

Universität  
Rostock



Traditio et Innovatio

**Etablierung eines Modellsystems  
zum Nachweis eines allergenen Potenzials  
in transgenen Pflanzen**

**Dissertation**

zur

Erlangung des akademischen Grades

*Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)*

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Diplom-Ingenieur für Biotechnologie Alain Steinmann

geb. am 04.12.1978 in Neustrelitz

Rostock 2011

**Gutachter:**

1. Prof. Dr. I. Broer, Universität Rostock (AUF)
2. Prof. Dr. U. Kragl, Universität Rostock (ICH)
3. Prof. Dr. S. Vieths, Paul-Ehrlich-Institut, Langen

**Tag der Promotion:** 19.12.2011

Zusammenfassung .....	1
A Einleitung .....	2
A 1 Risikoanalyse gentechnisch veränderter Pflanzen.....	2
A 2 Potenzielle Allergenität von GMP .....	4
A 2.1 Lebensmittelallergie .....	4
A 2.2 Mechanismus der Typ-I-Reaktion .....	6
A 2.3 Untersuchung der Allergenität vom Soforttyp .....	7
A 2.4 Untersuchung der potenziellen Allergenität.....	8
A 3 Verwendete Modellproteine .....	14
A 3.1 NPTII – Selektionsmarker in der Pflanzentransformation .....	14
A 3.2 VP60 – Virushüllprotein 60 des Rabbit Haemorrhagic Disease Virus .....	15
A 3.3 CTB – nicht toxische Untereinheit B des Cholera-Toxins .....	16
A 3.4 Cyanophycin – nachwachsender Rohstoff .....	18
A 4 Ziele der Arbeit .....	20
B Material und Methoden.....	21
B 1 Material .....	21
B 1.1 Verwendetes Pflanzenmaterial und Modellproteine .....	21
B 1.2 Labortiere .....	21
B 1.3 Puffer, Lösungen, Tierfutter .....	22
B 2 Methoden .....	23
B 2.1 Proteinanalytik .....	23
B 2.2 Darstellung der Modellproteine und -Antigene .....	26
B 2.3 Herstellung und Aufreinigung von Antikörpern .....	28
B 2.4 ELISA - Entwicklung .....	31
B 2.5 Proteinstabilitätsuntersuchung .....	34
B 2.6 Sequenzvergleich mit bekannten Allergenen .....	35
B 2.7 Serumscreening.....	37
B 2.8 Tierstudien.....	38
B 2.9 IgE - Bestimmung .....	39
B 2.10 Hexosaminidase – Assay.....	41
B 2.11 Basophiler Degranulationstest .....	42
C Ergebnisse .....	47
C 1 Entwicklung von Quantifizierungs-Assays zum Nachweis der Modellproteine ..	47
C 1.1 Bereitstellung der Modellproteine.....	47
C 1.2 Antikörpergewinnung .....	51
C 1.3 ELISA-Entwicklung zum quantitativen Nachweis transgener Proteine .....	52
C 2 Allergologische Untersuchungen .....	61
C 2.1 Untersuchungen zur Stabilität der Modellproteine.....	61
C 2.2 <i>In silico</i> -Vergleich der Modellproteine mit bekannten Allergenen .....	71
C 2.3 Screening von Patientenserum .....	72
C 2.4 Sensibilisierende Wirkung der Modellproteine – Labortierversuche .....	75
D Diskussion.....	95
D 1 Quantifizierungssysteme für die Modellproteine .....	95
D 1.1 CTxB-ELISA – Verwendung eines bakteriellen Proteins zur Assay- Entwicklung.....	95
D 1.2 VP60-ELISA – Verwendung von Substanzgemischen .....	96
D 1.3 NPTII-ELISA – Inclusionbodies und synthetische Peptide .....	98
D 1.4 Cyanophycin-Nachweis – Löslichkeitsproblem.....	100
D 2 Allergologische Risikobetrachtung von GMP .....	101
D 2.1 Sind die gewählten Verfahren zur allergologischen Risikoanalyse von GMP geeignet? .....	102
D 2.2 Welche Aussagen können anhand der durchgeführten Untersuchungen für die einzelnen Modellpflanzen bzw. Modellproteine getroffen werden? .....	115
D 2.3 Modellsystem - Entscheidungsbaum.....	120
E Ausblick .....	126
E 1 Durch welche Verfahren könnte das Modellsystem ergänzt werden? .....	126

F	Literaturverzeichnis.....	129
G	Anhang.....	140
G 1	Wachstums Kern BioOK.....	140
G 2	Verwendete Antigene und Antikörper.....	142
G 3	Zellen, Bakterien und Medien.....	143
G 4	Verwendete Chemikalien, Medien und Kits.....	144
G 5	Verwendete Geräte.....	145
G 6	Abkürzungsverzeichnis.....	145
G 7	Abbildungsverzeichnis.....	146
G 8	Tabellenverzeichnis.....	148
G 9	Datenübersicht.....	149
G 9.1	Immunisierungen zur Antikörperproduktion.....	149
G 9.2	ELISA-Entwicklung.....	150
G 9.3	Abbaustudien.....	153
G 9.4	Sequenzvergleich.....	155
G 9.5	Sensibilisierungsstudien – <i>Balb/c Maus</i> .....	157
G 9.6	$\beta$ -Hexosaminidase-Assay.....	161
G 10	Basophiler Degranulationstest.....	162
G 11	Proteingehalte der Kartoffelyophilisate.....	164
G 12	Hilfsmittel.....	164
G 12.1	Multiparameter-Assay.....	164
G 12.2	Fraktionierte Fällung.....	165
G 13	Proteinsequenzen.....	165
G 14	Summary.....	170
G 15	Veröffentlichungen und Vorträge.....	171
G 16	Lebenslauf.....	173
G 17	Danksagung.....	174

## Zusammenfassung

Entwickler von gentechnisch modifizierten Pflanzen (GMP) stehen vor der Herausforderung einerseits Pflanzen mit verbesserten agronomischen Eigenschaften bzw. nutzbaren Inhaltsstoffen zu kreieren und andererseits dafür Sorge zu tragen, dass durch die Modifikation kein erhöhtes gesundheitsschädigendes Risiko dieser Pflanzen auf den Verbraucher entsteht. Eines der wesentlichen Risiken durch die Expression neuer Proteine in transgenen Pflanzen ist die potenzielle Allergenität. Es besteht ein großer Bedarf an standardisierten Methoden zur Bestimmung einer potenziell erhöhten Allergenität von GMP, bevor diese für die kommerzielle Nutzung zugelassen werden. Es existieren eine Reihe von *in vivo*- (z. B. Prick-, Scratchtest) und *ex vivo*-Verfahren (z. B. Bestimmung von Serum-IgE) zur Diagnose von bestehenden Allergien. Diese klinischen Diagnostikmethoden können zur routinemäßigen Untersuchung allergischer Patienten herangezogen werden. Für die Erforschung eines veränderten allergenen Potenzials von GMP vor dem ersten Kontakt mit dem Verbraucher sind diese jedoch ungeeignet.

Ziel dieser Arbeit war es, ein Modellsystem zur Untersuchung des allergenen Potenzials gentechnisch modifizierter Pflanzen (GMP) im Vergleich mit ihren nahen isogenen Varianten (NIV) zu entwickeln. Für die Etablierung eines auf *in silico*-, *in vitro* und *in vivo*-Methoden basierenden Entscheidungsbaumes wurden zwei nahe isogene und acht transgene Varianten der Kulturpflanze Kartoffel (*Solanum tuberosum*) herangezogen.

Auf Grundlage verschiedener Richtlinien der IFBC/ILSI, FAO/WHO und der EFSA zur allergologischen Risikoanalyse von GMP konnte eine Standardverfahrensweise zur Prüfung und experimentellen Testung der potenziellen Allergenität von GMP vor ihrer Verwendung durch den Verbraucher entwickelt werden. Es wurden *in silico*-Methoden zur Untersuchung von Homologien des transgenen Proteins mit bekannten Allergenen mit *in vitro*-Verfahren zur Analyse der IgE-Reaktivität und *in vivo*-Sensibilisierungsstudien an Labortieren zu einem Entscheidungsbaum verflochten. Im Serum und im Vollblut der sensibilisierten Labortier-Spezies *Balb/c-Maus* und *Brown Norway Ratte* wurden allergiespezifische Parameter wie Gesamt-IgE- und spezifische IgE-Konzentration mittels ELISA und dem zellbasierten Verfahren  $\beta$ -Hexosaminidase-Assay bestimmt. Darüber hinaus konnten erste Hinweise der Funktionalität der Adaption der in der Human-Allergiediagnostik etablierten Flow CAST-Methode an tierisches Untersuchungsmaterial gewonnen werden.

Das Gesamtverfahren ermöglicht eine schnelle und effiziente Untersuchung des allergenen Potenzials der transgen exprimierten Proteine sowie der gesamten GMP im Vergleich mit ihrer nahen isogenen Variante (NIV). Es unterscheidet sich von bestehenden Schemata (IFBC/ILSI, FAO/WHO) dahingehend, dass ein positives Zwischenergebnis kein Ausschluss-Kriterium für die GMP bedeutet, sondern diese in weitergehenden Untersuchungen auf ihr allergenes Potenzial analysiert wird. Das Schema der allergologischen Untersuchungen ist unterteilt in zwei Stufen. Die erste Stufe umfasst umfangreiche *in silico*- und *in vitro*-Analysen der transgenen Proteine sowie der gesamten Pflanzen. In einer zweiten Stufe ist eine *in vivo*-Studie, in der Labortiere sensibilisiert und im Anschluss auf allergiespezifische Parameter untersucht werden, angedacht.

## A Einleitung

### A 1 Risikoanalyse gentechnisch veränderter Pflanzen

Gentechnisch modifizierte Pflanzen (GMP) stellen einen Weg in der Pflanzenproduktion dar, der mehr und mehr als Alternative und Ergänzung für eine erfolgreiche Wertschöpfung in der Agrarwirtschaft angesehen wird. Sie spielen eine wichtige Rolle, wenn es darum geht, die Ernährungsgrundlagen zu sichern, Umweltbelastungen zu verringern sowie die Nachhaltigkeit der Lebensmittelproduktion zu verbessern (Potrykus 2010). Biotechnologie-Unternehmen und Universitäten haben Pflanzen mit verbesserten agronomischen Charakteristika, wie beispielsweise Resistenz gegen Insekten, Herbizide und Krankheiten, entwickelt (Christou und Capell 2007). Zukünftige Forschungsansätze könnten in der Entwicklung von Pflanzen mit verbesserter Anpassungsfähigkeit an das sich verändernde Klima oder in erhöhtem Nutzen für den Verbraucher, wie veränderter Geschmack, längerer Haltbarkeit oder höherem Nährstoffgehalt liegen (Spök *et al.* 2005).

Die Organisation ISAAA (International Organization for the Acquisition of Agri-biotech Applications) berichtet in ihrem aktuellen Report „Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2010“ (Clive 2010b), dass im vergangenen Jahr weltweit von 15,4 Millionen Landwirten in 29 Ländern auf 148 Millionen Hektar gentechnisch veränderte Pflanzen angebaut wurden. Das ist gegenüber dem Vorjahr 2009 eine Zunahme von mehr als 10 Prozent (entspricht 14 Mio ha). Die Länder mit den größten Anbauflächen für gentechnisch veränderte Pflanzen sind die USA mit 66,8 Millionen Hektar, Brasilien (25,4 Mio. ha), Argentinien (22,9 Mio. ha), Indien (9,5 Mio. ha), Kanada (8,8 Mio. ha), China (3,5 Mio. ha), Paraguay (2,6 Mio. ha), Pakistan (2,4 Mio. ha) und Süd-Afrika (2,2 Mio. ha).

In der Europäischen Union war bis 2009 Bt-Mais die einzige GMP, die durch sechs Länder angebaut wurde. Nach der Zulassung der transgenen Kartoffel „Amflora“ ist die Zahl der GMP-anbauenden Staaten in der EU auf acht gestiegen. Amflora ist seit 13 Jahren in der EU die erste für den Anbau zugelassene gentechnisch veränderte Pflanze und wurde 2010 in den Ländern Tschechien, Schweden und Deutschland auf einer Fläche von 450 ha angebaut. Die sechs Bt-Mais-anbauenden EU Länder (2010) sind nach der Größe ihrer Anbauflächen Spanien, Tschechien, Rumänien Portugal, Polen und die Slowakei. In Frankreich ist der Anbau von gentechnisch verändertem Bt-Mais seit 2008 nicht mehr erlaubt. Im Jahr 2007 wurden noch mehr als 21.000 ha Bt-Mais ausgebracht. Im Frühjahr 2009 hat auch Deutschland ein nationales Anbauverbot für Bt-Mais ausgesprochen (Clive 2010a).

Die europäische Union hat für die sichere Entwicklung moderner Biotechnologien, so auch gentechnisch veränderter Pflanzen, einen rechtlichen Rahmen in verschiedenen Verordnungen geregelt. So wird beispielsweise die Freisetzung von gentechnisch veränderten Organismen (GVO) in die Umwelt zu Versuchszwecken sowie das Inverkehrbringen von GVO, z. B. zum Anbau, zur Einfuhr oder zur Verarbeitung zu Industrieprodukten mit der Richtlinie 2001/18/EG geregelt. Das Inverkehrbringen von GVO, die zum menschlichen Verzehr oder als Futtermittel bestimmt sind oder Lebensmittel/ Futtermittel die GVO enthalten, aus solchen bestehen oder aus solchen hergestellt wurden, werden mit der Verordnung 1829/2003/EG über genetisch veränderte Lebens- und Futtermittel geregelt.

Entsprechend der Verordnung 1829/2003/EG sollten genetisch veränderte Lebensmittel und Futtermittel nur dann für das Inverkehrbringen in der Gemeinschaft zugelassen werden, wenn eine den höchstmöglichen Anforderungen standhaltende wissenschaftliche Bewertung aller damit verbundenen Risiken für die Gesundheit von Mensch und Tier bzw. für die Umwelt unter der Verantwortung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) durchgeführt worden ist.

Die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit – European Food Safety Authority (EFSA) hat mit dem „Guidance Document of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms for the Risk Assessment of Genetically Modified Plants and Derived Food and Feed“ in Übereinstimmung mit den Artikeln 5(8) und 17(8) der 1829/2003/EG eine ausführliche Anleitung als Hilfe für das Zulassungsverfahren einer GMP erstellt, welche die gesamte Risikobewertung der GMP berücksichtigt (EFSA 2006). Kernpunkte, die bei der Risikobewertung neben der Begutachtung potenzieller Gefahren für die Gesundheit für Mensch und Tier berücksichtigt werden sollten, sind vorab eine molekulare Charakterisierung, vergleichende Analysen zwischen der GMP und der konventionell gezüchteten nahen isogenen Pflanze und der Einfluss auf die Umwelt (EFSA 2006).

Die molekulare Charakterisierung beinhaltet unter anderem die Charakterisierung des DNA - Spenders und des - Empfängers. Weiterhin sind durch molekulare und biochemische Charakterisierung die Eigenschaften des neu exprimierten Proteins zu bestimmen. So können Informationen zur Primärsequenz, dem Molekulargewicht und eventuellen posttranslationalen Modifikationen generiert werden. Vergleichende Analysen zielen zum einen auf die substanzielle Äquivalenz (Inhaltsstoffanalyse) der gentechnisch veränderten Pflanze und der nahen isogenen Variante und zum anderen auf agronomische und morphologische Charakteristika ab (EFSA 2006). Die Untersuchung der substanzialen Äquivalenz geht auf ein von der OECD Anfang der 90-er Jahre entwickeltes Konzept zurück (OECD 1993). Mit den vergleichenden Analysen sollen neben der beabsichtigten genetischen Veränderung der Pflanzen auch die möglicherweise auftretenden unbeabsichtigten Veränderungen untersucht werden. Diese werden beispielsweise verursacht durch Insertionsmutationen, wenn ein bestehendes Gen durch das Einfügen des Transgens beschädigt wird. Unbeabsichtigtes Ausschalten von bestehenden Genen kann zu Störungen im Metabolismus der Pflanze führen, die sich unterschiedlich stark ausprägen können (Spök *et al.* 2005). Es können beispielsweise spezifische Analysen zum Vorkommen von Toxinen und Allergenen in der nahen isogenen und der gentechnisch veränderten Pflanze durchgeführt werden. Ein Vergleich der Resultate gibt Aufschluss darüber, ob deren Gehalt durch die genetische Modifikation unbeabsichtigt verändert ist.

Sobald eine gentechnische Veränderung mit der Absicht vorgenommen wurde, bestimmte Organismen zu beeinflussen (z. B. Bt-Mais → Maiszünsler), werden Analysen an Zielorganismen durchgeführt. Untersuchungen der Interaktion der GMP und Nicht-Zielorganismen müssen unter anderem den sofortigen und den verzögerten Einfluss der GMP auf die Umwelt, sowie den Einfluss auf Systeme, die mit den Nicht-Zielorganismen interagieren (Nahrungskette, Symbionten und Parasiten) berücksichtigen (EFSA 2006).

Ein besonderes Interesse der Öffentlichkeit bzw. der Verbraucher gilt bei der Lebens- und Futtermittelsicherheit transgener Pflanzen dem Risiko der Toxizität und der Allergenität. Es ist zwingend erforderlich wissenschaftlich zu untersuchen, ob eine potenzielle

Gefährdung der Verbraucher beim Verzehr von Produkten aus gentechnisch veränderten Pflanzen besteht. Dabei ist zu klären, ob durch die Wirkung des neuen Genproduktes oder durch unbeabsichtigte Effekte gegenüber konventionellen Produkten eine erhöhte Toxizität, Kanzerogenität oder Allergenität entstanden ist (EFSA 2006).

Besonders seit der Publikation von Forschungsergebnissen zur Untersuchung der potenziellen Toxizität transgener Lektin-Kartoffeln anhand von Fütterungsstudien an Ratten (Ewen und Pusztai 1999), hat die Risikoanalyse von GMP großes öffentliches Interesse gefunden. Bei einigen Tieren aus dieser Studie fanden sich Veränderungen der Organe. Über die Schlussfolgerungen aus diesen Befunden wird jedoch seit Jahren kontrovers diskutiert. Zu kleine Versuchsgruppen und zu geringe Proteingehalte des Futters lassen Kritiker an der Signifikanz der Ergebnisse zweifeln (Mowat, Correspondence, The Lancet 354, 1999).

Starkes öffentliches Interesse gewann die allergologische Risikoanalyse von GMP durch eine Studie an transgenem Soja (1996). Das Gen für ein 2S-Albumin aus der Paranuss wurde transferiert, um den Methioningehalt für Tierfutter zu erhöhen. Eine vom Hersteller (Pioneer Hi-Bred International) gesponserte Studie ergab, dass Seren von Paranuss-allergischen Patienten mit Extrakten der transgenen Pflanze reagierten. Bei dem Protein handelte es sich um das Allergen *Ber e 1* aus der Paranuss. Obwohl es sich bei der entwickelten GMP um eine Pflanze zum Einsatz als Tierfutter handelte, wurde die Pflanze aufgrund des erhöhten allergenen Risikos nicht zugelassen (Nordlee *et al.* 1996).

Eine weiteres Beispiel stellt die durch die Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO) durchgeführte Untersuchung von Erbsen, die ein aus der Kideybohne stammendes Gen für einen Amylasehemmer enthielten, dar. Das Protein, welches eine Resistenz gegen die Larven des Erbsenkäfers (*Bruchus pisorum*) vermitteln sollte, hatte ein leicht verändertes Glykosylierungsmuster gegenüber der Expression im Spenderorganismus Bohne. Bei Fütterungsversuchen mit der GMP an Mäusen wurden Krankheitssymptome festgestellt. Die Tiere entwickelten Antikörper gegen das transgene Protein und erkrankten an Lungenentzündung (Prescott *et al.* 2005).

Diese Beispiele verdeutlichen in besonderem Maße die Wichtigkeit, die Ergebnisse toxikologischer und allergologischer Studien an GMP für den Verbraucher mit hoher Transparenz darzustellen.

## **A 2 Potenzielle Allergenität von GMP**

### **A 2.1 Lebensmittelallergie**

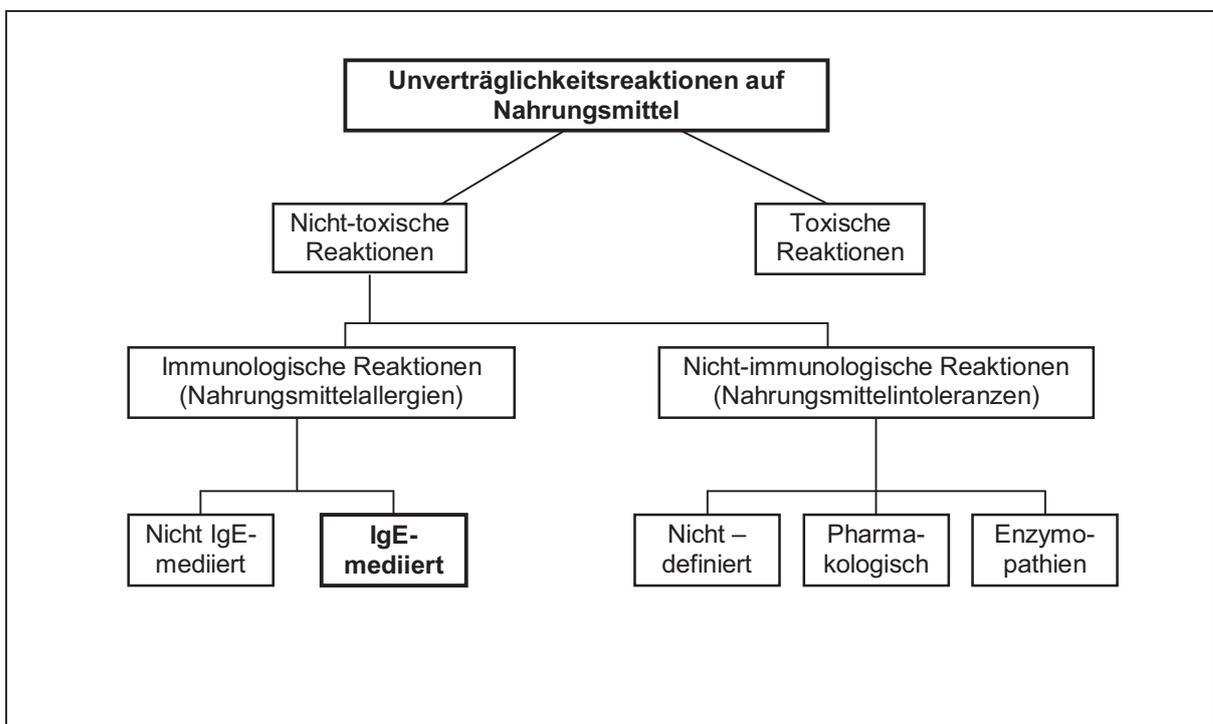
1963 wurden von den beiden britischen Pathologen Coombs und Gell pathogene Immunreaktionen beschrieben und nach ihren pathophysiologischen Mechanismen in vier Typen eingeteilt, die auch als Mischformen auftreten können (siehe Tabelle A 2.1) (Coombs und Gell 1963).

Die Typen I bis III dieser allergischen Reaktionen werden durch Antikörper vermittelt, wohingegen die Typ-IV-Reaktion durch bestimmte Zellen des Immunsystems, die T-Zellen, vermittelt wird.

**Tabelle A 2.1: Pathogene Immunreaktionen nach Coombs und Gell (modifiziert von Schütt und Bröker, 2009)**

Typ der Immunreaktion	Effektoren	Folgen	Klinische Beispiele
I: anaphylaktisch	IgE; Mastzellen, basophile Zellen, TH2 (IL-4)	Allergie	Insektengiftallergie, Asthma bronchiale, einige Formen von Urtikaria, Schock
II: zytotoxisch	IgG, Komplement	Autoimmunität, Infektanfälligkeit, Blutungsneigung	Morbus Basedow, postinfektiöse Myocarditis, Medikamentenunverträglichkeit
III: Immunkomplex-vermittelt	lösliche Immunkomplexe, Komplement, FcR-tragende Zellen	Überempfindlichkeit, Autoimmunität	Serumkrankheit, Farmerlunge, Kollagenosen, Glomerulonephritis
IV: zellvermittelt	Makrophagenaktivierung durch TH1, Eosinophilenaktivierung durch TH2	Überempfindlichkeit, Autoimmunität	Rheumatoidarthritis, Multiple Sklerose, Diabetes mellitus, Kontaktdermatitis, Glutensensitive Enteropathie, Asthma-Spätphasen-Reaktion

Die Europäische Akademie für Allergologie und klinische Immunologie (EAACI) hat die Unverträglichkeitsreaktionen nach Nahrungsaufnahme nach pathogenetischen Gesichtspunkten eingeteilt. So werden Nicht-toxische immunologische Reaktionen in IgE-medierte Nahrungsmittelallergie und nicht-IgE-medierte Nahrungsmittel-Allergie unterteilt.



**Abbildung A.1: Einteilung der Unverträglichkeitsreaktionen nach den Empfehlungen der EAACI (Bruijnzeel-Koomen et al. 1995)**

Allergie wird als „Überempfindlichkeitsreaktion, ausgelöst durch immunologische Mechanismen“ definiert. Sie betrifft Individuen mit genetischer Prädisposition (atopische Individuen) (Jackson 2003). Die Substanzen, die in den meisten Fällen für die Allergenität

von Lebensmitteln und von Pflanzenpollen verantwortlich sind, haben proteinogene Strukturen. Einige Abbauprodukte von Proteinen, z. B. Peptidfragmente können teilweise die Allergenität der nativen Proteine behalten und sind ebenfalls als Allergene zu betrachten (EFSA 2006). Allergische Reaktionen können lokal sofort nach Kontakt mit einem Allergen oder systemisch im ganzen Körper auftreten (Coombs und Gell 1963).

Bei den meisten Fällen der bestätigten Nahrungs- oder Lebensmittelallergie sind die Produktion von IgE-Immunglobulinen, sowie ein Netzwerk von verschiedenen Zelltypen und chemischen Mediatoren involviert. Dieser Typ der allergischen Reaktion wird als Soforttyp-Allergie oder Typ-I-Überempfindlichkeitsreaktion bezeichnet. Charakteristisch für die Soforttyp-Allergie sind Symptome, die sofort nach Kontakt mit dem Allergen auftreten. Die schwerwiegendsten Reaktionen der IgE-medierte Allergie sind das orale Allergie-Syndrom, Gastroenteritis (lokale Reaktionen) und allergische Urtikaria, Quincke-Ödem, allergische Rhinitis und Asthma und Anaphylaxie bis hin zum anaphylaktischen Schock (systemische Reaktionen) (Schütt und Bröker 2009).

Ein weiterer Mechanismus der Lebensmittelallergie ist die verzögerte Zell-vermittelte Allergie (Typ-IV-Überempfindlichkeit), die Stunden bis Tage nach Allergen-Kontakt auftreten kann und nicht IgE-mediert ist. Die Typ-IV-Allergie kann als Folge der Aufnahme verschiedener Lebensmittel zusätzlich oder anstelle der Typ-I-Reaktion auftreten und äußert sich durch Symptome in verschiedenen Teilen des Körpers, wie Haut, Darm und anderen Organen (Schütt und Bröker 2009).

Der Begriff „Lebensmittel- oder Nahrungsmittelallergie“ wird häufig zu weit gefasst und oftmals falsch angewendet. So werden Unverträglichkeitsreaktionen auf Nahrungsmittel oder unspezifische Intoleranzerscheinungen oder gar persönliche Aversionen gegen bestimmte Lebensmittel mit Nahrungsmittelallergie gleichgesetzt. So haben beispielsweise in England Umfragen ergeben, dass ca. 20 % der Bevölkerung der Meinung sind, dass sie eine Nahrungsmittelallergie oder eine Form von Nahrungsmittelintoleranz haben. Nachfolgende Untersuchungen (double blind, placebo controlled food challenge) durch Young *et al.* (1994) haben jedoch ergeben, dass von diesen Personen lediglich ca. 19 % an einer Nahrungsmittelintoleranz leiden. Weltweit zeigen ca. 1-2 % der Erwachsenen und 2-2,5 % der Kinder echte Nahrungsmittelallergien (Sampson und Burks 1996, Sicherer *et al.* 1999).

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Form der Nahrungsmittelallergie ist die IgE-vermittelte Soforttyp-Reaktion.

## **A 2.2 Mechanismus der Typ-I-Reaktion**

Nahrungsmittelallergie ist eine immunologisch bedingte Reaktion auf bestimmte Bestandteile von Lebensmitteln. Bei der Entstehung einer Allergie wird zwischen der Sensibilisierungsphase, in der nach Allergenkontakt entsprechende Antikörper gebildet werden und der Manifestationsphase, in der beim Sensibilisierten durch erneuten Allergenkontakt eine pathogene Immunreaktion ausgelöst wird, unterschieden (Schütt und Broeker, 2009). Trotz Verdauung und Prozessierung der Nahrungsmittelproteine im Magen-Darm-Trakt besteht die Möglichkeit der Allergenaufnahme über diesen Weg (Jäger *et al.* 1998). Die resorbierten Allergene werden von antigenpräsentierenden Zellen (APCs) aufgenommen und prozessiert. Die professionellen antigenpräsentierenden Zellen

sind vorwiegend dendritische Zellen (DCs). In den APCs werden die Allergene zu Peptiden von ca. 7-15 Aminosäuren abgebaut. Diese Bruchstücke werden an die Zelloberfläche transportiert und zusammen mit MHC Klasse II-Strukturen den T-Helferzellen präsentiert. Die APCs sezernieren humorale Faktoren, die für die Aktivierung der T-Helferzellen erforderlich sind. Von den T-Helferzellen existieren 2 Subpopulationen (TH1- und TH2-Zellen), die sich in ihrem Zytokinspektrum unterscheiden. Je nach Mikromilieu aus dem sie kommen, produzieren die APCs bei der Antigenpräsentation verschiedene Zytokine. Im Fall der Allergie vom Soforttyp oder der antiparasitären Abwehr sezernieren sie im besonderen Maße IL-4, was zur Aktivierung von TH2-Zellen führt. Wenn hingegen die APCs bakterielle oder virale Komponenten tragen, synthetisieren sie besonders stark Interleukin-12 (IL-12), was zu einer Differenzierung von T-Zellen zu TH1-Zellen führt (Brandtzeag 2002).

Nach der Bindung der TH2-Zellen an die APCs nehmen die TH2-Zellen Kontakt zu B-Zellen auf. Durch die von den TH2-Zellen produzierten Zytokine IL-4 und IL-13 wird in den B-Zellen von der initialen Produktion von IgM-Antikörpern auf IgE-Antikörper umgeschaltet (Corry und Kheradmand 1999). IgE-Antikörper haben die Fähigkeit mit ihrem Fc-Teil an den hochaffinen FcεRI-Rezeptor an der Zelloberfläche von gewebslokalisierten Mastzellen, zirkulierenden basophilen Leukozyten und aktivierten eosinophilen Zellen zu binden. Nach erneutem Allergenkontakt wird das Allergen von den Fab-Teilen der rezeptorgebundenen IgE-Antikörper gebunden. Trägt das Allergen mehr als ein Epitop, das von Antikörpern erkannt und gebunden wird, kommt es auf der Zelloberfläche der Mastzelle bzw. der basophilen Zellen zu einer Kreuzvernetzung der IgE-Antikörper. Die durch dieses „bridging“ ausgelöste Membranalterationen haben zur Konsequenz, dass zum einen, nach Fusion der Granula mit der Zellmembran, präformierte Mediatoren, wie Histamin, Tryptase, verschiedene Hydrolasen und chemotaktische Faktoren freigesetzt werden (Knol 2006, Salinas *et al.* 2008). Des Weiteren kommt es durch Phospholipase A2 zur Abspaltung von Fettsäuren aus den Triglyceriden der Zellmembran. In großer Menge wird Arachidonsäure freigesetzt. Diese wird auf dem Lipoxygenaseweg sofort zu Leukotrienen (C4, D4, E4) und auf dem Cyclooxygenaseweg zu Prostaglandinen und Tromboxanen abgebaut. Etwas verzögert kommt es zur Produktion und Freisetzung von Zytokinen, wie IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 (Schütt und Broeker, 2009). Bei basophilen Leukozyten führt die Quervernetzung der IgE-Antikörper durch Allergen neben der Ausschüttung von Mediatoren auch zu einer gesteigerten Synthese von membranständigen Aktivierungsmarkern. Zu den am besten untersuchten Markern zählen CD63 und CD203c (Bühning *et al.* 2006).

4-20 Stunden nach der IgE-vermittelten Mastzelldegranulation nach Allergenkontakt und der Ausschüttung von Mediatoren kommt es zur Spätphasenreaktion der Typ-I-Allergie. In dieser Phase werden Entzündungszellen, vor allem Eosinophile angelockt. Diese Zellen verfügen über ein Arsenal toxischer Moleküle und sorgen damit für lokale Gewebeschäden (Schütt und Broeker, 2009).

### **A 2.3 Untersuchung der Allergenität vom Soforttyp**

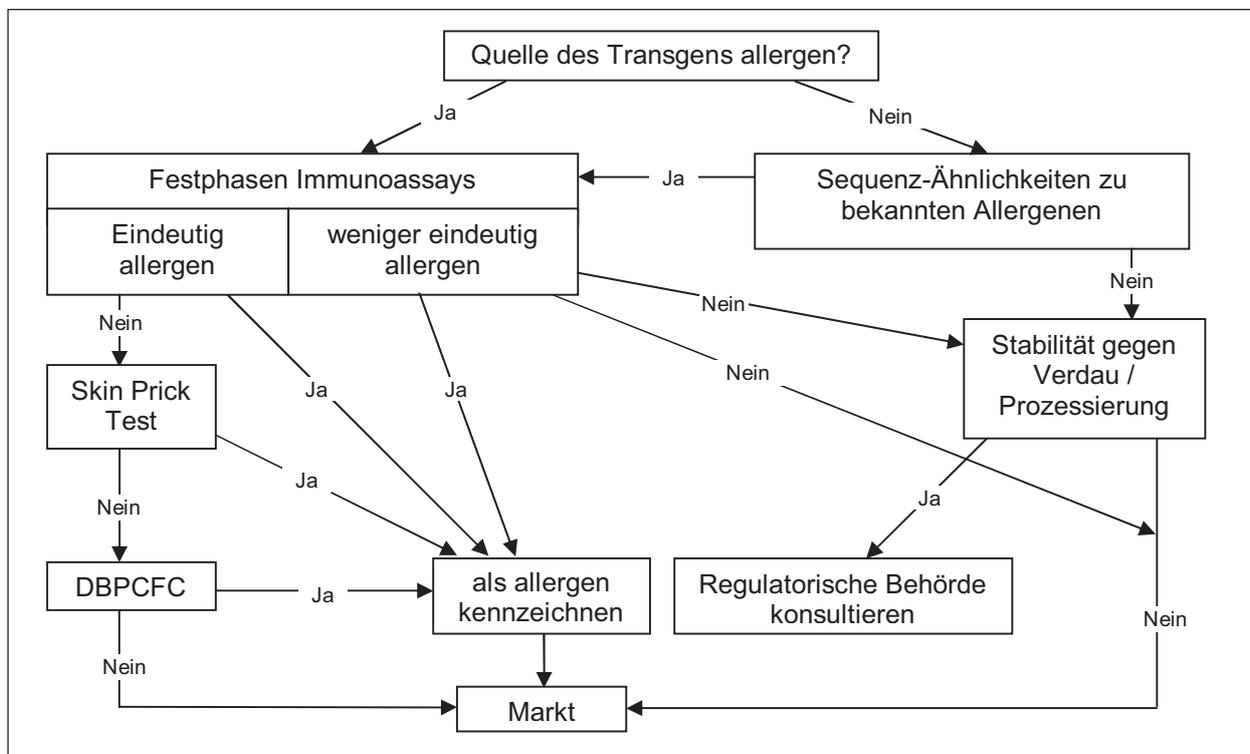
Um Patienten auf eine eventuell vorliegende Allergie zu untersuchen, existieren eine Reihe diagnostischer Verfahren. So können bei Verdacht auf eine Nahrungsmittelallergie einige *in vivo*-Methoden bzw. Hauttests, wie der Prick-Test oder der Scratch-Test, zum

Einsatz kommen (Jäger *et al.* 1998). Bei den zahlreichen *in vitro*-Testmethoden, kommt vor allem der Messung der Nahrungsmittel-spezifischen IgE-Antikörper eine Bedeutung zu. Die Bestimmung des Gesamt-IgE-Spiegels allein ist für eine Abklärung einer Nahrungsmittelallergie nicht aussagekräftig genug. Mit der Untersuchung des Gesamt-IgE-Spiegels und des spezifischen IgE-Titers im Serum der Patienten werden IgE-Antikörper erfasst, die sich frei gelöst im Serum befinden. Mit den Methoden des Basophilen-Degranulationstests oder des Histamin-Release-Testes lassen sich Aussagen über die IgE-Antikörper, die gebunden an basophilen Zellen vorliegen, ermitteln (Renz *et al.* 2010).

Diese *in vivo*- und *in vitro*-Methoden der humanen Allergiediagnostik sind jedoch ungeeignet für Untersuchungen auf allergenes Potenzial von rekombinanten Proteinen bzw. transgenen Pflanzen. Diese Proteine können unter Umständen bisher kein Bestandteil der menschlichen Ernährung gewesen sein (z.B. Cyanophycin) bzw. bisher nicht auf anderem Wege sensibilisierend gewirkt haben. Es gilt also bei der allergologischen Risikobetrachtung von GMP darauf zu untersuchen, ob die transgenkodierte Proteine, wenn sie mit der Nahrung aufgenommen werden, allergenes Potenzial besitzen.

**A 2.4 Untersuchung der potenziellen Allergenität**

Der erste systematische Ansatz für eine strukturierte Beurteilung eines allergenen Risikos neuer Proteine in Lebensmitteln wurde durch das International Food Biotechnology Council (IFBC) in Zusammenarbeit mit dem International Life Science Institut für Allergie und Immunologie (ILSI) 1996 veröffentlicht (Metcalf *et al.* 1996).



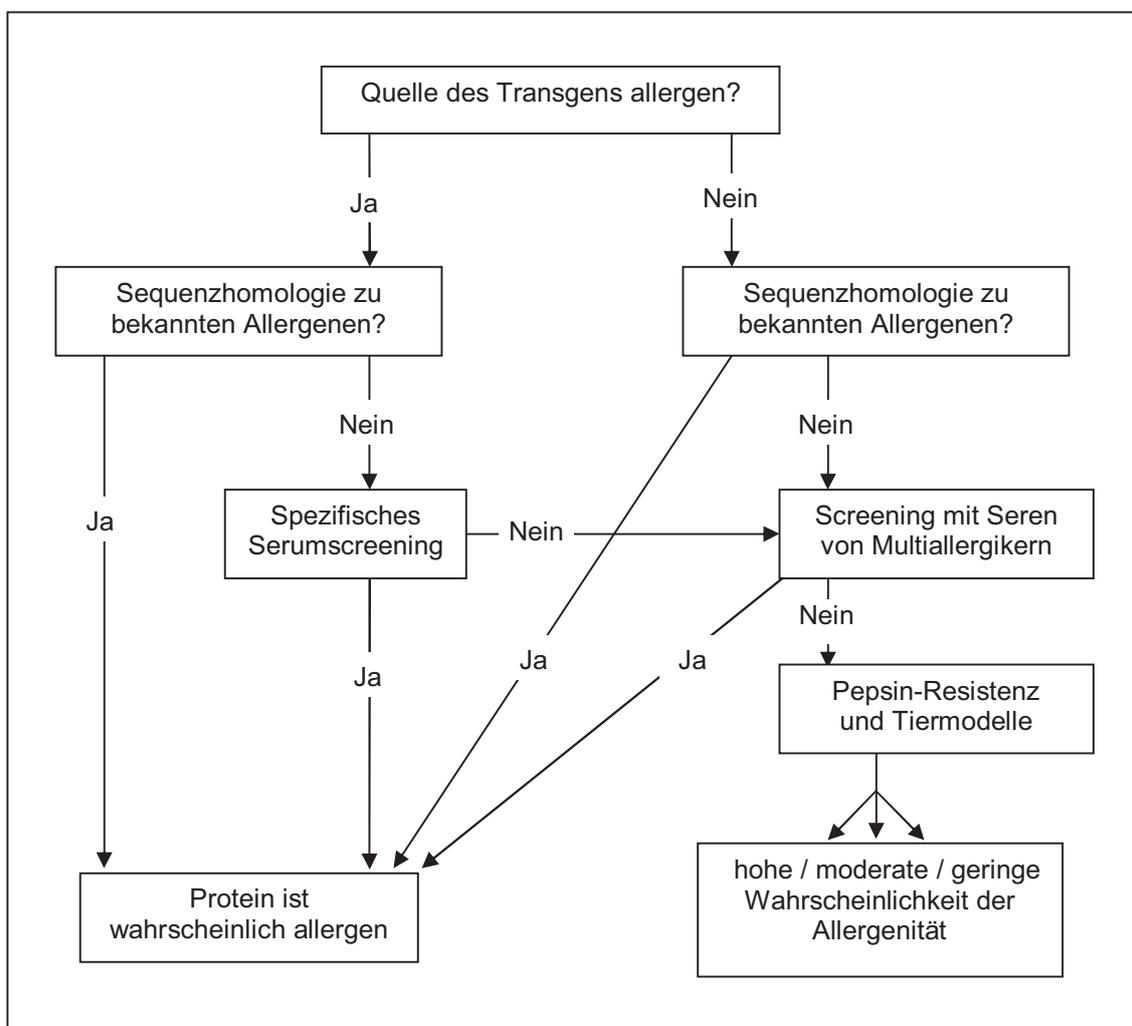
**Abbildung A.2: Entscheidungsbaum der IFBC/ILSI zur allergologischen Bewertung gentechnisch veränderter Pflanzen für die Lebensmittelproduktion (Metcalf *et al.* 1996)**  
 (Die Durchführbarkeit von Festphasen Immunoassays hängt von der Verfügbarkeit von Patientenserum ab. Es wird geraten mindestens 14 geeignete Seren zu prüfen. Werden mindestens 14 Seren eingesetzt und geben die Ergebnisse eindeutig keine Hinweise auf IgE-Reaktivität, kann

die GMP als nicht-allergen eingestuft werden. Werden weniger als 5 Seren geprüft und ist das Ergebnis negativ, muss mit der Prüfung auf Stabilität gegen Verdauung und Prozessierung fortgefahren werden.

DBPCFC = Double Blind, Placebo-controlled Food Challenge (Doppelblinde placebokontrollierte orale Nahrungsmittelallergen-Provokation) → sollte mit Lebensmitteln, für die keine allergische Wirkung bekannt ist durchgeführt werden)

Mit dem IFBC/ILSI Entscheidungsbaum wurde empfohlen, eine schrittweise Begutachtung des neu exprimierten Proteins, unter Berücksichtigung verschiedener Faktoren, wie Aminosäuresequenz-Homologien zu bekannten Allergenen und verschiedener physiko-chemischer Eigenschaften, wie Resistenz des Proteins gegen Hitze und Verdauung, durchzuführen (Metcalf *et al.* 1996).

2001 wurde der Entscheidungsbaum durch die Food and Agriculture Organization (FAO) und der World Health Organization (WHO) durch zusätzliche Tests erweitert. In die Risikobewertung wurden auch Tierversuche aufgenommen, die der Vorhersage des sensibilisierenden Potenzials der Proteine dienen sollen (Knippels und Penninks 2005).



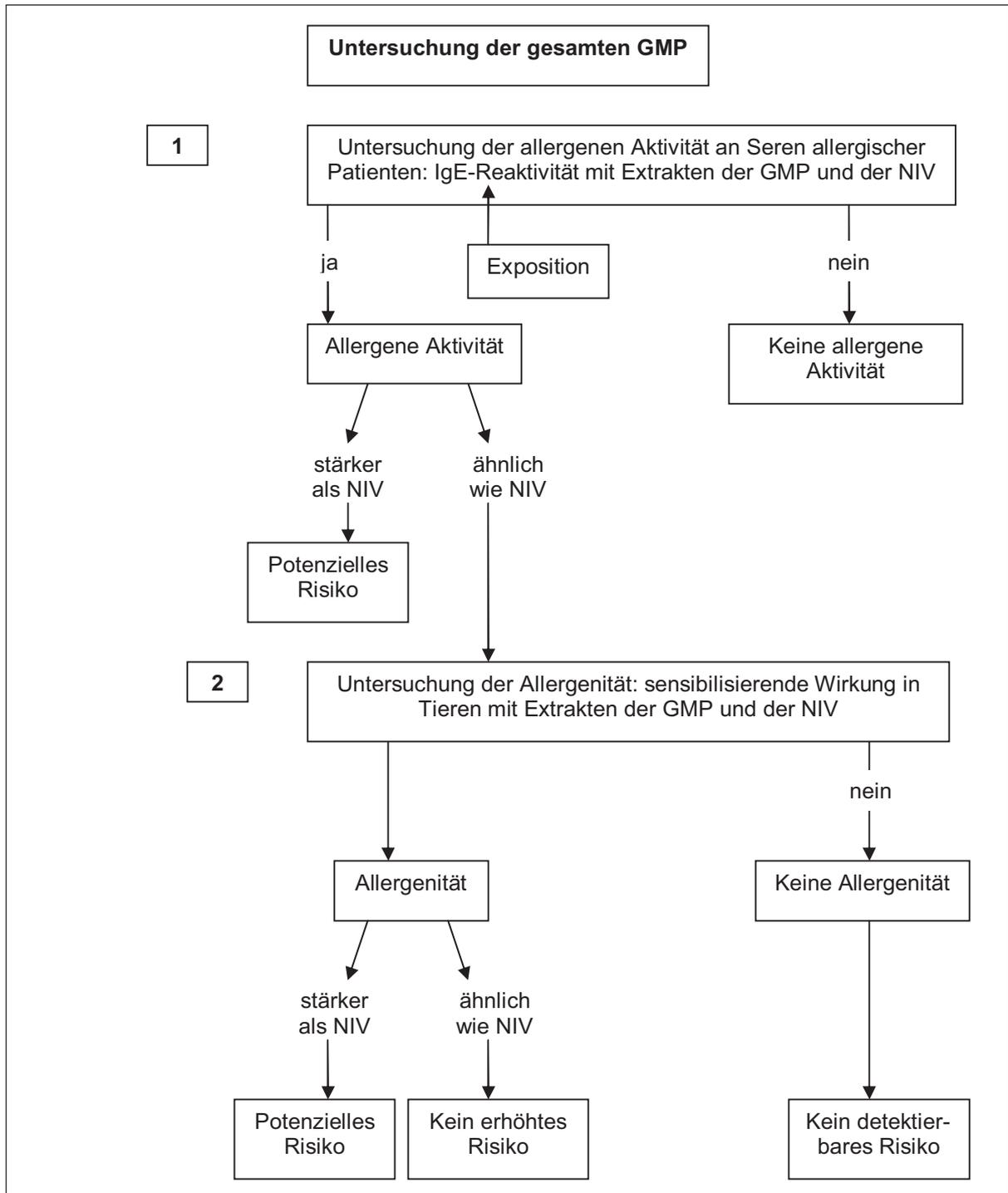
**Abbildung A.3: FAO/WHO Entscheidungsbaum zur Bewertung der Allergenität von transgenen Proteinen in GMP (FAO/WHO 2001)**

(In diesem Entscheidungsbaum wird die Möglichkeit der sensibilisierenden Wirkung eines transgenen Proteins nicht gänzlich ausgeschlossen. Es wird zwischen geringer, moderater und hoher Eintrittswahrscheinlichkeit einer Allergenität differenziert. Wenn eine Pepsinresistenz und

*eine sensibilisierende Wirkung im Tiermodell festgestellt werden, ist dem untersuchten Protein eine hohe Wahrscheinlichkeit einer allergenisierenden Wirkung zuzuschreiben. Sind beide Ergebnisse negativ ausgefallen, ist die Wahrscheinlichkeit gering. Ist das Ergebnis eines der beiden Versuche positiv, wird die potenziell sensibilisierende Wirkung als moderat wahrscheinlich eingestuft.)*

Bei der Risikobetrachtung einer gentechnisch modifizierten Pflanze (GMP) hinsichtlich ihrer möglichen Allergenität sind insbesondere zwei Gesichtspunkte zu berücksichtigen. Zum einen ist besonderes Augenmerk auf neu exprimierte Proteine, die in essbaren Teilen oder in Pollen der Pflanze vorkommen zu legen. Hierbei spielt die Quelle des Transgens eine ausschlaggebende Rolle. Zum anderen ist eine eventuelle Erhöhung der Allergenität der Pflanze bzw. den daraus produzierten Lebensmitteln zu untersuchen, die aus einer Überexpression der natürlich vorkommenden endogenen Allergene als unbeabsichtigter Effekt der genetischen Modifikation auftreten kann. Hierbei muss die Biologie des Transgen-Rezipienten berücksichtigt werden (EFSA 2006).

Spök *et al.* (2005) konzentrieren sich in ihrem Ansatz zur Untersuchung des allergenen Potenzials von GMP lediglich darauf, ob sich die Allergenität einer Pflanze im Vergleich zu ihrer nahen isogenen Variante (NIV), gemessen an den endogenen Allergenen, durch die genetische Veränderung erhöht. In einem möglichen Schema (siehe Abbildung A.4) zur allergologischen Risikobewertung schlagen sie vor, die allergene Aktivität von Pflanzenextrakten an allergischen Patienten zu untersuchen. Dabei sind unterschiedliche Expositionsszenarien zu berücksichtigen, da bei den einzelnen Verarbeitungsschritten einer Agrarpflanze verschiedene Pflanzenteile sensibilisierend wirken könnten. Wird weder für das Pflanzenmaterial der GMP noch der NIV allergene Aktivität festgestellt, kann das allergene Potenzial für die GMP als sehr gering eingestuft werden. Wenn jedoch das GMP-Material allergene Aktivität zeigt, kann je nach Intensität im Vergleich mit der Aktivität der NIV entschieden werden, ob von der GMP ein potenzielles Risiko ausgeht oder ob die Untersuchung auf sensibilisierende Wirkung im Labortier Aufschluss über eine Allergenität liefert. Löst eine Applikation von Pflanzenextrakten der GMP und der NIV an Labortieren keine allergiespezifischen Reaktionen aus, kann die GMP als Pflanze ohne detektierbares Allergierisiko bewertet werden. Wenn aber positive Reaktionen nachgewiesen werden, kann wiederum anhand der Intensität im Vergleich mit den Reaktionen, welche die NIV hervorrufen, entschieden werden, ob die GMP als Pflanze mit erhöhtem allergenem Risiko oder als Pflanze ohne erhöhtes allergenes Risiko eingestuft wird (Spök *et al.* 2005).



**Abbildung A.4: Mögliches Schema zur vergleichenden Untersuchung der allergenen Aktivität und der Allergenität einer GMP und ihrer nahen isogenen Variante (NIV) nach Spök *et al.* (2005)**

Um eine umfassende und eindeutige Vorhersage zur potenziellen Allergenität einer GMP treffen zu können, sind mehrere Schritte in der Risikobewertung durchzuführen. Anhand der Vorschläge des Codex ad hoc Intergovernmental Task Force on Foods Derived from Biotechnology (Codex Alimentarius 2003) ist eine schrittweise Fall-zu-Fall Bewertung für neu exprimierte Proteine durchzuführen.

Bei der Risikobewertung ist besonderes Augenmerk auf die Quelle des Transgens zu legen, um Aussagen darüber treffen zu können, ob das transgenkodierte Protein für ein Allergen kodiert (FAO/WHO 2001).

An diese Stelle sei darauf hingewiesen, dass bei der allergologischen Beurteilung der Transgenquelle eine Unterscheidung der Häufigkeit des Auftretens der Allergien berücksichtigt werden kann: a) Lebensmittel mit häufig auftretender allergener Wirkung, b) Lebensmittel mit weniger häufig auftretender allergener Wirkung und andere bekannte Allergenquellen und c) Quellen ohne bekannte Allergien. Zu den Lebensmitteln mit häufig auftretender allergener Wirkung zählen beispielsweise Erdnüsse, Soja, Milch, Eier, Fisch, Crustaceen (Krebstiere) und Weizen. Diese Lebensmittel verursachen über 90 % der weltweit bekannten und beschriebenen Lebensmittelallergien. Für diese sollten klinische Reagenzien, wie Patientenseren, für Analysen auf Kreuzreaktivität existieren. Für Lebensmittel mit weniger häufig auftretenden allergenen Wirkungen und Allergene, die nicht in Lebensmitteln vorkommen, wie Pollen, Staub, Pilzsporen, Insektengifte könnten wenig oder gar keine klinischen Reagenzien wie Patientenseren existieren (Metcalf *et al.* 1996, Thomas *et al.* 2007).

Bei der Beurteilung sollte eine Suche nach Sequenzhomologien und/ oder Strukturähnlichkeiten zwischen dem transgenkodierte Protein und bekannten Allergenen, sowie eine Identifizierung potenzieller linearer IgE-Bindungsepitope in der Aminosäuresequenz berücksichtigt werden. Die Mindestanzahl der aufeinander folgenden identischen oder chemisch ähnlichen Aminosäuren muss definiert festgelegt sein, um falsch positive oder falsch negative Ergebnisse zu vermeiden (Aalberse und Stadler 2006). Die wichtigen IgE-, T-Zell und B-Zell-Epitope vieler Allergene wurden bereits kartiert (zusammenfassend: Bannon und Ogawa 2006). Die immunologischen Mechanismen, die eine Atopie von einer nicht pathogenen Antwort unterscheiden, sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Jedoch konnte aus den Kartierungsstudien auf eine optimale Peptidlänge für eine Bindung von 8-12 Aminosäuren an T-Zellen geschlossen werden. B-Zell-Epitope haben noch längere Bindungsstellen (Rothbard und Geffer 1991). Basierend auf diesen Informationen wurde die Länge der Sequenz für den Vergleich des transgenkodierte Proteins mit bekannten Allergenen von mindestens 8 aufeinanderfolgenden identischen Aminosäuren festgelegt (Metcalf *et al.* 1996).

Die Testmethode des Sequenzvergleiches ist lediglich als ein Indikator und nicht als ausschlaggebend bei der Bestimmung des allergenen Potenzials eines Proteins anzusehen. Die Methode ist limitiert, da sie diskontinuierliche Epitope, die durch die Tertiärstruktur eines Allergens bedingt sind, nicht erkennen kann. Beispielsweise ist die IgE-Bindung an das Allergen *Bet v 3* (in Birkenpollen) abhängig von einer kalziumregulierten Konformationsänderung. IgE bindet nur in Anwesenheit von Kalzium nach einer Konformationsänderung an *Bet v 3* (Seiberler *et al.* 1994). Die Methode könnte auf der anderen Seite auch stark konservierte Sequenzen identifizieren, die mit dem allergenen Potenzial eines Proteins nicht in Verbindung stehen (Metcalf *et al.* 1996).

Werden *in silico*-Homologien oder identische Aminosäuresegmente gefunden, sollten als weiterer Schritt bei der Beurteilung der potenziellen Allergenität des neu exprimierten Proteins *in vitro*-Tests durchgeführt werden, die untersuchen, ob spezifisches IgE (sIgE) aus dem Serum allergischer Patienten an das untersuchte Protein bindet (Metcalf *et al.* 1996).

Wenn die Quelle des Transgens bekannte allergene Eigenschaften hat, für das neu exprimierte Protein jedoch keine Sequenzhomologien festgestellt werden, sollte ein spezifisches Screening mit Seren von Patienten, die Allergien gegen die Quelle des

Transgens aufweisen, durchgeführt werden. Bei positivem IgE-Nachweis kann das neu exprimierte Protein mit hoher Wahrscheinlichkeit als allergen eingestuft werden. Bei negativem IgE-Test, sollte das Protein weiteren Tests unterzogen werden (Metcalf *et al.* 1996).

Aufgrund der Tatsache, dass Lebensmittelallergene oftmals resistent gegen Abbau durch Verdau sind, wurde postuliert, dass Proteine, die den Transport durch den Magen-Darm-Trakt in einer intakten Konformation überstehen, über den oralen Weg sensibilisierend wirken können (Astwood *et al.* 1996). Fu *et al.* (2002) hingegen zeigten, dass keine absolute Korrelation zwischen der Stabilität eines Proteins gegen Verdau durch proteolytische Enzyme einerseits und der Allergenität des Proteins andererseits besteht. Die Untersuchung der Stabilität von Proteinen gegenüber Pepsin wird dennoch als wichtiges Kriterium bei der Risikoanalyse herangezogen, da diese Untersuchung erste Hinweise in puncto potenzielle Allergenität liefert (EFSA 2006).

Des Weiteren sind Tiermodelle für die Beurteilung des sensibilisierenden Potenzials der neu exprimierten Proteine zu heranzuziehen. Das Potenzial der Proteine allergische Immunantworten in Individuen zu induzieren, kann somit untersucht werden (FAO/WHO 2001). Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurden umfassende Studien mit Tiermodellen zur Bewertung allergener Risiken von Lebensmitteln oder transgener Pflanzen durchgeführt. Ein gut untersuchtes Tiermodell ist die *Brown Norway Ratte*. Diese Rattenlinie reagiert auf Allergenapplikation verstärkt mit der Aktivierung von TH2-Zellen und ähnelt somit atopischen Individuen, die aufgrund ihrer genetischen Prädisposition auf bestimmte Antigene mit einer erhöhten IgE-Antwort reagieren (Kimber *et al.* 2003). *Brown Norway Ratten* wurden erfolgreich für die Untersuchung der sensibilisierenden Wirkung diverser Lebensmittelproteine nach oraler Applikation eingesetzt (Knippels *et al.* 1998, 1999, 2002, 2003). Ein weiteres Nagetiermodell, das auf Proteinapplikation vorwiegend mit der TH2-Typ Immunantwort reagiert, ist die *Balb/c Maus*. Dearman *et al.* (2003) etablierten erfolgreich dieses Tiermodell, um die Immunogenität (überwiegend IgG-Antikörper-Synthese, jedoch keine IgE-Antikörper-Synthese) und die Allergenität (hauptsächlich IgE-Antikörper-Bildung) von Proteinen nach systemischer Gabe (intrapertoneal; i.p.) unterscheiden zu können. Eine Bildung spezifischer IgE-Antikörper und klinische Reaktionen, ähnlich denen beim Menschen nach Sensibilisierung mit Lebensmittelproteinen, konnte in Hunden nachgewiesen werden (Teuber *et al.* 2002; Buchanan *et al.* 2002). Studien zur Antigenerkennung durch IgE nach Spaltung der Disulfidbrücken in den Allergenen wurde durch Ermel *et al.* (1997) an Hunden mit starker IgE-Antwort untersucht. Die Hunde entstammten den Inzuchtlinien Spaniel, Retriever und Basenji. Weiterhin lassen sich in den Tiermodellen Schwein und Rind (Kalb) experimentell Allergien induzieren, deren klinische Symptome und Antikörperantworten denen im Menschen ähneln. Von Bailey *et al.* (1993) und Li *et al.* (1991) wurden Sensibilisierungsstudien mit Lebensmittelallergenen an Ferkeln durchgeführt. Obwohl anti-Schweine-IgE kommerziell nicht erhältlich ist, lassen sich IgE-artige Reaktionen beispielsweise mit Hauttests nachweisen. Im Tiermodell Schwein konnten Sensibilisierungen mit Sojaproteinen erzielt werden, die zu Symptomen führten, wie sie bei Kleinkindern beschrieben wurden.

### A 3 Verwendete Modellproteine

Für die Modellpflanze Kartoffel (*Solanum tuberosum*) gibt es mehrere Forschungsansätze mit Hilfe der Gentechnik verschiedene Inhaltsstoffe zur Rohstoffproduktion anzureichern bzw. neu zu exprimieren, um sie resistent gegenüber Krankheiten zu machen oder Substanzen mit medizinischer Wirkung zu produzieren (zusammengefasst in <http://www.transgen.de/datenbank/pflanzen/44.kartoffel.html>; Stand 08-2011).

Im Folgenden wird auf die unterschiedlichen Modellproteine, die in den in dieser Arbeit untersuchten Sorten *Albatros* und *Desiree* der Modellpflanze Kartoffel transgen exprimiert werden, eingegangen.

- NPTII (Neomycin-Phosphotransferase II)
- VP60 (Virushüllprotein 60 des Rabbit Haemorrhagic Disease Virus)
- CTxB (nicht toxische Untereinheit B des Cholera-toxins)
- Cyanophycin (nicht ribosomal gebildetes Polyaspartat mit Argininseitenketten)

#### A 3.1 NPTII – Selektionsmarker in der Pflanzentransformation

Um erfolgreich transformierte Pflanzenzellen von den Zellen, die ein gewünschtes Transgen nicht aufgenommen haben, selektieren zu können, wird das Zielgen mit einem selektierbaren Marker gekoppelt. Durch die Expression des Markers wird den Wirtszellen ein Selektionsvorteil gegenüber den nicht transformierten Zellen übertragen. Bei den meisten Selektionsmarkern handelt es sich um Antibiotika-Resistenzgene, die den erfolgreich transformierten Zellen ein Wachstum auf einem Nährmedium, das das entsprechende Antibiotikum enthält, ermöglicht. Nicht transformierte Zellen, die das Transgen und den Marker nicht tragen, können auf dem Selektionsmedium nicht wachsen und sterben ab (Nelson und Cox, Lehninger Biochemie, 3. Auflage, 2001).

Einer der am häufigsten genutzten Selektionsmarker ist das aus dem prokaryotischen Transposon Tn5 stammende *nptII*-Gen. Es kodiert für die Neomycin-Phosphotransferase II (NPTII). NPTII ist eine Aminoglycosid-3'-Phosphotransferase des Typs II (APH(3')II), die die ATP-abhängige Phosphorylierung der 3'-Hydroxylgruppe des Aminohexose-Rings bestimmter Aminoglycosid-Antibiotika katalysiert und sie damit inaktiviert. Das Enzym zeichnet sich durch eine hohe Substratspezifität aus. Zu den Substraten der APH(3')II-Enzyme gehören die Antibiotika Kanamycin, Neomycin, Geneticin, Butirosin, Gentamicin A und B sowie Paromomycin (Trieu-Cuot *et al.* 1987; Davies 1991; Simon und Stille 1995).

Aufgrund seiner langjährigen und häufigen Anwendung ist das Enzym NPTII intensiv auf seinen Einfluss auf die Umwelt und auf die menschliche sowie tierische Gesundheit untersucht worden (Flavell *et al.* 1992; Fuchs *et al.* 1993). Da das *nptII*-Gen und sein Genprodukt auch in der Transformation von Säugetierzellen Verwendung findet und kein Effekt auf die Lebensfähigkeit bzw. das Wachstum der Zellen festgestellt werden konnte, wird darauf geschlossen, dass das Enzym keine toxische Wirkung auf Säugetierzellen hat (Flavell *et al.* 1992). In Fütterungsstudien an Nagetieren mit transgenen Tomaten, die das Protein NPTII als Selektionsmarker tragen (Redenbaugh *et al.* 1992) und mit dem reinen Protein, transgen hergestellt und aufgereinigt aus *E. coli* (Fuchs *et al.* 1993) konnte kein schädigender Einfluss des Enzyms ermittelt werden. Es wurden Konzentrationen, die ein Vielfaches der möglichen NPTII-Aufnahme über die Nahrung überschreiten, gewählt.

Fehlende signifikante Homologien mit bekannten Toxinen und Allergenen und eine schnelle Inaktivierung und schneller Abbau des Enzyms, analysiert anhand von *in vitro*-Verdauungsversuchen, lassen weder auf ein toxisches noch ein allergenes Potenzial schließen (Redenbaugh *et al.* 1992).

### **A 3.2 VP60 – Virushüllprotein 60 des Rabbit Haemorrhagic Disease Virus**

Das Modellprotein VP60 ist ein ca. 60 kDa großes Protein, das als Hauptstrukturprotein (VP60) des RHD-Virus identifiziert wurde. Das RHD-Virus ist der Erreger der schwerwiegenden Hasen- und Kaninchenkrankheit Rabbit Haemorrhagic Disease (RHD) und gehört zu der Familie der *Calciviridae* (Parra und Prieto 1990). Seit dem ersten Ausbruch der Krankheit in China 1984 (Liu *et al.* 1984) ist RHD in verschiedenen Ländern schnell endemisch geworden. Das RHD-Virus (RHDV) ist ein einsträngiges (ss) nacktes RNA Virus positiver Polarität. Es hat zwei offene Leserahmen (open reading frames = ORFs), wobei ORF1 für ein Polyprotein codiert, welches gespalten wird in Nicht-Struktur-Komponenten und in das große Strukturprotein, das Kapsid VP60 (Abrantes *et al.* 2008).

Das VP60 Protein besteht aus sechs Regionen (A - F). Cryo-Elektronenmikroskop-Modellstudien haben gezeigt, dass das Kapsid aus zwei konzentrischen Schalen besteht. Einer inneren Schale, bestehend aus der N-terminalen Hälfte des VP60 Proteins (S-Domäne), welche das Genom des Virus beinhaltet und schützt und der äußeren Schale, die durch die C-terminale Hälfte des Proteins (P-Domäne) gebildet wird. Diese besteht aus den zwei hoch-variablen Regionen C und E und der hauptsächlich antigenen Region (Abrantes *et al.* 2008).

Parra und Prieto (1990) konnten zeigen, dass nach aktiver Immunisierung von Kaninchen mit aufgereinigtem viralem VP60 ein vollständiger Schutz gegen das RHDV aufgebaut wird. Zur Entwicklung von Veterinär-Impfstoffen zur Bekämpfung der RHD wurde 1994 durch Boga *et al.* das Gen, das für das Strukturprotein VP60 kodiert, in *E. coli* transformiert. Das rekombinante VP60 zeigte vergleichbare Antigenität wie das native virusexprimierte VP60 und eine schützende Immunisierung von Kaninchen gegen RHDV nach oraler Gabe (Boga *et al.* 1994). Bei der Produktion von rekombinantem VP60-Kapsidprotein im Baculovirus-Expressionssystem werden virus-ähnliche Partikel gebildet, die morphologisch und immunologisch den nativen RHDV-Partikeln sehr ähnlich sind (Laurent *et al.* 1994; Gromadzka *et al.* 2006). Bei Versuchen von Plana-Duran *et al.* zur Verbesserung der VP60-Expressionsstärke im Baculovirus-System wurde die cDNA der VP60-kodierenden Sequenz des RHDV unter der Kontrolle der beiden Promotoren für Polyhydrin und p10 des Baculovirus in Insektenzellen exprimiert. Die p10-Promotor-kontrollierte Expression war fünf bis zehn mal höher als die Polyhydrin-Promotor-kontrollierte Expression. Bei intramuskulärer und subkutaner Applikationen von 0,5 µg bzw. oraler Gabe von 3 µg VP60 konnte eine ausreichende Immunität gegen das RHDV induziert werden (Plana-Duran *et al.* 1996). Das VP60-Kapsid wurde in einer Reihe weiterer Systeme, wie den Hefen *Saccharomyces cerevisiae* (Boga *et al.* 1997), *Pichia pastoris* (Farnós *et al.* 2005), rekombinanten Viren (Bertagnoli *et al.* 1996) und den Larven von *Trichoplusia ni* (Pérez-Filgueira *et al.* 2007) mit protektiver Immunogenität exprimiert.

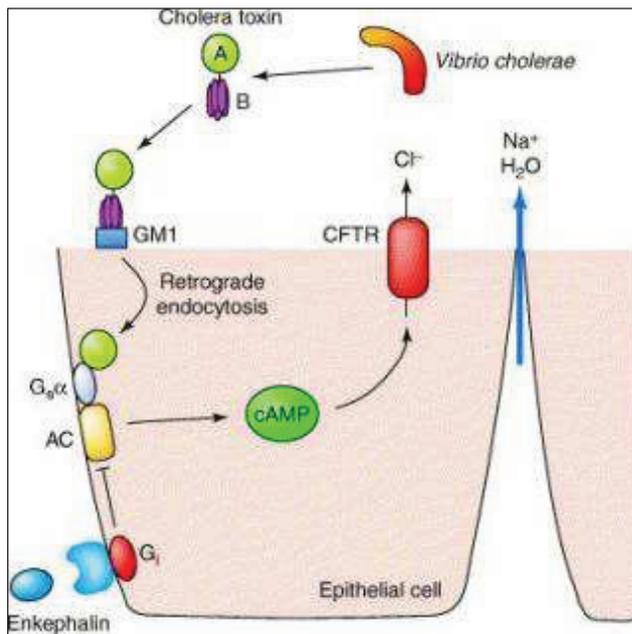
Seit einigen Jahren wird intensiv an der Produktion von Impfstoffen für die Human- und Veterinärmedizin im Pflanzensystem gearbeitet (Castañón *et al.* 1999, Fernández-

Fernandéz *et al.* 2001, Gil *et al.* 2006, Mikschofsky *et al.* 2009). Die Produktion rekombinanter pharmazeutischer Proteine in transgenen Pflanzen ist aus Gründen der Kosteneffizienz und der hohen biologischen Sicherheit eine vielversprechende zukunftsfähige Methode (Arntzen 1997). Die Expression von VP60 in Tabakblättern mit dem Potyvirus-Vektor (Fernandéz-Fernandéz *et al.* 2001) und in Kartoffeln (Castañón *et al.* 1999) konnte nach subkutaner Applikation am Kaninchen die Bildung protektiver Antikörper auslösen.

### **A 3.3 CTxB – nicht toxische Untereinheit B des Cholera-toxins**

Das Modellprotein CTxB ist die nicht toxische Untereinheit des Cholera-toxins (CTx). Das Cholera-toxin ist der hauptsächliche virulente Faktor des natürlichen Krankheitserregers *Vibrio cholerae*. Erst seit kurzem ist bekannt, dass die Gene für das Cholera-toxin von einem nicht-lytischen Bakteriophagen stammen, den die Bakterien tragen (Sánchez und Holmgren 2008). Das CTx besteht aus einer hetero-hexameren Proteinstruktur, die aus einer enzymatisch aktiven A-Untereinheit (CTx-A; 27 kDa), die nicht kovalent gebunden an einen Komplex aus 5 identischen rezeptorbindenden Untereinheiten (CTx-B; 58 kDa) vorliegt, besteht (Labib *et al.* 2009).

Wenn das Cholera-toxin von den Bakterien im infizierten Darm freigesetzt wird, bindet es mit dem CTxB-Pentamer an den Gangliosid GM1 Rezeptor auf der Zellmembran von Intestinalzellen. Anschließend erfolgt die Abspaltung der A1- von der A2-Domäne, wodurch die A1-Domäne ihre enzymatische Aktivität erhält. Durch eine ADP-Ribosylierungsreaktion aktiviert die A1-Domäne das G-Protein  $G_s\alpha$ , was zu einer ständigen Aktivierung der Adenylatzyklase führt, die einen intrazellulären Anstieg von zyklischem AMP (cAMP) bewirkt. Die erhöhte cAMP Konzentration in der Zelle führt über die Aktivierung eines Transmembranregulators (CTFR; fibrosis transmembrane conductance regulator) zu einer starken Sekretion großer Mengen Wasser und Elektrolyte in den Darm und zu schwerwiegenden Durchfällen (McDowall 2005).



**Abbildung A.5: Wirkprinzip des Cholera-Toxins**

A, B (Cholera-Toxin Untereinheiten); GM1 (GM1 Gangliosid Rezeptor);  $G_s\alpha$  ( $\alpha$ -Untereinheit des stimulatorischen G Proteins); AC (Adenylatzyklase); cAMP (zyklisches AMP); CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) (Thiagarajah und Verkman 2005)

Dem Cholera-Toxin wird eine außergewöhnlich starke Wirkung als oral-mucosales Immunogen und Adjuvants für viele co-applizierte Antigene zugesprochen. Diese Eigenschaft kann auf die folgenden Charakteristika zurückgeführt werden. Erstens ist das Molekül durch seine Funktion als starkes Toxin sehr stabil gegen Proteasen und andere Komponenten des Darms. Zweitens bindet es mit hoher Affinität über die B-Untereinheit an den GM1 Gangliosid Rezeptor, der auf der Oberfläche der meisten Säugetierzellen, so auch auf den "M-Zellen" in den Peyer'schen Plaques, den antigenpräsentierenden Zellen (APCs) des Darms, vorhanden ist. Um die Probleme der Toxizität des gesamten Cholera-Toxins als Immunogen zu vermeiden, wurden Untersuchungen zur Fähigkeit von rekombinantem CTxB die Immunantwort auf co-applizierte Antigene zu erhöhen, durchgeführt. Es wurde jedoch festgestellt, dass das CTxB allein eine geringere Wirkung als mukosales Adjuvants besitzt als das komplette Cholera-Toxin. Wenn das CTxB jedoch als Fusionsprotein, gekoppelt an das Antigen vorliegt, ist eine sehr gute Adjuvantswirkung gegeben (Sánchez und Holmgren 2008).

Das nicht-toxische CTxB wurde beim Menschen ohne jegliche Nebenwirkungen vielfach als mukosales Immunogen angewendet. Das Präparat Dukoral<sup>®</sup> zur Cholera-Phylaxe enthält neben inaktivierten Erregern auch rekombinantes CTxB. Das Präparat gilt als stark immunogen und sicher. Es wird in über 50 Ländern weltweit vertrieben. Aufgrund der exzellenten Sicherheit und guten Immunogenität wurden sowohl die CTxB-haltige Cholera-Vakzine als auch die CTxB-Komponente allein oft als Modellimmunogen für Studien mukosaler Immunantworten im Menschen herangezogen (Sánchez und Holmgren 2008).

Aufgrund der guten ökonomischen Eigenschaften und einer Minimierung der Kontamination mit tierischen bzw. bakteriellen Pathogenen wird seit einiger Zeit an der Produktion von Impfstoffen im Pflanzensystem geforscht und gearbeitet (z. B. Jani *et al.* 2004; Mikschofsky 2006). Die B-Untereinheit des Cholera-Toxins wurde bereits in einer Reihe transgener Pflanzen exprimiert (Tabak - Hein *et al.* 1996, Kartoffel - Arakawa *et al.* 1997, Tomate - Jani *et al.* 2002, Erbse - Mikschofsky 2006, Kim *et al.* 2009).

In ersten Tierversuchen mit pflanzenexprimiertem CTxB fand man heraus, dass es im Tiermodell Maus eine schützende Immunantwort auslöst (Arakawa *et al.* 1998). Wang *et al.* (2001) konnten anhand immunochemischer Methoden zeigen, dass aufgereinigtes Tabak-exprimiertes CTxB sich strukturell nicht von nativem bakteriellen CTxB unterscheidet.

Da das Cholera-toxin recht stabil ist gegen Abbau durch Proteasen und andere Komponenten des Verdauungstraktes (Sánchez und Holmgren 2008), ist die Wahl der B-Untereinheit des Toxins als Modellprotein zur Untersuchung einer potenziellen Allergenität gerechtfertigt. Proteine, die eine Resistenz bzw. gewisse Stabilität gegen proteolytische Enzyme zeigen, wird ein höheres allergenisierendes Potenzial zugesprochen als solchen, die durch Verdauungsenzyme schnell abgebaut werden (Astwood *et al.* 1996).

### A 3.4 Cyanophycin – nachwachsender Rohstoff

Cyanophycin ist ein nicht ribosomal gebildetes Polypeptid, das von dem Enzym Cyanophycin-Synthetase synthetisiert wird. Das Molekül besteht aus einem Poly- $\alpha$ -Aspartat-Rückgrat, dessen  $\beta$ -Carboxylgruppen jeweils mit der  $\alpha$ -Aminogruppe eines Argininrestes verbunden sind (Simon und Weathers 1976).

Cyanophycin ist von technischem Interesse, da durch chemische Hydrolyse die Arginin-Seitenketten abgespalten und die Homo- und Polymere L-Arginin und Polyaspartat gewonnen werden können (Joentgen *et al.* 2001). Eine industrielle Anwendung wird durch den Ersatz von chemisch synthetisiertem Polyaspartat ermöglicht. Die Synthese des Polypeptids in großem Maßstab durch rekombinante Bakterien und Pflanzen kann dabei wirtschaftlich erscheinen. Der weltweite Bedarf an Polycarboxylaten liegt bei 265.000 Tonnen pro Jahr (Eissen *et al.* 2002). Der Anteil an chemisch synthetisiertem Polyaspartat liegt etwa bei 12.600 Tonnen pro Jahr (Swamborn 1996). Darüber hinaus können die aus Cyanophycin gewonnenen Monomere Aspartat und Arginin als Ausgangssubstanzen für eine Reihe weiterer Substanzen genutzt werden (Scott *et al.* 2007). Beispielsweise kann Arginin über die Zwischenstufen Ornithin und 1,4-Butandiamin zur Synthese von Nylon-4,6 dienen und Aspartat kann als Ausgangsstoff für die Substanzen 2-Amino-1,4-Butandiol und 3-Aminotetrahydrofuran (genutzt in der Polymerindustrie) oder Fumarsäure (genutzt bei Produktion von Polyesterharzen) und Acrylamid (Farbstoff- oder Papierindustrie) genutzt werden (siehe Abbildung G.17).

Cyanophycin wird von Cyanobakterien (Blaualgen) und einigen anderen Bakterien (z.B. *Acinetobacter calcoaceticus*, *Desulfitobacterium hafniense* oder *Beijerinckia dextrii*) gebildet (Kreienbrink *et al.* 2004, Ziegler *et al.* 2002, Miyasaka *et al.* 2003). Cyanophycin hat in den genannten Organismen die Funktion eines Kohlenstoff- und Stickstoffspeichers. Es ist unlöslich in Wasser, organischen Lösemitteln (Methanol, Ethylenglycol, Dimethylsulfoxid, Formamid, Dimethylformamid), wässrigen Lösungen von Glycin, EDTA, dem Detergenz Triton X-100 und Natrium-deoxycholat. Salzsäure Lösungen (0,05 mol/l HCl), stark basische Lösungen (3,0 mol/l NaOH), Caesiumchlorid, 4 mol/l Harnstoff und 1 %-iges Natriumdodecylsulfat vermögen die Substanz Cyanophycin in Lösung zu bringen (Simon *et al.* 1971, Lang *et al.* 1972).

Cyanophycin-Granula wurden 1887 bei lichtmikroskopischen Studien von Blaualgenzellen entdeckt (Borzi 1887). Borzi beschrieb, dass die von ihm entdeckten Granula in Säure

quellen und sich auflösen. Die Struktur und die physikochemischen Eigenschaften des Polypeptids konnten erst nach der ersten Isolierung von Cyanophycin aus *Anabaena cylindrica* durch Robert Simon 1971 mittels Dichtegradientenzentrifugation beschrieben werden. Bestimmungen des isoelektrischen Punktes (IP) in Polyacrylamidgelen zeigten, dass Cyanophycin aus *Anabaena cylindrica* zwei isoelektrische Punkte besitzt. Bei der isoelektrischen Fokussierung in einem 6,0 mol/l Harnstoffgel wurde für den Hauptanteil des Cyanophycins ein IP von 4,75 und für einen kleineren Anteil ein IP von 6,0 festgestellt. Die Begründung liegt darin, dass das Cyanophycin mit einem IP von 6,0 ein äquivalentes molares Verhältnis von Aspartat und Arginin von 1:1 und dass das Cyanophycin mit einem IP von 4,75 eine geringere Anzahl an Arginin-Seitenketten aufweist (Simon und Weathers 1976).

Cyanophycin wird von der Cyanophycin-Synthetase, die in den meisten Blaualgen und einigen anderen (o.g.) Bakterien vorkommt, gebildet. Als Substrate für die Synthese von Cyanophycin durch das Enzym dienen die beiden Aminosäuren Aspartat und Arginin sowie ATP. Für die Aktivität der Synthetase sind KCl, MgCl<sub>2</sub>, sowie Mercaptoethanol oder Dithiothreitol notwendig. In *in vitro*-Assays konnte gezeigt werden, dass die meisten Cyanophycin-Synthetasen neben Arginin auch Lysin sowie verschiedene Arginin-Analoga als Substrat nutzen können (Berg *et al.* 2000). Durch die Expression der Cyanophycin-Synthetase aus *Synechocystis* PCC 6803 (Pasteur Culture Collection), *Thermosynechococcus elongatus* oder *Desulfitobacterium hafniense* DCB-2 in *E. coli* oder in Kartoffeln zeigte sich ebenfalls ein teilweiser Austausch von Arginin durch Lysin (Ziegler *et al.* 2002, Frey *et al.* 2002, Neumann *et al.* 2005). Es wird auch von Austausch der basischen Aminosäure Arginin gegen saure Aminosäuren berichtet. Unter Wachstumsbedingungen mit limitierter Stickstoffversorgung wurde durch das Cyanobakterium *Synechocystis* PCC 6803 Cyanophycin gebildet, bei dem nahezu sämtliche Argininreste durch Glutaminsäurereste ersetzt waren (Merrit *et al.* 1994). Das transgen von der *Desulfitobacterium hafniense* - Cyanophycin-Synthetase in *E. coli* und das von der *Thermosynechococcus elongatus* - Cyanophycin-Synthetase in Kartoffel- und Tabakpflanzen produzierte Cyanophycin ist teilweise wasserlöslich (Ziegler *et al.* 2002, Neumann *et al.* 2005).

Aufgrund seiner verzweigten Struktur ist Cyanophycin durch die meisten Proteasen nicht abbaubar. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Cyanophycin durch Mikroorganismen unter aeroben und anaeroben Bedingungen abgebaut werden kann (Sallam und Steinbüchel 2008; Obst *et al.* 2005). Der Abbau erfolgt durch Cyanophycinasen und resultiert in der Bildung von  $\beta$ -Aspartat-Arginin-Dipeptiden (Richter *et al.* 1999).

#### A 4 Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit gliederte sich in das BMBF-geförderte Verbundprojekt „BioOK - Entwicklung von Zulassungs- und Überwachungsverfahren für gentechnisch veränderte Nutzpflanzen“ in den Themenkomplex „Analyse und Bewertung der Lebens- und Futtermittelsicherheit transgener Nutzpflanzen“ ein.

Ziel dieser Arbeit war es, eine neuartige Standardverfahrensweise zur Prüfung und experimentellen Testung der Allergenität gentechnisch veränderter Pflanzen im Vergleich zu ihren Ausgangspflanzen zu entwickeln, die es ermöglicht, schneller und sicherer die Anwesenheit bekannter Allergene in transgenen Nahrungsmitteln zu erkennen. Um auch das mögliche allergene Potenzial von Stoffen, die bisher nicht Teil der humanen Ernährung waren und daher noch keine Allergien auslösen konnten zu bestimmen, sollte überprüft werden, ob die transgenkodierte Proteine ein allergenisierendes Potenzial besitzen.

Um einen möglichen Einfluss des Transgens auf den Gehalt der endogenen Allergene in der Pflanze zu berücksichtigen, sollten ausgehend von Vorschlägen verschiedener Richtlinien der IFBC/ILSI, FAO/WHO und der EFSA zur Risikoanalyse von GMP, standardisierte Verfahren entwickelt werden, die sowohl eine Untersuchung der potenziellen Allergenität der neu exprimierten Proteine, als auch der gesamten Pflanze ermöglichen.

Die Verfahren sollten in einem Entscheidungsbaum miteinander verknüpft werden, um einen möglichst geringen und effizienten Untersuchungsumfang bei gleichbleibender Sicherheit zu ermöglichen.

Für die Entwicklung kamen von der Kulturpflanze Kartoffel die zwei nahen isogenen Varianten *Solanum tuberosum* Albatros und Desiree und acht transgene Linien, die die Modellproteine VP60, CTxB, NPTII und Cyanophycin exprimieren, zur Anwendung.

Die Verknüpfung der einzelnen Methoden innerhalb des Verfahrensschemas sollte derart gestaltet sein, dass eine Entscheidungsfindung mitunter auch unter Reduzierung von Tierversuchen zu erreichen ist.

## B Material und Methoden

### B 1 Material

#### B 1.1 Verwendetes Pflanzenmaterial und Modellproteine

Zur Bestimmung des allergenen Potenzials von GMP wurden 8 transgene und 2 nahe isogene Pflanzenkonstrukte vergleichend untersucht.

Von der Arbeitsgruppe um Frau Prof. Dr. Broer der Agrar- und Umweltfakultät (AUF) der Universität Rostock wurden folgende transgene und nahen isogenen Varianten der Kartoffelsorten *Albatros* und *Desiree* zur Verfügung gestellt und entsprechend der vorab geplanten Versuchsdurchführung durch die biovativ GmbH in Groß Lüsewitz vermehrt.

**Tabelle B 1.1: Untersuchte Modellpflanzen**

Pflanze	Konstrukt	Modellprotein
<i>Solanum tuberosum</i> <i>Albatros</i>	<i>A-NIV</i>	-
	<i>A-CTxB-204</i>	Choleratoxin Subunit B (CTxB) / NPTII
	<i>A-CTxB-218</i>	Choleratoxin Subunit B (CTxB) / NPTII
	<i>A-35S-205</i>	NPTII
	<i>A-PsbY-cy1-12</i>	Cyanophycin /NPTII
	<i>A-PsbY-cy1-23</i>	Cyanophycin /NPTII
<i>Solanum tuberosum</i> <i>Desiree</i>	<i>D-NIV</i>	-
	<i>D-35S-6</i>	NPTII
	<i>D-VP60-SEK-6</i>	RHDV-Hüllprotein 60 (VP60)
	<i>D-VP60-SEK-17</i>	RHDV-Hüllprotein 60 (VP60)

Um ein lagerfähiges und homogenes Probenmaterial zu erhalten, wurden die Kartoffelknollen homogenisiert, tiefgefroren und anschließend lyophilisiert (gefriergetrocknet).

#### B 1.2 Labortiere

Für die Untersuchung der potenziellen Allergenität (Soforttyp) der verwendeten Modellpflanzen wurden Labortierversuche mit systemischer und oraler Applikation an den beiden Spezies *Brown Norway Ratte* und *Balb/c Maus* (Charles River Laboratories, Research Models and Services, Sulzfeld, Deutschland) durchgeführt. Die Versuchstierspezies *Brown Norway Ratte* wurde durch vergleichende Untersuchungen mehrerer Ratten-Linien durch Knippels *et al.* (1999, 2003) als geeignete Kleintierspezies zur Durchführung von Fütterungsstudien zur Abschätzung der potenziellen Allergenität bestimmt. Von Kimber *et al.* (2003) und Dearman *et al.* (2003) wurden in zahlreichen Studien *Balb/c Mäuse* zur Untersuchung der charakteristischen Immunantwort nach systemischer (i.p., intra peritoneal) Gabe von Testproteinen eingesetzt. In beiden Labortiermodellen wurden das sensibilisierende Potenzial und die Fähigkeit bestimmter Proteine allergische Reaktionen auszulösen untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unter Verwendung der Labortierspezies Kaninchen (ZIKA-Hybridkaninchen, Gottin, Deutschland) und Legehennen (White Leghorn, Ovalehn, Kloster Lehnin, Deutschland) verschiedene polyklonale Antikörper produziert (siehe B 2.3). Die aufgereinigten Antikörper fanden sowohl Anwendung in der Entwicklung von Systemen zum Nachweis der Modellproteine auf ELISA-Basis, als auch in Westernblotanalysen.

### B 1.3 Puffer, Lösungen, Tierfutter

Alle verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von der Firma Sigma-Aldrich bezogen (siehe G 2).

#### Puffer für ELISA, Proteinextraktion und Chromatographien:

PBS:	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,4
Karbonat-Bikarbonatpuffer:	15 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ; 35 mM NaHCO <sub>3</sub> ; pH 9,6
Waschpuffer:	PBS; 0,05 % Tween-20
Blocklösung 1:	PBS; 1 % BSA
Blocklösung 2:	PBS; 1 % MMP
Blocklösung 3:	RotiBlock
Assay diluent (BD OptEIA™ Set Mouse IgE)	10 % FKS in PBS
Waschlösung für Ratten IgE ELISA Quantitation Kit:	0,05 M Tris; 0,14 M NaCl; 0,05 % Tween 20; pH 8,0
Blocklösung für Ratten IgE ELISA Quantitation Kit:	1 % BSA in 0,05 M Tris; 0,14 M NaCl; pH 8,0
Proben Diluent für Ratten IgE ELISA Quantitation Kit:	0,05 M Tris; 0,14 M NaCl; 0,05 % Tween 20; 1% BSA; pH 8,0
Acetatpuffer; 0,1 M:	0,1 M C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub> ; 0,5 M NaCl; pH 4,5
Natriumhydrogencarbonat-Lösung; 1 M	1 M NaHCO <sub>3</sub>
Guanidinhydrochlorid-Lösung; 6M	6 M CH <sub>5</sub> N <sub>3</sub> × HCl

#### Puffer und Lösungen für die Elektrophorese

Trenngelpuffer	1,5 M C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> ; pH 8,8
Sammelgelpuffer	1,0 M C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> ; pH 6,8
SDS-Lösung; 10 %	347 mM C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> NaO <sub>4</sub> S
APS-Katalysatorlösung; 10 %	438 mM H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> S <sub>2</sub>
Elektrophoresepuffer:	25 mM C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> ; 192 mM C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> ; 34,7 mM C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> NaO <sub>4</sub> S; pH 8,3
Permanente Fixierlösung:	612 mM C <sub>2</sub> HCl <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ; 40 % Methanol; 50 % Aqua dest
Probenpuffer	RotoLoad1 (Carl-Roth)

#### Färbung der SDS-PAGE-Gele:

##### Coomassie- Färbung

Coomassie-Blue-Brilliant-Färbelösung (R 250):	0,1 % Coomassie Brilliant Blue R 250; 40 % Methanol; 10 % Essigsäure; 49,9 % Aqua dest
Entfärbelösung:	25 % Methanol; 75 % Aqua dest

##### Silberfärbung:

Inkubationslösung:	33,3 % Ethanol; 830 mM C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub> ; 12,65 mM Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ; 3,12 mM C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>
Färbelösung:	11,8 mM AgNO <sub>3</sub> ; 0,0074 % Formaldehyd (≈ 200 µl 37 %-iges Formaldehyd pro 1000 ml Lösung)
Entwicklerlösung:	283 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ; 0,0037 % Formaldehyd; pH 11,8
Stopplösung:	63,5 mM C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> (EDTA)

#### Puffer und Lösungen für Western-Blot Analysen:

Transferpuffer:	20 % Methanol; 48 mM C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> ; 39 mM C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>
Anodenpuffer:	10 % Anodenpuffer (Carl-Roth); 20 % Methanol; 70 % Aqua dest.
Kathodenpuffer:	10 % Kathodenpuffer (Carl-Roth); 20 % Methanol; 70 % Aqua dest.
BSA – Blocklösung:	PBS; 0,05 % Tween-20; 3 % BSA

<b>Puffer und Lösungen für <math>\beta</math>-Hexosaminidase-Assay:</b>	
Tyrode's Puffer:	130 mM NaCl; 5 mM KCl; 1,4 mM CaCl <sub>2</sub> ; 1 mM MgCl <sub>2</sub> ; 5,6 mM Glukose; 10 mM HEPES; 0,1 % FKS
Citratpuffer; 1 M; pH 4,5:	1 M C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> ; 154 mM NaCl; pH 4,5
Citratpuffer; 0,1 M; pH 4,5:	100 mM C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> ; 15,4 mM NaCl; pH 4,5
Carbonatpuffer; 1M:	1 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ; 1 M NaHCO <sub>3</sub> ; pH 9,6
Carbonatpuffer; 0,1 M:	100 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ; 100 mM NaHCO <sub>3</sub> ; pH 9,6
0,1 % Triton-X-100	1 ml Triton-X-100 in 999 ml Tyrode's Puffer ( $\approx$ 625 mM) 130 mM NaCl; 5 mM KCl; 1,4 mM CaCl <sub>2</sub> ; 1 mM MgCl <sub>2</sub> ; 5,6 mM Glukose; 10 mM HEPES; 0,1 % FKS
pNAG (p-Nitrophenyl-N-acetylglucosaminid):	3,8 mM C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O ; 100 mM C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> ; 15,4 mM NaCl; pH 4,5
<b>Puffer und Lösungen für die basophile Degranulation:</b>	
FACS-Puffer	PBS; 2 mM EDTA; 0,5 % BSA
Stimulationspuffer	Lyophilisat in Glasvial der Firma Bühlmann; resuspendiert in 50 ml Aqua dest.
Stopp-Lösung	PBS; 2 mM EDTA
Blockierungspuffer	Fertige Lösung; Firma Bühlmann
OVA-Lösung	Endotoxinfreies Ovalbumin Firma Profos AG; resuspendiertes Lyophilisat (c = 1 mg/ml)
<b>Tierfutter:</b>	
Futter mit 20 % Kartoffelmaterial:	30 g Gelatine, 770 g ssniff® EF R/M Mehl (Firma ssniff), 200 g Kartoffellyophilisat ad 1 l Wasser

## B 2 Methoden

### B 2.1 Proteinanalytik

#### B 2.1.1 Proteinextraktion

Gefriergetrocknetes (lyophilisiertes) Pflanzenmaterial wurde in einem Mörser fein zermalen und anschließend in PBS (1 g auf 10 ml PBS) suspendiert. Das Röhrchen wurde für 5 Minuten in ein Ultraschallbad (Bandelin DT 106) gestellt und anschließend 10 Minuten bei 4500  $\times$  g zentrifugiert. Der Überstand wurde mithilfe eines Spritzenvorfilter (0,45  $\mu$ m) sterilfiltriert und konnte anschließend für die weitere Analytik direkt eingesetzt oder bei - 20 °C gelagert werden.

#### B 2.1.2 Proteinbestimmung

Die Quantifizierung des Gehaltes an löslichem Protein (Total Soluble Protein = TSP) erfolgte mit den beiden Protein-Quantifizierungsmethoden nach Biuret oder nach Bradford im Mikrotiter-Assay.

Methode A: Biuret

Im Biuret-Assay kam das Farbreagenz Roti-Quant (Firma Roth) zur Anwendung, welches nach den Vorgaben der Packungsbeilage angesetzt wurde. Die Quantifizierung erfolgte anhand einer BSA-Standardreihe (5 - 2000  $\mu$ g/ml). 50  $\mu$ l je Standard, Blank und Probe und 150  $\mu$ l Farbreagenz wurden in Dreifachbestimmung in die Kavitäten der Mikrotiterplatte pipettiert. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37 °C und 15 Minuten bei Raumtemperatur konnten die Extinktionen der Ansätze bei 490 nm und 630 nm (Referenzwellenlänge) mit dem Plattenreader (BioTek ELx808) gemessen werden.

Anhand der Extinktion der Standards ließ sich die Proteinkonzentration der Proben berechnen.

Methode B: Bradford (Bradford 1976)

Der Trimethylmethanfarbstoff Coomassie-Brilliant-Blue G250 bildet in saurer Lösung mit kationischen und unpolaren Aminosäuren in Proteinen Komplexe. Das Absorptionsmaximum des ungebundenen (kationischen, roten) Form des Farbstoffes liegt bei 470 nm und das der gebundenen (anionischen, blauen) Form bei 595 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm der Lösung mit steigender Proteinkonzentration kann mit hoher Empfindlichkeit gegen das freie Farbreagenz bei 470 nm gemessen werden. Wie bei der Methode A (Biuret) erfolgte die Proteinquantifizierung der Proben anhand einer BSA-Standardreihe.

Die Verwendung des kommerziellen Färbereagenzes Roti-Nanoquant erlaubte eine Proteinbestimmung im niedrigen Konzentrationsbereich von 1,63 - 200 ng/ml. 50 µl der Standards, Blank und Proben und 200 µl Färbelösung (1:5 verdünnt in Aqua dest.) wurden in Doppelbestimmung auf eine Mikrotiterplatte gegeben. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Extinktionen der Lösungen bei 550 nm und 450 nm gemessen. Der Quotient der Extinktionen bei 550 nm und 450 nm wurde ermittelt und anhand der Resultate der Standards konnten die Konzentrationen der Proben bestimmt werden.

### **B 2.1.3 Proteinfällung**

Proteinfällungen aus Lösungen wurden zur Konzentrierung der Proteine und teilweise zur Umpufferung durchgeführt.

#### Acetonfällung

Einem Volumen Proteinlösung wurden 4 Volumen - 20 °C kaltes Azeton hinzugegeben. Nach gutem Durchmischen des Ansatzes wurde dieser für mindestens 3 Stunden bei - 20 °C gelagert. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 8000 × g und 4 °C und Verwerfen des Überstandes konnte ein Proteinpellet gewonnen werden.

#### Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

Nach den Angaben der Tabelle G 12.1 wurde festes Ammoniumsulfat (im Mörser fein zermalen) in kleinen Portionen unter stetigem Rühren zu der Proteinlösung im Eisbad gegeben. Die ausgefällten Proteine wurden durch 5 minütige Zentrifugation bei 5000 × g bei Raumtemperatur pelletiert. Der Überstand konnte für weitere Schritte der fraktionierten Fällung herangezogen werden. Die ausgefällten Proteine konnten entweder durch Acetonfällung, Membranfiltration oder Dialyse entsalzt werden.

### **B 2.1.4 Elektrophorese**

Mit der diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) lassen sich Proteine nach ihrer Molekularmasse trennen. Dazu werden die Proteine mit dem Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) beladen und die Disulfidbrücken der Proteine reduktiv mit β-Mercaptoethanol beim Kochen gespalten. Das resultierende Ladungs-Masse-Verhältnis der Proteine ist für alle Proteine gleich. Die Auftrennung des Proteingemisches erfolgt in sogenannten restriktiven Polyacrylamidgelen im elektrischen Feld. Polyacrylamid zeichnet sich durch hohe chemische und mechanische Stabilität aus

und wird durch Copolymerisation von Acrylamidmonomeren und N,N'-Methylenbisacrylamid als Vernetzer hergestellt. Die Proteine sind negativ geladen und wandern in Richtung Anode. Da die netzartige Struktur der Gele die Wanderung kleiner Moleküle begünstigt und der größeren Moleküle stärker behindert, ist die resultierende Wanderungsgeschwindigkeit und zurückgelegte Strecke umgekehrt proportional zur molekularen Masse der Proteine. Die Proteingröße kann anhand von Proteinreferenzmarkern mit definierter Größe bestimmt werden.

#### Herstellung der Gele:

Es wurden 12- und 15 %-ige denaturierende SDS-Polyacrylamidgele verwendet (Laemmli 1970). Die Zusammensetzung der Gel-Lösungen ist in Tabelle B 2.1 dargestellt.

**Tabelle B 2.1: Zusammensetzung der SDS-PAGE-Gele**

	<b>12 % Trenngel</b>	<b>15 % Trenngel</b>	<b>Sammelgel</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	3,3 ml	2,3 ml	2,05 ml
<b>Tris-HCl; pH 6,8</b>	-	-	0,375 ml
<b>Tris-HCl; pH 8,8</b>	2,5 ml	2,5 ml	-
<b>30% Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid</b>	4,0 ml	5,0 ml	0,5 ml
<b>10 % SDS</b>	0,1 ml	0,1 ml	0,03 ml
<b>10 % APS</b>	0,1 ml	0,1 ml	0,015 ml
<b>TEMED</b>	0,004 ml	0,004 ml	0,004 ml

Nach Beenden des Elektrophorese-Laufes wurden die Gele entweder einer Färbung zum Sichtbarmachen der Proteine unterzogen oder für eine Proteintransfer auf eine Membran mittels Western-Blot eingesetzt.

#### Färben der Proteine

Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung:

- Gel in Fixier- und Färbelösung (1 - 2 h, schwenken, Raumtemperatur (RT))
- Gel in Entfärbelösung (Gel in Lösung belassen, bis Hintergrund entfärbt ist und Proteinbanden noch deutlich gefärbt sind)

Silberfärbung:

- Gel 3 × 10 Minuten in Aqua dest waschen
- 45 Minuten bis 1 h in Silbernitratlösung schwenken, kurz mit Aqua dest spülen
- 5 bis 10 Minuten in Entwicklerlösung schwenken
- nach Sichtbarwerden der Proteinbanden Reaktion mit Stopplösung beenden
- 5 Minuten in Stopplösung belassen, anschließend 3 × 10 Minuten in Aqua dest waschen

### **B 2.1.5 Semidry - Western - Blot**

Beim Western - Blot werden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus dem SDS-Gel auf eine Membran (z. B.: PVDF, Nitrocellulose) transferiert. Der Transfer basiert auf der durch das SDS bedingten negativen Ladung der Proteine und sie wandern im elektrischen Feld in Richtung Anode, welche sich unterhalb der Membran befindet. Nach Blockierung der freien Bindungsstellen kann eine Immunodetektion bestimmter Proteinbanden durch Inkubation mit spezifischen Antikörpern durchgeführt werden.

### Proteintransfer:

- im Anschluss an Elektrophorese ungefärbtes Gel mit Aqua dest spülen
- 10 Minuten in Transferpuffer inkubieren
- 4 Lagen Filterpapier und Membran in Größe des Gels zurechtschneiden
- je 2 Filterpapiere in Anoden- bzw. Kathodenpuffer inkubieren
- Membran 5 Minuten in 100 % Methanol inkubieren, anschließend mit Aqua dest spülen und 10 Minuten in Transferpuffer schwenken
- Blot-Apparatur in folgender Reihenfolge aufbauen: Anode, Filterpapiere (Anodenpuffer), Membran, Gel, Filterpapiere (Kathodenpuffer), Kathode
- Stromstärke von 1 mA/cm<sup>2</sup> anlegen, Transferdauer von 1 h

### Immunodetektion:

Die Durchführung der Immunodetektion einer Proteinbande auf der Membran kann je nach Verfügbarkeit, Konzentration und Nachweissystem (unkonjugiert; konjugiert an POD) des spezifischen Detektionsantikörpers variieren.

- Blocken der freien Bindungsstellen auf der Membran mit Blocklösung (2 h schwenken, RT oder über Nacht bei 4 °C)
- Membran 3 × 10 Minuten waschen in PBST
- Inkubation (1 h schwenken, RT) mit verdünntem Antikörper (z.B. PBS/ 0,5 % BSA; Antikörper z.B. 1:2000; Serum z.B. 1:20), anschließend 3 × 10 Minuten waschen in PBST

Wenn der Antikörper POD-konjugiert ist, erfolgt die Detektion direkt durch Substratzugabe (TMB für Membranen). Die Farbentwicklung erfolgt nach Sicht etwa 5 - 15 Minuten. Die Reaktion wird durch Zugabe von Aqua dest gestoppt.

Liegt der spezifische Primärantikörper unkonjugiert vor, wird dieser mit einem anti-Spezies-POD-konjugiertem Antikörper (z.B. 1:2000) in PBS/ 0,5 % BSA verdünnt nachgewiesen. Die Bindungsreaktion erfolgt 1 h bei Raumtemperatur unter schwenken. Nach Waschen der Membran (3 × 10 Minuten in Waschpuffer) wird der spezifisch gebundene Antikörper durch Substratzugabe (TMB für Membranen) detektiert. Die Farbentwicklung erfolgt nach Sicht etwa 5 - 15 Minuten. Die Reaktion wird durch Zugabe von Aqua dest gestoppt.

## **B 2.2 Darstellung der Modellproteine und -Antigene**

Die Modellproteine und die -allergene wurden für verschiedene Anwendungen, beispielsweise zur Herstellung polyklonaler Antikörper oder als Standardmaterial im ELISA, in möglichst reiner Form benötigt. Für die Substanzen, die kommerziell nicht in gereinigter Form zu erwerben waren, wurden Reinigungsstrategien entwickelt.

### **B 2.2.1 NPTII**

Das Modellprotein NPTII wurde aus Inclusionbodies NPTII-exprimierender *E. coli*-Zellen aufgereinigt. Dafür wurde die bei - 80 °C gelagerte *E. coli*-TG1-Kultur (AUF, Uni Rostock) aufgetaut, im Quadrantenausstrich auf Caso-Agar ausgestrichen und über Nacht bei

37 °C bebrütet. Am folgenden Tag wurde eine Kolonie entnommen und in LB-Flüssigmedium in einem 1000 ml-Erlenmeyerkolben übertragen. Nach 24-stündiger Kultivierung bei 37 °C im Schüttelwasserbad (120 rpm), konnten die Zellpellets nach Zentrifugation (3000 × g, 10 min) in 50 ml-Röhrchen gewonnen werden. Die Pellets wurden vereinigt und konnten bis zu weiteren Aufarbeitung bei - 20 °C gelagert werden. 5 g *E.coli*-Zellpellet wurden in 40 ml 0,1 M Tris-HCl, 20 mM EDTA, pH 7,0 resuspendiert. Nach Zugabe von 25 mg/ml Lysozym wurde der Ansatz gut durchmischt, 120 Minuten bei 4 °C inkubiert und anschließend für 10 Minuten in ein Ultraschallbad gestellt. Die Lösung wurde auf Eppendorfreaktionsgefäße aufgeteilt und bei 12000 × g für 10 Minuten zentrifugiert, bevor die Pellets in 0,5 M NaCl mit 1 % Tween-20 aufgenommen, vereinigt und erneut in ein 50 ml-Röhrchen überführt wurden. Der Ansatz wurde über Nacht bei 4 °C belassen. Anschließend wurden 20 µl DNase und 100 µl MgCl<sub>2</sub>-Puffer (pH 6,5) hinzugegeben, um die aus den Zellen freigesetzte DNA abzubauen. Nach 12-stündiger Inkubation wurde die Lösung erneut in Eppendorfreaktionsgefäße überführt und 10 Minuten bei 12000 × g zentrifugiert. Zum Waschen der erhaltenen Pellets wurden diese dreimal in PBS resuspendiert und abzentrifugiert und anschließend vereinigt. Das Pellet (Inclusionbodies) wurde in 4 M Harnstoff und 50 mM Natriumphosphat (pH 8,5) aufgenommen und für 3 Stunden bei Raumtemperatur gelöst. Nach Zentrifugation (12000 × g) wurde der Überstand mit PBS mit 10 mM DTT auf eine Endkonzentration von 1,6 M Harnstoff verdünnt und zweimal gegen PBS dialysiert. Die erhaltene Proteinfraction konnte bei - 20 °C gelagert werden.

Desweiteren kam ein synthetisches Polypeptid bei der Antikörperproduktion zum Einsatz, welches den Aminosäuren 250 - 264 der Primäraminosäuresequenz des NPTII-Proteins entspricht. Das Peptid mit der Aminosäuresequenz NH<sub>2</sub>-Cys-DSQRIAFYRLLDEFF wurde durch das BMFZ an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mittels Festphasensynthese nach Merrifield hergestellt. Anschließend erfolgte eine Kopplung des Peptids an das Protein KLH (Keyhole Limpet Hämocyanin) aus der Napfschnecke (1 mg Peptid/mg KLH). Je 300 µg des Konjugates wurden unter Zusatz von Freund'schem Adjuvants für die Immunisierungen zweier Kaninchen (siehe B 2.3) verwendet.

### **B 2.2.2 Cyanophycin**

Bei der Aufreinigung der Modellsubstanz Cyanophycin wurde seine schlechte Löslichkeit bei physiologischem aber gute Löslichkeit bei saurem pH-Wert genutzt. 10 g des Kartoffellyophilisates (*A-PsbY-cyel-12* oder *A-PsbY-cyel-23*) wurden fein zermörsert und in ein 50 ml Röhrchen gegeben. Nach dreimaliger Extraktion des Pflanzenmaterials mit PBS und Verwerfen des Überstandes nach Zentrifugation (je 10 Minuten bei 3500 × g) wurde das Pellet dreimal mit 0,1 M HCl extrahiert. Die Überstände nach Zentrifugation (je 10 Minuten bei 3500 × g) wurden vereinigt und über einen Faltenfilter von groben Bestandteilen gereinigt. Das Filtrat wurde mit 1 M NaOH-Lösung auf pH 7,0 eingestellt. Der entstandene Niederschlag wurde durch Zentrifugation (10 Minuten bei 3500 × g) gewonnen. Das Pellet wurde mehrfach im Wechsel mit Aqua dest und 100 %-igem Methanol gewaschen. Das gereinigte Pellet wurde eingefroren und anschließend in einer Lyophilisationsanlage getrocknet.

Des Weiteren wurde Cyanophycin aus dem Expressionssystem *E. coli* für die Antikörperproduktion und für die Entwicklung von Nachweissystemen durch die AG Prof. Dr. Lockau der Humboldt-Universität Berlin zur Verfügung gestellt.

### **B 2.2.3 VP60 und CTxB**

Zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern in den Tieren Kaninchen und Huhn und zur Entwicklung von VP60-Nachweissystemen wurde das Modellprotein VP60 aus drei unterschiedlichen Systemen herangezogen (siehe

Tabelle G 2.1). Da das Protein VP60 in den verwendeten Expressionssystemen in nur sehr geringen Konzentrationen produziert wird, wurden Rohextrakte verwendet. Zum einen wurden das Lyophilisat eines VP60-exprimierenden Baculovirus-Insektenzellkultur-Systems zur Immunisierung von Kaninchen und der Kaninchenimpfstoff Rika-Vacc zur Immunisierung von Hühnern herangezogen. Zum anderen wurde mittels Dichtegradientenzentrifugation gereinigtes inaktiviertes RHDV zur Quantifizierung des VP60-Gehaltes in Proben mit unbekannter VP60-Konzentration verwendet.

Das Modellprotein CTxB, die nicht toxische Untereinheit des Choleratoxins, ist kommerziell erhältlich und wurde zur Produktion von Antikörpern und als Standardmaterial in Nachweissystemen genutzt und von der Firma Sigma-Aldrich bezogen.

## **B 2.3 Herstellung und Aufreinigung von Antikörpern**

### **B 2.3.1 Antikörper aus Kaninchen**

#### Serumgewinnung

Zur Produktion polyklonaler Antikörper wurden Tiere der Rasse ZIKA-Hybridkaninchen verwendet. Das reine Protein, gegen welches Antikörper erzeugt werden sollten, wurde mit einer Endkonzentration von 200 µg/ml in PBS gelöst. Zu gleichen Anteilen wurde diese Proteinlösung mit Freund'schen Adjuvans gemischt. Mithilfe einer Ultraschallsonde konnte das Gemisch in eine stabile Emulsion gebracht werden. Jeweils 1 ml der Emulsion wurden zwei Kaninchen intramuskulär und subkutan appliziert. Die Applikation wurde viermal mit Abständen von jeweils 1 Woche wiederholt (Boosterung). Für die Primärimmunisierung wurde komplettes Freund'sches Adjuvans verwendet, für die Folgeinjektionen das inkomplette Adjuvans. Bei jeder Immunisierung wurden den Kaninchen Blutproben aus der Ohrvene, zur Gewinnung von Testseren entnommen. Diese wurden im ELISA und/oder im Immunoblot auf die Entwicklung von proteinspezifischen Antikörpern untersucht.

Eine Woche nach der 5. Applikation wurden die Kaninchen entblutet. Das Blut der Kaninchen wurde in einem 500 ml Becherglas aufgefangen und mit einem Glasstab gelegentlich gerührt. Das Becherglas wurde abgedeckt für zwei Stunden bei 37 °C und anschließend über Nacht bei 4 °C belassen. Anschließend konnte das Serum dekantiert und bei 15000 × g zentrifugiert werden. Zur Lagerung wurde das Serum in 2 ml-Fractionen bei -20 °C eingefroren.

### Aufreinigung der Immunglobuline

Zur Gewinnung der Immunglobuline, wurde das Serum über eine Protein-A-Säule (German Health Care - GHC) aufgereinigt. Protein A ist ein Protein, das ursprünglich aus der Zellwand des Bakteriums *Staphylococcus aureus* stammt. Es bindet an die schwere Kette der Fc-Region von Immunglobulinen (hauptsächlich IgG) verschiedener Säugerarten.

1 ml sterilfiltriertes Serum wurde auf die Säule gegeben. Ungebundene Serumbestandteile wurden anschließend mit PBS von der Säule gespült. Die Immunglobuline wurden mit 0,03 M Citratpuffer eluiert und in einem 10 ml Röhrchen, in dem sich 0,5 ml 1 M Natriumhydrogencarbonat-Lösung zur Neutralisierung des pH-Wertes befanden, aufgefangen. Zur Bestimmung des Proteingehaltes der Immunglobulin-Lösung wurden 1:10 und 1:20 - Verdünnungen in PBS hergestellt und die Absorption bei 280 nm gemessen. Bei dieser Wellenlänge absorbieren die aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und in geringem Maße auch Phenylalanin. Der Proteingehalt berechnet sich folgendermaßen:

$$C_{\text{Protein}} = \frac{A_{280}}{1,37}$$

### Biotinylierung

Für die ELISA-Entwicklung ist es notwendig die Detektions-Antikörper zu markieren. Entweder werden sie direkt mit einem Enzym (z.B. POD; Peroxydase) gekoppelt oder es wird ein Ligand (Biotin) gekoppelt, an den über einen weiteren Liganden (Streptavidin) das Enzym (POD) gebunden wird.

Zur Kopplung von Biotin an die aufgereinigten Immunglobuline wurde das „Biotin Protein Labeling Kit“ (Fa. Roche) verwendet. Biotin bindet an Proteine, indem es mit freien Aminogruppen eine stabile Amidbindung eingeht.

Zu 1 mg des Protein A-gereinigten Immunglobulins wurden 7,6 µl Biotin (D-biotinoyl-ε-aminocaproic acid-N-hydroxy-succinimide ester) pipettiert. Dieser Ansatz wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend über eine Sephadex G-25 Säule aufgereinigt, um das nicht gebundene Biotin von den Immunglobulinen zu trennen. Von der konjugierten Antikörperlösung wurde der Proteingehalt bestimmt und zur Konservierung wurden 0,02 % Natriumazidlösung hinzupipettiert.

### **B 2.3.2 Antikörper aus Hühner-Eiern**

Zur Gewinnung von Antikörpern gegen die Modellproteine CTxB, VP60, Cyanophycin und NPTII zur Herstellung von ELISA-Testsystemen wurden neben den Kaninchen auch Legehennen der Rasse White Leghorn immunisiert. Aus dem Eigelb wurden die IgY-Antikörper gewonnen.

Je Protein wurden 2 Hennen im Alter von 25 Wochen für die Immunisierungen herangezogen. Die o.g. Proteine wurden mit einer Endkonzentration von 200 µg/ml in PBS gelöst und mit einem Volumenteil kompletten Freund'schen Adjuvants gemischt. In den Räumen der Firma Ovalehn wurde 1 ml dieses Gemisches den Hühnern intramuskulär appliziert. Die Applikation wurde viermal unter Verwendung von

inkomplettem Freund'schen Adjuvants wiederholt (Boosterung). 14 Tage nach der ersten Immunisierung wurden die Eier der Legehennen gesammelt und bei gekühlten Temperaturen (2 - 8 °C) gelagert. Zur Untersuchung der Entwicklung von proteinspezifischen Antikörpern wurde das Eigelb von ausgewählten Eiern mit Hilfe einer Spritze präpariert und in ein 10 ml Röhrchen überführt. Verdünnungen der Eigelblösung wurden im ELISA auf spezifische IgY-Antikörper nach folgender Testdurchführung geprüft.

- Beschichtung mit spezifischem Modellprotein (2 µg/ml, 50 µl je Kavität)
- Inkubation in feuchter Kammer bei 4 °C, über Nacht, anschließend waschen mit PBST (200 µl je Kavität)
- 50 µl Eigelblösung (1:5 verdünnt in PBS) in oberste Kavität eines ELISA-Streifens pipettieren; in 1:2-Schritten weiterverdünnen
- Inkubation bei 37 °C, 1 h, anschließend 3 × waschen mit PBST (200 µl je Kavität)
- 50 µl je Kavität anti-chicken-POD-Antikörper (1:1000 verdünnt in PBS)
- Inkubation bei 37 °C, 30 Minuten, anschließend 3 × waschen mit PBST (200 µl je Kavität)
- 100 µl TMB-Substrat je Kavität, Inkubation 20 Minuten bei RT
- Abstoppen der Reaktion mit je 100 µl 0,25 M Schwefelsäure
- Messen der Extinktion bei 450 nm und 630 nm als Referenzwellenlänge

Die Eier aus der Legeperiode mit den höchsten spezifischen IgY-Titern wurden zur IgY-Präparation herangezogen. Die IgY-Präparation wurde modifiziert nach Ko und Ahn (2007) durchgeführt.

Mit einer Kanüle und einer Spritze wurde das Eigelb aufgenommen und in ein 50 ml Becherglas überführt und anschließend mit 9 Volumenteilen Aqua dest. (4 °C) versetzt und mit Hilfe eines Ultraturrax bei geringer Umdrehungszahl, um einen zu starken Wärmeeintrag zu vermeiden, homogenisiert. Das Homogenisat wurde in 50 ml-Röhrchen überführt und bei 2800 × g für 40 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Becherglas überführt und unter Rühren wurden 0,01 % Aktivkohle (w/v) hinzugegeben. Nach Einstellen des pH-Wertes auf 4,0 und erneuter Zentrifugation (2800 × g, 4 °C, 30 Minuten) wurde der Überstand mit Hilfe einer Spritze und einem Spritzenvorsatzfilter (0,2 µm) filtriert. Das Volumen des Filtrates wurde bestimmt und anschließend mit Vivaspin 20-Röhrchen (100 kDa, Sartorius) bei einer Zentrifugation bei 3000 × g (25 Minuten, 20 °C) eingeeengt. Das Retentat wurde auf 1/5 des Ausgangsvolumens mit Aqua dest. aufgefüllt und der pH-Wert auf 9,0 eingestellt. Die Fällung der Proteine erfolgte durch langsames Zugeben von Ammoniumsulfat unter permanentem Rühren bei 4 °C bis zu einer 40 %-igen Sättigung. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 5000 × g (15 Minuten, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in einem ½ Volumen des Ausgangsvolumens des Überstandes 0,01 Tris-HCl (pH 8,0) resuspendiert. Im Anschluss erfolgte eine weitere Fällung durch langsames Zugeben von Ammoniumsulfat bei 4 °C unter permanentem Rühren bis zu einer 40 %-igen Sättigung und eine Zentrifugation bei 5000 × g (15 Minuten, 4 °C). Das Pellet wurde in ½ Volumen des Ausgangsvolumens des Überstandes PBS (pH 7,4) aufgenommen. Durch eine Zentrifugation mit einer Ultrafiltrationsmembran mit einer Ausschlussgröße von

30 kDa und erneutem Resuspendieren des Retentats in  $1 \times$  PBS, konnte das Salz entfernt und das Volumen weiter eingengt werden. Der Proteingehalt wurde durch Messen von Verdünnungen der IgY-Lösung bei 280 nm ( $c_{\text{Protein}} = \text{Extinktion} / 1,37$ ) und mit der Proteinbestimmungsmethode modifiziert nach Biuret (Roti<sup>®</sup>-Quant universal, Fa. Carl Roth) bestimmt.

Aliquote der präparierten IgY - Antikörper von je 1 ml wurden in Eppendorfreaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Zur Erfolgskontrolle der Ammoniumsulfatfällung der IgY-Antikörper wurden diese unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen auf 12 %-ige SDS-PAGE Gele aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Durch Färben der Gele mit Coomassie und Transfer der Proteine auf PVDF-Membranen und anschließende Immunodetektion mit anti-chicken-POD konnte das Ergebnis der Präparation überprüft werden.

## **B 2.4 ELISA - Entwicklung**

Für die Quantifizierung der verwendeten Modelproteine CTxB, Cyanophycin; NPT II und VP60 wurden im Rahmen dieser Arbeit Testsysteme zum quantitativen Nachweis entwickelt.

Bei der Durchführung der ELISA erfolgten alle Waschschrte mit 200  $\mu\text{l}$  PBST je Kavität. Die Messung der Extinktion wurde in einem ELISA-Platten-Reader (BioTek) bei 450 nm und 630 nm als Referenzwellenlänge durchgeführt.

### **B 2.4.1 CTxB - ELISA**

Zu Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen das Modellprotein CTxB wurden im Tiertechnikum der Firma BIOSERV A. & M. GmbH 2 Kaninchen mit einem kommerziell erhältlichen Choleratoxin B immunisiert. Die Applikation des Proteins, die Aufreinigung und die Markierung der Antikörper wurde wie unter Punkt B 2.3 beschrieben durchgeführt.

Durchführung des CTxB Sandwich-ELISA:

- Beschichtung mit anti-CTxB-AK (Kaninchen 1), (50  $\mu\text{l}$  je Kavität,  $c = 14 \mu\text{g/ml}$  in 0,05 M Carbonat-Puffer, pH 9,6)
- Inkubation in feuchter Kammer bei  $4^{\circ}\text{C}$ , über Nacht, anschließend  $1 \times$  waschen
- CTxB-Standardreihe ( $c = 0,5 - 50,0 \text{ ng/ml}$ ) und Proben auftragen (je 50  $\mu\text{l}$ )
- Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$ , 1 h, anschließend  $3 \times$  waschen
- 50  $\mu\text{l}$  biotinylierten anti-CTxB-Detektionsantikörper (Kaninchen 2), ( $c = 2,7 \mu\text{g/ml}$ , verdünnt in PBS), Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$ , 30 Minuten, anschließend  $3 \times$  waschen
- Streptavidin-POD (Sigma-Aldrich) 1:30.000 in KVP, 50  $\mu\text{l}$  je Kavität, Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$ , 30 Minuten, anschließend  $3 \times$  waschen
- 100  $\mu\text{l}$  Substrat (TMB), Inkubation von exakt 20 Minuten bei Raumtemperatur
- Abstoppen der Reaktion mit je 100  $\mu\text{l}$  0,25 M Schwefelsäure
- Messen der Extinktion bei 450 nm und 630 nm als Referenzwellenlänge

Durchführung des mGM1-ELISA:

- Beschichtung mit mGM1-Rezeptor (Sigma-Aldrich), (50 µl je Kavität, c = 0,3 µg/ml in 0,05 M Carbonat-Puffer, pH 9,6)
- Inkubation in feuchter Kammer bei 4 °C, über Nacht, anschließend 1 × waschen
- Blocken der freien Bindungsstellen mit 1 % BSA in PBS (200 µl je Kavität, 2 h, RT), anschließend 3 × waschen
- CTxB-Standardreihe (c = 0,5 - 50,0 ng/ml) und Proben auftragen (je 50 µl)
- Inkubation bei 37 °C, 1 h, anschließend 3 × waschen
- 50 µl biotinylierten anti-CTxB-Detektionsantikörper (Kaninchen), (c = 2,7 µg/ml, verdünnt in PBS), Inkubation bei 37 °C, 30 Minuten, anschließend 3 × waschen
- Streptavidin-POD (Sigma-Aldrich) 1:30.000 in KVP, 50 µl je Kavität, Inkubation bei 37 °C, 30 Minuten, anschließend 3 × waschen
- 100 µl Substrat (TMB), Inkubation von exakt 20 Minuten bei Raumtemperatur
- Abstoppen der Reaktion mit je 100 µl 0,25 M Schwefelsäure
- Messen der Extinktion bei 450 nm und 630 nm als Referenzwellenlänge

#### **B 2.4.2 VP60-ELISA**

Für die Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen das Modellprotein VP60 wurden zum einen Kaninchen mit einem Homogenisat einer Baculovirus-Insektenzellkultur, in der VP60 exprimiert wurde (SF9-Pos), immunisiert. Zum anderen wurden Hühner mit dem kommerziellen Impfstoff RIKA-VACC<sup>®</sup>, der gegen die haemorrhagische Kaninchenkrankheit wirkt und aus der Leber experimentell infizierter Kaninchen gewonnen wird, immunisiert. Die Applikation der Proteine, die Aufreinigung und die Markierung der Antikörper wurde wie unter Punkt B 2.3 beschrieben durchgeführt.

Für die VP60-ELISA wurden die Proben und Detektionsantikörper in einem Puffer aus PBST + 5 % Pferdeserum verdünnt.

Variante 1 - Durchführung des IgG/IgY VP60-ELISA:

- Beschichtung mit anti-VP60-IgG-AK (Kaninchen) (50 µl je Kavität, c = 1,4 µg/ml in 0,05 M Carbonat-Puffer, pH 9,6)
- Inkubation in feuchter Kammer bei 4 °C, ü. N., anschließend 1 × waschen
- Blocken der freien Bindungsstellen mit PBST + 5 % Pferdeserum (200 µl je Kavität, 1 h, RT), anschließend 3 × waschen
- 50 µl der VP60-Kontrollen (SF9-Pos und SF9-Neg, jeweils 1:10 verdünnt)
- Inkubation bei 37 °C, 1 h, anschließend 3 × waschen
- 50 µl biotinylierten Detektionsantikörper (anti-VP60-IgY-AK, c = 1,1 µg/ml, verdünnt in PBST + 5 % Pferdeserum); Inkubation bei 37 °C, 60 Minuten, anschließend 3 × waschen
- Streptavidin-POD (Sigma-Aldrich) 1:30.000 in KVP, 50 µl je Kavität, Inkubation bei 37 °C, 30 Minuten, anschließend 3 × waschen
- 100 µl Substrat (TMB); Inkubation von exakt 20 Minuten bei Raumtemperatur
- Abstoppen der Reaktion mit je 100 µl 0,25 M Schwefelsäure und Messen der Extinktion

Als weitere Variante wurde ein bestehendes ELISA-Verfahren, welches im FLI-Riems entwickelt wurde, eingesetzt.

Variante 2 – Durchführung des VP60-ELISA (FLI-Riems):

- Beschichtung mit anti-VP60-AK (Meerschwein) (100 µl je Kavität, 1:2000 in 0,05 M Carbonat-Puffer, pH 9,6)
- Inkubation in feuchter Kammer bei 4 °C, ü. N., anschließend 1 × waschen
- Blocken der freien Bindungsstellen mit PBST + 5 % Pferdeserum (200 µl je Kavität, 1 h, RT), anschließend 3 × waschen
- 100 µl der VP60-Kontrollen (SF9-Pos und SF9-Neg, jeweils 1:10 verdünnt) und Proben auftragen
- Inkubation bei 37 °C, 1 h, anschließend 3 × waschen
- 100 µl anti-RHDV-mAK-Mix (Maus), 1:200 verdünnt in PBST + 5 % Pferdeserum, Inkubation bei 37 °C, 1 h, anschließend 3 × waschen
- 100 µl anti-Maus-IgG-POD (Sigma-Aldrich) 1:3000 verdünnt in PBST + 5 % Pferdeserum, Inkubation bei 37 °C, 1 h, anschließend 3 × waschen
- 100 µl Substrat (TMB); Inkubation von exakt 10 Minuten bei Raumtemperatur
- Abstoppen der Reaktion mit je 100 µl 0,25 M Schwefelsäure und Messen der Extinktion

### **B 2.4.3 Cyanophycin-ELISA**

Für die Entwicklung eines Quantifizierungssystems für die Modellsubstanz Cyanophycin wurde zum einen pflanzenexprimiertes Cyanophycin aus Kartoffeln und zum anderen aus transgenen *E. coli*-Zellen stammendes Protein herangezogen. Das transgen von der *Desulfitobacterium hafniense*-Cyanophycin-Synthetase in *E. coli* produzierte Cyanophycin ist teilweise wasserlöslich (Ziegler *et al.* 2002, Neumann *et al.* 2005). Diese Substanz kam für die Antikörperproduktion im Kaninchen und im Huhn zum Einsatz. Als Standardmaterial im Quantifizierungssystem ELISA fand Cyanophycin aufgereinigt aus *E. coli* und aus Cyanophycin-exprimierenden Kartoffeln (siehe B 2.2.2) Anwendung.

Aufgrund der schlechten Löslichkeit der Substanz Cyanophycin unter physiologischen Bedingungen, war lediglich die Entwicklung eines direkten ELISA-basierten Quantifizierungssystems möglich.

Durchführung des direkten Cyanophycin-ELISA:

- Beschichtung mit Cyanophycin-Standardreihe (gereinigt aus Kartoffeln, Konzentrationen von 1 - 64 µg/ml 0,1 M HCl) und Proben (extrahiert in 0,1 M HCl), 50 µl je Kavität
- Inkubation in feuchter Kammer bei 4 °C, ü. N., anschließend 3 × waschen
- 50 µl biotinylierten anti-Cyanophycin-Detektionsantikörper (c = 3 µg/ml in PBS)
- Inkubation für 1 h bei 37 °C, anschließend 3 × waschen
- 50 µl Streptavidin-POD Konjugat (1:30.000 in KVP) je Kavität auftragen
- Inkubation für 1 h bei 37 °C, anschließend 3 × waschen
- 100 µl Substrat (TMB); Inkubation von exakt 10 Minuten bei Raumtemperatur
- Abstoppen der Reaktion mit je 100 µl 0,25 M Schwefelsäure und Messen der Extinktion

#### **B 2.4.4 NPTII-ELISA**

Für die Produktion der anti-NPTII-Antikörper kamen zum einen aus Inclusionbodies aufgereinigtes NPTII und zum anderen ein synthetisches Polypeptid (siehe B 2.2.1) zum Einsatz. Zur Immunisierung von zwei Kaninchen mit dem kompletten aus Inclusionbodies renaturiertem Protein wurde diese zuvor mithilfe einer präparativen Elektrophorese weiter aufgereinigt. Die NPTII-Bande wurde aus dem SDS-PAGE-Gel ausgeschnitten, zerkleinert und den Kaninchen subkutan appliziert.

Variante 1 - Durchführung des NPTII-ELISA:

- Beschichtung mit anti-NPTII-AK (aus Kaninchen, welches mit NPTII aus Inclusionbodies immunisiert wurde) (50 µl je Kavität, c = 2,0 µg/ml in 0,05 M Carbonat-Puffer, pH 9,6)
- Inkubation in feuchter Kammer bei 4 °C, ü. N., anschließend 1 × waschen
- 50 µl der Proben auftragen
- Inkubation bei 37 °C, 1 h, anschließend 3 × waschen
- 50 µl biotinylierten anti-NPTII-Detektionsantikörper (aus Kaninchen, welches mit synthetischen Polypeptid immunisiert wurde; c = 5 µg/ml in PBS)
- Inkubation bei 37 °C, 1 h, anschließend 3 × waschen
- 50 µl Streptavidin-POD Konjugat (1:30.000 in KVP) je Kavität auftragen
- 100 µl Substrat (TMB); Inkubation von exakt 10 Minuten bei Raumtemperatur
- Abstoppen der Reaktion mit je 100 µl 0,25 M Schwefelsäure und Messen der Extinktion

In einer weiteren Variante wurden zwei kommerziell erhältliche anti-NPTII-Kaninchen-Antikörper eingesetzt (Sigma-Aldrich, N6537 und N6412). Diese Antikörper sind ebenfalls unter Verwendung zweier synthetischer Polypeptide in Kaninchen hergestellt worden. Der Antikörper N6412 wurde für den Einsatz im Sandwich-ELISA biotinyliert.

Variante 2 – Durchführung des NPTII-ELISA mit kommerziellen Antikörpern:

- Beschichtung mit anti-NPTII-AK (N6537) (50 µl je Kavität, 1:1000 (c = 4,4 µg/ml) verdünnt in 0,05 M Carbonat-Puffer, pH 9,6)
- Inkubation in feuchter Kammer bei 4 °C, ü. N., anschließend 1 × waschen
- 50 µl der Proben auftragen
- Inkubation bei 37 °C, 1 h, anschließend 3 × waschen
- 50 µl biotinylierten anti-NPTII-Detektionsantikörper (N6412), 1:500 in PBS (c = 2 µg/ml)
- Inkubation bei 37 °C, 1 h, anschließend 3 × waschen
- 50 µl Streptavidin-POD Konjugat (1:30.000 in KVP) je Kavität auftragen
- 100 µl Substrat (TMB); Inkubation von exakt 10 Minuten bei Raumtemperatur
- Abstoppen der Reaktion mit je 100 µl 0,25 M Schwefelsäure und Messen der Extinktion

#### **B 2.5 Proteinstabilitätsuntersuchung**

Nach den Richtlinien der EFSA und der FAO/WHO sind Untersuchungen zur Stabilität der in den GMP neu exprimierten Proteine gegen den Verdau durch Pepsin durchzuführen, da davon ausgegangen wird, dass eine Korrelation zwischen der Stabilität von Proteinen

gegenüber Verdau und dem allergenen Potenzial besteht (Astwood *et al.* 1996). Die Stabilität von Proteinen gegen Enzyme bzw. Vorgänge des Verdauens kann *in vitro* und *in vivo* untersucht werden.

Für die *in vitro*-Untersuchung wurden 30 g Kartoffelyophilisat in 100 ml Aqua dest. resuspendiert. Dem Ansatz wurden 60 ml einer Pepsinlösung (2 g/L, gelöst in 0,1 M HCl, pH = 2,0) hinzugegeben. Während der Inkubation des Ansatzes in einem Wasser-Schüttelbad bei 37 °C wurden nach definierten Zeiten Proben von jeweils 5 ml entnommen. Diese wurden zur Neutralisation (pH 7,0) in Probengefäße mit einer Vorlage von 0,2 M NaHCO<sub>3</sub>-Lösung pipettiert und bis zur weiteren Bearbeitung auf Eis gelagert. Nach Zentrifugation der Proben (10.000 × g, 20 Minuten, 4 °C) konnte der Überstand mittels Sandwich-ELISA (siehe B 2.4) auf noch vorhandene transgenkodierte Proteine oder immunogen wirkende Bruchstücke untersucht werden.

Für die Untersuchung der Stabilität der Modellsubstanz Cyanophycin gegen den proteolytischen Verdau durch Pepsin wurde eine saure Extraktion des Kartoffelyophilisates mit 0,1 M HCl durchgeführt. Vorab wurden alle unter physiologischen Bedingungen löslichen Bestandteile mittel 3-facher Extraktion des Materials in PBS gelöst und verworfen. Zu 3 ml saurem Extrakt wurden 6 ml Pepsinlösung gegeben und anschließend bei 37 °C inkubiert. Nach definierten Zeitpunkten wurden Proben entnommen, welche sofort, ohne sie zu neutralisieren, eingefroren wurden, um sie später im Bradford-Assay auf den Proteingehalt zu untersuchen.

Für die *in vivo*-Untersuchung der Stabilität der Modellproteine gegen Verdau wurden bei der Firma Primacyt GmbH, Schwerin Tierfütterungsstudien an Ratten durchgeführt. Dazu wurden Lyophilisate der GMP und der nahen isogenen Varianten zu unterschiedlichen Anteilen (0, 5 und 15 %) dem Tierfutter beigemischt und den Tieren als alleiniges Futter zur Verfügung gestellt. In Stoffwechselkäfigen konnten die Kot- und Urinproben getrennt gesammelt werden. Diese wurden bis zur weiteren Untersuchung auf Vorhandensein transgener Proteine, bei -20 °C gelagert. Für die Untersuchung der Kot- und Urinproben auf transgenkodierte Proteine oder immunogen wirksame Bruchstücke der Modellproteine kamen die unter B 2.4 beschriebenen ELISA-Systeme zum Einsatz. Die Urinproben wurden unverdünnt untersucht und die Kotproben wurden vor der Quantifizierungsanalyse mit PBS extrahiert. Zur Extraktion der Kotproben wurden Mengen von etwa 1 g in 15 ml Röhrchen eingewogen und mit exakt der 5-fachen Menge PBS versetzt. Die Ansätze wurden für 1 Minute gevortext und anschließend für 5 Minuten bei 3000 × g zentrifugiert. Die Quantifizierung der Modellproteine in den Überständen erfolgte mittels ELISA.

Zur Detektion der Modellsubstanz Cyanophycin wurden die Kotproben mit 0,1 M HCl extrahiert. Die Kotextrakte der mit Cyanophycinmaterial gefütterten Tiere wurde vergleichend mit Kotextrakten der Tiere, die mit Normalfutter oder mit Material der nahen isogenen Kartoffellinie gefüttert wurden auf den Proteingehalt unter Verwendung des Bradford-Assay untersucht.

## **B 2.6 Sequenzvergleich mit bekannten Allergenen**

Für Studien der Sequenzhomologie der untersuchten Modellproteine zu bekannten Allergenen stehen eine Reihe internetbasierter Programme zur Verfügung. Allen Programmen gemeinsam ist, dass die untersuchten Sequenzen im FASTA-Format in das

Suchfenster eingegeben werden. Das FASTA-Format ist ein Text aus Nukleinsäure- oder Aminosäuresequenzen, das im Einbuchstabencode (single letter code) geschrieben wird.

Das FASTA-Format geht aus dem von Lipman und Pearson entwickelten FASTA Nukleinsäuren- bzw. Aminosäuresequenz-Abgleich-Programm hervor. Der FASTA-Algorithmus wurde 1985 für Proteine entwickelt und 1988 auf Nukleotide erweitert (Lipman und Pearson 1985, 1988). Das FASTA-Alignment-Programm sucht nach Ähnlichkeiten zwischen Sequenzen oder vergleicht gegebene Sequenzen mit Sequenz-Datenbanken.

Zur Untersuchung der Sequenzhomologien der Modellproteine zu bekannten Allergenen in Anlehnung an die FAO/WHO (2001) Richtlinie, wurden die Datenbanken SDAP, EVALLER™, Allermatch™, Farrp, PIR und SwissProt herangezogen. In der Richtlinie wird geraten Allergene zu identifizieren, die eine Homologie mit den Modellproteinen von 35 % in einem Fenster von 80 Aminosäuren bzw. eine Identität von 6 aufeinanderfolgenden Aminosäuren aufweisen.

**SDAP** (<http://fermi.utmb.edu/SDAP/index.html>; Stand 09/2011)

Die Datenbank SDAP (Structural Database of Allergenic Proteins) ist eine Internet-Datenbank, die von der University of Texas Medical Branch (UTMB) betrieben wird. Neben Sequenzen allergener Proteine können eine Reihe von Computer-Werkzeugen zur Untersuchung der biologischen Struktur von Proteinen oder zur Untersuchung auf Kreuzreaktivität von neuen oder transgenkodierte Proteinen mit bekannten Allergenen genutzt werden. Die SDAP-Datenbank beinhaltet Informationen zu Allergen-Namen, Quellen, Sequenz, Struktur, teilweise IgE-Epitope, Literaturangaben und links zu den größten Protein- (PIR, PDB, Swiss-Prot, NCBI) und Literaturservern (Pubmed, Medline).

**EVALLER™** (<http://www.slv.se/en-gb/Group1/Food-Safety/e-Testing-of-protein-allergenicity/>; Stand 09/2011; Martinez, *et al.*, 2007)

EVALLER™ ist ebenfalls eine Internet-Datenbank, welche die bioinformatische Beurteilung von Proteinen auf ihre potenzielle Allergenität vom Typ I anhand der Sequenzhomologien zu bekannten Allergenen ermöglicht. Die in der EVALLER™ Datenbank hinterlegten Aminosäuresequenzen stammen aus öffentlich zugänglichen Katalogen allergener Proteine wie Allergome ([www.allergome.org](http://www.allergome.org)), der Allergenliste des IUIS (International Union of Immunological Societies) Allergen Nomenclature Subcommittee ([www.allergen.org/List.htm](http://www.allergen.org/List.htm)), dem Food Allergy Research and Resource Program (Farrp) (<http://www.allergenonline.org/>), der Seite "The Allergen Database" (<http://allergen.csl.gov.uk/>) und der Datenbank für Lebensmittelallergene pflanzlichen Ursprungs - Protall (<http://www.ifr.ac.uk/protall/>).

Die verfügbaren Sequenzen in diesen Katalogen werden typischerweise über die Server UniProt (<http://www.uniprot.org/>), einer der Unterverzeichnisse (SwissProt, TrEMBL oder PIR) oder vom European Bioinformatics Institute (EBI) search services (<http://www.ebi.ac.uk>) bezogen.

Die Datenbank wird betrieben von der Universität Uppsala, der Schwedischen Universität der Agrarwissenschaften - SLU in Uppsala und der schwedischen nationalen Lebensmittelbehörde Livsmedelsverket.

**Allermatch™** (<http://www.allermatch.org/>; Stand 09/2011; Fiers *et al.*, 2004)

Die Allermatch™-Datenbank wird von der Universität und Forschungszentrum Wageningen UR betrieben.

Die Proteinsequenzen der Allermatch™ Datenbank stammen aus öffentlich zugänglichen Datenbanken wie SwissProt, GenPept (NCBI), und PIR und wurden teilweise modifiziert (Pro- oder Signalpeptide entfernt).

**AllergenOnline** (<http://www.allergenonline.org/>; Stand 09/2011)

AllergenOnline wurde entwickelt und wird betrieben durch das Food Allergy Research and Resource Program (Farrp) des Departments of Food Science and Technology der Universität von Nebraska in Lincoln.

Farrp wurde 1995 als Kooperationsprojekt zwischen der Universität von Nebraska und 7 Industriepartnern gegründet. Heute hat das Programm über 50 Mitgliedsfirmen. Das Programm arbeitet weltweit mit Forschungsinstitutionen, Behörden, Verbrauchergruppen und Wissenschaftlern zusammen, um Wissen und Erfahrungen auszutauschen und die Sicherheit von Lebensmittelprodukten für Verbraucher mit Lebensmittelallergien zu verbessern.

Die aktuelle AllergenOnline Version 11 (09/2011) beinhaltet 1491 überprüfte Sequenzen.

## **B 2.7 Serumscreening**

Zur Bewertung der potenziellen Allergenität transgener Pflanzen, die als Lebens- oder Futtermittel Verwendung finden sollen, sollten die Quelle des Spenders der genetischen Information sowie der Empfängerorganismus in der Untersuchung berücksichtigt werden (IFBC/ILSI 1996, FAO/WHO 2001, EFSA 2006). Da die Quellen der in dieser Arbeit untersuchten transgenen DNA nicht als allergen bekannt sind, wurden keine Untersuchungen zu Kreuzreaktivitäten mit Seren von Patienten, die gegen die Quelle der genetischen Information in den GMP allergisch sind, durchgeführt. In behördlichen Richtlinien (EFSA 2006) wird empfohlen Seren von Patienten, die gegen die herkömmliche Vergleichspflanze allergisch sind, auf Reaktivität gegen die gentechnisch veränderte Pflanze (GMP) zu untersuchen.

Aus dem gefriergetrockneten Kartoffelmaterial der transgenen und der nahen isogenen Varianten wurden Extrakte zur Untersuchung auf allergene Effekte hergestellt. Durch ein Partnerlabor (Fachlabor für Immunologie, Dr. Erwin Walraph; Neubrandenburg) wurden Untersuchungen zur IgE-Kreuzreaktivität der Extrakte mit Kartoffelallergikerseren durchgeführt. Mit dieser Untersuchung sollte analysiert werden, ob die Patientenseren Unterschiede in der Reaktivität mit transgenem und nahe isogenem Pflanzenmaterial aufzeigen.

Untersuchungen zur Kreuzreaktivität der Modellproteine mit sequenzhomologen bekannten Allergenen (siehe B 2.6) wurden unter Mithilfe von Prof. Dr. Ollert der Technischen Universität München durchgeführt. Die Analysen erfolgten unter Verwendung des Systems ImmunoCAP® 250 der Firma Phadia. Das System arbeitet mit Reaktionskavitäten (ImmunoCAPs), die denen von ELISA-Platten ähneln. Im Gegensatz

zu ELISA-Kavitäten besitzen diese jedoch 3-dimensionale feste Phasen aus derivatisierter Cellulose. Durch die schwammartige Struktur ist die Bindungskapazität für Analyten um das bis zu 250-fache erhöht ([www.immunocapinvitrosight.com](http://www.immunocapinvitrosight.com), 09/2010).

In einem ersten Schritt der Analyse auf Kreuzreaktivität der Modellproteine und bekannten Allergenen wurden Patientenserum mit Reaktivität gegen das sequenzhomologe Allergen (siehe B 2.6) identifiziert. Anschließend wurde biotinyliertes Modellprotein an Streptavidin-aktivierte ImmunoCAPs gebunden, welche zur Untersuchung der IgE-Kreuzreaktivität der selektierten Seren mit dem Modellprotein herangezogen wurden.

Kopplung des Modellproteins an Streptavidin-aktivierte ImmunoCAPs:

- Biotinylierung des Modellproteins (vgl. Biotinylierung von Antikörpern - B 2.3.1)
- 3 × waschen der ImmunoCAPs mit je 200 µl PBS, Zentrifugation der CAPs (300 × g, 5 Minuten, RT)
- 50 µl des biotinylierten Proteins (c = 0,2 mg/ml in PBS) in jedes CAP
- Inkubation bei 37 °C, 1 h, anschließend Zentrifugation (300 × g, 5 Minuten, RT) und 3 × waschen mit je 200 µl PBS
- 50 µl PBS mit 0,02 % NaN<sub>3</sub> in jedes CAP, Lagerung der konjugierten CAPs bei 4 °C

## B 2.8 Tierstudien

Zur Untersuchung der potenziellen Allergenität vom Soforttyp der verwendeten Modellpflanzen wurden Labortierversuche mit systemischer und oraler Applikation an den beiden Spezies *Brown Norway Ratte (BN Ratte)* und *Balb/c Maus* durchgeführt.

### B 2.8.1 Orale Applikation

Für die Untersuchung der allergenen Wirkung nach oraler Applikation wurden *BN Ratten* mit einem Gewicht von 100 - 150 g verwendet. Pro Versuchsgruppe wurden 10 Tiere (in Vorversuchen 5 weibliche und 5 männliche, in nachfolgenden Versuchen lediglich weibliche Tiere) eingesetzt. Die Tiere bekamen Trockenfutter, dem 20 % Kartoffellyophilisat beigemischt wurde, über einen Zeitraum von 42 Tagen. Vor Beginn und nach Ablauf des Versuches wurden den Tieren Blutproben entnommen und daraus Seren gewonnen, welche bis zur weiteren Untersuchung bei - 20 °C lagerten.

Futterherstellung:

Für die Fütterungsversuche wurde lyophilisiertes Kartoffelmateriale dem Normalfutter zu 20 % beigemischt. Die Kartoffelmateriale, mit den gleichen zu untersuchenden Modellproteinen wurden gepoolt (siehe

Tabelle B 2.2)

Die Zutaten (siehe B 1.3) werden miteinander vermengt, in einer Schicht der Dicke von ca. 0,5 cm auf Aluminiumfolie ausgebreitet und in Stücke von ca. 2 × 2 cm geschnitten. Diese wurden bei Raumtemperatur getrocknet.

**Tabelle B 2.2: Futterherstellung für Allergenitätsstudien (orale Applikation)**

Futterbezeichnung	Enthaltene Lyophilisate
A-NIV	<i>Albatros</i> - nahe isogene Variante
A-I	<i>Albatros-CTxB-204</i> <i>Albatros-CTxB-218</i>
A-II	<i>Albatros-35S-205</i>
A-III	<i>Albatros-PsbY-cyel-12</i> <i>Albatros-PsbY-cyel-23</i>
D-NIV	<i>Desiree isogener Typ</i>
D-I	<i>Desiree-35S-6</i>
D-II	<i>Desiree-VP60-SEK-6</i> <i>Desiree-VP60-SEK-17</i>

Das zubereitete, getrocknete Futter wurde durch das Labor für Lebensmittelanalytik der Firma auf BIOSERV A. & M. GmbH in Rostock auf seine Nährwerte untersucht, um sicherzustellen, dass durch die Kartoffeldiät keine Mangelernährung bei den Labortieren auftritt. Die Parameter Fett, Protein, Wasseranteil, Asche, Trockenmasse, Kohlenhydrate, Brennwert, Ballaststoffe, und Kochsalz wurden bestimmt.

### B 2.8.2 Systemische Applikation

Für die Untersuchung der allergenen Wirkung nach systemischer Applikation wurden *Balb/c Mäuse* mit einem Gewicht von 15 - 25 g verwendet. Pro Versuchsgruppe kamen 10 Tiere (5 weibliche und 5 männliche) zum Einsatz.

Von den Kartoffellyophilisaten wurden Extrakte in physiologischer Pufferlösung (PBS) hergestellt und die Gesamt-Konzentration der löslichen Proteine (TSP = total soluble protein) bestimmt. Die Proteinbestimmung wurde mit einem Mikrotiterplatten-Assay nach der Biuret-Methode bestimmt.

Für jede untersuchte Variante kamen im Labortierversuch drei verschiedene Proteinkonzentrationen zum Einsatz, die mit physiologischer Pufferlösung eingestellt wurden (0,1; 1,0 und 10,0 mg TSP/ml). Als Positivkontrolle diente ein Protein mit bekannter allergener Wirkung - Ovalbumin (OVA, Konz.: 1,0 mg/ml) (Sampson *et al.* 1996).

Die Applikation der Extrakte an den Mäusen erfolgte einmal wöchentlich *intra peritoneal* (i.p. = in die Bauchhöhle) in definierten Volumina (10 µl/g Körpergewicht). Vor Beginn und nach Ablauf des Versuches wurden den Tieren Blutproben entnommen und daraus Seren gewonnen, welche bis zur weiteren Untersuchung bei - 20 °C lagerten.

### B 2.9 IgE - Bestimmung

Die Bestimmung der Gesamt-IgE-Titer (IgE) in den Seren der Versuchstiere wurde mit kommerziellen ELISA-Kits durchgeführt. Für die Konzentrationsbestimmung in Mäuseserum wurde das Kit „BD OptEIA™ Set Mouse IgE“ (BD Biosciences) eingesetzt. Die Bestimmung des Gesamt-IgE-Titers im Serum der Ratten erfolgte mit dem „Rat IgE ELISA Quantitation Kit“ (BETHYL Laboratories, Inc.).

Zur Analyse der Seren der Labortiere auf spezifischen IgE-Antikörper (sIgE) wurden eigene Assays auf ELISA-Basis etabliert.

#### Durchführung des BD OptEIA™ Set Mouse IgE:

- Beschichtung mit anti-Maus-IgE-Antikörper (100 µl je Kavität, verdünnt 1:250 in Carbonatpuffer, pH 9,6)
- Inkubation ü. N. in feuchter Kammer bei 4 °C, anschließend 3 × waschen mit 200 µl PBST
- Blocken der freien Bindungsstellen mit Assay Diluent (200 µl je Kavität, 2 h bei RT), anschließend 3 × waschen mit 200 µl PBST
- Auftragen der in Assay Diluent verdünnten Standards (1,6 - 100 ng/ml) und Proben (1:100) in Doppelbestimmung, jeweils 100 µl
- Inkubation bei 37 °C, 1 h, anschließend 5 × waschen mit 200 µl PBST
- 1 h Inkubation (37 °C) mit biotinyliertem anti-Maus-IgE (aus Ratte, 1:500 verdünnt in Assay Diluent) und Streptavidin-POD-Konjugat (1:250 in Assay Diluent)
- 7 × waschen (je Kavität 200 µl PBST)
- Detektion mit TMB und Messung der Extinktion (450 und 630 nm)

#### Durchführung des spezifischen Maus-IgE-ELISA:

- Beschichtung mit Modellprotein (50 µl je Kavität, 2 µg/ml in 1×PBS)
- Inkubation ü. N. in feuchter Kammer bei 4 °C, anschließend 3 × waschen mit 200 µl PBST
- Blocken der freien Bindungsstellen mit Assay Diluent (200 µl je Kavität, 2 h bei RT), anschließend 3 × waschen mit 200 µl PBST
- 50 µl der Seren der sensibilisierten Mäuse (1:10 in Assay Diluent) in oberste Reihe der ELISA-Platte auftragen, in 1:2-Schritten weiterverdünnen
- Inkubation bei 37 °C, 1 h, anschließend 3 × waschen mit 200 µl PBST
- 1 h Inkubation (37 °C) mit POD-konjugiertem anti-Maus-IgE (BETHYL, aus Ziege, 1:2000 verdünnt in Assay Diluent)
- 3 × waschen (je Kavität 200 µl PBST)
- 100 µl Substrat (TMB); Inkubation von exakt 10 Minuten bei Raumtemperatur
- Abstoppen der Reaktion mit je 100 µl 0,25 M Schwefelsäure und Messen der Extinktion
- relative Quantifizierung des spezifischen IgE-Titers in den Proben anhand der Extinktion (450 nm)

#### Durchführung des Rat IgE ELISA Quantitation Kit:

- Beschichtung (100 µl je Kavität anti-Ratte-IgE-AK (verdünnt in 0,05 M Carbonat-Puffer, pH 9,6)
- Inkubation bei 37 °C, 1 h, anschließend 3 × waschen mit Waschlösung (200 µl je Kavität)
- Inkubation bei RT, 30 Minuten mit Blocklösung (200 µl je Kavität), anschließend 3 × waschen mit Waschlösung
- Inkubation für 1 h bei RT mit 100 µl der Standards (0,78 - 50 ng/ml in Proben Diluent) und Seren der sensibilisierten Ratten (1:200 in Proben Diluent) in Doppelbestimmung

- 5 × waschen mit Waschlösung
- Inkubation für 1 h bei RT mit 100 µl je Kavität mit POD-konjugiertem anti-Ratten-IgE-AK (1:2000 in Proben Diluent)
- 5 × waschen mit Waschlösung
- 100 µl Substrat (TMB); Inkubation von exakt 10 Minuten bei Raumtemperatur
- Abstoppen der Reaktion mit je 100 µl 0,25 M Schwefelsäure und Messen der Extinktion (450 nm)

Durchführung des spezifischen Ratten-IgE-ELISA:

- Durchführung wie spezifischer Maus-IgE-ELISA, jedoch:
  - Proben der sensibilisierten Ratten auftragen
  - Nachweis mit POD-konjugiertem anti-Ratte-IgE-AK (BETHYL, aus Ziege, 1:2000 in Assay Diluent)

### **B 2.10 Hexosaminidase – Assay**

Der von Hoffmann *et al.* (1997) beschriebene zellbasierte *in vitro*  $\beta$ -Hexosaminidase-Assay wurde zur Allergenitätsprüfung von GMP herangezogen. Der Test dient dem quantitativen Nachweis von spezifischem IgE, dass frei im Serum sensibilisierter Tiere und nicht gebunden an Mastzellen oder basophilen Zellen vorliegt. Der Test basiert auf der spezifischen Bindung von freiem IgE an den hoch affinen Fc $\epsilon$ RI-Rezeptor auf basophilen Zellen. Wird von den gebundenen IgE-Antikörpern das zugegebene Allergen erkannt und gebunden und existieren am Allergen mehr als ein Epitop, kommt es zu einer Quervernetzung der IgE-Immunglobuline, was zu einer Freisetzung von  $\beta$ -Hexosaminidase aus den Zellen führt.

Für den *in vitro*-Assay wurden basophile Ratten Leukämie Zellen (RBL-Zellen; DSMZ ACC 312) in einem Zellkulturmedium aus 70 % MEM Medium, 20 % RPMI 1640 Medium und 10 % FKS bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

Die RBL-Zellen wurden in einer Dichte von 10<sup>5</sup> Zellen/Kavität in 200 µl Medium in einer 96-well-Mikrotiterplatte ausgesät. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> konnte das Zellkulturmedium entfernt und das Serum der sensibilisierten Ratten und Mäuse in den Verdünnungen 1:50 und 1:100 (verdünnt in Zellkulturmedium) auf die Zellen gegeben werden. Als Positiv- und Funktionskontrolle des Assays diente eine Maus-IgE-Lösung (BD Bioscience, 1:50 in Zellkulturmedium). Während einer einstündigen Inkubation bei 37 °C, fand die Bindung der frei im Serum vorliegenden IgE-Antikörper an die Fc $\epsilon$ RI-Rezeptoren an der Oberfläche der basophilen Zellen statt. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen 4 × mit 200 µl Tyrode's Puffer gewaschen. Das Allergen wurde in Konzentrationen von 0,01 mg/ml, 0,1 mg/ml und 1,0 mg/ml in Tyrode's Puffer zu 100 µl je Kavität zu den Zellen pipettiert und die Mikrotiterplatte für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Zellen der Positivkontrolle wurden mit einer Lösung von anti-Maus-IgE (Ratte, BD Pharmingen) 1:1000 verdünnt in Tyrode's Puffer behandelt. Als Negativkontrolle, die zur Bestimmung der Spontanfreisetzung von Hexosaminidase diente, wurden 100 µl Tyrode's Puffer, der kein Allergen enthielt in Doppelbestimmung auf die Zellen gegeben. Je Kavität wurden 60 µl des Überstandes entnommen und in eine neue Mikrotiterplatte überführt. Anschließend wurden die Zellen 3 × mit 200 µl Tyrode's Puffer gewaschen, bevor je Kavität 60 µl einer Lösung von 0,1 %-igem Triton-X-100 in Tyrode's Puffer hinzupipettiert wurde, was zu einer Lyse der Zellen und zu einem

Freisetzen der restlichen Hexosaminidase führte. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C wurden erneut jeweils 60 µl der Überstände in eine neue Mikrotiterplatte überführt. Den Überständen wurden jeweils 25 µl des Substrates pNAG (1,3 mg/ml p-nitrophenyl N-acetyl-glucosaminid in 0,1 M Citratpuffer, pH 4,5) hinzugegeben. Der Umsatz des Substrates durch das Enzym Hexosaminidase resultierte in einer gelben Farbreaktion. Die enzymatische Reaktion wurde nach einer Inkubation von 90 Minuten bei 37 °C durch Zugabe von je 100 µl 0,2 M Glycinlösung (pH 10,7) beendet. Die Farbreaktion konnte bei 405 nm und 630 nm als Referenzwellenlänge gemessen werden. Die Ergebnisse wurden als Prozentsatz der durch Sensibilisierung freigesetzten Menge durch totale Freisetzung minus spontane Freisetzung an β-Hexosaminidase dargestellt.

Formel: 
$$F_s [\%] = \frac{E_s}{E_{TF} - E_{SF}} * 100 \%$$

$F_s$  - Prozentsatz der Hexosaminidase-Freisetzung durch Sensibilisierung der Zellen

$E_s$  - Extinktion Hexosaminidase-Freisetzung durch Sensibilisierung der Zellen

$E_{TF}$  - Extinktion bei totaler Freisetzung

$E_{SF}$  - Extinktion bei spontaner Freisetzung

### B 2.11 Basophiler Degranulationstest

Der „Basophile Degranulationstest“ (BASOTEST®) aus der Humandiagnostik wurde zur Allergenitätsprüfung mit einem Tiermodell herangezogen. Der Test basiert auf der Allergen-induzierten Aktivierung basophiler Granulozyten und der Stimulierung von Aktivierungsmarkern auf der Oberfläche von basophilen Zellen. Durch die Aktivierung der basophilen Zellen wird beispielsweise die Expression der Oberflächenmarker CD63 (Glycoprotein gp53) und des Ectoenzym CD203c (E-NPP3; PD-Iβ; B10; gp130<sup>RB13-6</sup>, PDNP3) induziert (Bühring *et al.* 2006).

Die Aktivierung der Basophilen erfolgt über die Quervernetzung der fixierten IgE-Antikörper (siehe B 2.10). Auf der Oberfläche der basophilen Zellen befinden sich hochspezifische Rezeptoren (FcεRI), an denen IgE-Antikörper binden können. Liegt eine Allergie vom Soforttyp gegen ein bestimmtes Allergen vor, so werden die von den Plasmazellen gebildeten sIgE-Antikörper, die gegen das Allergen gerichtet sind, an die Oberfläche von Mastzellen und basophilen Zellen gebunden. Bei einem wiederholten Allergenkontakt, werden die Allergene von den an der Oberfläche befindlichen IgE-Antikörpern erkannt und es kommt zu einer Vernetzung der Antikörper, welche zu einer Aktivierung der Zellen führt. Nachfolgend kommt es zu einer Fusion cytoplasmatischer Granula mit der Plasmamembran und zur Freisetzung allergiespezifischer Zellprodukte (u.a. Histamin, welches zu Entzündungsreaktionen führt) und zu einer Induzierung bestimmter Oberflächenmoleküle (CD63, CD203c). Weiterhin synthetisieren basophile Zellen durch Abspaltung von Fettsäuren aus den Triglyceriden der Zellmembran Allergie-Mediatoren aus der Gruppe der Leukotriene (LT). Die Form LTC4 (wird zusammen mit seinen Metaboliten LTD4 und LTE4 freigesetzt) kann mittels ELISA quantifiziert und als Indikator für eine vorliegende Allergie herangezogen werden.

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS) können aktivierte basophile Zellen (exprimieren allergiespezifische Oberflächenmoleküle) von nicht aktivierten basophilen Zellen unterschieden werden. Die Oberflächenmoleküle (CD63 oder CD203c) werden mit

spezifischen Antikörpern, an die spezielle Farbmoleküle gebunden sind, markiert. Die Gesamtheit der basophilen Zellen wird mit Hilfe von gegen den FcεRI-Rezeptor (bzw. gegen gebundenes IgE) gerichteten Antikörpern markiert. Im FACS-Gerät wird die Emission der verschiedenen Farbstoffe detektiert und es kann die Zahl der aktivierten basophilen Zellen der Zahl der nicht aktivierten basophilen Zellen gegenübergestellt werden.

Mit dieser Methode lässt sich eine Aussage über das Vorhandensein und die Intensität einer Allergie gegen das untersuchte Antigen treffen.

### B 2.11.1 Markierung von Antikörpern mit Fluoreszenzfarbstoffen

Für die durchflusszytometrische Bestimmung der basophilen Degranulation anhand von Ratten-spezifischen Antikörpern, wurden diese mit den beiden Fluoreszenzfarbstoffen FITC (Fluorescein-5-Isothiocyanate) (Anregung: 494 nm; Emission: 518 nm) und PE (Phycoerythrin) (Anregung: 564 nm; Emission: 575 nm) markiert.

Die Markierungen erfolgten zum einen mit dem „BioPAINT™ MINI FITC Antibody Labeling Kit“ der Firma IMGENEX und zum anderen mit dem „NH<sub>2</sub>-reactive B-Phycoerythrin Labeling Kit“ der Firma Abnova gemäß den Herstellerangaben.

In folgender Tabelle sind die verwendeten Antikörper und die zur Markierung genutzten Farbstoffe zusammengefasst.

**Tab. B 2.1: Antikörper-Markierung mit den Fluoreszenzfarbstoffen FITC und B-PE für durchflusszytometrische Analysen**

Antikörper	Herkunft, Konzentration	Markiert mit:
Purified Mouse IgG1; Isotype Control	- BD Deutschland (Art.-Nr.: BD 557273) - Konz.: 0,5 mg/ml	FITC B-PE
Purified Mouse anti-Rat High Affinity IgE Receptor (FcεRI)	- BD Deutschland (Art.-Nr.: BD 551469) - Konz.: 0,5 mg/ml	FITC
Purified Mouse anti-Rat-IgE	- BD Deutschland (Art.-Nr.: BD 551469) - Konz.: 0,5 mg/ml	FITC
Purified Mouse anti-Rat-CD63	- BD Deutschland (Art.-Nr.: BD 551458) - Konz.: 0,5 mg/ml	B-PE

Die Volumina der zu markierenden Antikörper wurden jeweils so bemessen, dass ein Vergleich der Reaktivität und Spezifität der Antikörper anhand der gleichen eingesetzten Menge gewährleistet werden konnte.

#### FITC-Markierung mit dem „BioPAINT™ MINI FITC Antibody Labeling Kit“

Der Farbstoff FITC wurde nach Zugabe von 1 ml DMSO durch vorsichtiges auf- und abpipettieren gelöst. Die FITC-Lösung wurde in Aliquoten zu je 100 µl in Eppendorfgefäßen bei - 80 °C gelagert.

Die zu markierenden Antikörper sollten in einem Puffer vorliegen, der kein Natriumazid, Tris oder Glycin enthält, damit das FITC nicht an Stickstoff dieser Substanzen bindet und wurden daher in Carbonatpuffer (pH 8,0 - 9,5) umgepuffert. Dazu wurden 100 µl der Antikörperlösung und 400 µl Carbonatpuffer in eine Filtrationseinheit, die sich in einem Eppendorfgefäß befand, pipettiert und 12 Minuten bei 7000 × g zentrifugiert. Die Filtrationseinheit wurde entnommen und über Kopf gedreht in ein unbenutztes Sammelröhrchen gestellt. Nach 1-minütiger Zentrifugation bei 7000 × g wurde das

Volumen der umgepufferten und aufkonzentrierten Antikörperlösung bestimmt und die Proteinkonzentration berechnet. Für die Kopplung sollte die Konzentration 2 - 3 mg/ml betragen. Anschließend wurde ein Aliquot der FITC-Lösung auf Raumtemperatur temperiert. Gemäß Herstellerangaben wurden etwa 1,4 µl der FITC-Lösung pro 100 µg Antikörper für die Kopplung eingesetzt. Nach vorsichtigem Mischen des Ansatzes fand die Inkubation lichtgeschützt auf einem Schüttler bei Raumtemperatur statt.

Die Herstellerangaben zur Abtrennung der ungebundenen FITC-Moleküle wurden leicht modifiziert. Nach der Inkubation der Antikörper mit der FITC-Lösung wurde der Ansatz in einen Eppendorf-Filtrationseinsatz pipettiert, der vorher mit Tris-Puffer gespült wurde. Dem Ansatz wurden 400 µl Tris-Puffer hinzupipettiert und anschließend 12 Minuten bei 7000 × g zentrifugiert. Der Filtrationseinsatz wurde anschließend umgekehrt in ein braunes 1,5 ml-Eppendorfgefäß gestellt und 1 Minuten bei 7000 × g zentrifugiert. Den markierten Antikörpern wurde Tris-Puffer hinzupipettiert, um ein Endvolumen von 200 µl zu erhalten.

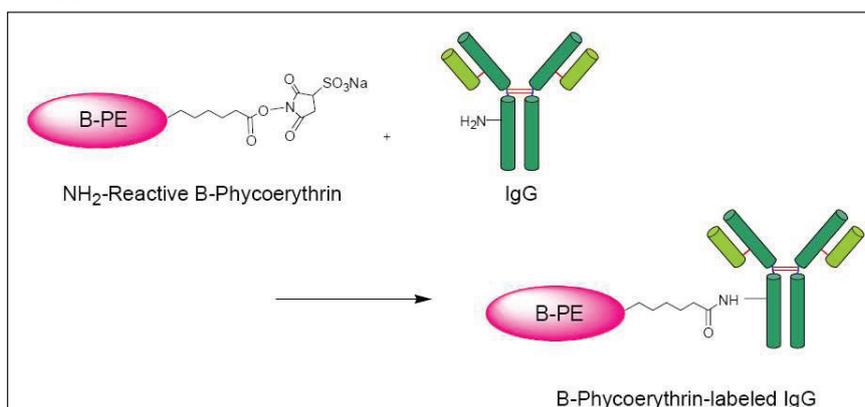
Von den markierten Antikörpern wurden die Absorptionen bei 280 nm (Proteinbestimmung) und 495 nm (Anregungswellenlänge) bestimmt, um die Antikörperkonzentration nach folgender Formel zu bestimmen.

$$\text{FITC-Konz.: } c_{\text{FITC-AK}} = \frac{(A_{280} - 0.35 * A_{495})}{1.4}$$

Die Antikörper lagerten bis zur Anwendung lichtgeschützt im Kühlschrank bei 4 °C.

#### PE-Markierung mit dem „NH<sub>2</sub>-reactive B-Phycoerythrin Labeling Kit“

Das NH<sub>2</sub>-reaktive B-PE hat aktivierte Estergruppen die kovalent an Aminogruppen des Zielmoleküls binden. Der Farbstoff hat eine orangefarbene Fluoreszenz mit einem Maximum bei 575 nm.



**Abbildung B.1:**  
**Reaktionsschema der**  
**Kopplung von NH<sub>2</sub>-**  
**reaktivem B-PE an**  
**Antikörper**

(Darstellung aus  
Markierungsvorschrift  
des „NH<sub>2</sub>-reaktive B-  
Phycoerythrin Labeling  
Kit“ der Firma Abnova)

Zur Kopplung wurden 100 µl Waschpuffer und 50 - 200 µg Antikörper (gelöst in einem Volumen von nicht mehr als 100 µl) in eine Filtrationseinheit pipettiert und in ein Eppendorfgefäß gestellt. Der Ansatz wurde durch auf- und abpipettieren durchmischt und anschließend für 10 Minuten bei 8000 × g zentrifugiert. Weitere 100 µl Waschpuffer wurden auf die Filtrationseinheit gegeben und ein zweites Mal bei 8000 × g für 10 Minuten zentrifugiert. Während der Zentrifugation konnte das B-PE in 10 µl Reaktionspuffer gelöst werden. Das gelöste B-PE wurde zu den gewaschenen Antikörpern in die

Filtrationseinheit pipettiert und mit Hilfe der Pipette vorsichtig durchmischt. Nach einer 2-stündigen Inkubation bei 37 °C wurden dem Ansatz 190 µl Waschpuffer hinzugegeben, durchmischt und zentrifugiert. Die markierten Antikörper konnten in Waschpuffer aufgenommen, in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 0 - 5 °C gelagert werden.

### **B 2.11.2 Sensibilisierung der Labortiere und Aufbereitung der Vollblutproben**

Für die Etablierung der Allergenitätsprüfung anhand FACS-gemessener basophiler Degranulation wurden 2 Gruppen von je 10 weiblichen *Brown Norway Ratten* zusammengestellt. Eine Gruppe erhielt Futter, dem zu 10 % (w/w) das Modell-Allergen Ovalbumin (OVA) beigemischt war. Die zweite Gruppe erhielt Normalfutter (Negativkontrolle). Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Futter und wurden über einen Zeitraum von 42 Tagen sensibilisiert.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden 2 Gruppen a 6 weiblicher *Brown Norway Ratten* zusammengestellt. Die Tiere der ersten Gruppe wurden systemisch (intra peritoneal) mit dem Allergen Ovalbumin (c = 10 mg/ml in PBS) sensibilisiert (1 ml/kg Körpergewicht). Den Tieren der zweiten Gruppe wurde lediglich PBS als Negativkontrolle appliziert.

Den narkotisierten Ratten wurde Blut aus dem Orbitalplexus entnommen und in Eppendorfgefäße überführt. Für die Lyse der Erythrozyten wurde ein Lysepuffer im Verhältnis 1:10 (v/v) aus 0,17 molarer Tris-Base-Lösung und 0,16 molarer Ammoniumchloridlösung hergestellt. Die Blutproben wurden innerhalb der Gruppen gepoolt und in Aliquote von je 2 ml in heparinisierten 15 ml-Röhrchen aufgeteilt. Den Aliquoten wurden jeweils 12 ml des Lysepuffers hinzugegeben und die Ansätze wurden 7 Minuten in einem Rotationsschüttler bei 20 rpm über Kopf geschwenkt. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation der Röhrchen bei 140 × g und Raumtemperatur wurde der Überstand vorsichtig dekantiert, das Zellpellet aufgeschüttelt und der Lysevorgang wiederholt. Die Zellpellets konnten in je 3 ml FACS-Puffer aufgenommen, gewaschen und zentrifugiert (140 × g, 10 Minuten) werden. Nach Resuspendieren der pelletierten Zellen wurden diese durch ein Metallsieb (200 mesh; 75 µm; Fa. Alfa Aesar) gegeben und in einer Petrischale aufgefangen. Nach Überführen der Zellsuspension in ein 15-ml-Röhrchen und 10-minütiger Zentrifugation bei 140 × g wurden die Zellen in Stimulationspuffer (enthält IL3, Heparin und Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>) aufgenommen und innerhalb der Gruppen gepoolt. Den beiden Ansätzen (Negativ- und Positiv-Gruppe) wurden jeweils 100 µl einer OVA-Lösung (c = 1 µg/ml) hinzugegeben und anschließend für 40 ± 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von jeweils 5 ml kalter Stopp-Lösung beendet und die Ansätze wurden in Aliquote aufgeteilt. Nach Zentrifugation (10 Minuten, RT, 140 × g) wurden die Überstände dekantiert und zur Leukotrienquantifizierung mittels ELISA aufbewahrt (-20 °C). Die Zellpellets wurden in jeweils 100 µl kaltem FACS-Puffer suspendiert und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die PE- bzw. FITC-markierten Antikörper hinzugegeben wurden. Die Inkubation der Zellen mit den Antikörpern erfolgte im Dunkeln für 30 ± 5 Minuten bei 4 °C. Nach Zugabe von je 1 ml FACS-Puffer und 10-minütiger Zentrifugation bei 140 × g wurden die Überstände verworfen und die Zellpellets in FACS-Puffer aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in jeweils 1 ml FACS-Puffer aufgenommen und bis zur Analyse am Durchflusszytometer bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt. Die Messung sollte innerhalb von 2 Stunden durchgeführt werden.

Die Leukotrienquantifizierung der Zellüberstände nach OVA-Sensibilisierung mittels ELISA erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers (NEOGEN). Die quantitative Bestimmung der Leukotriene C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> und E<sub>4</sub> beruht auf der kompetitiven Bindung eines Enzymkonjugates und den Leukotrienen in der Probe an eine begrenzte Anzahl von Bindungsstellen.

Durchführung des Leukotrien-ELISA:

- Je 50 µl der Standards (enzymkonjugierte Leukotriene C<sub>4</sub>/D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub>) und Proben in Doppelbestimmung auf Antikörper-beschichtete Mikrotiterplatte auftragen
- 50 µl verdünntes Enzymkonjugat in jede Kavität
- Inkubation bei RT, 1 h, anschließend 3 × waschen mit Waschlösung (200 µl je Kavität)
- 150 µl Substratlösung (TMB) je Kavität
- 30-minütige Inkubation bei RT, Abstoppen der Reaktion mit 50 µl 1 M HCl je Kavität
- Auswerten der Extinktionen bei 450 nm und 630 nm als Referenzwellenlänge

## C Ergebnisse

Zur Entwicklung der einzelnen Verfahren und des gesamten Systems zur Risikoanalyse von gentechnisch veränderten Pflanzen wurden acht transgene Konstrukte und vergleichend dazu zwei nahe isogene Varianten (*Albatros* und *Desiree*) der Modellpflanze *Solanum tuberosum* herangezogen. Die transgen exprimierten Proteine waren:

- das Virushüllprotein VP60 des Erregers der haemorrhagischen Kaninchenkrankheit und
- die nicht toxische Untereinheit CTxB des Choleraerregers *Vibrio cholerae* als Vertreter für rekombinante Impfstoffe aus dem Produktionssystem Pflanze,
- das nicht ribosomal produzierte Polypeptid Cyanophycin als Beispiel für einen in Pflanzen produzierten biologisch abbaubaren Rohstoff und
- das Enzym Neomycinphosphotransferase II als ein in der Pflanzengenetik oft verwendeter Selektionsmarker, der bereits gut untersucht ist. Diese Protein diente als Methodenkontrolle des kompletten Systems der allergologischen Risikoanalyse.

Mit Ausnahme von NPTII waren diese transgenen Proteine bisher nicht regulärer Teil der menschlichen und tierischen Nahrung. Viele Bakterien, die unter anderem auch im Darm angesiedelt sind, tragen das *nptII*-Resistenzgen (Smaller *et al.* 1993). Darüber hinaus enthielten für den Verzehr zugelassene transgene Pflanzen, wie z. B. die FLAVR SAVR Tomate des Unternehmens Calgene das Protein NPTII (Bruening *et al.* 2000, Redenbaugh *et al.* 1992).

Auch wenn bestimmte GMP nicht als Nahrungs- oder Futtermittel Verwendung finden sollen, müssen sie auf ihr allergenes Potenzial untersucht werden, um dieses „worst case scenario“ zu berücksichtigen (EFSA 2009).

### C 1 Entwicklung von Quantifizierungs-Assays zum Nachweis der Modellproteine

Ziel dieses Teilbereiches war die Etablierung von Quantifizierungsverfahren für die in den transgenen Kartoffeln exprimierten Modellproteine VP60, NPTII, CTxB und Cyanophycin. Für den quantitativen Nachweis dieser Proteine wurden verschiedene ELISA-Systeme unter Verwendung von polyklonalen und monoklonalen Antikörpern entwickelt. Für die Produktion der polyklonalen Antikörper in Hühnern und Kaninchen und zum Einsatz als Standardmaterial im Assay wurden die Proteine in aufgereinigter Form benötigt. Es kamen Proteine aus unterschiedlichen Produktionssystemen zum Einsatz.

#### C 1.1 Bereitstellung der Modellproteine

##### CTxB und VP60:

Ein aus dem Erreger *Vibrio cholerae* aufgereinigtes CTxB ist kommerziell erhältlich (Fa. Sigma Aldrich) und wurde zur Produktion polyklonaler anti-CTxB-Antikörper eingesetzt.

Das Modellprotein VP60 wurde durch das Friedrich Loeffler Institut (FLI) – Insel Riems in einem Baculovirus/ Insektenzellkultur-System produziert und als Lyophilisat zur Verfügung gestellt. Des Weiteren kam der kommerzielle Impfstoff RIKA-VACC® (Riemser

Arzneimittel AG), der aus der Leber RHD-Virus-infizierter Kaninchen gewonnen wird, zur Produktion von anti-VP60-Antikörpern zum Einsatz.

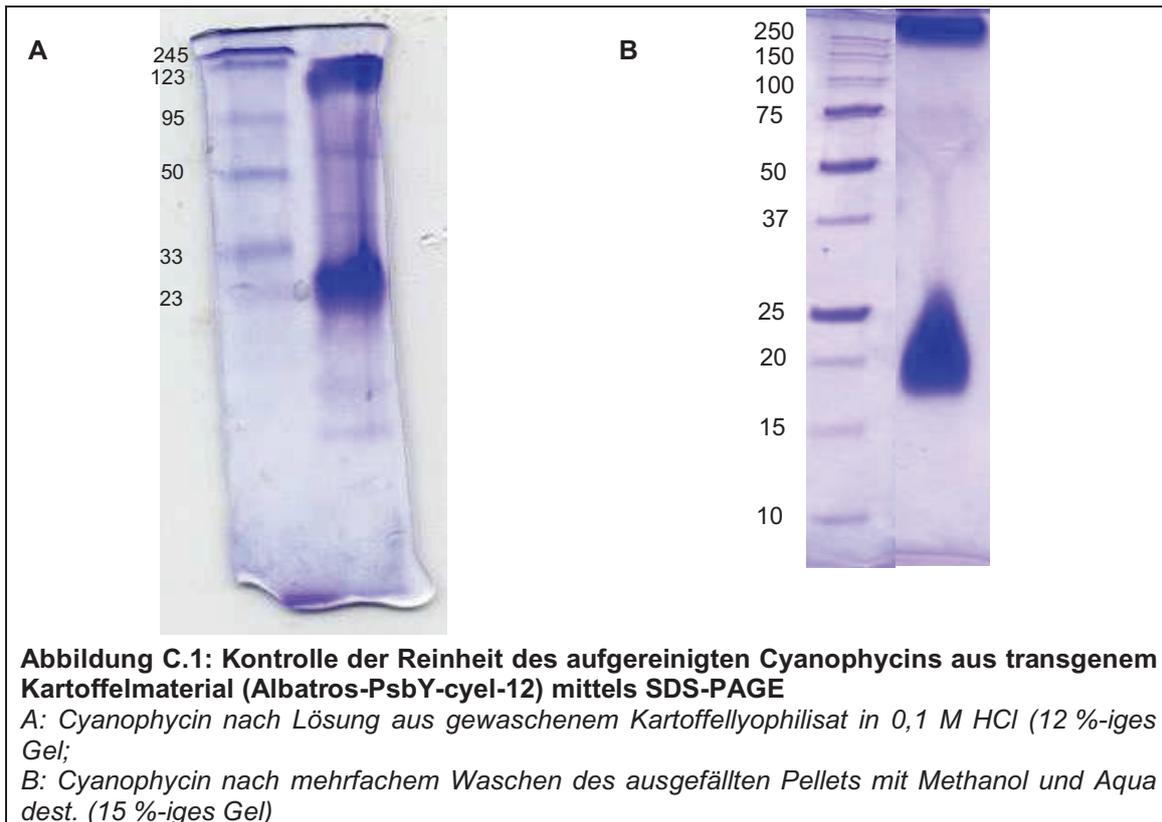
#### Cyanophycin:

Das Polyaspartat-Molekül Cyanophycin ist unter physiologischen Bedingungen, wie sie zur Immunisierung zur Antikörperproduktion nötig sind, nicht löslich. Das transgen von der *Desulfotobacterium hafniense*-Cyanophycin-Synthetase in *Escherichia coli* und das von der *Thermosynechococcus elongatus*-Cyanophycin-Synthetase in Kartoffel- und Tabakpflanzen produzierte Cyanophycin ist teilweise in Wasser löslich (Ziegler *et al.* 2002, Neumann *et al.* 2005). Von Prof. Dr. Lockau der HU Berlin wurde ein lösliches Cyanophycin, aufgereinigt aus *E. coli*, zur Antikörperproduktion zur Verfügung gestellt.

Des Weiteren wurde die Substanz zur Verwendung als Standardmaterial im ELISA, aus Knollenmaterial transgener Kartoffeln aufgereinigt. Die Aufreinigung der wasserunlöslichen Form erfolgte in Anlehnung an die Isolierung von Cyanophycin aus Cyanobakterien (Frey *et al.* 2002) (siehe B 2.2). Die Isolierung wurde aus jeweils 10 g lyophilisiertem Knollenmaterial der Variante *Albatros-PsbY-cyeI-12* im Vergleich mit der nahe isogenen Variante (*Albatros-NIV*) durchgeführt. Aus dem Material der transgenen Variante konnten 39 mg Trockensubstanz gewonnen werden. Unter gleichen Isolationsbedingungen aus Material der nahen isogenen Variante, wurde ein Rückstand von 2 mg ermittelt. Es kann davon ausgegangen werden, dass eine Menge von 37 mg Cyanophycin aus 10 g Knollenlyophilisat isoliert wurde. Der getrocknete Rückstand der Reinigung zeigte eine dunkelbraune bis schwarze Färbung.

Da Cyanophycin auch in SDS löslich ist, konnte eine Kontrolle der Reinheit der aufgereinigten Substanz mittels SDS-PAGE und anschließender Proteinfärbung mit Coomassie-Blau durchgeführt werden. Die elektrophoretische Reinheitskontrolle (Abbildung C.1 A) der isolierten Substanz zeigt neben zwei kräftigen Banden bei 123 kDa und bei etwa 30 kDa weitere schwache Banden unterschiedlicher Molekulargröße und eine diffuse Hintergrundfärbung.

Um Cyanophycin in höherer Reinheit zu erhalten, wurde der Rückstand mehrfach im Wechsel mit Aqua dest. und 100 %-igem Methanol gewaschen. Nach dem Waschen des Pellets mit Aqua dest. bildete sich bei der transgenen im Gegensatz zur nahen isogenen Variante ein trüber Überstand. Die Trübung verschwand nach Einstellen des pH-Wertes auf < 2. Um das Volumen der gelösten Substanz einzuengen wurde nach Neutralisation der Lösung der entstandene Niederschlag mittels Zentrifugation (24.000 × g) separiert. Nachdem das Pellet mit 0,1 M HCl versetzt wurde, verblieb ein bräunlicher Niederschlag. Diese Verunreinigung wurde eliminiert indem nach erneuter Zentrifugation der Überstand auf pH 4 gebracht wurde. Der entstandene weiße Niederschlag wurde zentrifugiert, getrocknet und elektrophoretisch aufgetrennt, um seine Reinheit zu untersuchen (Abbildung C.1 B). Nach der Coomassie-Blau-Färbung des SDS-PAGE-Gels war zum einen eine kräftige Bande bei etwa 250 kDa zu erkennen und zum anderen eine starke Bande zwischen ca. 17 und 26 kDa. Da es sich bei der isolierten Substanz um das Modellprotein Cyanophycin handelte, konnte anhand einer Immunodetektion mit Serum eines Kaninchens, welches mit löslichem Cyanophycin immunisiert wurde, bewiesen werden (siehe Abbildung C.4).



#### Neomycinphosphotransferase II:

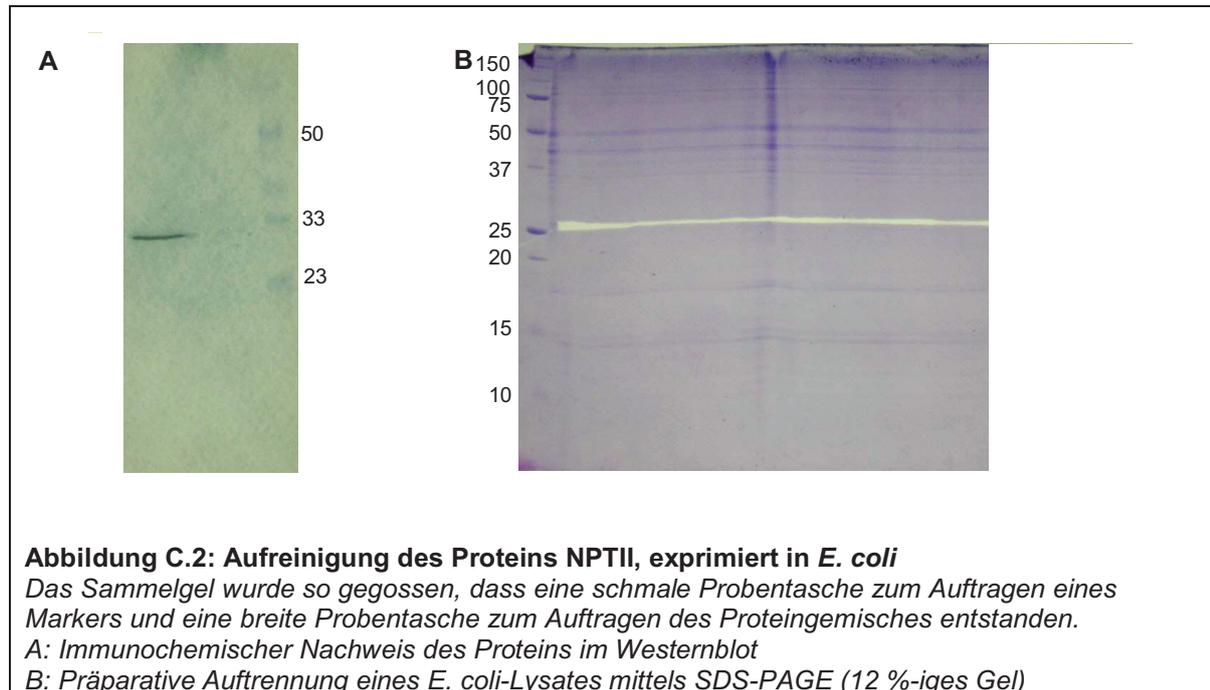
Das in der Gentechnik häufig eingesetzte Selektionsgen *nptII* codiert für das Protein Neomycinphosphotransferase II (NPTII), das bei Expression eine Toleranz gegen das Antibiotikum Kanamycin vermittelt. Für die Herstellung polyklonaler Antikörper gegen dieses Protein wurden zwei Strategien gewählt. Zum einen wurde das Protein aus „Inclusionbodies“ von NPTII-exprimierenden *E. coli*-Zellen (Stamm TG1) präpariert und zum anderen wurde ein synthetisches Polypeptid (Aminosäuren 250-264) zur Antikörperproduktion hergestellt.

Während der Proteinaufreinigung wurden Proben der einzelnen Aufreinigungsschritte mittels Westernblot auf Vorhandensein von NPTII untersucht. Die Detektion erfolgte mit einem anti-NPTII-Antikörper (Sigma-Aldrich), der gegen die Aminosäuren 250-264 des Proteins gerichtet ist.

Die Reinigung des Proteins nach Lösung aus den „Inclusionbodies“ erfolgte zum einen mittels Affinitätschromatographie und zum anderen über die Trennung des Proteingemisches nach der Größe der Moleküle. Als Trägermaterial diente Brom-Cyan-aktivierte Sepharose, an die kommerzielle anti-NPTII-Antikörper (Sigma Aldrich, N6512) gekoppelt wurden. Die Elution des Proteins von der Säule mit 0,1 M Citratpuffer wurde mit einem 280 nm-Detektor verfolgt. Das Eluat wurde mittels Westernblot auf das Vorhandensein von NPTII untersucht.

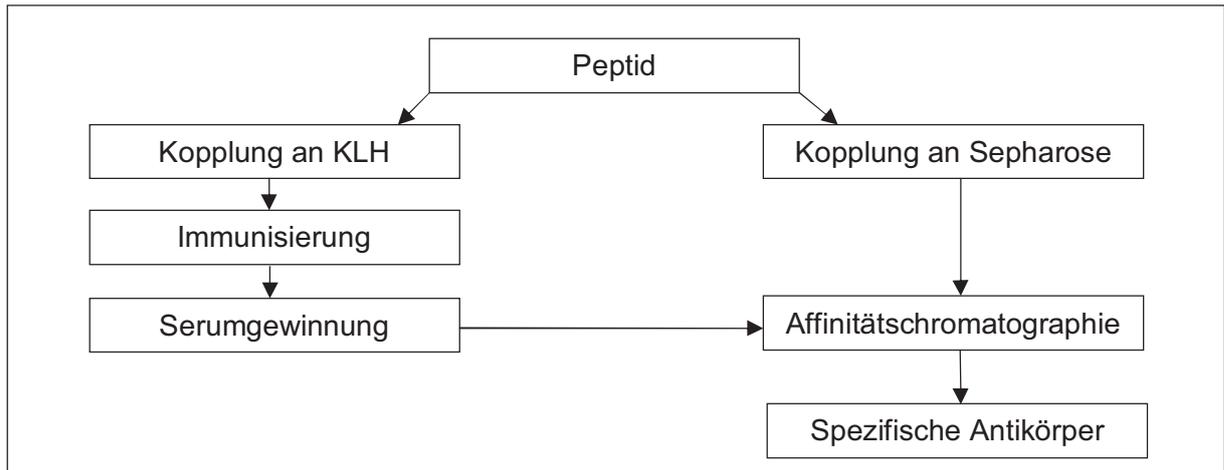
Zur Größenauffrennung der Moleküle des Proteingemisches wurde ein SDS-PAGE-Gel herangezogen. Nach dem Elektrophoreselauf wurde ein Streifen des Gels zur Identifizierung der NPTII-Bande mittels Westernblot aus dem Gel geschnitten. Das restliche Gel wurde mit Coomassie-Blau G-250 gefärbt. Nach erfolgter Identifizierung

konnte die entsprechende Bande aus dem verbliebenen Gelstück ausgeschnitten und zur Immunisierung zerkleinert werden. Dazu wurde das Gelmaterial mehrfach mithilfe einer Spritze durch eine Kanüle gedrückt.



Als weitere Strategie der Isolation möglichst reinen Immunisierungsmaterials für die Produktion polyklonaler Antikörper mit Spezifität gegen das Modellprotein NPTII wurde ein synthetisches Polypeptid aus 15 Aminosäuren (Aminosäurereste 250-264 der Sequenz des Proteins NPTII) hergestellt, an dessen N-terminales Ende ein Cysteinrest angehängt wurde. Synthetische Peptide sind in der Regel allein nicht immunogen, also für die Produktion von Antikörpern nicht geeignet. Um dennoch eine Immunogenität zu erzielen werden sie an Trägerproteine gekoppelt (Holtzhauer 1997). Über den SH-Rest der Seitenkette der Aminosäure Cystein, wurde das Peptid vor der Immunisierung an das immunstimulierende Protein KLH (Keyhole Limpet Hämocyanin) aus der Napfschnecke gebunden.

Die Synthese des Polypeptids und die Kopplung an KLH erfolgten durch das Biologisch-Medizinische Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. 1 mg des Peptids wurde an KLH gebunden und das restliche Material diente zur Aufreinigung der Antikörper mittels Affinitätschromatographie (siehe Abbildung C.3).



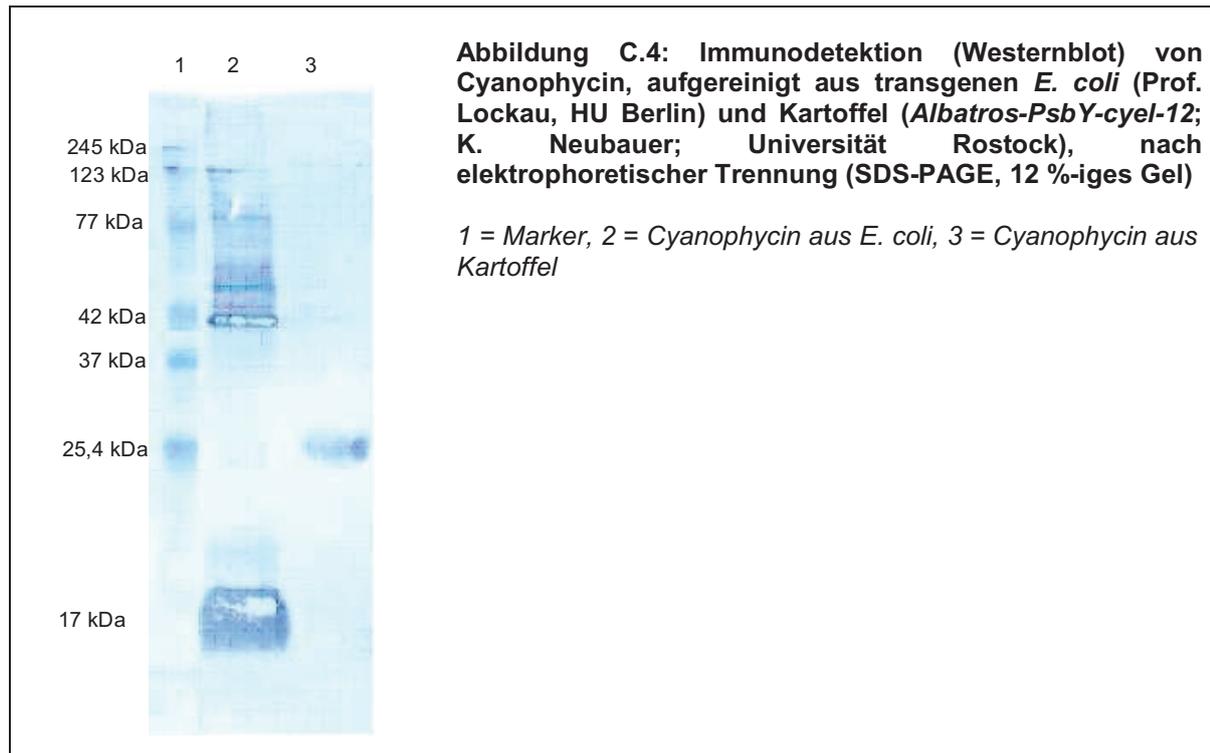
**Abbildung C.3: Verwendung des synthetischen Polypeptids aus den Aminosäureresten 250-264 der Sequenz des Proteins NPTII zur Herstellung spezifischer Antikörper**

Das synthetische Polypeptid trägt am N-Terminus zusätzlich die Aminosäure Cystein (Cys-SQRIAFYRLLDEFF). Über die SH-Gruppe der Seitenkette dieser Aminosäure wurde das Peptid zum einen an das Trägerprotein KLH für eine nachfolgende Immunisierung und zum anderen an aktivierte Sepharose (SulfoLink-Kit der Fa. Thermo Scientific) gekoppelt. Die konjugierte Sepharose diente zur affinitätschromatographischen Reinigung spezifischer Antikörper gegen das Peptid aus dem Serum der immunisierten Kaninchen.

### C 1.2 Antikörpergewinnung

Zur Antikörpergewinnung für die ELISA-Entwicklung wurden bei der BIOSERV A. & M. GmbH Kaninchen und bei der Ovalehn GmbH Legehennen mit den Modellproteinen bzw. Teilstücken dieser Proteine immunisiert und mehrfach geboostert. Der Grundimmunisierung folgten mit Abständen von jeweils 14 Tagen mindestens zwei weitere Immunisierungen (Boosterung). Vor jeder Boosterung wurden den Tieren Blutproben entnommen, welche mittels ELISA bzw. Westernblot-Analysen auf die Bildung spezifischer Antikörper untersucht wurden. Aus dem Rohserum der Kaninchen wurde unter Verwendung von Protein A-Sepharose der Gesamt-Pool der IgG-Antikörper gewonnen. Die IgY-Antikörper aus dem Eigelb der Legehennen binden nicht an Protein A und wurden mittels Ammoniumsulfat-Fällung isoliert.

Abbildung C.4 stellt exemplarisch eine Immunodetektion von Cyanophycin mit den aus dem Serum des Cyanophycin-immunisierten Kaninchens gewonnenen IgG-Antikörpern dar. Es ist zu erkennen, dass sich mit den Antikörpern des „Cyanophycin-Kaninchens“ in der Probe des Cyanophycins aus *E. coli* mehrere Proteine und in der Probe des Cyanophycins aus der Kartoffel lediglich ein Protein nachweisen lassen.



Die Seren der Kaninchen, die mit dem synthetischen Peptid der NPTII-Sequenz immunisiert wurden, wurden zur Gewinnung der spezifischen Antikörper mittels Peptidgekoppelter Affinitätschromatographiesäule (SulfoLink der Fa. Thermo Scientific) gereinigt. Der Titer der spezifischen Antikörper war sehr gering ( $< 5 \mu\text{g/ml}$ ) und es wurde auf die Vorreinigung mit Protein A verzichtet. Die Eluate der affinitätschromatographischen Reinigung von 10 ml Serum wurden vereinigt und anschließend mit Hilfe von Membranfiltrationsröhren auf ein Volumen von 0,5 ml eingengt. So konnte eine Proteinkonzentration der Antikörperlösung von 0,3 mg/ml erreicht werden.

Die Antikörperbildung in den Eiern der mit den Modellproteinen immunisierten Legehennen wurde über den gesamten Zeitraum der Legeperiode im ELISA überprüft. Dazu wurde das Eigelb einzelner Eier ohne weitere Vorbereitung auf einer mit dem zur Immunisierung verwendeten Protein beschichteten Mikrotiterplatte in verschiedenen Konzentrationen aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit einem anti-Huhn-IgG/IgY-POD-Antikörper (Fa. Sigma Aldrich) (1:2000 in KVP) und anschließender Substratzugabe (TMB, Fa. Seramun).

Nach der Kontrolle der Spezifität wurde das Eigelb der Eier gepoolt und zur Aufreinigung der Antikörper mittels Ammoniumsulfatfällung eingesetzt (siehe B 2.2).

### C 1.3 ELISA-Entwicklung zum quantitativen Nachweis transgener Proteine

Zielstellung dieses Teilbereiches war die Entwicklung von quantitativen, spezifischen und sensitiven Nachweisverfahren für die Modellproteine VP60, CTxB, NPTII und Cyanophycin. Die Entwicklung von Systemen auf ELISA-Basis erfolgte in mehreren Stufen. Zunächst wurden entsprechende Antigene gewonnen (C 1.1), die zur Produktion von polyklonalen Antikörpern (C 1.2) und als Standardmaterial im Quantifizierungssystem

Verwendung finden sollten. Die aus dem Serum der immunisierten Kaninchen bzw. aus den Eiern der sensibilisierten Legehennen gewonnenen Antikörper wurden in verschiedenen Kombinationen und Konzentrationen auf ihre Tauglichkeit für den Einsatz im ELISA getestet. Weiterhin wurden Faktoren wie unterschiedliche Beschichtungspuffer, Blockmittel, Pufferlösungen für die Detektionsantikörper in die Optimierungsarbeiten mit einbezogen.

Bei der Entwicklung von ELISA-Systemen zur Quantifizierung von Proteinen mit polyklonalen Antikörpern müssen verschiedene Parameter untersucht werden, um Verfahren mit der gewünschten Sensitivität und Stabilität zu erhalten. Für die Begutachtung bzw. die Verifizierung eines ELISA-Assays wurden folgende Parameter untersucht.

Präzision: Die Präzision beschreibt die Wiederholgenauigkeit eines Testes. Die Präzision gibt das Ausmaß der Schwankungen der Resultate als Variationskoeffizient (VK) in Prozent an. Der VK ist der Quotient aus Standardabweichung und Mittelwert einer Messreihe. Bei der Beurteilung eines ELISA-Assays wird zwischen Intra-Assay und Inter-Assay unterschieden. Beim Intra-Assay wird eine Probe wiederholt auf einer Mikrotiterplatte (96 wells) aufgetragen und die Präzision bestimmt. Beim Inter-Assay wird eine Probe auf verschiedenen Platten, möglicherweise an verschiedenen Tagen untersucht und die Präzision der Ergebnisse ermittelt. In Tabelle C 1.1 ist die Präzision des Intra-Assays angegeben.

Wiederfindung: Eine weitere Überprüfung der Richtigkeit eines ELISA ist die Wiederfindung (recovery). Um diese zu bestimmen, wird einer Probe (Negativprobe) eine definierte Menge des Antigens zugegeben und die Probe wird analysiert. Bei der Messung sollte die zugegebene Menge des Antigens experimentell nachgewiesen werden können. Die wiedergefundene Konzentration wird in Prozent der zugegebenen Menge angegeben.

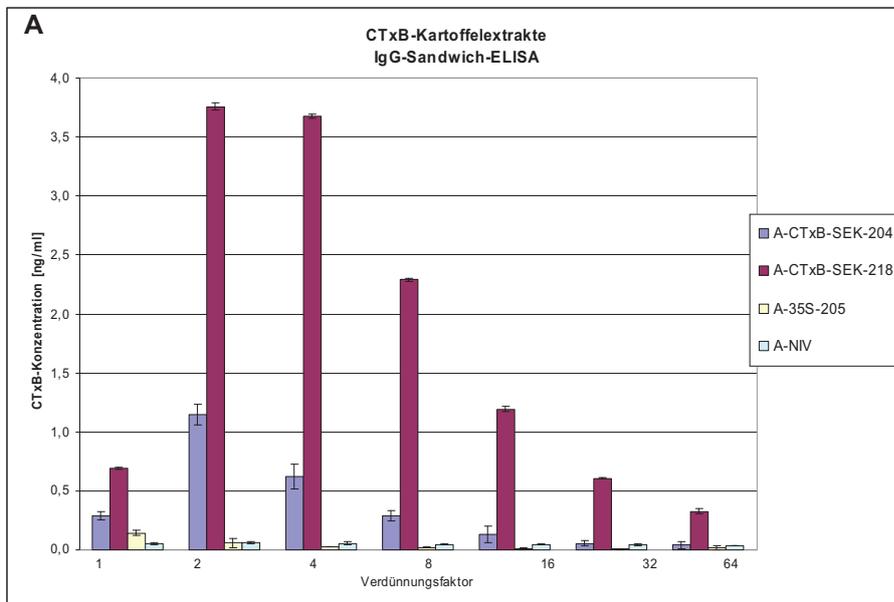
Messbereich: Bei der Bestimmung des Messbereichs wird das Detektionslimit (Limit of detection = LOD) und die obere Grenze des Bereiches ermittelt. Das Detektionslimit wird bestimmt, indem man zu dem Mittelwert der Blanks seine dreifache Standardabweichung (SD) addiert. Der obere Grenzwert des Messbereichs wird definiert als diejenige Konzentration der mittleren maximalen Absorption - 3 SD (Steiner *et al.* 2003).

#### CTxB-ELISA:

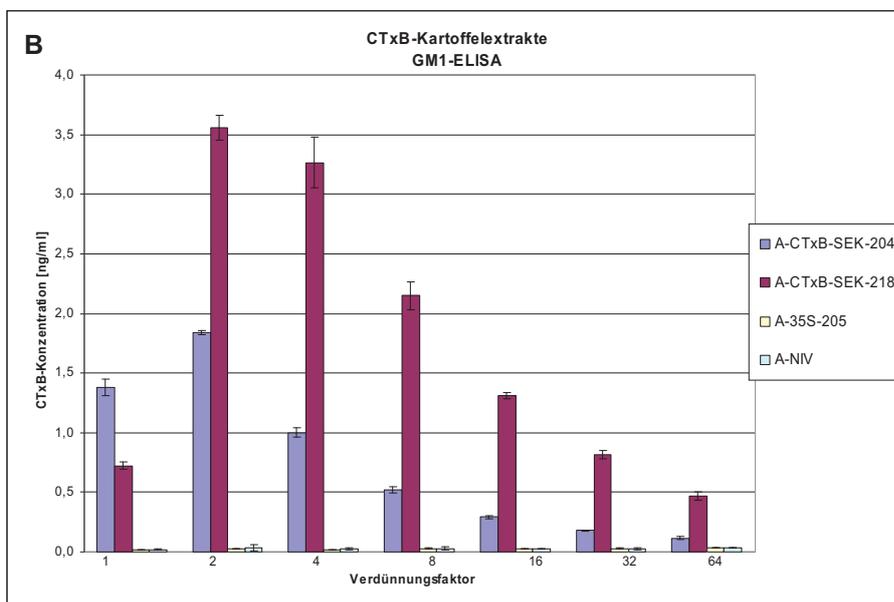
Für die Bestimmung der CTxB-Konzentration in pflanzlichem und tierischem Untersuchungsmaterial wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Quantifizierungssysteme entwickelt. Ein Sandwich-ELISA aus zwei polyklonalen Kaninchen-Antikörpern und ein Sandwich-ELISA auf Basis des bovinen mGM1-Monogangliosid-Rezeptors und eines polyklonalen Kaninchen-Antikörpers. Mit dem auf dem mGM1-Rezeptor basierendem ELISA ist neben der Konzentrationsbestimmung ein Funktionsnachweis der pentameren CTxB-Proteine möglich. Der bakterielle Erreger *Vibrio cholerae* synthetisiert die monomere Proteinstruktur der Untereinheit CTxB, welche sich im periplasmatischen Raum zu Pentameren fusionieren (Hirst und Holmgreen 1987). Die CTxB-Untereinheit kann nur in Form des Pentamerkomplexes an den Gangliosid-GM1-Rezeptor auf der Zellmembran von Intestinalzellen binden und so die CTxA-Einheit in die Zelle einschleusen. Der Funktions- und Aktivitätsnachweis des CTxB im Untersuchungsmaterial

erfolgte demnach mit dem mGM1-Sandwich-ELISA. Zusätzlich wurde der auf 2 polyklonalen Antikörpern basierende ELISA herangezogen, um auch eventuell vorliegende CTxB-Monomere nachweisen zu können. Für beide ELISA-Systeme konnten Messbereiche von 0,16 – 10,0 ng/ml CTxB in der Untersuchungslösung (z.B. Pflanzenextrakt) erreicht werden.

In Abbildung C.5 sind exemplarisch die Ergebnisse der Bestimmung der CTxB-Konzentration in Extrakten der CTxB-exprimierenden Pflanzen (*Albatros-CTxB-SEK-204*, *Albatros-CTxB-SEK-218*) und der Vergleichsvarianten (*Albatros-35S-205* und nahe isogene Variante *Albatros-NIV*) der Kartoffellinie Albatros dargestellt. Für die Untersuchung wurden Extrakte aus Kartoffellyophilisaten hergestellt (200 µg Lyophilisat + 1800 µl Aqua dest) und auf der ELISA-Platte in mehreren Verdünnungen (in PBS) in Dreifach- oder in Doppelbestimmung (Kontrollen) aufgetragen. Anhand beider ELISA-Systeme ist zu erkennen, dass das Konstrukt *A-CTxB-SEK-218* signifikant mehr CTxB exprimiert als *A-CTxB-SEK-204*.



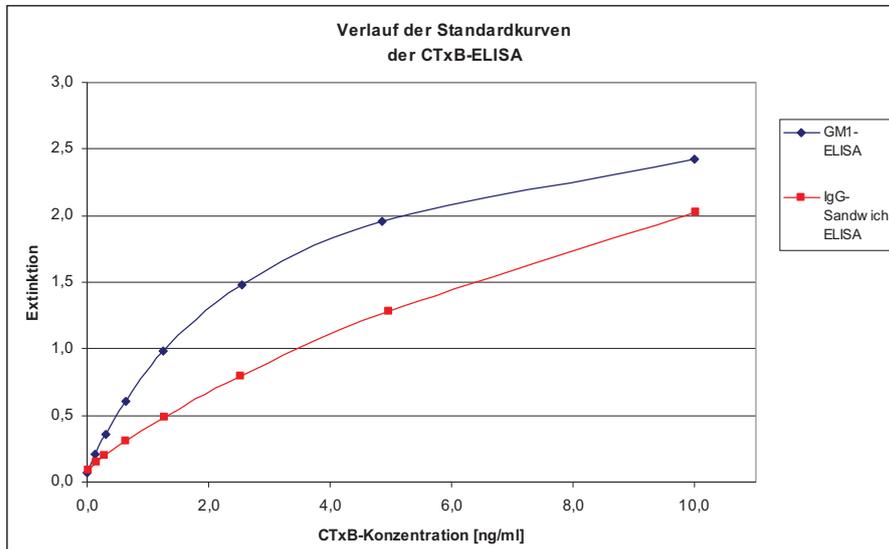
**Abbildung C.5:** Darstellung der CTxB-Konzentration in Extrakten der Pflanzen *Albatros-CTxB-SEK-204* (*A-CTxB-SEK-204*) und *Albatros-CTxB-SEK-218* (*A-CTxB-SEK-218*) Als Negativkontrollen wurden Extrakte der Pflanzen, die den Leervektor tragen (*A-35S-205*, exprimiert das Markerprotein NPTII) und der nahen isogenen Variante *Albatros-NIV* untersucht;



**A:** Messung mit dem IgG-Sandwich-ELISA  
**B:** Messung mit dem mGM1-ELISA

N = 2  
(Doppelbestimmungen)

Anhand der folgenden Abbildung C.6 kann der Verlauf der Standardkurven der beiden Systeme mGM1-ELISA und IgG-IgG-ELISA und der ideale Messbereich interpretiert werden. Im Gegensatz zur nahezu linearen Standardkurve des IgG-IgG-ELISA, hat die Kurve des mGM1-ELISA einen hyperbolen Verlauf.



**Abbildung C.6: Verlauf der Standardkurven in den beiden verwendeten CTxB-ELISA-Systemen mGM1-ELISA (blaue Kurve) nahezu linear bis zu einer Extinktion von 1 (entspricht einer Konzentration von 1,2 ng/ml), flacht dann ab; IgG-Sandwich-ELISA (rote Kurve) hat über den gesamten Konzentrationsbereich einen annähernd linearen Verlauf**

N = 2

(Doppelbestimmungen)

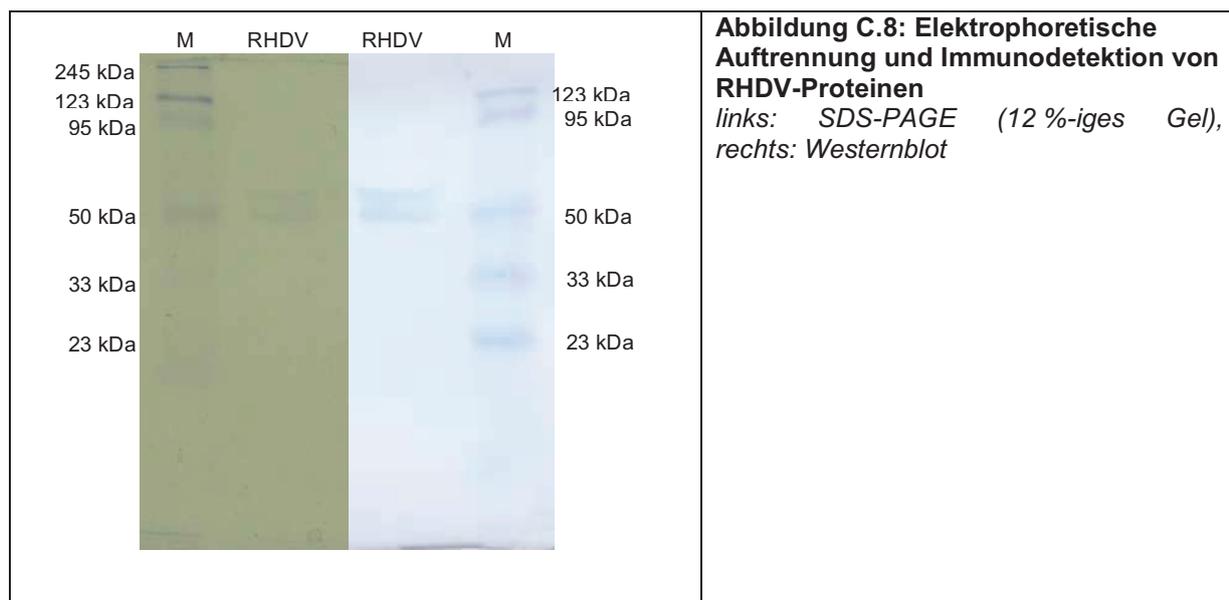
#### VP60:

Zur Einschätzung des VP60-Gehaltes in pflanzlichem sowie in tierischem Probenmaterial wurde ein VP60-Sandwich-ELISA unter Verwendung von IgG-Antikörpern aus Kaninchen und IgY-Antikörpern aus Eiern einer Legehähne entwickelt. Die Kaninchen wurden mit einem Lysat eines VP60-exprimierenden Baculovirus/ Insektenzellkultur-Systems und das Huhn mit dem Veterinärimpfstoff Rika-Vacc immunisiert. Zur Kontrolle der Funktionalität des ELISA kamen zum einen Lysate von Insektenzellkulturen und zum anderen Extrakte von Kartoffelyophilisaten zum Einsatz. Das auch zur Immunisierung der Kaninchen eingesetzte VP60-haltige Lysat des Baculovirus/Insektenzellkultur-Systems (SF9-Pos) diente als Positivkontrolle. Als Negativkontrolle wurde Material eines Baculovirus/ Insektenzellkultur-Systems (SF9-Neg), die kein VP60 exprimiert, verwendet.

Bei der Assay-Entwicklung wurde weiterhin ein VP60-ELISA für Vergleichsuntersuchungen herangezogen, der im Friedrich-Löffler-Institut (FLI) für die Erforschung der RHD-Erkrankung entwickelt wurde. Um Aussagen über VP60-Konzentrationen treffen zu können, wird im FLI ein ELISA-Index, der sogenannte „Zahner-Index“ verwendet (siehe Abbildung C.7).

$Index = \left( \frac{OD_{Probe} - OD_{Neg}}{OD_{Pos} - OD_{Neg}} \right)$	<b>Abbildung C.7:</b> <b>Berechnung des VP60-</b> <b>ELISA-Index („Zahner-</b> <b>Index“) des FLI</b>
<p>OD<sub>Probe</sub> = Optische Dichte bei 450 nm der Probe</p> <p>OD<sub>Pos</sub> = Optische Dichte bei 450 nm der Positivkontrolle (Lysat des VP60-exprimierenden Insektenzellkultur/Baculovirus-Systems)</p> <p>OD<sub>Neg</sub> = Optische Dichte bei 450 nm der Negativprobe (Lysat des Insektenzellkultur/Baculovirus-Systems, das kein VP60 exprimiert)</p>	

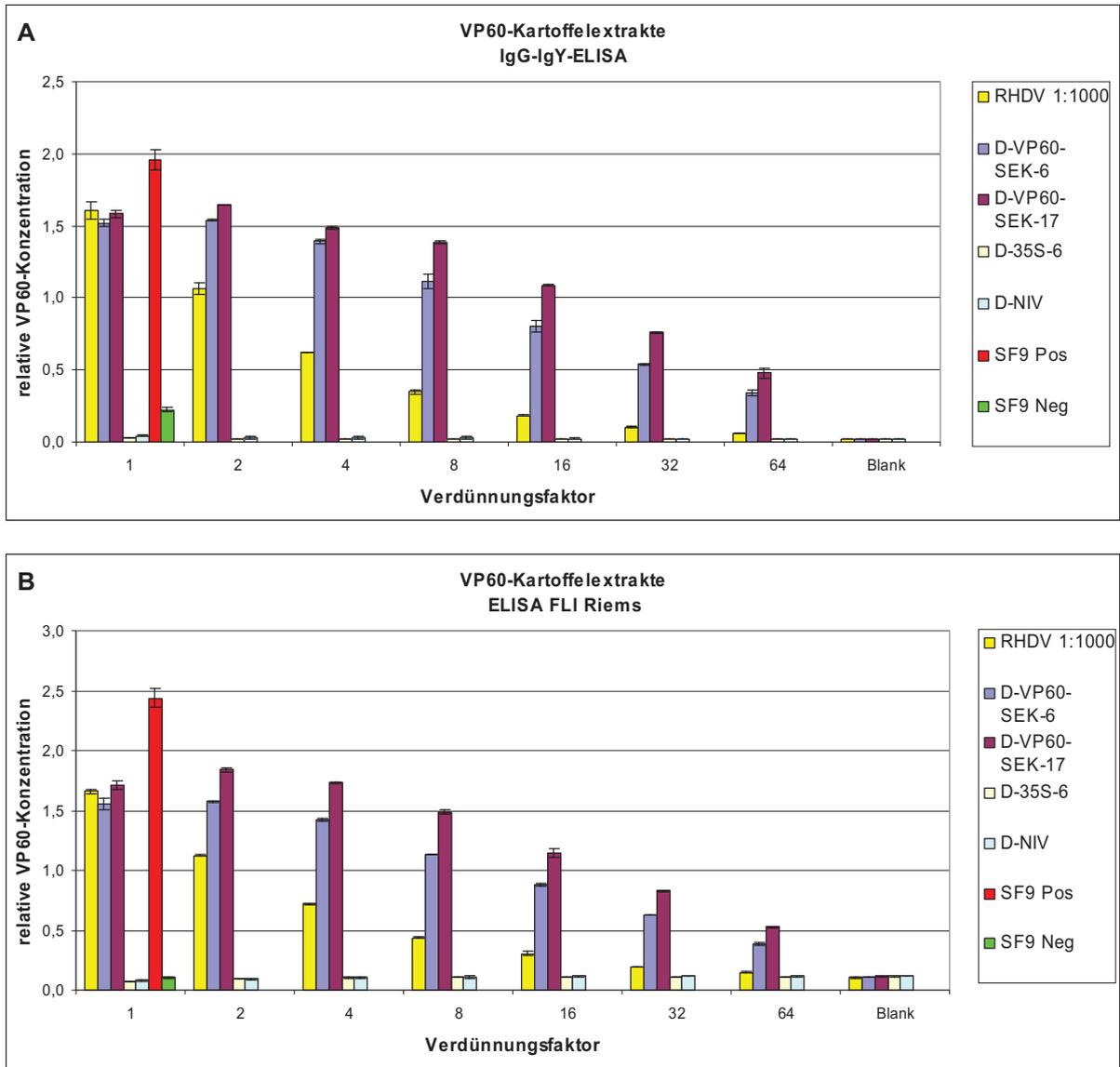
Mit dem Index lassen sich die Verhältnisse der VP60-Anteile in den unterschiedlichen Proben darstellen, jedoch ist eine Aussage über die genaue Konzentration nicht möglich. Hierfür ist die Verwendung eines definierten Standards nötig. Herangezogen dafür wurde dichtegradientenaufgereinigtes RHD-Virus, welches vom FLI zur Verfügung gestellt wurde. Zum Einsatz als Standardmaterial wurde dieses mit Formaldehyd inaktiviert und anschließend zur Proteinbestimmung eingesetzt. Für das Material wurde im Bradford-Assay (Nanoquant®; Fa. Roth) ein Gesamtproteingehalt von 20,2 µg/ml bestimmt.



Anhand der bekannten Konzentration der RHDV-Probe konnte die Konzentration des VP60-haltigen Insektenzellkulturlysates (SF9-Pos) bestimmt werden. Verdünnungen dieses Materials wurden aliquotiert, bei -80 °C gelagert und als Positivmaterial, mit semiquantitativ bestimmter VP60-Konzentration eingesetzt.

Nachfolgende Abbildung C.9 zeigt exemplarisch die Resultate der VP60-Bestimmung mit dem IgG-IgY-ELISA von Kartoffelextrakten der Varianten *Desiree-VP60-SEK-6* und *Desiree-VP60-SEK-17* (und der Vergleichsvarianten *D-35S-6* und *D-NIV*), einer Verdünnungsreihe des gereinigten RHD-Virus und von Homogenisaten der SF9-Zellen mit und ohne VP60. Die SF9-Pos-Proben zeigen im IgG-IgY-ELISA eine etwas niedrigere ( $1,956 \pm 0,072$ ) und die SF9-Neg-Proben ( $0,224 \pm 0,014$ ) eine etwas höhere Extinktion als beim Nachweis mit dem ELISA vom FLI Riems (SF9-Pos:  $2,440 \pm 0,080$ ; SF9-Neg:  $0,107 \pm 0,005$ ). Die Extinktionen der Verdünnungsreihen des gereinigten RHD-Virus und

der Extrakte der VP60-exprimierenden Kartoffeln liegen in vergleichbaren Wertebereichen, wobei die Extinktionen des Leerwertes (Blank) und der Proben der Kartoffelvarianten *D-35S-6* und *D-NIV* gemessen mit dem ELISA des FLI Riems etwas höher liegen.



**Abbildung C.9: Darstellung der relativen VP60-Konzentration in Extrakten der Pflanzen Desiree-VP60-SEK-6 (D-VP60-SEK-6) und Desiree-VP60-SEK-17 (D-VP60-SEK-17)**

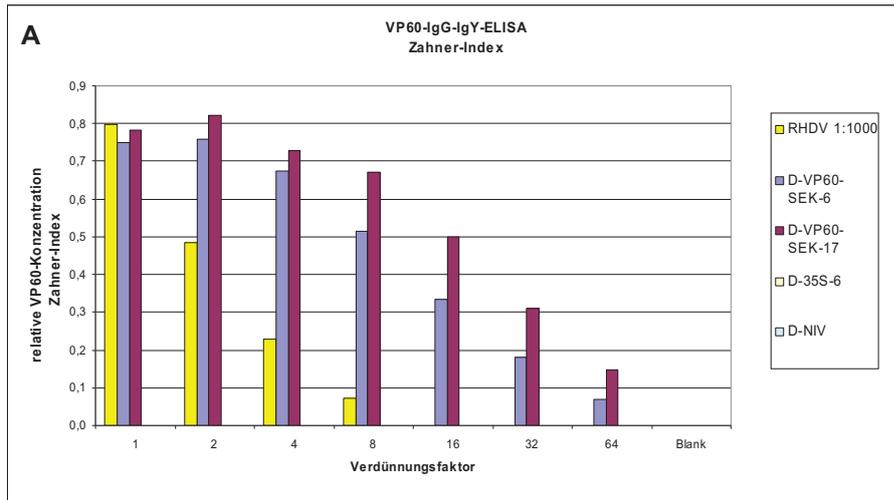
Als Negativkontrollen wurden Extrakte der Pflanzen, die den Leervektor tragen (*D-35S-6*), exprimiert das Markerprotein NPTII) und der nahen isogenen Pflanze (*D-NIV*) untersucht; als weitere Kontrollen dienten 1:10-Verdünnungen der Insektenzellkultur-homogenisate (SF9 Pos → mit VP60, SF9 Neg → ohne VP60)

A: Messung mit dem IgG-IgY-Sandwich-ELISA

N = 2 (Doppelbestimmungen)

B: Messung mit dem ELISA des FLI Riems

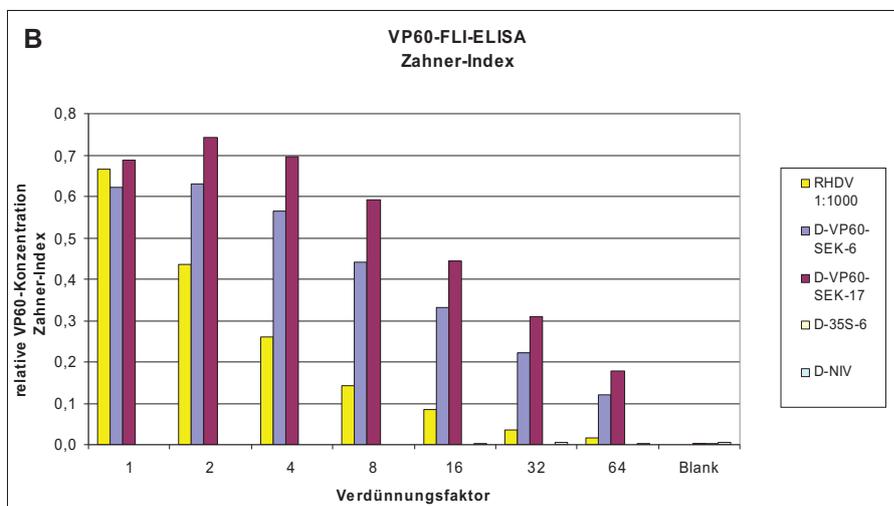
Umgerechnet in eine relative VP60-Konzentration, verdeutlicht mit dem Zahner-Index, bedeutet das, dass der Index im höheren Konzentrationsbereich für den IgG-IgY-ELISA höher ist als für den FLI-ELISA (vgl. Abbildung C.10).



**Abbildung C.10:**  
**Darstellung der VP60-**  
**Konzentration von**  
**Kartoffelextrakten**  
**und RHDV-Proben**  
**anhand des Zahner-**  
**Index**

*Negative Zahner-Indices wurden gleich Null gesetzt und sind somit in dieser Abbildung nicht dargestellt*

N = 2  
(Doppelbestimmungen)



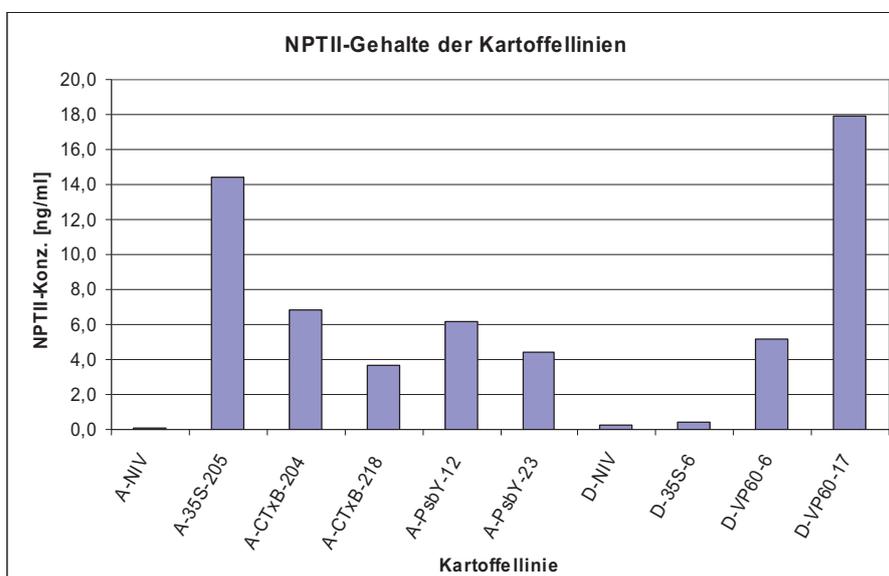
**NPTII:**

Die Antikörper der Tiere, die mit dem NPTII aus *E. coli* bzw. mit dem synthetischen Polypeptid (Aminosäurereste 250-264 des NPTII-Proteins) immunisiert wurden, zeigten nicht die gewünschte Reaktivität. Weder im ELISA, noch im Westernblot konnten ausreichend intensive und spezifische Bindungen mit dem Zielprotein detektiert werden. Da das aufgereinigte NPTII nur in begrenzter Menge zur Verfügung stand, welches ausschließlich zur Immunisierung Verwendung fand, war eine Kontrolle der spezifischen Antikörperreaktivität nur begrenzt möglich. So wurden im Westernblot Extrakte aus Kartoffellyophilisat von NPTII-exprimierenden Pflanzen und *E. coli*-Lysat für diese Studien eingesetzt. Als Kontrolle einer korrekten Bindung der Antikörper an das Zielprotein NPTII wurden im Vergleich kommerzielle Antikörper (Sigma-Aldrich) eingesetzt.

Die kommerziellen anti-NPTII-Antikörper sind gegen zwei unterschiedliche Epitope des Proteins gerichtet (Aminosäuren 250-264 und die Region der Aminosäuren 133-150) und konnten somit im Sandwich-ELISA getestet werden. Für die Detektion wurden jeweils 100 µl der Antikörperlösungen biotinyliert und zusammen mit dem anderen Antikörper als Beschichtungsantikörper eingesetzt. Mit beiden Kombinationen konnten Extrakte von Pflanzenmaterial NPTII-exprimierender Pflanzen und der NIV unterschieden werden.

Die Quantifizierung der NPTII-Konzentrationen in den Kartoffelextrakten erfolgte anhand eines Standardmaterials aus dem kommerziellen NPTII-ELISA-Kit PathoScreen der Firma Agdia. Mit Hilfe dieser Kits konnte die NPTII-Konzentration eines Extraktes von NPTII-haltigem Pflanzenmaterial (*A-NPTII-35S*) bestimmt werden. Aliquote dieses NPTII-haltigen Extraktes wurden als Positivkontrolle und Extrakte der nahen isogenen Variante (*Albatros-NIV*) als Negativkontrolle bei - 80 °C gelagert.

Unter Verwendung dieser beiden Kontrollen wurden Extrakte aller in dieser Arbeit untersuchten Kartoffellinien auf ihre NPTII-Konzentrationen untersucht. Zur Extraktion kamen jeweils 200 mg Lyophilisat und 800 µl PBS zur Anwendung und wurden zur Messung im ELISA weiter verdünnt. In Material der Linie *D-VP60-SEK17* war mit 17,9 ng/ml die höchste NPTII-Konzentration nachweisbar. Hingegen war im Extrakt der Linie *D-35S-6* lediglich eine NPTII-Konzentration von 0,453 ng/ml detektierbar und lag somit nur knapp über dem für *D-NIV* bestimmten Wert.



**Abbildung C.11:**  
NPTII-Konzentrationen in Extrakten aller in dieser Arbeit untersuchten Kartoffellinien  
N = 2 (Doppelbestimmungen)

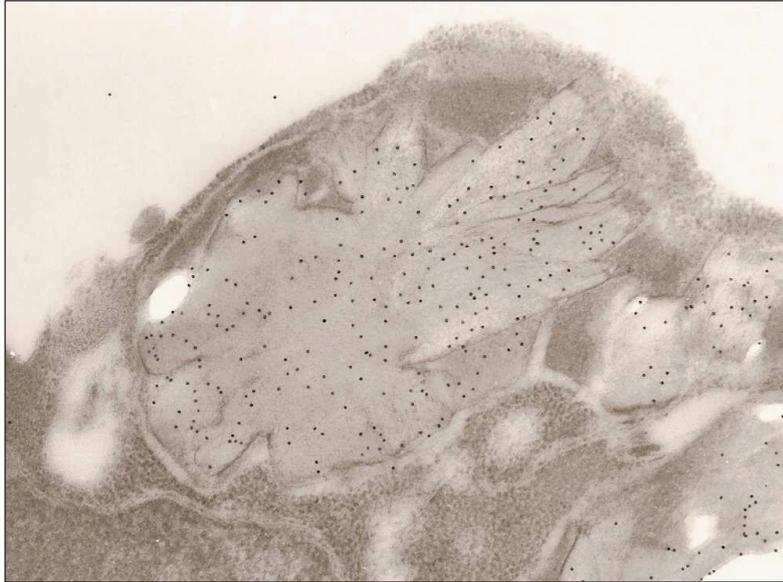
Unter Verwendung des Positiv-Extraktes (*A-35S-205*) konnten Analysen zur Bestimmung der Präzision (Intra-Assay) und der Wiederfindung vorgenommen werden. Für die Probe konnte eine mittlere optische Dichte (OD bei 450 - 630 nm) von 0,891 und eine Standardabweichung von 0,0571 ermittelt werden. Der daraus resultierende Variationskoeffizient beträgt somit 6,41 %. Das bedeutet, dass mit diesem Assay ermittelte Werte eine Messunsicherheit von 6,41 % haben.

#### Cyanophycin:

Die biochemischen Eigenschaften der Modellsubstanz Cyanophycin, insbesondere die geringe Löslichkeit bei neutralem pH-Wert, machte die Entwicklung eines Sandwich-ELISA unmöglich. Der Hauptanteil des Cyanophycins geht nur bei saurem (< 2) oder basischem pH-Wert (> 9) in Lösung. Eine Antigen-Antikörper-Reaktion kann jedoch nur bei neutralem pH-Wert stattfinden.

Die bei BIOSERV hergestellten Antikörper zeigten zwar bei immunocytochemischen Untersuchungen an Präparaten transgener Kartoffeln und Tabakpflanzen, die freundlicherweise durch die Arbeitsgruppe um Frau Prof. Dr. Pistorius der Universität Bielefeld durchgeführt wurden, eine begrenzte Reaktivität (siehe Abbildung C.12), welche

aber für die Verwendung im Sandwich-ELISA unzureichend ist. Ein möglicher Nachweis ist nur im direkten ELISA-Assay (Antigen ist an Mikrotiterplatte immobilisiert; Nachweis erfolgt mit einem spezifischen Antikörper) möglich. Diese Methode konnte aber nicht für die Quantifizierung von Cyanophycin in Pflanzenextrakt oder Kot- und Urinproben angewendet werden, da die Cyanophycin-Konzentration dort zu gering war.



**Abbildung C.12:**  
Elektronenmikroskopische Aufnahme (40.000 x) eines Schnittes einer Cyanophycin-exprimierenden Kartoffel

*Der immunohistologische Nachweis des Cyanophycins erfolgte unter Verwendung von Antikörpern der Kaninchen, die mit dem löslichen Cyanophycin immunisiert wurden.*

*Die schwarzen Punkte sind Antikörper, die an Cyanophycin gebunden haben (persönliche Mitteilung, Frau Prof. Dr. Pistorius)*

Eine sensitivere Methode zur Quantifizierung des Cyanophycins in Pflanzenextrakten und Exkrementen der Cyanophycin-gefütterten Ratten war die saure Extraktion (0,1 M HCl) des Probenmaterials mit anschließender Proteinbestimmung des Extraktes mit der Bradford-Methode.

Nachfolgende Tabelle fasst die wesentlichen Komponenten zur Beschreibung der entwickelten ELISA-Systeme zusammen.

**Tabelle C 1.1: Zusammenfassung der Ergebnisse zur ELISA-Entwicklung**

Protein	Cyano- phycin	VP60		NPTII	CTxB	
	AG:IgY	IgG:IgY	IgG:IgG	IgG:IgG	IgG:IgG	GM1:IgG
Quelle Antigen	- aus <i>E. coli</i> - aus Kartoffel	- Insekten- zellkultur- Lyophilisat  - RIKA- VACC®- Impfstoff	keine Angabe	- aus <i>E. coli</i>  - synthetisches Polypeptid	- kommerz. AG	keine Angabe
Herkunft Antikörper (AK) bzw. Rezeptor	- Kaninchen - Hühnereier	- Kaninchen - Hühnereier	- Meer- schwein - Maus	- Kaninchen - Hühnereier - kommerz. AK (Kaninchen)	- Kaninchen	- boviner mGM1- Rezeptor  - AK (Kaninchen)

Ursprung Positiv- kontrolle für ELISA	- <i>E. coli</i> - Kartoffel	- Insekten-zellkultur- Lyophilisat - RHD-Virus	- Kartoffel- extrakt - <i>E. coli</i>	- kommerz. AG	- kommerz. AG	
Präzision	Cyanophycin hauptsächlich im sauren löslich; Aufbau eines Sandwich- ELISA nicht mgl.; lediglich ELISA im direkten Assay	5.1 %	6.1 %	6.4 %	7.6 %	6.2 %
Wieder- findung		92.5 %	96.2 %	87.6 %	102.0 %	98.8 %
Mess- bereich		- Zahner- Index - Extinktion (rel. Konz.)	- Zahner- Index - Extinktion (rel. Konz.)	- 0.047 - 3.0 ng/ml - Extinktion (rel. Konz.)	0.16 - 10.0 ng/ml	0.16 - 10.0 ng/ml

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die entwickelten ELISA-Systeme in der Lage sind die Modellproteine CTxB, VP60 und NPTII in Substanzgemischen, wie beispielsweise Pflanzenextrakten, spezifisch nachzuweisen. Die Quantifizierung der Modellschubstanz Cyanophycin konnte aufgrund ihrer schlechten Löslichkeit bei physiologischem pH-Wert nicht mittels ELISA erfolgen, sondern bedurfte einer sauren Extraktion des Untersuchungsmaterials und anschließender Proteinbestimmung mit der Bradfordmethode. Dieser Nachweis der Substanz Cyanophycin sollte jedoch stets im Vergleich mit nahe isogenem Probenmaterial analysiert werden, denn bei der sauren Extraktion wird nicht nur Cyanophycin extrahiert, sondern auch andere säurelösliche Substanzen.

## C 2 Allergologische Untersuchungen

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein Modellsystem zur allergologischen Risikoanalyse von gentechnisch modifizierten Pflanzen (GMP) zu erstellen. In diesem Teilbereich wurden Verfahren etabliert, die den Anforderungen verschiedener Richtlinien der IFBC/ILSI, FAO/WHO und der EFSA zur Untersuchung einer potenziellen Allergenität von GMP gerecht werden. Es wurden Methoden etabliert, die sowohl eine Untersuchung der potenziellen Allergenität der neu exprimierten Proteine, als auch der gesamten Pflanze ermöglichen. In das Modellsystem fließen *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen zur Prüfung der Stabilität der Modellproteine gegen Verdau und Prozessierung, *in silico*- und *in vitro*-Untersuchungen zur Analyse möglicher Homologien zu bekannten Allergenen und Sensibilisierungsstudien an Labortieren ein. Die Tierstudien beinhalten Analysen der Seren auf allergiespezifische Parameter. Dazu wurden ELISA zur Bestimmung des Gesamt-IgE-Titers herangezogen und Methoden zur Analyse spezifischen IgEs entwickelt und etabliert.

### C 2.1 Untersuchungen zur Stabilität der Modellproteine

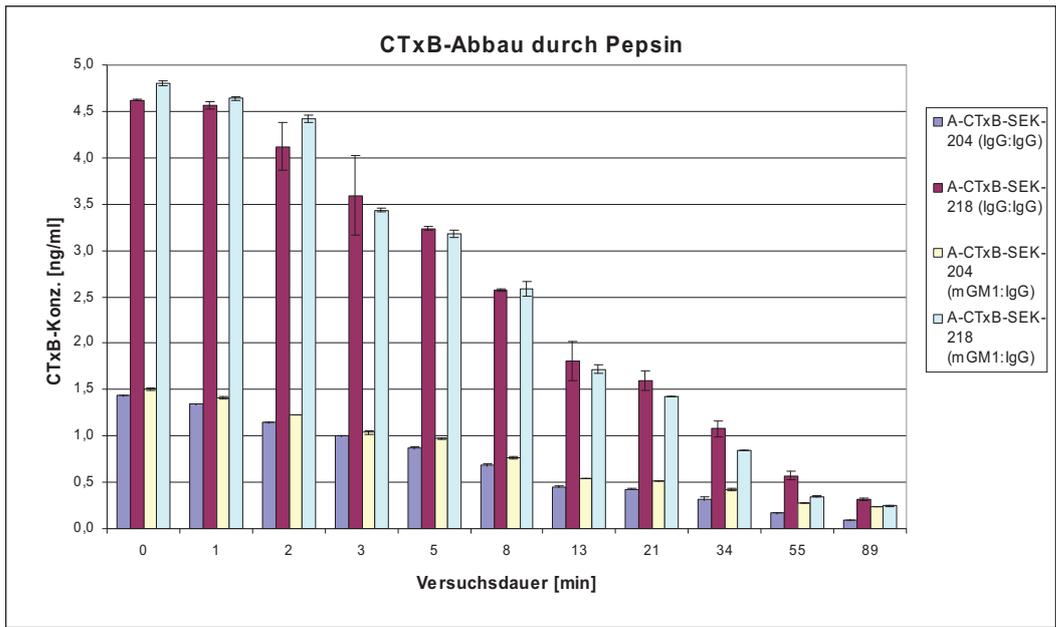
#### In-vitro-Verdau

Ein wichtiger Bestandteil der Risikobewertung gentechnisch veränderter Pflanzen ist die Prüfung der transgen exprimierten Proteine auf Stabilität gegenüber Verdau.

Durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mohr der Agrar- und Umweltwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock wurden *in vitro*-Methoden zur Untersuchung der Stabilität der Modellproteine gegen Enzyme des Verdauens (Amylase, Pepsin, Pankreatin) modifiziert oder entwickelt. In Anlehnung an diese Testverfahren konnten Stabilitätsuntersuchungen mit den Modellproteinen durchgeführt werden. Besondere Aufmerksamkeit wurde dabei auf die Prüfung der Stabilität gegen die Endopeptidase Pepsin gelegt. Die Stabilität der Proteine gegen Amylasen, die bei Verdauungsschritten im Speichel eine Rolle spielen, wurde nicht berücksichtigt, da diese Enzyme lediglich Polysaccharide spalten. Auch wurden keine umfassenden Beständigkeitsuntersuchungen für die Modellproteine gegen das Enzymgemisch Pankreatin durchgeführt, da die Konzentrationen der Modellproteine nach Pepsinbehandlung unterhalb des Detektionslimits der Quantifizierungssysteme (ELISA) lagen.

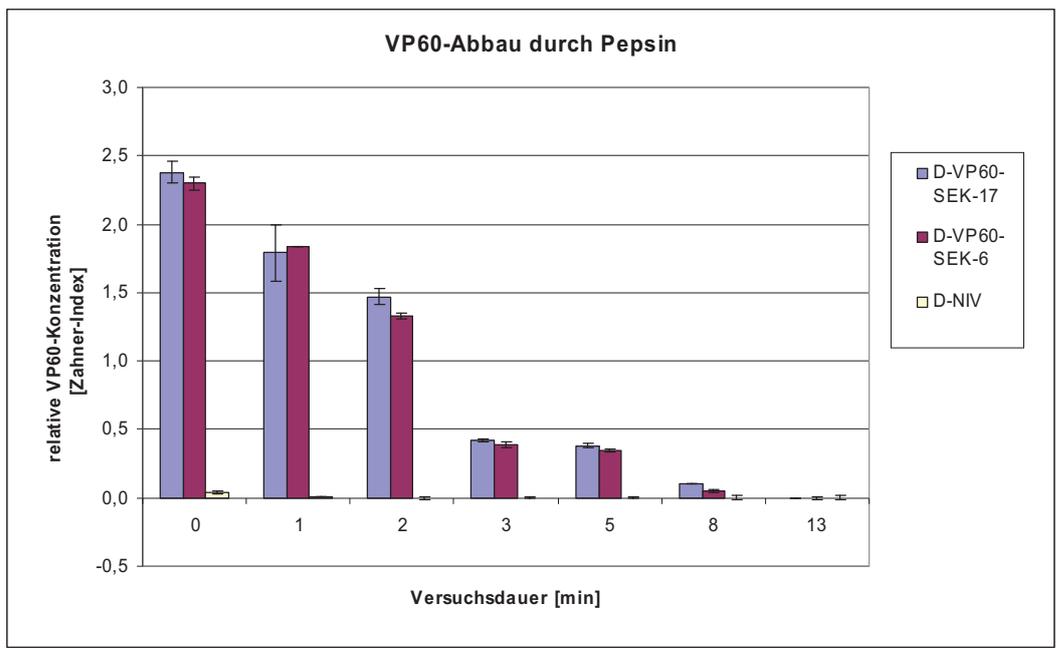
Um die Stabilität der Proteine zu bestimmen, wurde lyophilisiertes Pflanzenmaterial in Wasser homogenisiert und der pH-Wert der Suspension auf das Aktivitäts-Optimum des Verdauungsenzyms Pepsin (pH 1,5) eingestellt. Der Ansatz inkubierte bei 37 °C auf einem Schüttler. Nach bestimmten Zeitabständen wurden Proben von diesem Ansatz entnommen. Durch sofortige Neutralisierung des pH-Wertes (pH 7) wurde die Enzymaktivität des Pepsins inhibiert und die Proben konnten bis zur weiteren Untersuchung auf Eis gelagert werden. Die Quantifizierung der Modellproteine erfolgte mittels der entwickelten ELISA-Systeme.

Abbildung C.13 zeigt das Ergebnis einer Untersuchung zur Abbaukinetik des Modellproteins CTxB aus lyophilisiertem Pflanzenmaterial der Varianten *Albatros-CTxB-SEK-204* und *Albatros-CTxB-SEK-218* durch das Verdauungsenzym Pepsin. Die Quantifizierung des CTxB erfolgte mit den beiden Systemen IgG:IgG-ELISA und mGM1:IgG-ELISA. Wie bereits unter Punkt C 1.3 beschrieben, wird auch aus diesen Ergebnissen deutlich, dass die Kartoffelvariante *Albatros-CTxB-SEK-218* signifikant mehr CTxB exprimiert als die Linie *Albatros-CTxB-SEK-204*. In beiden Varianten wird das Protein CTxB nach Pepsinzugabe zur Probensuspension mit der Zeit stetig abgebaut. Die Abbildung C.13 zeigt deutlich, dass der Abbau des Proteins CTxB einem nahezu linearen Verlauf folgt. Doch auch nach Reaktionszeiten von 89 Minuten ist das Protein im Ansatz der Variante *Albatros-CTxB-SEK-218* mit beiden Detektionssystemen noch in Spuren nachzuweisen (IgG:IgG-ELISA: 0,314 ng/ml, mGM1:ELISA: 0,248 ng/ml). Der CTxB-Gehalt nach 89 minütiger Reaktionszeit im Ansatz der Variante *Albatros-CTxB-SEK-204* liegt für die IgG:IgG-ELISA unterhalb der Nachweisgrenze (0,156 ng/ml) und gemessen mit dem mGM1-ELISA bei 0,238 ng/ml.



**Abbildung C.13: Abbaukinetik des Modellproteins CTxB durch das Verdauungsenzym Pepsin, gemessen mit zwei unterschiedlichen Detektionssystemen (mGM1:lgG-ELISA und IgG:lgG-ELISA)**  
 N = 2 (Doppelbestimmungen)

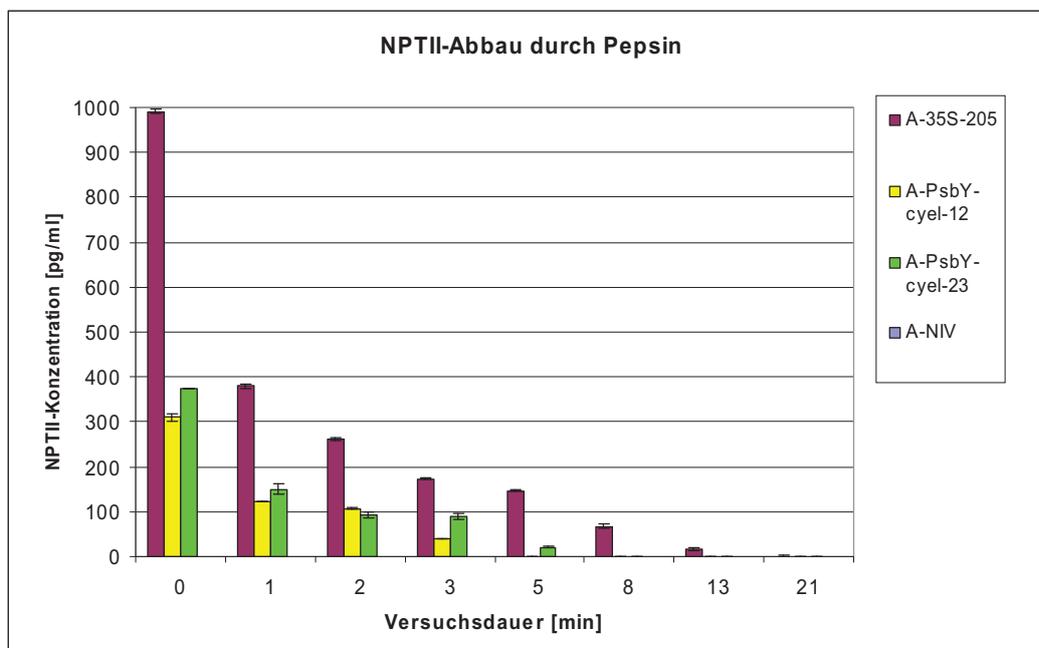
Für die Analyse der Abbaukinetik des Modellproteins VP60 wurden zum einen der ELISA des FLI Riems und zum anderen das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte ELISA-Verfahren herangezogen. Mit beiden Verfahren ließ sich zeigen, dass das Protein VP60 durch das Verdauungsenzym Pepsin zügig abgebaut wird. Nach 8-minütiger Reaktion der Probensuspensionen mit Pepsinlösung liegt der VP60-Gehalt im Bereich der mitgeführten Negativkontrolle (D-NIV).



**Abbildung C.14: Abbau des Modellproteins VP60 durch das Verdauungsenzym Pepsin**  
 Darstellung der relativen VP60-Konzentration (Zahner-Index) der Varianten *Desiree-VP60-SEK-6*, *Desiree-VP60-SEK17* und *Desiree-NIV*  
 N = 3 (Dreifachbestimmungen)

Jede der untersuchten transgenen Kartoffellinien exprimiert das Genprodukt des Resistenzgens *nptII* Neomycinphosphotransferase II. Abbildung C.15 zeigt deutlich, dass das Verdauungsenzym Pepsin das Modellprotein NPTII innerhalb weniger Minuten abzubauen vermag. Es wurden lyophilisierte Kartoffelmaterialien der Linien *A-NIV*, *A-35S-205*, *A-PsbY-cyel-12* und *A-PsbY-cyel-23* für die Untersuchung der Abbaukinetik des Modellproteins NPTII durch das Verdauungsenzym Pepsin herangezogen. Zu Beginn der Reaktionszeit lag der NPTII-Gehalt des Extraktes der Linie *A-35S-205*, bei den vorliegenden Extraktionsbedingungen (1 g Lyophilisat, 3 ml Aqua dest., 6 ml Pepsin-Lösung), bei 991,5 pg/ml ( $\pm 6,4$  pg/ml). Nach einer Reaktionszeit von 13 Minuten war die Konzentration auf 16,8 pg/ml ( $\pm 2,1$  pg/ml) gesunken und nach 21 Minuten war kein NPTII mehr zu detektieren.

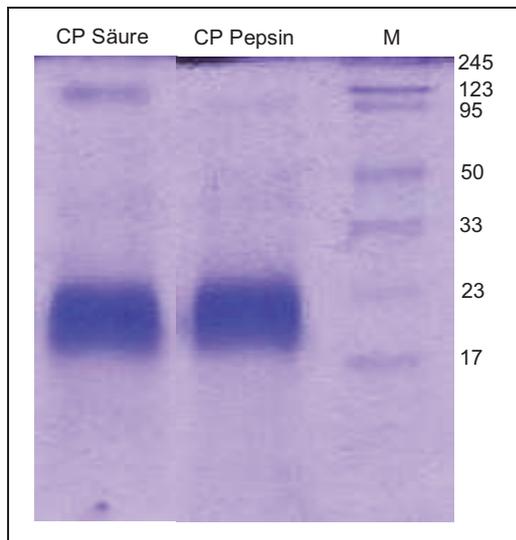
Weiterhin ist zu erkennen, dass die NPTII-Expressionslevel in den einzelnen Linien unterschiedlich hoch sind. So lag bei identischen Extraktionsbedingungen der NPTII-Gehalt der Linien *A-PsbY-cyel-12* und *A-PsbY-cyel-23* nur bei ca. einem Drittel (309,7 pg/ml ( $\pm 8,0$  pg/ml) und 373,3 pg/ml ( $\pm 0,0$  pg/ml)) der NPTII-Konzentration der Linie *A-35S-205* (991,5 pg/ml ( $\pm 6,4$  pg/ml)).



**Abbildung C.15: Abbau des Modellproteins NPTII durch den Einfluss des Enzyms Pepsin**  
Zur Untersuchung herangezogen wurden die Linien *Albatros-35S-205*, *Albatros-PsbY-cyel-12*, *Albatros-PsbY-cyel-23* und *Albatros-NIV*  
N = 2 (Doppelbestimmungen)

Für die Bestimmung der Stabilität der Substanz Cyanophycin wurde lyophilisiertes Kartoffelmaterial der Linien *Albatros-PsbY-cyel-12*, *Albatros-PsbY-cyel-23* und *Albatros-NIV* zum einen in 0,1 molarer HCl und zum anderen in Pepsinlösung suspendiert. Da Cyanophycin bei pH-Werten von  $< 2$  in gelöster Form vorliegt, kann davon ausgegangen werden, dass die saure Pepsinlösung (pH 1,5) diese Substanz aus dem Kartoffelmaterial zu lösen vermag. Nach bestimmten Zeiten wurden aus den Versuchsansätzen Proben zur quantitativen Cyanophycinbestimmung entnommen. Die Quantifizierung erfolgte in diesem Versuch nicht mit der Bradford-Methode, da diese Proteinnachweis-Methode auch mögliche Spaltprodukte des Cyanophycins detektieren und keine Aussage über einen eventuellen Abbau liefern würde. Es wurden lediglich Aliquote auf ein Elektrophoresegel

aufgetragen und die Intensität der Cyanophycinbanden nach Coomassie-Färbung bewertet. Folgende Abbildung C.16 zeigt ein Elektrophoresegelel, auf welches Cyanophycinproben nach 90-minütiger Behandlung mit Säure (Negativkontrolle) bzw. Pepsin aufgetragen wurden. Es ist kein Unterschied in der Intensität der Cyanophycinbande (ca. 17-23 kDa) zwischen der Säurebehandlung und der Pepsinbehandlung zu erkennen. Lediglich eine Proteinbande, die in der Säureprobe bei ca. 123 kDa vorhanden ist, liegt nach Pepsinverdau nicht mehr vor.



**Abbildung C.16: Pepsin-Behandlung von gereinigtem Cyanophycin**

Zur Untersuchung der Stabilität der Substanz Cyanophycin (CP) gegen das Verdauungsenzym Pepsin wurde aufgereinigtes Material aus der Kartoffellinie A-PsbY-Cyel-12 eingesetzt. Dargestellt ist CP nach 90-minütiger Behandlung mit Säure (Negativkontrolle) bzw. Pepsin.

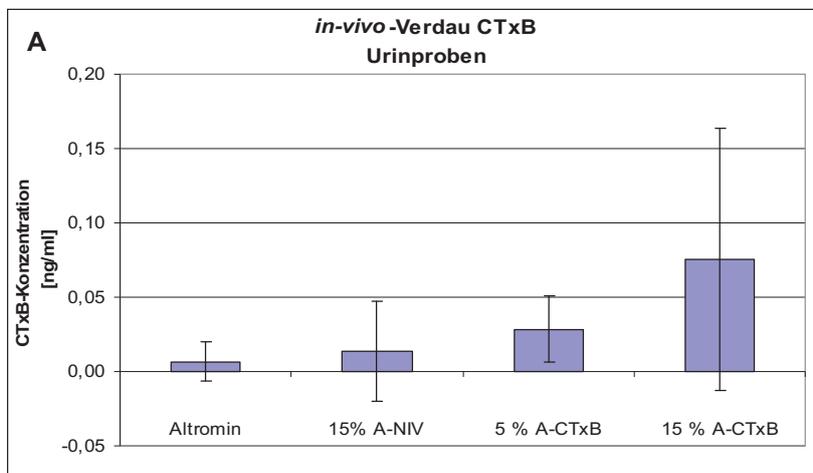
### In vivo-Verdau

In den Laboren der Primacyt GmbH, Schwerin wurden Fütterungen von Laborratten zur *in vivo*-Untersuchung der Stabilität der Modellproteine vorgenommen. Den Ratten der Rasse *Wistar* wurde ein Futter, welches zu 0 und 5 bzw. 15 % beigemengtes Kartoffelyophilisat enthielt als Alleinfutter *ad libitum* verfüttert. Pro Versuchsgruppe kamen 3 Tiere zum Einsatz. Um Fragestellungen des Verdauens der Modellproteine quantitativ beantworten zu können, wurden die Tiere einzeln für acht Stunden in Stoffwechselkäfigen gehalten. Mithilfe dieser speziellen Käfige konnten Kot und Urin des untersuchten Tieres separat gesammelt werden. Die Kot- und Urinproben wurden mit den unter C 1.3 beschriebenen ELISA-Systemen auf Vorhandensein von Modellproteinen untersucht. Bis zur Analyse wurden die Proben bei -20 °C gelagert. Die Urinproben wurden unverdünnt zur Untersuchung eingesetzt, die Kotproben wurden mit PBST in einem Verhältnis von 1:5 (Masse/Volumen) extrahiert. Um den Einfluss der Probenmatrix charakterisieren zu können, wurden Wiederfindungsstudien durchgeführt. Dazu wurden den Urinproben und den Kotextrakten die jeweiligen Modellproteine in bekannter Konzentration hinzugegeben - die Proben wurden „gespiked“. Für die Wiederfindungsuntersuchungen wurden Konzentrationen gewählt, die der Hälfte der höchsten Konzentration der mitgeführten Standardreihe entsprachen. Diese Proben wurden dann quantitativ im ELISA untersucht und die detektierte Menge wurde in Prozent der theoretischen Konzentration angegeben.

Für die Bestimmung der Wiederfindung des Modellproteins **CTxB** in Sammelurinproben der Ratten die mit Material der CTxB-exprimierenden Kartoffeln gefüttert wurden, wurde CTxB (SIGMA-Aldrich) in einer Konzentration von 5 ng/ml zugesetzt. Hier konnte eine mittlere Wiederfindungsrate von 57,7 % (36,1 % - 85,7 %) im mGM1-ELISA ermittelt werden. Es wurden also durchschnittlich von den zugegebenen 5 ng/ml CTxB lediglich

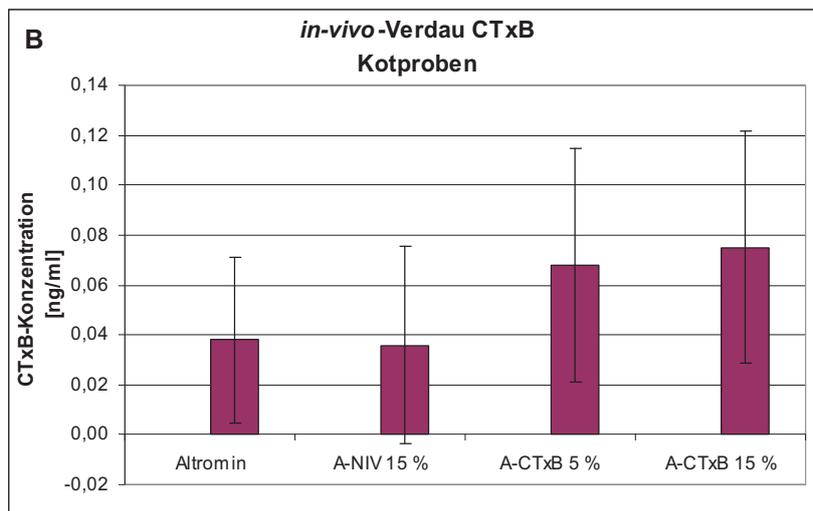
2,885 ng/ml im Sammelurin wiedergefunden. In den Extrakten der Kotproben lag die Wiederfindung des Proteins CTxB zwischen 1,07 und 4,19 %. Es konnten von den gespikten 5 ng/ml lediglich 0,054 bis 0,210 ng/ml wiedergefunden werden.

In den ungespikten Sammelurinproben und extrahierten Kotproben der Ratten, die mit CTxB-haltigem Kartoffelmaterial gefüttert worden sind, konnten geringste Mengen an CTxB detektiert werden. Wie in Abbildung C.17 zu erkennen sind die Konzentrationen an detektiertem CTxB in den Urin- (A) und Kotproben (B) der CTxB-Kartoffel gefütterten Tiere etwas höher als bei den Tieren, die mit Normalfutter (Altromin) bzw. mit Kartoffelmaterial der nahen isogenen Variante *Albatros* gefüttert worden sind. Jedoch liegen die nachgewiesenen Konzentrationen teilweise unterhalb des kleinsten Standards der mitgeführten Standardreihe des Messsystems von 0,156 ng/ml. Darüber hinaus überschneiden sich die Fehlerbalken der gemessenen Proben, sodass die Unterschiede nicht signifikant sind.



**Abbildung C.17: In vivo-Verdau des Modellproteins CTxB**

*A: Detektierte CTxB-Konzentrationen im Urin der Versuchstiere*



*B: Detektierte CTxB-Konzentrationen in Extrakten der Kotproben der Versuchstiere*

N = 10 Proben  
(Doppelbestimmungen)

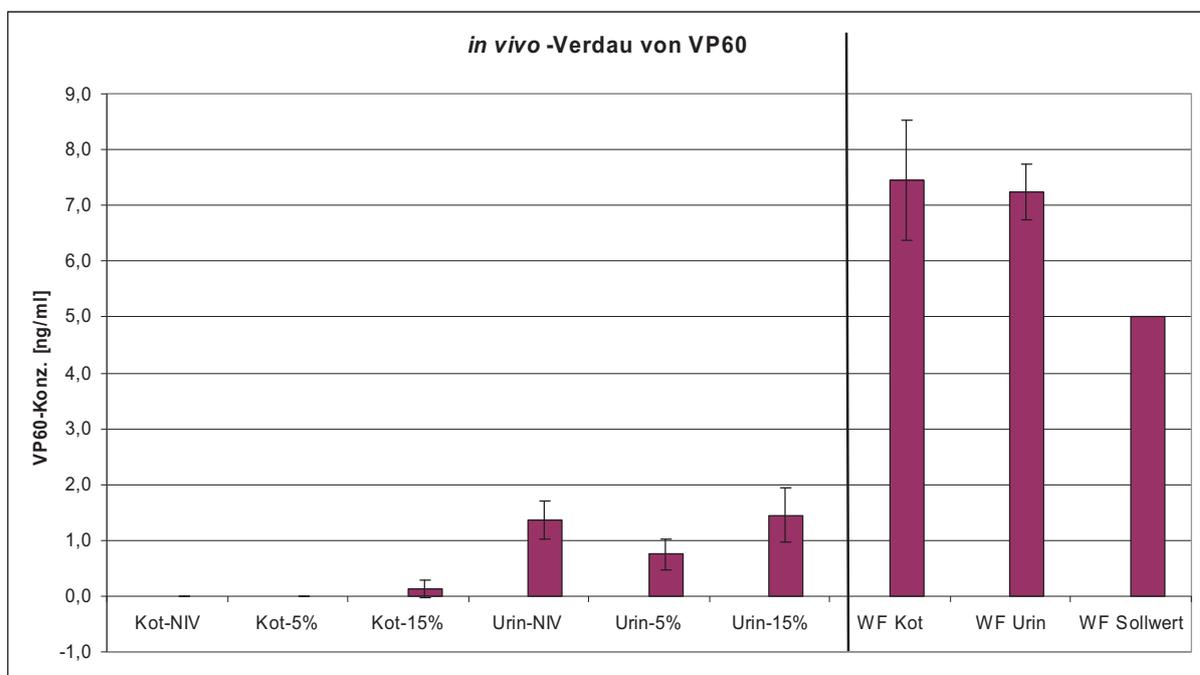
Da zur Bestimmung des CTxB-Gehaltes im Gegensatz zu den Urinproben die Kotproben mit PBST im Verhältnis von 1:5 extrahiert wurden, muss die detektierte CTxB-Konzentration mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden. Nach Berücksichtigung der Verdünnung sind 0,339 ng/g im Kot der Ratten, die mit 5 % A-CTxB und 0,375 ng/g im Kot der Ratten, die mit 15 % A-CTxB gefüttert worden sind, nachzuweisen. Dabei ist zu beachten, dass auch 0,190 ng/g bei den mit Normalfutter (Altromin) und 0,179 ng/g bei

den mit *A-NIV* gefütterten Ratten detektiert wurde. Die detektierten Unterschiede sind nicht signifikant unterschiedlich zueinander.

Für den Nachweis des Modellproteins **VP60** in den Exkrementen der mit VP60-haltigem Kartoffelmaterial gefütterten Ratten konnten anhand eines semiquantifizierten Standardmaterials Mengenbestimmungen durchgeführt werden. Im Kotextrakt der Tiere, die mit Futter, dem zu 15 % VP60-haltiges Kartoffelmaterial beigemischt war gefüttert wurden, konnten 0,119 ng/ml detektiert werden. Dieser Wert liegt jedoch unterhalb des kleinsten Standards von 0,3125 ng/ml.

In den Urinproben der Tiere, die mit VP60-haltigem Kartoffelmaterial gefüttert wurden, konnten VP60-Konzentrationen von 0,751 ng/ml (Fütterung von 5 % Kartoffelmaterial mit VP60) bzw. 1,446 ng/ml (Fütterung von 15 % Kartoffelmaterial mit VP60) nachgewiesen werden. Jedoch konnten auch im Urin der Tiere, die mit Material der nahen isogenen Variante gefüttert worden sind durchschnittlich 1,367 ng/ml VP60 nachgewiesen werden. Die Standardabweichungen der auf VP60 untersuchten Urinproben überschneiden sich, sodass die Unterschiede nicht signifikant sind.

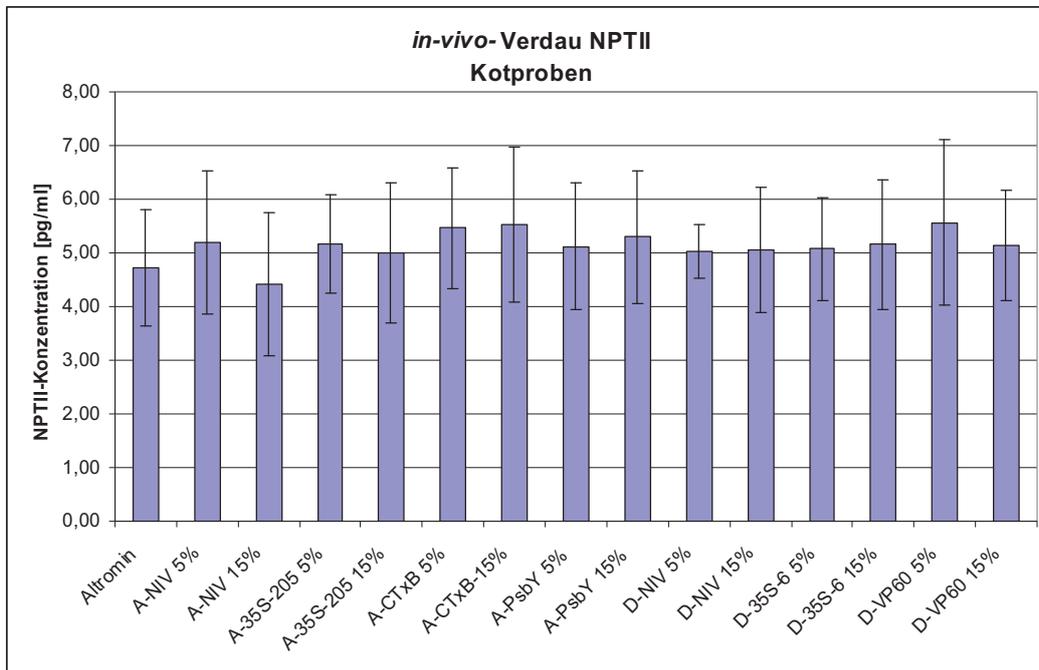
Sowie für die Kotextrakte als auch für die Urinproben wurden Wiederfindungsstudien durchgeführt, um einen Einfluss der Probenmatrix auf das untersuchte Modellprotein beurteilen zu können. Poolproben von Kotextrakten und Urinproben von Tieren, die mit Material der nahen isogenen Variante gefüttert worden sind, wurde VP60-Material in einer Endkonzentration von 5 ng/ml hinzugegeben. Im gespikten Kotextrakt wurden  $7,457 \pm 1,083$  ng/ml und im Urin  $7,236 \pm 0,496$  ng/ml nachgewiesen. Diese Konzentrationen entsprechen Wiederfindungen von 149,1 % für den Kotextrakt und 144,7 % für die Urinprobe. Nach Abzug des durchschnittlichen VP60-Wertes der ungespikten Urinproben ergibt sich eine Wiederfindung von 117,4 %.



**Abbildung C.18: In vivo-Verdau des Modellproteins VP60 - Detektierte VP60-Konzentrationen in Kotextrakten und Urin der Versuchstiere (WF = Wiederfindung)**

N = 10 Proben (Doppelbestimmungen)

Das Protein **NPTII** wird in allen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten transgenen Linien exprimiert. Um zu analysieren, ob nach Aufnahme von NPTII-haltigem Kartoffelmaterial mit dem Futter das Modellprotein in den Exkrementen der Ratten nachweisbar ist, wurden 8 Pools der Kotproben je Versuchsgruppe zusammengestellt und untersucht.



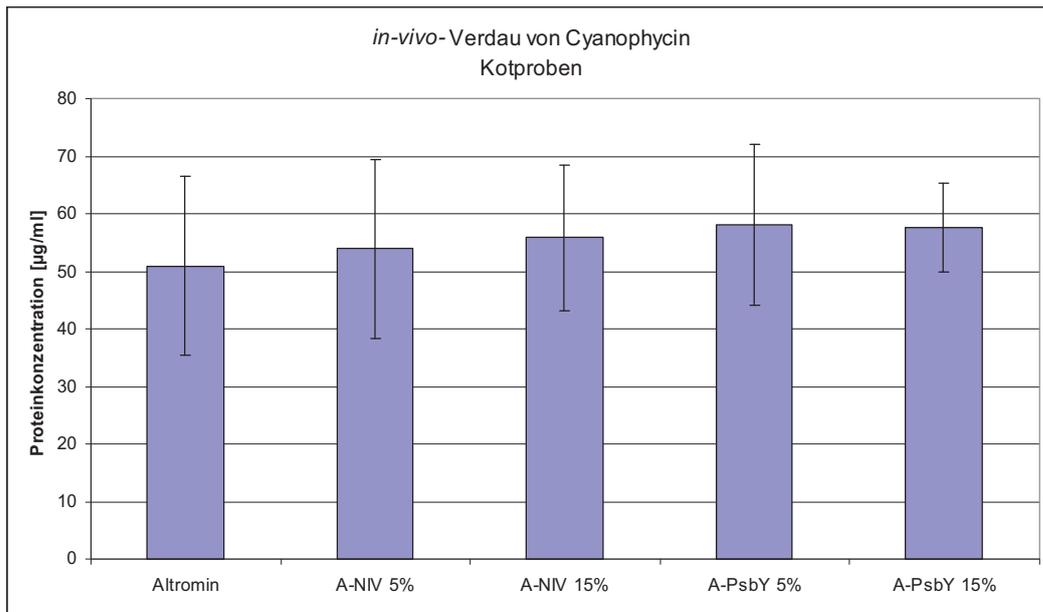
**Abbildung C.19: In vivo-Verdau des Modellproteins NPTII - Detektierte NPTII-Konzentrationen in Kotextrakten und Urin der Versuchstiere**

N = 10 Proben (Doppelbestimmungen)

In allen Pools der Kotproben der mit den verschiedenen transgenen und nahen isogenen Kartoffeln gefütterten Ratten konnten geringe Mengen von durchschnittlich 5,1 µg/ml an NPTII detektiert werden. Die Unterschiede in den NPTII-Gehalten in den Exkrementen der einzelnen Versuchsgruppen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. In den Proben der mit transgenem, NPTII-haltigem Material gefütterten Tieren konnte nicht mehr NPTII nachgewiesen werden als in den Proben der Tiere, die mit dem Normalfutter Altromin oder mit Kartoffelmaterial der nahen isogenen Varianten gefütterter wurden. Weiterhin ist kein Unterschied im NPTII-Gehalt in den Proben der Tiere, die 5 % oder 15 % Futter (Lyophilisat-Anteil am Futter) bekamen, zu erkennen.

Für die Analyse des **Cyanophycin**-Gehaltes in den Kotproben der Ratten, die mit transgenem, cyanophycin-haltigem Kartoffelmaterial gefütterter worden sind, wurden die Kotproben nach dem Herauslösen der wasserlöslichen Proteine mit 0,1 M HCl extrahiert. Diese Extrakte wurden unter Verwendung der Bradford-Methode auf Ihren Gesamtproteingehalt untersucht und anhand einer BSA-Standardreihe quantifiziert.

Die detektierten Proteinkonzentrationen in den sauren Extrakten der Kotproben-Pools der Cyanophycin-gefütterten Tiere lagen mit 58,1 µg/ml (5 % Lyophilisat *A-PsbY*) und 57,5 µg/ml (15 % Lyophilisat *A-PsbY*) etwas höher als in den Extrakten der mit Normalfutter Altromin (50,9 µg/ml) oder mit Material der nahen isogenen Pflanzen (53,9 µg/ml für 5 % und 55,8 µg/ml für 15 %) gefütterten Tiere. Diese Mengen sind jedoch aufgrund der relativ hohen Schwankungen innerhalb der einzelnen Gruppen (von bis zu 15,6 µg/ml) nicht signifikant unterschiedlich.



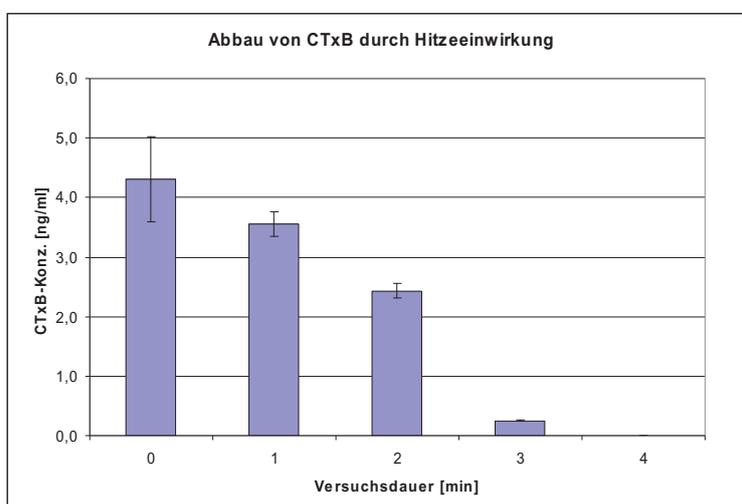
**Abbildung C.20: In vivo-Verdau der Modellsbstanz Cyanophycin Konzentrationen in Kotextrakten der Versuchstiere**  
N = 10 Proben (Doppelbestimmungen)

### Hitzeresistenz

Die meisten Lebensmittelallergene verlieren ihre sensibilisierende Wirkung, wenn sie hohen Temperaturen, wie sie beispielsweise beim Kochen entstehen, ausgesetzt werden (Fiocchi *et al.* 2004).

Um die Stabilität der Modellproteine gegen Prozessierung zu analysieren, wurden Extrakte der Kartoffelyophilisate einer Temperatur von 100 °C ausgesetzt. Nach bestimmten Zeitabständen wurden Proben entnommen und bis zur Analyse der Modellproteine mit den entwickelten ELISA-Systemen in einem Eiswasserbad gelagert. Für diese Untersuchung wurden Extrakte der einzelnen Kartoffelyophilisate eingesetzt.

Abbildung C.21 stellt den Verlauf des Denaturierungsvortschritts des Modellproteins **CTxB** durch Hitze einwirkung in Abhängigkeit von der Zeit dar. Es ist zu erkennen, dass das CTxB in einem Extrakt, der einer Temperatur von 100 °C ausgesetzt war, bereits 4 Minuten mit dem ELISA-System nicht mehr nachweisbar war.

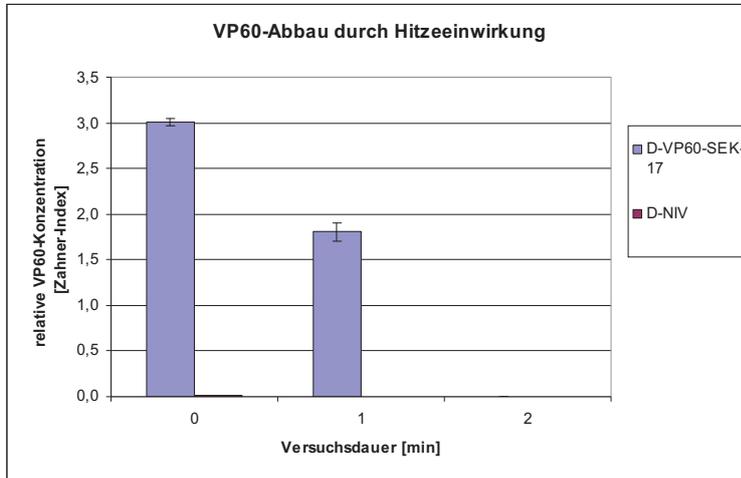


**Abbildung C.21: Denaturierung des Modellproteins CTxB durch Hitze einwirkung**

*Untersucht wurde ein Lyophilisat-Extrakt der Kartoffellinie A-CTxB-SEK-218*

N = 2 (Doppelbestimmungen)

Anhand der folgenden Abbildung wird der denaturierende Einfluss einer Temperatur von 100 °C auf das Modellprotein **VP60** in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Nach 1 Minute liegt die relative VP60-Konzentration des Extraktes, noch bei etwa 60 %, nach 2 Minuten ist das Modellprotein jedoch nicht mehr nachweisbar.



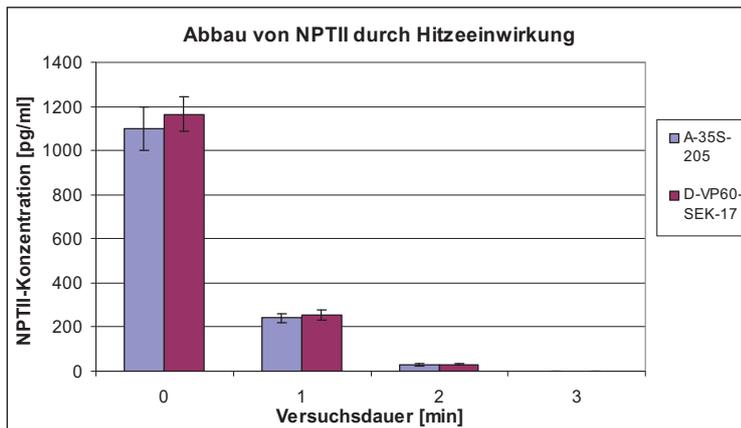
**Abbildung C.22:**  
Denaturierung des  
Modellproteins VP60 durch  
Hitze einwirkung

*Für diese Teiluntersuchung wurde ein Extrakt der Kartoffellinie D-V60-SEK-17; als Kontrolle diente ein Extrakt der Linie D-NIV*

*Die relative VP60-Konzentration ist anhand des Zahner-Index dargestellt*

N = 2 (Doppelbestimmungen)

Zur Untersuchung der Hitzestabilität des Modellproteins **NPTII** wurden Extrakte des lyophilisierten Pflanzenmaterials der Linien *A-35S-205* und *D-VP60-SEK-17* eingesetzt. Beide Linien haben etwa die gleiche Konzentration an Gesamtprotein und NPTII. Nach 1 Minute bei 100 °C lag der NPTII-Gehalt in den Extrakten bei 21,9 % und nach 2 Minuten bei 2,6 % (*A-35S-205*) bzw. 2,7 % der Ausgangskonzentration.



**Abbildung C.23:** Denaturierung des  
Modellproteins NPTII durch  
Hitze einwirkung

*Untersucht wurden Extrakte der Linien A-35S-205 und D-VP60-SEK-17*

N = 2 (Doppelbestimmungen)

Um den Einfluss einer Temperatur von 100 °C auf die Substanz Cyanophycin zu untersuchen, wurde nicht wie bei den anderen Modellproteinen ein Extrakt des Kartoffelmaterials, sondern aufgereinigtes Cyanophycin eingesetzt. Die Substanz lag gelöst in 0,1 M HCl mit einer Proteinkonzentration von 0,1 mg/ml vor. Der Nachweis der Substanz in den entnommenen Aliquoten des Ansatzes erfolgte semiquantitativ mittels SDS-PAGE. Die Intensitäten der Cyanophycinbanden nach Färben des Gels wiesen bis zur untersuchten Versuchsdauer von 89 Minuten keine Unterschiede zueinander auf.

### C 2.2 *In silico*-Vergleich der Modellproteine mit bekannten Allergenen

Die Kriterien der FAO/WHO zur *in silico*-Allergenitätsprüfung sind in dem gemeinsam veröffentlichten Dokument „Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology“ (2001) aufgeführt. Nach diesen Vorschlägen sollten Untersuchungen auf Kreuzreaktivitäten vorgenommen werden, wenn mindestens einer der beiden folgenden Punkte zutrifft:

- mehr als 35 % Identität innerhalb eines Sequenzbereiches von 80 Aminosäuren des untersuchten Proteins mit einem bekannten Allergen oder
- Homologie von 6 aufeinanderfolgenden Aminosäuren in der Sequenz des untersuchten Proteins im Vergleich mit einem bekannten Allergen

Für einen *in silico*-Vergleich der Sequenzen der Modellproteine mit Sequenzen bekannter Allergene wurden verschiedene Internet-basierte Datenbanken genutzt. Um die Sequenzen vergleichen zu können, müssen diese in den sogenannten „single letter amino acid code“ gebracht werden. Das heißt, dass die Aminosäureabfolge der Primärstruktur des zu untersuchenden Proteins, beginnend mit dem N-Terminus in Richtung C-Terminus, welche auch der Translation an den Ribosomen entspricht, herangezogen wird (Löffler *et al.* 2007).

Für keines der Modellproteine wurden homologe Allergensequenzen detektiert, die in Sequenzbereichen von 80 Aminosäuren Identitäten von mehr als 35 % aufwiesen. In Tabelle G 9.16 (siehe Anhang) sind sämtliche mit der Datenbank SDAP (Sequence Database of Allergenic Proteins) identifizierte Allergene mit einer Homologie von mehr als 25 % aufgelistet. Die Datenbank SDAP greift für die Sequenzvergleiche eingegebener Proteine mit bekannten Allergenen auf die Datenbanken PDB, MMDB-Entrez, SwissProt, NCBI-Entrez und PIR zu.

Bei einem Abgleich der Aminosäuresequenzen der Modellproteine mit der Datenbank SDAP konnten für das Protein CTxB zwei Übereinstimmungen von jeweils 6 aufeinanderfolgenden Aminosäuren gefunden werden. Es wurden Homologien zu den Allergenen *Can f 3* und *Dic v a* identifiziert. *Can f 3* ist ein Albumin aus dem Hund (*Canis domesticus*), dem eine allergene Wirkung zugesprochen wird. Das Protein findet sich an den Haaren und den Hautschuppen von Hunden und zählt zu den „indoor-Allergenen“. Etwa 35 % der Hundeallergiker zeigen eine positive IgE-Reaktivität auf dieses Protein (Spitzauer *et al.* 1994). Anhand der anderen beschriebenen Datenbanken konnten keine Homologien zu bekannten Allergenen detektiert werden.

*Dic v a* ist ein Protein aus dem bovinen Lungenwurm *Dictyocaulus viviparus*. Es besitzt hohe Bindungsaffinität zu Fettsäuren (Ölsäure, Palmitinsäure, Stearinsäure, Arachidonsäure) und Retinoiden (chemische Substanzen, ähnlich dem Retinol = Vitamin A) (Kennedy *et al.* 1995).

Für die Analyse des Modellproteins CTxB auf Homologien zu bekannten Allergenen, wurden zwei Sequenzen herangezogen. Zum einen wurde die aus der Gensequenz abgeleitete Proteinsequenz (Mikschofsky, Universität Rostock) und zum anderen die Sequenz (P01556) aus der UniProt-Datenbank zur Untersuchung eingesetzt. Die Sequenz aus der UniProt-Datenbank lieferte lediglich einen Treffer zur Homologie von 6 aufeinanderfolgenden Aminosäuren (VLLSSA). Bei dem sequenzierten Protein ist die Aminosäure Isoleucin (I) an Stelle 68 (siehe Anhang) gegen ein Threonin (T)

ausgetauscht. Dieser Aminosäureaustausch führte dazu, dass im Protein CTxB die kurze Sequenz KNGATF, welche eine Homologie von 6 aufeinanderfolgenden Aminosäuren zum Allergen *Dic v a* darstellte, verändert vorliegt.

**Tabelle C 2.1: Ergebnisse des *in silico*-Vergleichs des Modellproteins CTxB mit bekannten Allergenen, Identität von 6 aufeinanderfolgenden Aminosäuren**

Abgleich mit FASTA 3.45

AS = Aminosäuresequenz; Sequenz der 6 aufeinanderfolgenden identischen Aminosäuren

Protein	Identität bei 6 aufeinanderfolgenden AS			
	Allergen	Sequenz	Herkunft	Proteinart
CTxB (sequenziertes Protein)	<i>Can f 3</i>	P49822 AS: VLLSSA	<i>Canis familiaris</i> ( <i>Canis domesticus</i> ); Hund	Serum Albumin (Precursor)
	<i>Dic v a</i>	AAC47403 AS: KNGATF	<i>Dictyocaulus viviparus</i> ; Boviner Lungenwurm	Lipid-bindendes Protein; Nematode Polyprotein Antigen Precursor
CTxB - Sequenz nach UniProt Datenbank	hier nur Treffer für <i>Can f 3</i> , da 1 Aminosäuren- austausch an Position 68	P49822 AS: VLLSSA	<i>Canis familiaris</i> ( <i>Canis domesticus</i> ); Hund	Serum Albumin (Precursor)

## C 2.3 Screening von Patientenseren

### C 2.3.1 Spezifisches-Serumscreening

Die *in silico*-Analyse der primären Aminosäuresequenz der Modellproteine auf Homologie zu bekannten Allergenen lieferte keine positiven Resultate für das Kriterium, dass in Sequenzbereichen von 80 Aminosäuren Homologien von mehr als 35 % auftreten. Jedoch wurden in der primären Aminosäuresequenz des Modellproteins CTxB zwei Sequenzen von jeweils sechs aufeinanderfolgenden Aminosäuren identifiziert, die identisch zu Sequenzen bekannter Allergene (Tabelle C 2.1) sind. Eine allergologische Risikoanalyse von GMP sieht in diesem Fall vor, dass transgenkodierte Protein auf Kreuzreaktivitäten mit Seren von Patienten mit Sensitivität gegen die identifizierten Allergene zu untersuchen.

Um Analysen auf IgE-Kreuzreaktivitäten des Modellproteins CTxB mit den identifizierten Allergenen durchführen zu können, war es notwendig Seren von Patienten mit bekannter Allergie gegen *Can f 3* und *Dic v a* heranzuziehen. Patientenseren mit bestätigter IgE-Reaktivität gegen das Allergen *Dic v a* waren nicht zu beziehen. Ebenfalls waren Seren mit Reaktivität gegen *Can f 3* nicht verfügbar. Jedoch ist das Allergen *Can f 3* in gereinigter Form über die Firma Phadia kommerziell erhältlich. Um Patientenseren zu identifizieren, die spezifisches IgE gegen dieses Allergen enthalten, wurden 100 Seren mit bestätigter Hundeallergie auf Reaktivität mit *Can f 3* getestet (siehe Anhang). Für diese Studie wurde das ImmunoCAP-System der Firma Phadia herangezogen und wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. Ollert der klinischen Forschergruppe Molekulare und klinische Allergotoxikologie der Technischen Universität München (TUM) durchgeführt.

Die Seren, die positiv auf IgE-Reaktivität gegen *Can f 3* getestet wurden, sind anschließend auf Reaktivität mit dem Modellprotein CTxB untersucht worden. Dazu ist das Protein (Sigma-Aldrich) biotinyliert (Biotinylierungs-Kit; Roche) und an die Schwämmchen der ImmunoCAPs gekoppelt worden. Der Kopplungserfolg ist mit polyklonalen Maus-anti-CTxB-IgG-Antikörpern (Acris) und anti-Maus-IgG-POD-Antikörpern überprüft worden.

Von 11 *Can f 3* positiven Seren zeigten vier eine positive Reaktion mit dem Modellprotein CTxB (>0,35 kU/L; Werte: 0,49; 0,35; 3,01; 1,14 kU/L) und vier weitere ein leicht positives Ergebnis (>0,1<0,35 kU/L; Werte: 0,15; 0,23; 0,23; 0,30 kU/L). Insgesamt also 8/11 mit eindeutiger oder niedrigpositiver Reaktivität. 3/11 *Can f 3*-reaktive Seren zeigten keine Kreuzreaktivität mit dem Modellprotein (Werte: 0,01; 0,00; 0,05 kU/L). Von sechs Hund-positiven aber *Can f 3*-negativen Seren war keines mit CTxB reaktiv. Von drei völlig unabhängigen Kontrollen, die alle Hund-negativ waren, war kein Serum mit CTxB reaktiv. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Methode hilfreiche Ergebnisse liefern kann, um Hinweise auf IgE-Kreuzreaktionen zwischen zwei Proteinen zu erhalten.

Die Konzentrationen an spezifischem-Serum-IgE (kU/L) werden nach folgender Tabelle in bestimmte CAP-Klassen eingeteilt.

**Tabelle C 2.2: Einteilung der CAP-Klassen für spezifisches IgE**

IgE-Konzentration [kU/L]	CAP-Klasse
0,1 – 0,35	0
0,35 – 0,7	I
0,7 – 3,5	II
3,5 – 17,5	III
17,5 – 50	IV
50 – 100	V
> 100	VI

**Tabelle C 2.3: Can f 3 (e221)-positive Patientenserum - getestet auf Reaktivität mit dem Modellprotein CTxB**

<i>Can f 3</i> (e221) positive Seren (sIgE >0,35 kU/L)		CTxB-Reaktivität	
KU/L	Klasse	KU/L	Klasse
12,20	III	0,30	0
63,29	V	1,14	II
2,67	II	0,15	0
12,30	III	0,35	I
31,13	IV	0,49	I
4,27	III	0,23	0
0,93	II	0,01	0
4,39	III	0,23	0
134,22	VI	3,01	II
1,26	II	0,05	0
0,74	II	0,00	0

### C 2.3.2 Serumscreening mit Seren von Kartoffellergikern

Für die Analyse, ob die Integration der Transgene in das Genom der Kartoffellinien *Albatros* und *Desiree* einen Einfluss auf die Konzentration oder die Reaktivität der endogenen Kartoffellergene *Sola t1*, *t2*, *t3* und *t4* hat, wurde ein umfassendes Screening mit Seren von Kartoffellergikern und Nicht-Allergikern durchgeführt. In Zusammenarbeit

mit der Laborpraxis für Immunologie, Dr. Walraph in Neubrandenburg wurden 463 Patientenseren mit dem RAST (Radio-Allergen-Sorbent-Test) -System auf Vorhandensein spezifischer IgE-Antikörper gegen die endogenen Kartoffelallergene *Sola t1 - t4* untersucht. Die Ergebnisse der RAST-Untersuchungen werden in kU/L und zusätzlich in den Klassen 0 - VI angegeben (vgl. Tabelle C 2.2 ).

Neben den 10 untersuchten Konstrukten der Kartoffellinien *Albatros* und *Desiree* (siehe Tabelle B 1.1) wurde auch die IgE-Reaktivität gegen die Kontroll- bzw. Vergleichskartoffellinie *Linda* untersucht. Von den 463 Patientenseren zeigten 456 keine Reaktivität mit den Kartoffelallergenen der Linie *Linda* und wurden mit der RAST-Klasse 0 eingestuft. Im Folgenden soll auf die Ergebnisse, bei denen sich Unterschiede bei der vergleichenden Analyse der Modellpflanzen mit der Kartoffellinie *Linda* gezeigt haben, näher eingegangen werden. Drei der mit 0 eingestuften Seren zeigten leicht positive Reaktionen bei der Untersuchung der Linie *Albatros-NIV* (vgl. Serum 2, 3, 10) und wurden mit der RAST-Klasse I eingestuft. Eines der drei Seren mit „sehr niedriger“ (Klasse I) IgE-Reaktion mit der Linie *Linda* zeigte „deutlich erhöhte“ (Klasse III) bzw. „niedrige“ (Klasse II) Reaktivität bei der Untersuchung der Linien *Albatros* und *Desiree* (Seren 4, 7, 8). Ein Serum, welches mit der Stufe II eingestuft war, zeigte eine deutlich erhöhte IgE-Reaktion gegen die Allergene der Linien *Albatros* und *Desiree* (Serum 5). Die Reaktivität zweier Seren der Klasse III (Seren 1 und 9) wiesen mit dem Konstrukt *A-CTxB-204* eine erhöhte (Klasse IV) IgE-Reaktivität auf. Serum 6 wies bei der Linie *Linda* sowie bei den 10 Linien der Modellpflanzen hohe IgE-Reaktivitäten auf (Klasse IV).

In der folgenden Tabelle C 2.4 sind die Ergebnisse der 10 Patientenseren, die Reaktivität gegen die Allergene der Linie *Linda* und die Linien der Modellpflanzen *Albatros* und *Desiree* zeigten des Serumscreenings zusammengefasst.

**Tabelle C 2.4: Ergebnisse des Serumscreenings**

Patientenserum	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>Kartoffellinie</b>										
<i>Linda</i>	III	0	0	I	II	IV	I	I	III	0
<i>A-NIV</i>	III	I	I	I	III	IV	III	I	III	I
<i>A-CTxB-204</i>	IV	I	I	I	III	IV	III	I	IV	I
<i>A-CTxB-218</i>	III	I	I	I	III	IV	III	I	III	I
<i>A-35S-205</i>	III	I	I	I	III	IV	III	I	III	I
<i>A-PsbY-cyel-12</i>	III	I	I	I	III	IV	III	I	III	0
<i>A-PsbY-cyel-23</i>	III	I	I	I	III	IV	III	I	III	0
<i>D-NIV</i>	III	I	I	I	III	IV	III	I	III	0
<i>D-35S-6</i>	III	I	I	I	III	IV	III	I	III	0
<i>D-VP60-SEK-6</i>	III	0	I	I	III	IV	II	I	III	0
<i>D-VP60-SEK 17</i>	III	I	I	I	III	IV	II	I	III	0

Anhand der Ergebnisse der Seren 2, 3, 5, 7 und 10 wird eine leichte Erhöhung in der *in vitro*-IgE-Reaktivität bei der Untersuchung der nahen isogenen Varianten *Albatros* und *Desiree* im Vergleich mit der Sorte *Linda* ersichtlich. Selbst drei Seren, die gegen die Linie *Linda* keine Reaktion zeigten, wiesen eine leichte Erhöhung bei der Untersuchung der Modellpflanzen auf. Die vorliegenden Ergebnisse verdeutlichen demnach hauptsächlich einen geringen Sortenunterschied. Differenzen bei der vergleichenden Untersuchung der IgE-Reaktivität von nahe isogenem und transgenem Pflanzenmaterial ist lediglich anhand zweier Seren für das Konstrukt *A-CTxB-204* zu erkennen.

## **C 2.4 Sensibilisierende Wirkung der Modellproteine – Labortierversuche**

Um Aussagen darüber zu erhalten, ob eine genetische Veränderung einen Einfluss auf das allergene Potenzial der Modellpflanze Kartoffel hat, wurden Sensibilisierungsstudien mit Labortieren durchgeführt. Für die Untersuchungen wurden die Tiermodelle *Balb/c-Maus* und *Brown Norway Ratte* mit Material der Modellpflanzen sensibilisiert. Die Untersuchungen dienten zum einen der Detektion einer potenziellen Allergenität der Modellproteine und zum anderen der Analyse einer Veränderung der endogenen Allergene der Pflanze durch die genetische Modifikation.

Den Mäusen wurden 1 × wöchentlich über einen Zeitraum von 42 Tagen Extrakte der Kartoffellyophilisate intraperitoneal verabreicht. Die Extrakte kamen in drei unterschiedlichen Konzentrationen an gesamt löslichem Protein (TSP) (0,1; 1 und 10 mg/ml) zum Einsatz. Die Menge an verabreichtem Extrakt richtete sich nach dem Körpergewicht der Tiere. Vor Beginn und nach Abschluss des Versuches wurden den Labortieren Blutproben zur Untersuchung allergiespezifischer Parameter entnommen.

Die Ratten bekamen über einen Zeitraum von 42 Tagen dem Normalfutter zu 20 % beigemengte Kartoffellyophilisate gefüttert. Auch den Ratten wurden vor Beginn und nach Abschluss der Versuche Blutproben zur Bestimmung allergiespezifischer Parameter entnommen.

Als Parameter zum Nachweis und zur Quantifizierung einer allergischen Reaktion in den sensibilisierten Labortieren wurden die Bestimmung des Gesamt-IgE-Titers, des spezifischen IgE-Titers und der Nachweis von Substanzen nach basophiler Degranulation im Serum herangezogen.

### **C 2.4.1 Tiermodell *Balb/c Maus***

#### **Vorversuche – Untersuchung der Eignung von OVA als potenzielle Positivkontrolle**

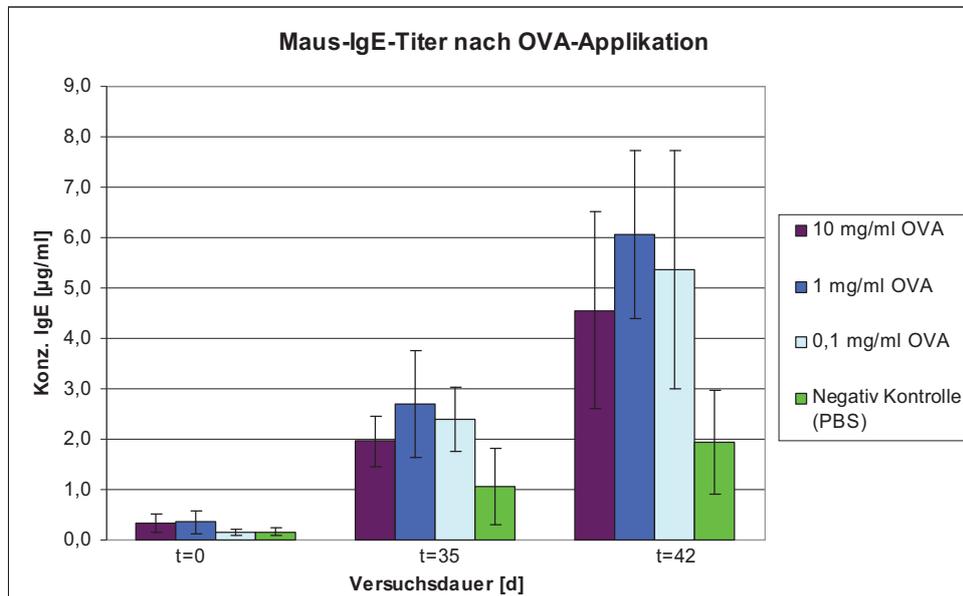
Gegenstand von Vorversuchen war es, eine Positivkontrolle in der geeigneten Konzentration zu finden und in anschließenden Versuchen einsetzen zu können. Die Positivkontrolle sollte ein als Allergen wirkendes bekanntes Protein sein, das nach Sensibilisierung von Labortieren eine detektierbare Bildung bzw. Veränderung allergiespezifischer Indikatoren auslöst.

Ovalbumin (OVA), eines der Proteine aus dem Hühnereiweiß, ist ein bekanntes Allergen, welches in Allergenitätsstudien häufig als Positivkontrolle Verwendung findet (Sampson u. Burks 1996). Eine Recherche in der Datenbank SDAP (Structural Database of Allergenic Proteins; <http://fermi.utmb.edu/SDAP/>) bestätigte die allergenen Eigenschaften des Proteins Ovalbumin (*Gal d 2*).

Zur Ermittlung der geeigneten Konzentration wurde eine Versuchsreihe mit *Balb/c-Mäusen* durchgeführt. Es wurden vier Versuchsgruppen mit jeweils sechs Tieren zusammengestellt, die jeweils mit einer anderen Konzentration (0,1; 1,0; 10,0 mg/ml und PBS ohne OVA als Neg.-Kontrolle) des Modellallergens über einen Zeitraum von 42 Tagen sensibilisiert wurden, indem den Tieren das gelöste Protein systemisch (intraperitoneal, i.p.) verabreicht wurde. Es wurden 10 µl Lösung je Gramm Körpergewicht appliziert. Zu Beginn des Versuches, nach 35 Tagen und nach Versuchsende wurden den Tieren Blutproben zur Bestimmung des Gesamt-IgE-Titers entnommen. Die Seren der

sensibilisierten Labortiere wurden mithilfe eines kommerziellen ELISA-Kits (Becton Dickinson; BD Opt. EIA Set Mouse IgE) auf ihre Gesamt-IgE-Titer untersucht.

In der folgenden Abbildung ist die Konzentration des Gesamt-IgE im Serum der Versuchstiere über die Versuchsdauer dargestellt.



**Abbildung C.24: Entwicklung des Gesamt-IgE Titer in der Maus nach Sensibilisierung mit verschiedenen Konzentrationen des Allergens Ovalbumin**  
N = 10 Seren, Doppelbestimmungen

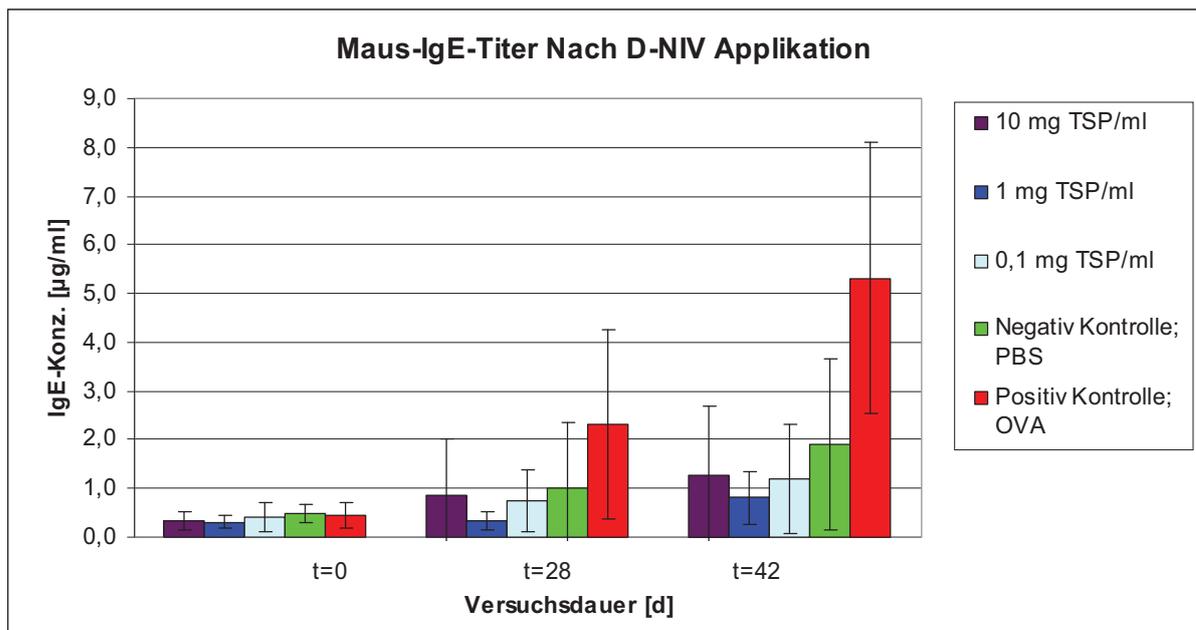
Aus dem dargestellten Balkendiagramm (Abbildung C.24) wird ersichtlich, dass die Verwendung des Modellallergens OVA als Positivkontrolle für eine Sensibilisierungsstudie geeignet ist. Der Gesamt-IgE-Titer im Serum der wöchentlich sensibilisierten Labortiere nimmt über den Zeitverlauf der Versuchsdauer zu. Es fällt auf, dass der Anstieg des Gesamt-IgE-Titers nicht mit der verabreichten OVA-Konzentration korreliert. Weiterhin verdeutlicht die Zunahme der einzelnen Standardabweichungen in den Gruppen (Fehlerbalken) die schwankende Reaktion der Einzelindividuen auf die OVA-Applikation.

### Sensibilisierung mit Pflanzenmaterial – Bestimmung der Serum IgE-Titer

Die Sensibilisierungsstudien mit den *Balb/c Mäusen* wurden für jede Konzentrationsstufe an je fünf weiblichen und fünf männlichen Tieren durchgeführt. In jeder Versuchsreihe wurden Kontrollgruppen berücksichtigt, denen zum einen mit OVA (Positivkontrolle, c = 1 mg OVA/ml PBS) und zum anderen lediglich mit PBS (Negativkontrolle) appliziert wurde.

Das Balkendiagramm in Abbildung C.25 stellt die Zunahme des Gesamt-IgE-Titers der Mäuse, die mit Extrakten des Kartoffelmateriale *Desiree-NIV* behandelt wurden, dar. Neben den Titern der drei Extraktkonzentrationen (10; 1,0 und 0,1 mg/ml) sind auch die IgE-Titer der mitgeführten Kontrollgruppen (PBS und 1 mg/ml OVA) an den Tagen 0, 28 und 42 der Versuchsdauer dargestellt. Zu Versuchsbeginn (Tag 0) liegt der mittlere IgE-Titer der fünf Gruppen zwischen 0,31 µg/ml (Gruppe 1 mg/ml) und 0,48 µg/ml (Negativkontroll-Gruppe). Nach 28 Tagen ist die Serum-IgE-Konzentration der Tiere der OVA-Gruppe (Positiv-Kontrolle) von 0,46 µg/ml auf 2,31 µg/ml angestiegen. Die Titer der Kartoffelextrakt-behandelten Tiere sind ebenfalls leicht angestiegen (0,87 µg/ml in der

10 mg TSP/ml-Gruppe). Der mittlere Titer der PBS-behandelten Gruppe (Negativ-Kontrolle) ist jedoch ebenfalls angestiegen (von 0,48  $\mu\text{g/ml}$  auf 1,01  $\mu\text{g/ml}$ ). Es fällt auf, dass die Zunahme der Gesamt-IgE-Titer bis zum Tag 42 nicht mit der Konzentration der Kartoffelextrakte korreliert. Die mittlere IgE-Konzentration der Extrakt-behandelten Tiere bewegt sich zwischen 0,81  $\mu\text{g/ml}$  (1,0 mg TSP/ml) und 1,29  $\mu\text{g/ml}$  (10 mg/ml). Der mittlere Titer der OVA-Gruppe ist zum 42. Versuchstag auf 5,31  $\mu\text{g/ml}$  angestiegen. Auch für die Negativkontroll-Gruppe ist eine Zunahme des IgE-Titers auf 1,91  $\mu\text{g/ml}$  zu verzeichnen, welcher somit über den IgE-Titern der Kartoffelextrakt-behandelten Tiere liegt.



**Abbildung C.25: Entwicklung des Gesamt-IgE-Titers in der Maus nach Applikation mit verschiedenen Konzentrationen eines Extraktes des Kartoffelyophilisates der nahen isogenen Variante *Desiree* (D-NIV)**

N = 10 Seren, Doppelbestimmungen

Die graphischen Darstellungen der Entwicklung der IgE-Konzentrationen im Serum der Balb/c Mäuse nach Applikation verschiedener Konzentrationen aller im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Konstrukte der Modellpflanze *Solanum tuberosum*, sind im Anhang G 9.5 aufgeführt.

In Zusammenarbeit mit der Firma BioMath GmbH (Groß Lüsewitz) wurden die Ergebnisse der Gesamt-IgE-Bestimmung im Serum der Balb/c Mäuse nach Applikation von Extrakten der transgenen und der nahen isogenen Varianten (NIV) statistisch auf Unterschiede untersucht. In der folgenden Tabelle C 2.5 sind die signifikanten Titer-Differenzen vom Tag 0 zu den beiden Probennahmepunkten Tag 28 und Tag 42 dargestellt. Signifikanz bedeutet in diesem Fall, dass eine Titer-Differenz verschieden von 0 ist. In der folgenden Tabelle sind die signifikanten Unterschiede (auf einem Niveau von 0,05) mit einem Sternchen (\*) und die Fälle, bei denen kein signifikanter Unterschied vorliegt mit einem Strich (-) gekennzeichnet.

Mit diesem Test wurden die Konzentration des verabreichten Pflanzenmaterials und der Zeitpunkt der Probennahme untersucht. Es wurden die drei Konzentrationen 10; 1,0 und 0,1 mg TSP/ml und die Differenzen der Gesamt-IgE-Titer vom jeweiligen Probennahme-Zeitpunkt zum Tag 0 berücksichtigt. Nicht berücksichtigt wurden in dieser Betrachtung die Unterschiede zwischen den einzelnen Linien.

**Tabelle C 2.5: Unterschiede der Serum-IgE-Titer der *Balb/c Mäuse* über die Versuchsdauer, Vergleiche innerhalb der einzelnen Linien**

(\* signifikant auf 0,05 Niveau; – keine Signifikanz)

Konstrukt \ Konzentration [mg/ml]	IgE-Titer(28) – IgE-Titer(0)			IgE-Titer(42) – IgE-Titer(0)		
	10	1	0,1	10	1	0,1
<i>Albatros CTB-SEK204</i>	*	*	*	*	*	*
<i>Albatros CTB-SEK218</i>	–	*	*	–	*	*
<i>Albatros NPTII</i>	*	*	*	*	*	*
<i>Albatros PsbY12</i>	*	*	*	*	*	*
<i>Albatros PsbY23</i>	*	–	–	*	*	–
<i>Albatros NIV</i>	*	*	*	–	–	–
<i>Desiree VP60-SEK17</i>	*	*	*	*	*	*
<i>Desiree VP60-SEK6</i>	–	–	–	*	*	*
<i>Desiree NPTII</i>	*	*	*	*	*	*
<i>Desiree NIV</i>	–	–	–	*	*	–

Der Test ergab beispielsweise für die Linie *A-NIV*, dass die Applikation von Pflanzenmaterial für alle drei gewählten Konzentrationen einen signifikanten Unterschied im Serum-IgE-Titer der Mäuse vom Tag 0 zum Tag 28 verursachte. Hingegen war der Unterschied zwischen dem IgE-Titer am Tag 0 und am Tag 42 nicht signifikant. Für die Linie *A-PsbY-23* ergab der Test, dass lediglich die Konzentration von 10 mg/ml einen signifikanten Unterschied im IgE-Titer zwischen Tag 0 und 28 auslöste. Bei der Betrachtung der Ergebnisse derselben Linie für den Unterschied zwischen Tag 0 und 42 wird auch für die Konzentration von 1,0 mg/ml eine signifikante Differenz deutlich. Für die restlichen Linien der Sorte *Albatros* sind keine Unterschiede zwischen den Probennahmezeitpunkten detektiert worden.

Folgende Tabelle C 2.6 stellt die Ergebnisse der statistischen Auswertung der Unterschiede der IgE-Titer bei *Balb/c Mäusen* nach Applikation von Kartoffelextrakten verschiedener Konzentrationen im Vergleich zur jeweiligen *NIV* dar. Es wurden jeweils die Konzentration der verabreichten Extrakte (TSP/ml) und der Zeitpunkt der Probennahme berücksichtigt. Der untersuchte Faktor ist die Linie, wobei als Bezug die jeweilige *NIV* diente.

Signifikanz bedeutet hier, dass der Titer einer Linie sich von dem Titer der *NIV* auf dem Niveau von 0,05 unterscheidet. Die signifikanten Differenzen zwischen den Linien und *NIV* sind mit Sternchen (\*) markiert. Eine Signifikanz besteht, wenn der zugehörige Signifikanz-Wert kleiner oder gleich 0,05 ist.

**Tabelle C 2.6: Unterschiede der Serum-IgE-Titer der *Balb/c Mäuse* über die Versuchsdauer, paarweiser Vergleich der transgenen Linien zur jeweiligen *NIV* (\* signifikant auf 0,05 Niveau; – keine Signifikanz)**

Konstrukt \ Konzentration [mg/ml]	Titer (Tag 0)			Titer (Tag 28)			Titer (Tag 42)		
	10	1	0,1	10	1	0,1	10	1	0,1
<i>Albatros CTB-SEK204</i>	*	*	–	*	*	–	–	–	–
<i>Albatros CTB-SEK218</i>	*	*	–	*	*	–	–	–	*
<i>Albatros NPtII</i>	*	–	–	*	*	–	–	–	–
<i>Albatros PsbY12</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Albatros PsbY23</i>	*	–	–	–	*	–	*	–	*
<i>Desiree VP60-SEK17</i>	–	–	–	*	–	–	*	*	*
<i>Desiree VP60-SEK6</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Desiree NPtII</i>	–	–	–	–	*	*	*	*	*

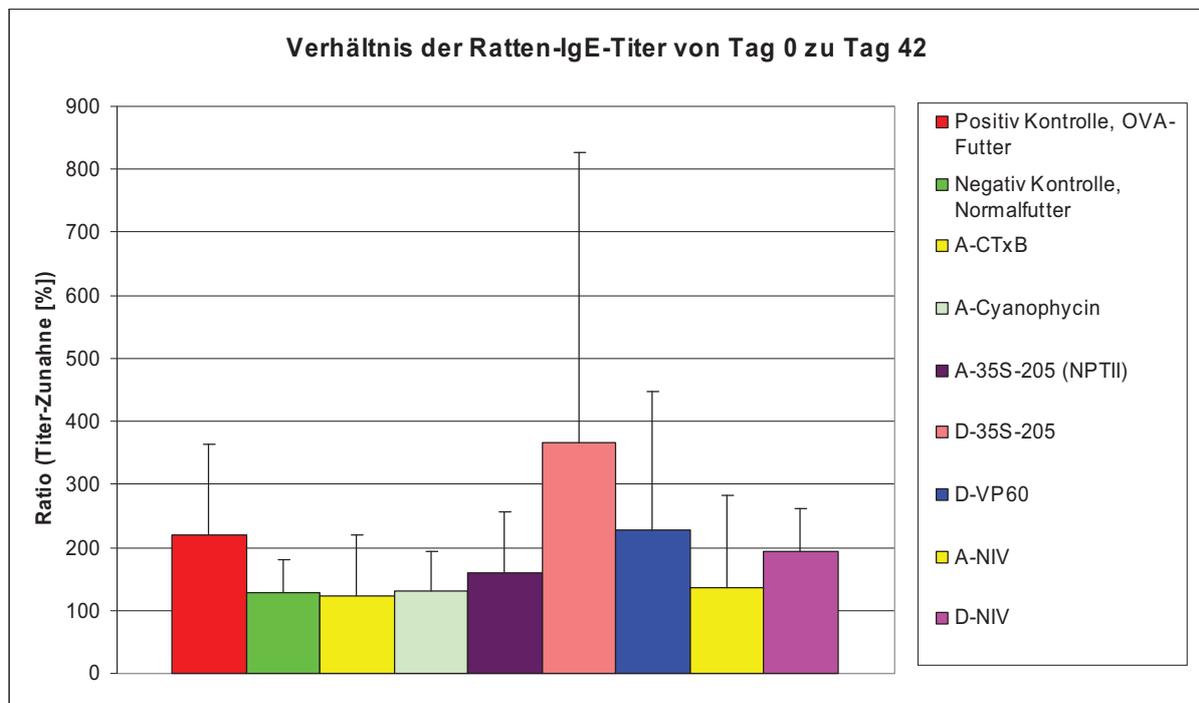
Der Test ergab für die Linien *A-CTxB-204* und *A-CTxB-218*, dass für die Konzentrationen 10 und 1,0 mg TSP/ml bereits signifikante Unterschiede im Gesamt-IgE-Titer zur *NIV-Linie* am Tag 0 bestehen. Am Probennahme-Zeitpunkt Tag 28 waren diese Unterschiede noch vorhanden, konnten aber am 42. Versuchstag nicht mehr detektiert werden. Es wurde jedoch zusätzlich für die Linie *A-CTxB-218* eine signifikante Differenz für die Konzentration von 0,1 mg TSP/ml ermittelt. Für die Linie *A-35S-205* konnte ebenfalls an den Tagen 0 und 28 ein signifikanter Unterschied im IgE-Titer festgestellt werden. Dieser Unterschied war jedoch am 42. Versuchstag nicht mehr signifikant. Es konnte eine IgE-Titer-Differenz zur Linie *A-NIV* für die Konzentration 1,0 mg TSP/ml am Tag 28 detektiert werden. Die IgE-Konzentration im Serum der *A-PsbY-12*-sensibilisierten Mäuse unterschied sich zu keinem Zeitpunkt signifikant von der Konzentration der *A-NIV*-sensibilisierten Tiere. In den Seren der *A-PsbY-23*-sensibilisierten Mäuse wurde zum Probennahme-Zeitpunkt 0 lediglich ein signifikanter Unterschied im IgE-Gehalt der Gruppen, die mit 10 mg TSP/ml behandelt wurden. Zum Zeitpunkt 28 Tage war diese Differenz nicht mehr signifikant, jedoch konnte für 1,0 mg TSP/ml ein Unterschied ermittelt werden. Nach 42 Versuchstagen war für diese Linie der IgE-Titer bei den Mäusen, die mit 10 bzw. 0,1 mg TSP/ml sensibilisiert wurden signifikant unterschiedlich.

Für die Varianten der Sorte *Désirée* bedeuten die Ergebnisse des Testes im Einzelnen, dass sich der IgE-Titer der *D-VP60-6*-sensibilisierten Mäuse sich zu keinem Zeitpunkt vom Titer der *NIV*-behandelten Tiere unterscheidet. Zum Zeitpunkt 0 unterscheiden sich die IgE-Konzentrationen der Tiere, die mit den Linien *D-VP60-6*, *D-VP60-17* und *D-35S-6* behandelt wurden nicht von Serum-Konzentrationen der *NIV*-behandelten Mäuse. Am 28. Versuchstag war der IgE-Gehalt der mit 10 mg TSP/ml *D-VP60-17*-behandelten Tiere und 42. Tag der IgE-Titer aller drei gewählten TSP-Konzentrationen signifikant different zu den *NIV*-applizierten Mäusen. Für *D-35S-6* waren am 28 Tag für die Konzentrationen 0,1 und 1,0 mg TSP/ml und für den 42. Versuchstag für alle Konzentrationen signifikante Unterschiede im Serum-IgE-Gehalt festgestellt worden.

### C 2.4.2 Tiermodell - *Brown Norway Ratte*

Neben der systemischen Applikation der Kartoffelextrakte an *Balb/c Mäusen* wurden Fütterungsstudien an *Brown Norway Ratten* durchgeführt. Die orale Applikationsform der Kartoffelmateriale berücksichtigt Verdauungsvorgänge und ermöglicht eine Analyse unter realen Bedingungen der Nahrungsaufnahme. Die Fütterungsstudien wurden für jedes Modellprotein an je fünf weiblichen und fünf männlichen Tieren durchgeführt. Die Lyophilisate der jeweiligen Konstrukte, die das gleiche Modellprotein exprimierten, wurden gepoolt. Das Kartoffelmateriale wurde zu 20 % dem Normalfutter beigemischt. Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. In jeder Versuchsreihe wurden Kontrollgruppen mitgeführt, die zum einen mit OVA-haltigem Futter (Positivkontrolle; 10 % am Normalfutter) und zum anderen lediglich mit Normalfutter gefüttert wurden. Den Tieren wurden vor Versuchsbeginn (Tag 0) und nach 42 Tagen der Fütterung Blutproben entnommen, die auf ihre IgE-Konzentrationen untersucht worden sind.

Folgende Abbildung C.26 stellt die durchschnittliche prozentuale Zunahme der IgE-Titer der Ratten von Tag 0 zu Tag 42 graphisch dar. Die so genannte Ratio wurde ermittelt aus dem Quotienten der IgE-Titer am Tag 42 und am Tag 0 und Multiplikation mit 100.

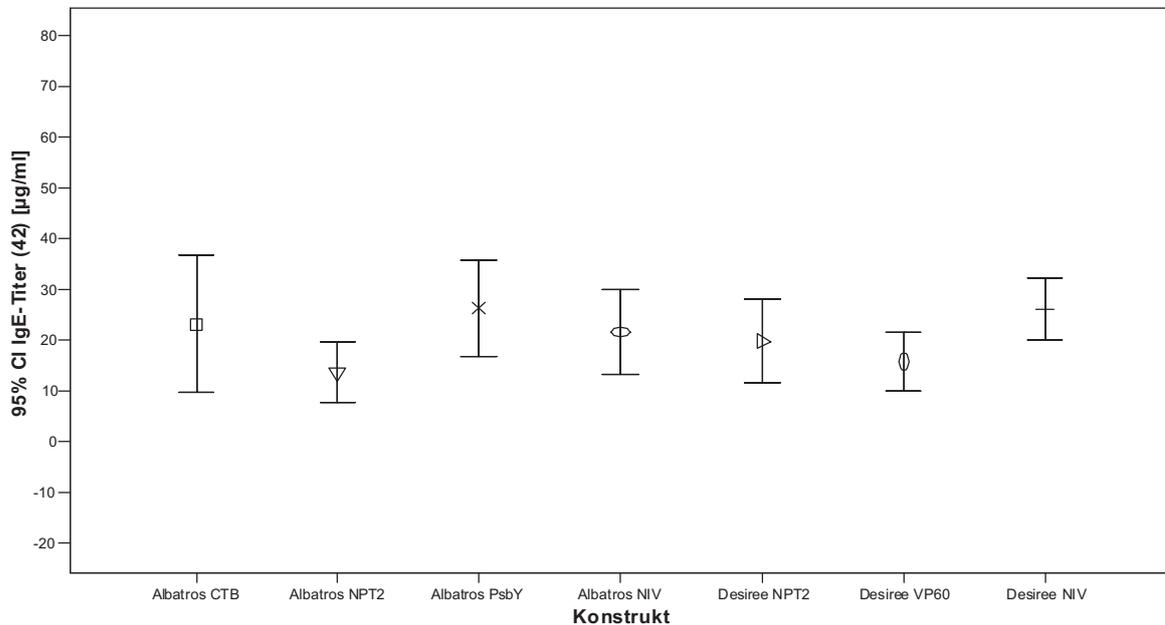


**Abbildung C.26: Ratio der Gesamt-IgE-Titer in den Rattenserum nach Fütterung mit Knollenmaterial verschiedener transgener Kartoffellinien und der nahen isogenen Varianten *Albatros* und *Desiree***

N = 10 Seren, Doppelbestimmungen

Auch die Ergebnisse der IgE-Bestimmung im Serum der *Brown Norway Ratten* nach Fütterung mit Knollenmaterial von transgenen und der nahen isogenen Kartoffelvarianten *Albatros* und *Desiree* wurden statistisch auf Unterschiede untersucht. Zum einen wurden die Unterschiede in den Titer-Differenzen vom Tag 0 zum Tag 42, also der Differenzen innerhalb der einzelnen Konstrukte auf Signifikanz untersucht. Signifikanz bedeutet in diesem Fall, dass eine Titer-Differenz verschieden von 0 ist. Zum anderen erfolgte eine Auswertung der Unterschiede der IgE-Titer nach Fütterung von Kartoffelmateriale verschiedener transgener Konstrukte im Vergleich zur jeweiligen *NIV*. Signifikanz

bedeutet hier, dass der Titer eines Konstruktes sich von dem Titer der *NIV* auf dem Niveau von 0,05 unterscheidet. Eine Signifikanz besteht, wenn der zugehörige Signifikanz-Wert kleiner oder gleich 0,05 ist. Signifikanz würde sich zeigen, wenn sich die Fehlerbalken des Konstruktes und der *NIV* nicht überlappen würden (siehe Abbildung C.27).



**Abbildung C.27: Darstellung der 95 %-Konfidenzintervalle der Gesamt-IgE-Titer im Serum der Ratten nach 42 Tagen Fütterung mit transgenem und nahe isogenem Kartoffelmateriale**  
N = 10 Seren, Doppelbestimmungen

Beim Vergleich der Gesamt-IgE-Titer zwischen Probenahme-Zeitpunkt 0 und 42 innerhalb der einzelnen Linien lag kein signifikanter Unterschied vor. Auch bei der Analyse der Gesamt-IgE-Konzentrationen im Serum der Ratten, die 42 Tage mit Kartoffelmateriale gefüttert wurden, traten keine signifikanten Differenzen auf.

### C 2.4.3 Spezifisches IgE – *Balb/c-Maus* und *Brown Norway Ratte*

Neben der Bestimmung des Gesamt-IgE-Titers im Serum der mit Pflanzenextrakt sensibilisierten Labortiere, ist die Untersuchung auf spezifisches IgE (sIgE) bezüglich der allergologischen Risikoanalyse des Modellproteins aussagekräftiger.

Dazu wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene ELISA-Verfahren zur Bestimmung dieses Parameters entwickelt. Zum einen wurde ein modifiziertes Verfahren nach Knippels (Knippels *et al.* 1998) herangezogen, bei dem die Mikrotiterplatte mit anti-IgE-Antikörpern beschichtet wurde. Nach Waschschrift und Blocking wurden die Seren in mehreren Verdünnungen aufgetragen, sodass die Serum IgE-Immunglobuline gebunden werden konnten. Nach einem weiteren Waschschrift wurde ein Biotin-markiertes Modellprotein aufgetragen, welches von dem spezifischen Serum-IgE gebunden wurde. Im Anschluss konnte das Modellprotein mit Hilfe eines Streptavidin-POD-Konjugates und Substratzugabe (TMB) detektiert werden.

Das zweite Verfahren zur Bestimmung spezifischen Serum-IgEs beruht auf der Bindung des entsprechenden Modellproteins direkt auf der Mikrotiterplatte. Nach Wasch- und Blockingschrift wurden die Testseren in mehreren Verdünnungen aufgetragen und die

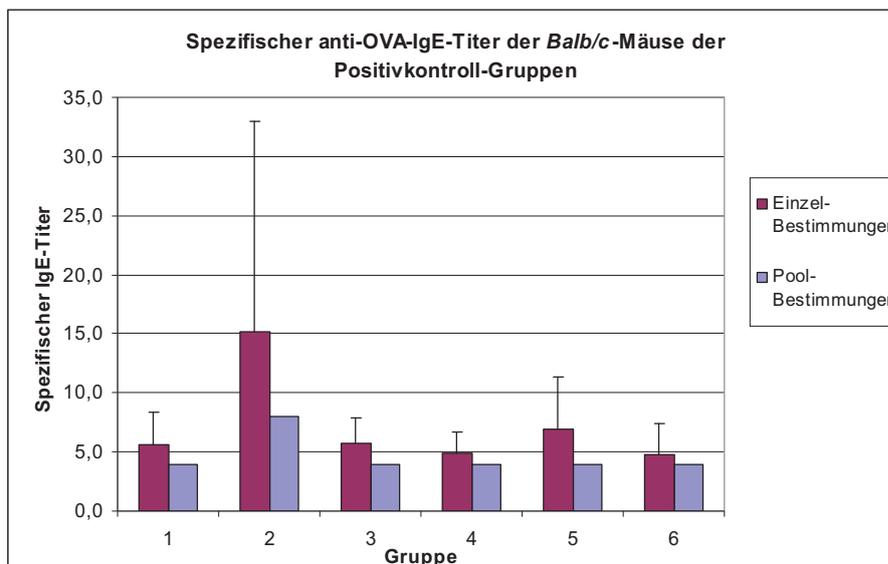
spezifischen IgE-Moleküle konnten an die Modellproteine binden. Die gebundenen IgE-Immunglobuline konnten mittels biotinyliertem anti-IgE-Antikörper, anschließender Streptavidin-POD-Konjugat- und Substrat-Zugabe detektiert werden.

Für beide Methoden dienten Seren von Tieren die nicht mit dem untersuchten Modellprotein in Kontakt gekommen sind als Negativkontrolle.

Da für diese Test-Verfahren keine Standards zur Quantifizierung des spezifischen IgEs existieren, konnte hier lediglich eine „Semi-Quantifizierung“ durchgeführt werden. So wurde der Mittelwert der Extinktion der Negativkontrollen plus  $3 \times$  Standardabweichung (SD) als Referenzwert herangezogen. Das Reziproke der am stärksten verdünnten Probe eines Testserums mit einer Extinktion höher oder gleich dem Referenzwert wurde als Titer abgelesen, wenn eine verdünnungsabhängige Abnahme der Extinktion auftrat (Madsen und Pilegaard 2003).

### Spezifisches anti-OVA-IgE bei der *Balb/c-Maus*

In den Seren der *Balb/c-Mäuse* aus den Positivkontrollen wurden die spezifischen anti-OVA-IgE-Titer sowohl einzeln als auch in Gruppen-Pools bestimmt. Anhand der vorliegenden Daten (siehe Abbildung C.28) soll die Notwendigkeit der Untersuchung der Einzelseren zur Identifikation von Individuen, die auf eine Applikation eines Allergens besonders stark reagieren („starke responder“) verdeutlicht werden. Bei Betrachtung der IgE-Titer, die anhand der Seren-Pools bestimmt wurden, weisen die Gruppe 1 und 3 - 6 einen relativen Titer von 4 auf. Der Titer der Gruppe 2 liegt mit einem relativen Wert von 8 bei dieser Bestimmung doppelt so hoch. Betrachtet man die relativen durchschnittlichen IgE-Konzentrationen der Gruppen, bestimmt anhand der Einzelseren werden geringe Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen deutlich und die IgE-Konzentrationen liegen etwas höher als bei der IgE-Quantifizierung der Pool-Seren (siehe Abbildung C.28).

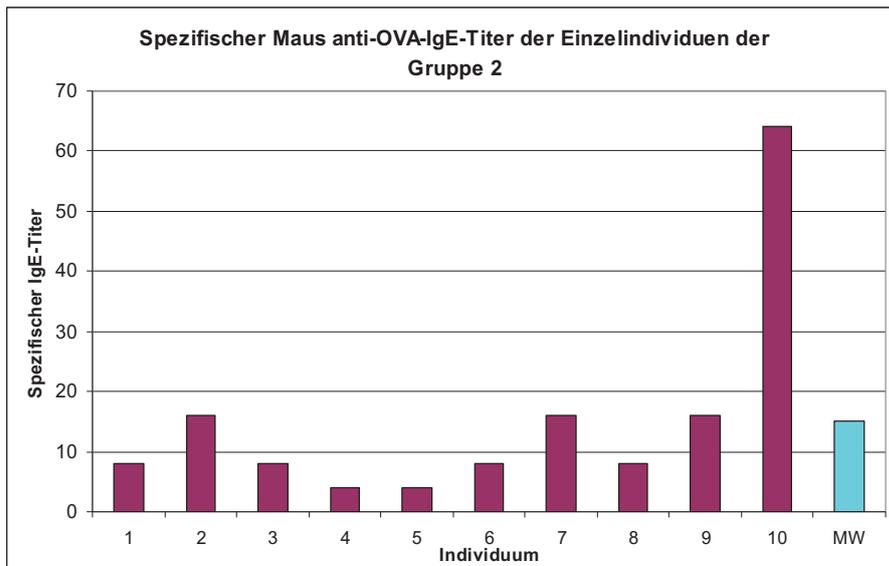


**Abbildung C.28:**  
Relative anti-OVA-IgE-Titer in den Seren der Ovalbumin-sensibilisierten *Balb/c-Mäuse*

Einzelbestimmungen:  
N = 10 Seren;  
Doppelbestimmungen

Poolbestimmungen:  
N = 2  
(Doppelbestimmungen)

Bei näherer Betrachtung der spezifischen anti-OVA-IgE-Titer der Einzelindividuen der Gruppe 2 fällt der besonders hohe Titer eines Individuums auf (siehe Abbildung C.29). Dieser liegt mit einem relativen Wert von 64 weit über dem durchschnittlichen Wert von 15,2.



**Abbildung C.29: Relativer anti-OVA-IgE-Titer der Einzelindividuen der Versuchsgruppe 2**  
N = 2 (Doppelbestimmungen)

Dieses Resultat deutet auf die Wichtigkeit hin, bei *in vivo*-Allergenitätsprüfungen stets auf Individuen zu achten, die auf applizierte Allergene unterschiedlich starke IgE-Antworten ausbilden („Responder“ und „Nicht-Responder“) (Knippels *et al.* ).

### Spezifisches anti-OVA-IgE bei der *BN-Ratte*

Die Etablierung eines Quantifizierungs-Assays zur Bestimmung von spezifischen anti-OVA-IgE-Antikörpern im Rattenserum erfolgte unter Verwendung von Seren systemisch sensibilisierter Tiere (intra peritoneale Applikation von 1 mg/ml OVA; 10 µl/g Körpergewicht). Die Seren von 6 OVA-immunisierten Tieren und 6 unbehandelten Tieren wurden in einer Verdünnung von 1:10 in PBS vergleichend untersucht. Anhand des Mittelwertes der Extinktionen der Negativseren und ihrer 3-fachen Standardabweichung konnte ein Referenzwert von 0,065 bestimmt werden. Die Extinktionen der Positivseren lagen alle bis zu einer Verdünnung von 1:40 über diesem Referenzwert. Nach Berücksichtigung der Ausgangsverdünnung konnte für diese Seren ein spezifischer anti-OVA-IgE-Titer von 4 bestimmt werden (1:40 / 1:10). Parallel wurden diese Seren auf OVA-spezifisches IgG untersucht und für die Positivseren ein Titer von 640 bestimmt.

Weiterhin wurden die Seren von Ratten, die mit OVA gefüttert wurden (10 % OVA am Normalfutter) im Vergleich mit Rattenserum von Tieren, die lediglich Zugang zu Normalfutter hatten, auf OVA-spezifisches IgE und IgG untersucht. Es konnte ein spezifischer IgE-Titer von 2 für die 10 untersuchten Tiere der OVA-Gruppe ermittelt werden. Der mittlere OVA-spezifische IgG-Titer der OVA-gefütterten Tiere lag bei  $3 \pm 4,8$ .

### Spezifisches anti-CTxB-IgE und IgG bei der *Balb/c Maus*

Die Analyse der spezifischen IgE- und IgG-Titer nach systemischer Sensibilisierung mit Extrakten von CTxB-exprimierenden Kartoffeln wurde an 19 Mäuseseren durchgeführt. Zehn der Tiere wurden mit Extrakten der Kartoffellinie *A-CTxB-SEK-204* und neun Tiere mit Extrakten der Linie *A-CTxB-SEK-218* einmal wöchentlich über einen Zeitraum von 6 Wochen behandelt. Für neun der zehn Tiere, die mit Extrakten der Linie *A-CTxB-SEK-204* behandelt wurden, ließen sich IgE-Titer von 1 - 8 und für zwei der neun Tiere, die mit

Extrakten der Linie *A-CTxB-SEK-218* behandelt wurden Titer von 1 bzw. 4 detektieren. Spezifisches IgG mit CTxB-Reaktivität ließ sich bei sechs von zehn Tieren der ersten Gruppe (*A-CTxB-SEK-204*) und bei fünf von neun Tieren der zweiten Gruppe (*A-CTxB-SEK-218*) mit Titern von bis zu 16 nachweisen.

### **Spezifisches anti-CTxB-IgE und IgG bei der *BN Ratte***

Für die Untersuchung der IgE und IgG-Reaktivität von Rattenserum mit dem Modellprotein CTxB kamen neun Seren von Ratten, die mit Lyophilisat der Kartoffellinien *A-CTxB-204* und *A-CTxB-218* gefüttert wurden (20 % Lyophilisat am Normalfutter) zum Einsatz. Als Negativkontrolle dienten drei Seren von Tieren, die mit Normalfutter gefüttert wurden. Für zwei der neun Seren wurde ein IgE-Titer von 1 bestimmt. Die restlichen Seren zeigten keine IgE-Reaktivität mit dem Modellprotein CTxB. Ein anti-CTxB-IgG-Titer von 4 wurde für acht der neun Seren bestimmt und ein Serum wies keine detektierbaren CTxB-spezifischen IgG-Antikörper auf.

### **Spezifisches anti-VP60-IgE und IgG bei der *Balb/c Maus***

Zur Bestimmung, ob eine systemische Applikation von Extrakten von Kartoffeln, die das Modellprotein VP60 exprimieren eine Bildung von VP60-spezifischen IgE- und IgG-Antikörpern auslöst, wurden zwanzig Mäuseseren analysiert. Die Hälfte der Tiere wurde mit Extrakten (TSP = 10 mg/ml) der Linie *D-VP60-SEK-6* und die andere Hälfte mit Extrakten der Linie *D-VP60-SEK-17* sensibilisiert. Weder für die Linie *D-VP60-SEK-6* noch für *D-VP60-SEK-17* konnten VP60-spezifische IgE-Antikörpertiter detektiert werden. VP60-reaktives IgG ließ sich lediglich bei vier der mit *D-VP60-SEK-6* behandelten Tiere mit einem Titer von 1 ermitteln.

### **Spezifisches anti-VP60-IgE und IgG bei der *BN Ratte***

Die spezifische IgE- und IgG-Reaktivität mit dem Modellprotein VP60 nach oraler Applikation mit VP60-haltigem Kartoffelmateriale wurde anhand von neun Rattenserum untersucht. Die Tiere hatten über einen Zeitraum von sechs Wochen ad libitum Zugang zu Wasser und Futter (20 % Kartoffelyophilisat am Normalfutter; Pool aus *D-VP60-SEK-6* und *D-VP60-SEK-17*). Als Negativkontrollen dienten Seren von Tieren, die mit Normalfutter gefüttert wurden. Keines der Seren der VP60-gefütterten Tiere lag über diesen Referenzwerten. Es konnte in den untersuchten Rattenserum kein VP60-spezifischer IgE oder IgG-Titer detektiert werden.

### **Spezifisches anti-Cyanophycin-IgE und IgG bei der *Balb/c Maus***

Die Bestimmung der anti-Cyanophycin-IgE- und IgG-Titer im Serum der systemisch mit Kartoffelextrakten sensibilisierten Labormäuse erfolgte an den Seren der Tiere, die mit den höchsten Extrakt-Konzentrationen (10 mg TSP/ml) behandelt wurden. Keines der Seren der mit Extrakt der Cyanophycin-exprimierenden Kartoffeln sensibilisierten *Balb/c-Mäuse* zeigte bei den gewählten Versuchsbedingungen eine IgE-Reaktivität. Sieben der mit Extrakt der Linie *A-PsbY-12* behandelten Tiere wiesen einen spezifischen IgG-Titer von 2 und drei Tiere einen Titer von 1 auf. Die Seren der mit Extrakt der Linie *A-PsbY-23*

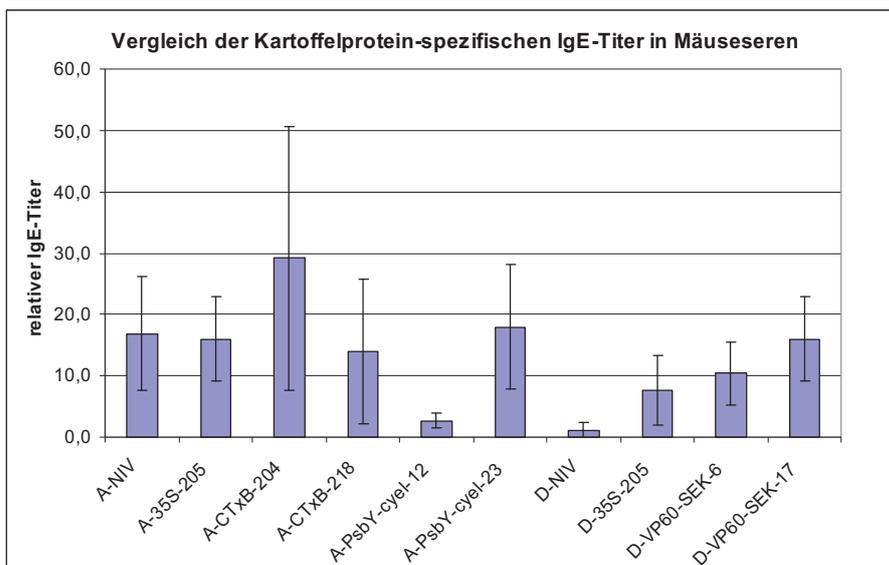
behandelten Mäuse hatten ebenfalls IgG-Titer im Bereich von 1 bis 2 (sechs Tiere mit 2; vier Tiere mit 1).

### Spezifisches anti-Cyanophycin-IgE und IgG bei der *BN Ratte*

Für die zehn auf spezifische IgG-Reaktivität mit dem Modellprotein Cyanophycin untersuchten Rattenserum konnten anti-Cyanophycin-IgG-Titer von 1 bestimmt werden. Cyanophycin-spezifische IgE-Antikörper konnten nicht nachgewiesen werden.

### Spezifisches anti-Kartoffelprotein-IgE bei der *Balb/c Maus*

Um einen Einfluss des Transgens auf den Haushalt bzw. die Reaktivität der endogenen Allergene in der Pflanze zu untersuchen, wurden die relativen IgE-Titer gegen Kartoffelproteine in den Mäuseseren bestimmt. Dazu wurden Mikrotiterplatten mit azetongefälltem Kartoffelprotein ( $c = 2 \mu\text{g/ml}$ ) beschichtet und die Seren der Kartoffelextrakt-sensibilisierten Mäuse wurden im Vergleich mit Negativseren in verschiedenen Verdünnungen analysiert. Die Detektion erfolgte mit POD-markierten anti-Maus-IgE-Antikörpern. Aus den Extinktionen der Negativseren, wurde für jede Versuchsreihe ein Referenzwert ermittelt. Die Untersuchung erfolgte für alle Einzelseren der Tiere, die mit Kartoffelextrakten der Konzentration 10 mg TSP/ml sensibilisiert wurden.



**Abbildung C.30: IgE-Titer in Mäuseserum mit Reaktivität gegen Kartoffelproteine**  
N = 10 Seren, Doppelbestimmungen

Die spezifischen anti-Kartoffelprotein-IgE-Titer der *Balb/c-Mäuse* schwanken von  $1,1 \pm 1,36$  (D-NIV) bis  $29,2 \pm 21,5$  (A-CTxB-204).

#### C 2.4.4 Hexosaminidase Assay

Mithilfe des  $\beta$ -Hexosaminidase-Assays können Aussagen über den Titer an spezifischem IgE, das sich frei und nicht gebunden an Mastzellen oder Basophilen im Serum der Versuchstiere befindet, getroffen werden.

Dieser Assay ist ein zellbasiertes *in vitro*-Testverfahren. 200 µl einer Suspension von Ratten-Basophilen-Leukämie (RBL) Zellen wurden mit einer Zellzahl von  $10^5$  Zellen/ml in jede Kavität einer 96-er Zellkulturplatte gegeben. Versuchsreihen ergaben, dass ein kommerzieller Maus-IgE-Antikörper (Firma Becton Dickinson) in einer 1:50 Verdünnung in RBL-Medium (DMEM + 10 % FKS) als Positivkontrolle geeignet war. Als Negativkontrolle diente lediglich RBL-Medium. Die Seren der sensibilisierten Labortiere wurden, wie die Positivkontrolle 1:50 in RBL-Medium verdünnt. Alle Proben und Kontrollen wurden in Doppelbestimmung auf die 96-er Zellkulturplatte aufgetragen.

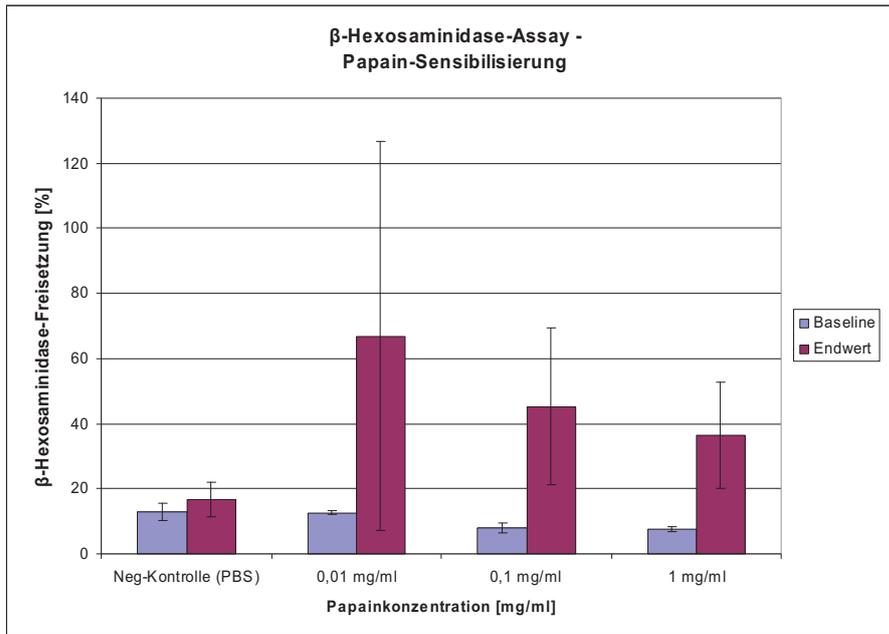
Der Assay basiert auf der Bindung der sich im Testserum und in der Positivkontrolle befindlichen IgE-Immunglobuline an die IgE-Rezeptoren, welche sich auf der Oberfläche der RBL-Zellen befinden. Nach Inkubation und Waschschrritten wurde das Antigen zu dem Testansatz gegeben. Für die Positivkontrolle wurde ein kommerzieller Ratten-anti-Maus-IgE Antikörper (Firma Becton Dickinson) verwendet und für die Seren die zur Sensibilisierung verwendete Substanz (Modellproteine bzw. Modellallergene). Erkennen die gebundenen IgE-Antikörper die entsprechende Substanz, werden diese auf der Oberfläche der RBL-Zellen quervernetzt und es kommt unter anderem zur Freisetzung von  $\beta$ -Hexosaminidase.

Dieses Enzym kann durch Zugabe des Substrates pNAG (p-nitrophenyl N-acetylglucosaminid) in einer separaten Zellkulturplatte nachgewiesen und quantifiziert werden. Die freigesetzte Menge in den Kavitäten der Proben wurde ins Verhältnis mit der Menge der Positiv- und der Negativkontrolle gesetzt.

Ein Freisetzen der gesamten Menge der  $\beta$ -Hexosaminidase konnte durch Permeabilisierung der Zellen mit einer 1 %-igen Lösung von Triton-X-100 erreicht werden.

Die Ergebnisse wurden als Prozentsatz der durch Sensibilisierung freigesetzten Menge durch totale Freisetzung abzüglich des Wertes der spontanen Freisetzung an  $\beta$ -Hexosaminidase dargestellt (siehe Formel 3.1).

Zur Verifizierung der Eignung des Testes zum Nachweis und zur Semi-Quantifizierung von freiem spezifischem IgE wurde neben der Sensibilisierung mit OVA eine weitere Versuchsreihe mit dem Modellallergen Papain durchgeführt. Im Folgenden sind die Resultate der Bestimmung der spezifischen IgE-Gehalte im Serum der Papain-sensibilisierten Balb/c-Mäuse, ermittelt unter Verwendung des  $\beta$ -Hexosaminidase-Assays dargestellt (siehe Abbildung C.31).

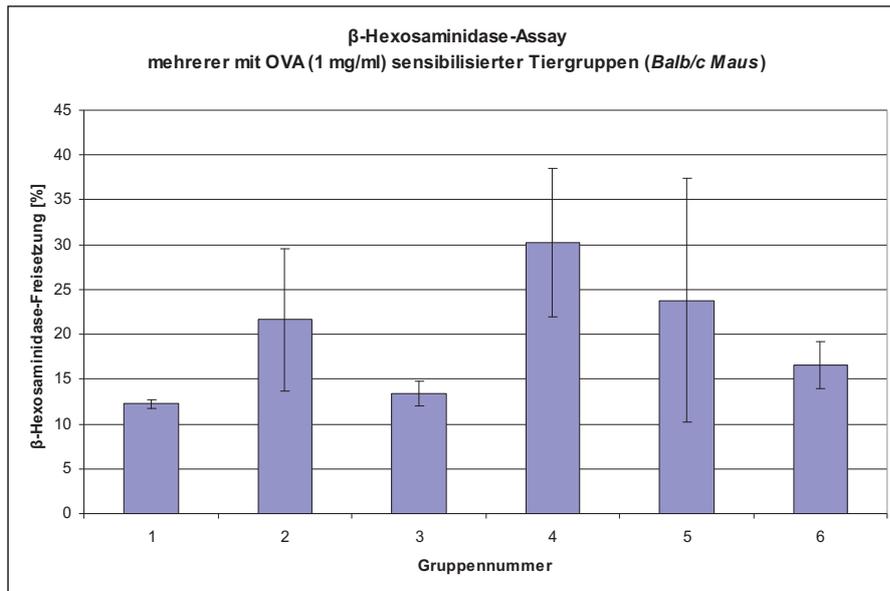


**Abbildung C.31:  $\beta$ -Hexosaminidase-Freisetzung aus den RBL-Zellen durch Sensibilisierung mit Papain**

N = 10 Seren, Doppelbestimmungen

Die mittleren Werte der  $\beta$ -Hexosaminidase-Freisetzung aus den RBL-Zellen nach Behandlung mit Seren von Tieren, die nicht mit Papain behandelt wurden (Baseline = Seren der Tiere vor Versuchsbeginn) und anschließender Inkubation der Zellen mit Papain (100  $\mu$ g/ml), lagen zwischen 7,62 % und 12,73 %. Nach Abschluss der Sensibilisierungsphase der Tiere mit dem Allergen konnten mittlere  $\beta$ -Hexosaminidase-Freisetzungen von 36,57 % (Gruppe, die mit 1,0 mg Papain/ml behandelt wurde), 45,31 % (0,1 mg/ml) und 66,88 % (0,01 mg/ml) ermittelt werden. Für die lediglich mit PBS behandelten Tiere wurde eine durchschnittliche Freisetzung von 16,65 % bestimmt.

Weiterhin wurden die Seren der Tiere, die mit Ovalbumin behandelt (Konzentration = 1 mg/ml) und als Positivkontrollen in den Sensibilisierungsstudien mit den Kartoffelextrakten herangezogen wurden, anhand des  $\beta$ -Hexosaminidase-Assays semiquantitativ auf spezifisches anti-OVA-IgE untersucht (siehe Abbildung C.32). Die  $\beta$ -Hexosaminidase-Freisetzung, resultierend aus der Behandlung der RBL-Zellen mit den Seren der immunisierten Tiere und anschließender Sensibilisierung mit dem Allergen OVA belief sich zwischen 12,27 % ( $\pm$  0,49 %) und 30,23 % ( $\pm$  8,23 %).



**Abbildung C.32: Hexosaminidase-Freisetzung aus RBL-Zellen durch Sensibilisierung mit OVA**

N = 10 Seren, Doppelbestimmungen

#### Intra-Assay des Hexosaminidase-Assays

Zur Leistungsbewertung des Testverfahrens wurde ein Intra-Assay durchgeführt, bei dem als Positivkontrolle ein 1:50 in RBL-Medium verdünnter Maus-IgE-Antikörper (Firma Becton Dickinson), als Negativkontrolle RBL-Medium und als Probe ein Pool aus 9 Seren (Papain-Versuch; 0,01 mg/ml Papain appliziert) 1:50 in RBL-Medium verwendet wurde.

Für die mitgeführte, mehrfach aufgetragene Positivkontrolle wurde eine mittlere  $\beta$ -Hexosaminidase-Freisetzung aus den RBL-Zellen von 64,09 % ( $\pm 3,04$  %) ermittelt. Für die Negativkontrollen konnte eine mittlere Freisetzung von 8,69 % ( $\pm 2,22$  %) und für die Proben von 33,74 % ( $\pm 3,83$  %) bestimmt werden. Der Variationskoeffizient für die Positivkontrolle liegt bei 4,7 % und der der Poolprobe bei 11,3 %.

#### Serenscreening mit dem Hexosaminidase-Assay

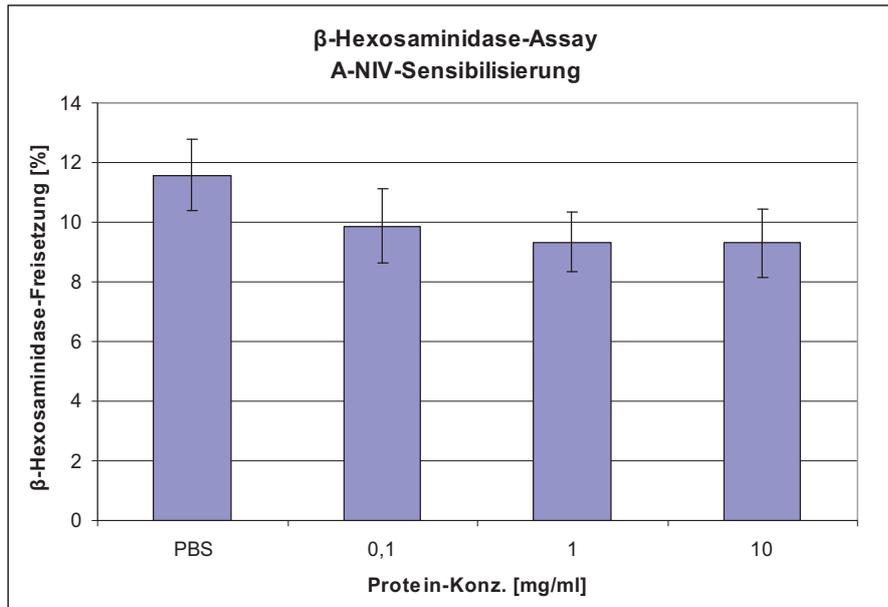
Zum Screening der Seren der mit den Kartoffelextrakten sensibilisierten Labortiere auf spezifische IgE-Globuline gegen die Modellproteine wurden die verdünnten Seren (1:50 in RBL-Medium) auf die Zellen aufgetragen. Als Antigene, welche die rezeptorgebundenen IgE-Antikörper quervernetzen sollten, wurden zum einen Extrakte der jeweiligen zur Sensibilisierung verwendeten Kartoffeln und zum anderen aufgereinigte Modellproteine eingesetzt.

Tabelle C 2.7 stellt die mit dem  $\beta$ -Hexosaminidase-Assay durchgeführten Versuche mit den Mäuseseren zusammenfassend dar. In der linken senkrechten Spalte sind die Seren der mit Kartoffelextrakt der entsprechenden Linie sensibilisierten Labortiere aufgeführt. In der oberen wagerechten Reihe sind die Kartoffellyophilisate bzw. die reinen Proteine, die im Assay als Allergen (Antigen - AG) eingesetzt wurden, dargestellt.

**Tabelle C 2.7: Untersuchung der Mäuseseren mit dem  $\beta$ -Hexosaminidase-Assay**

AG Serum	Kartoffelyophilisate										Reine Proteine				
	A-WT	A-CY-12	A-CY-23	A-NPT II	A-CTB-204	A-CTB-218	D-WT	D-VP60-6	D-VP60-17	D-NPT II	Cyanophycin	VP60	CTXB	NPT II	OVA
A-WT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
A-CY-12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
A-CY-23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
A-NPTII	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
A-CTB-204	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
A-CTB-218	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
D-WT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
D-VP60-6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
D-VP60-17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
D-NPTII	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Ovalbumin (OVA)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
PBS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

Der Tabelle ist zu entnehmen, dass alle Seren der Kartoffel-sensibilisierten Mäuse positiv reagieren, wenn im Assay als Antigen Kartoffelextrakte eingesetzt wurden. Da in Kartoffeln die 4 endogenen Allergene *Sola t1 - Sola t4* (Seppälä *et al.* 2001) vorliegen, könnte man auf eine Sensibilisierung der Labortiere gegen diese Allergene schließen, die in diesem Assay in einem positiven Ergebnis resultieren. Da aber auch die Seren der OVA-behandelten Tiere, die im Versuch nicht mit Kartoffelextrakten in Kontakt gekommen sind, positiv reagieren, ist dieses Ergebnis auf eine andere Reaktion zurückzuführen. Um diese Reaktion zu untersuchen, wurde in einer weiteren Versuchsreihe ein Kartoffelextrakt (*Albatros-NIV*) mit einer Proteinkonzentration von 0,05 mg TSP/ml und Verwendung von Seren der *Balb/c-Mäuse*, die mit Extrakten dieser Kartoffellinie sensibilisiert wurden, getestet. Als Negativkontrolle dienten Seren von Tieren, die lediglich mit PBS behandelt wurden.



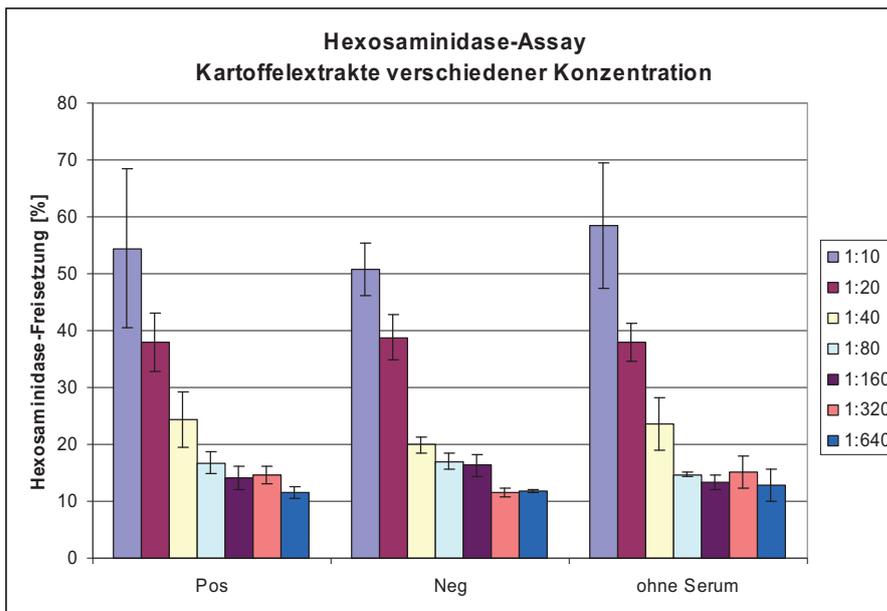
**Abbildung C.33: β-Hexosaminidase-Freisetzung aus RBL-Zellen nach Sensibilisierung mit Kartoffelextrakt**

N = 10 Seren, Doppelbestimmungen

Die mittleren Werte der β-Hexosaminidase-Freisetzung aus den RBL-Zellen nach Reaktion mit Seren von Kartoffelextrakt-behandelten Mäusen und anschließender Behandlung mit Extrakt der Kartoffellinie A-NIV, lagen zwischen  $9,30 \pm 1,24$  % (10 mg TSP/ml behandelte Mäuse) und  $9,87 \pm 1,16$  % (0,1 mg TSP/ml-behandelte Mäuse). Die Freisetzung aus den RBL-Zellen die mit Seren der PBS-applizierten Tiere (Negativkontrolle) behandelt wurden, lag bei  $11,58 \pm 1,21$  % und ist nicht signifikant verschieden zu den Werten der drei anderen Probengruppen.

Um Einflüsse des Kartoffelextraktes auf die β-Hexosaminidase-Freisetzung aus den RBL-Zellen, die nicht auf eine IgE-Reaktion zurückzuführen sind, abschätzen zu können, wurden weitere Versuche unter Verwendung verschiedener Konzentrationen des Kartoffelextraktes durchgeführt. Als Serum wurde ein Serenpool von Kartoffelextrakt-sensibilisierten *Balb/c-Mäusen* (0,1 mg TSP/ml A-NIV-Extrakt appliziert) 1:50 in RBL-Medium verwendet. Eine Positivkontrolle (IgE und anti-IgE) und eine Negativkontrolle (RBL-Medium) wurden zur Funktionalitätskontrolle des Verfahrens mitgeführt. Um die IgE-Reaktionen von sonstigen Reaktionen, die nicht auf eine Quervernetzung der gebundenen IgE-Immunglobuline zurückzuführen sind zu unterscheiden, wurden die RBL-Zellen zum einen mit Seren von Kartoffel-sensibilisierten Tieren und zum anderen mit Negativseren (Papain-Versuch; 0,01 mg/ml Papain appliziert) und parallel dazu lediglich mit RBL-Medium behandelt.

Der Kartoffelextrakt wurden mit dem Ziel potenziell toxische Stoffe zu entfernen mithilfe eines Membranfiltrationsröhrchens (Ausschlussgröße: 5 kDa) vorbehandelt. Von dem Retentat, welches ausschließlich Moleküle > 5 kDa enthalten sollte, wurden Verdünnungen in PBS mit Konzentrationen von 0,035 mg TSP/ml (Verdünnung 1:640) bis 2,0 mg TSP/ml (Verdünnung 1:10) hergestellt.



**Abbildung C.34:  $\beta$ -Hexosaminidase-Freisetzung nach Behandlung der RBL-Zellen mit Positiv- und Negativseren und RBL-Medium und Sensibilisierung mit verschiedenen Konzentrationen an Kartoffel-Extrakt**

N = 2 (Doppelbestimmungen)

Die Werte der mittleren  $\beta$ -Hexosaminidase-Freisetzung nach Reaktion der RBL-Zellen mit Positiv- und Negativseren bzw. RBL-Medium und anschließender Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen eines Kartoffelextraktes unterscheiden sich in den einzelnen Verdünnungsstufen nicht signifikant voneinander.

Der  $\beta$ -Hexosaminidase-Assay wurde auch zur Analyse auf spezifisches IgE im Serum der sensibilisierten Tiere der Spezies *Brown Norway Ratte* getestet. Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Seren von systemisch mit OVA sensibilisierten Tieren und Seren von unbehandelten Ratten detektiert werden.

### C 2.4.5 Basophiler Degranulationstest

Ziel dieses Teilbereiches war es eine allergiediagnostische Methode zu etablieren, die dem Nachweis von an  $Fc\epsilon RI$ -Rezeptoren gebundenen spezifischen IgE-Antikörpern an der Oberfläche von basophilen Zellen dient. Dieses in der Human-Allergiediagnostik bewährte Verfahren sollte an Untersuchungsmaterial aus den in den Sensibilisierungsstudien eingesetzten Tiermodellen *Balb/c Maus* und/oder *Brown Norway Ratte* adaptiert werden.

Der Test basiert auf der Allergen-induzierten Aktivierung basophiler Granulozyten und der Stimulierung von Aktivierungsmarkern auf der Oberfläche von basophilen Zellen. Durch die Aktivierung der basophilen Zellen wird beispielsweise die Expression der Oberflächenmarker CD63 und des Ectoenzym CD203c induziert (Bühring *et al.*, 2006). Darüber hinaus synthetisieren basophile Zellen Allergie-Mediatoren aus der Gruppe der Leukotriene (LT). Die Form LTC4 kann mittels ELISA quantifiziert und als Indikator für eine vorliegende Allergie herangezogen werden.

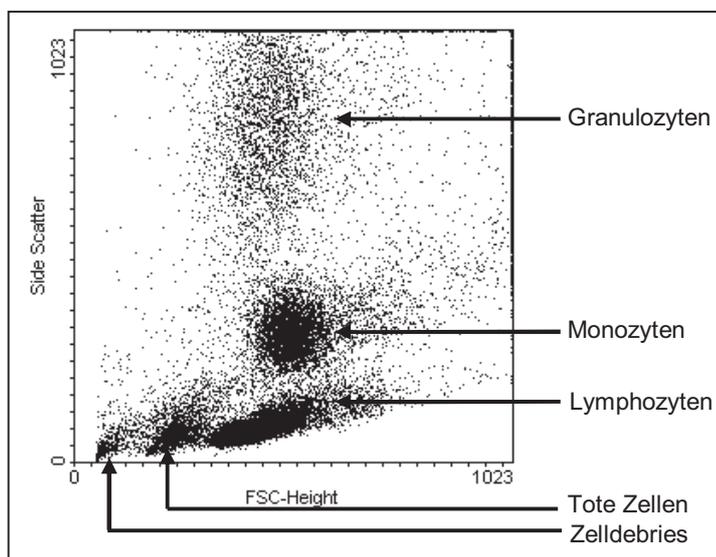
Vorversuche zum Nachweis gebundener spezifischer IgE-Antikörper auf basophilen Zellen wurden mit heparinisierten Vollblutproben von mit OVA-sensibilisierten *Balb/c Mäusen* durchgeführt. Zur Detektion der an  $Fc\epsilon RI$ -Rezeptoren gebundenen IgE-

Antikörper an der Oberfläche der basophilen Zellen und der allergiespezifischen Oberflächenmoleküle CD63 bzw. CD203c wurden Antikörper eingesetzt, die gegen humane Strukturen gerichtet sind. Aufgrund der Strukturähnlichkeit der Oberflächenmoleküle CD63 und CD203c (siehe G 13) aus Maus, Ratte und Mensch sollte untersucht werden, ob diese Allergiemarker mit human-reaktiven Antikörpern auch im Untersuchungsmaterial aus Maus und Ratte nachzuweisen sind.

Die Ergebnisse dieser Vorversuche lassen jedoch keine eindeutige Aussage darüber zu, ob nach Stimulation mit dem Allergen OVA mehr Zellen CD63 oder CD203C exprimieren als nicht stimulierte Zellen. Auch die Messungen der Positivkontrollen (anti-IgE und FMLP) ließen keinen Unterschied zu den Negativkontrollen erkennen (siehe G 10).

Für weitere Versuche wurden Ratten-spezifische Antikörper herangezogen. Da diese Antikörper kommerziell teilweise nur unmarkiert zu beziehen sind, mussten sie für die Anwendung am Durchflusszytometer mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden (siehe B 2.11). Nach der Markierung der Antikörper mit den Farbstoffen FITC bzw. B-PE wurde die Proteinkonzentration photometrisch bestimmt, um bei der Markierung der Zellen mit vergleichbaren Antikörperkonzentrationen arbeiten zu können.

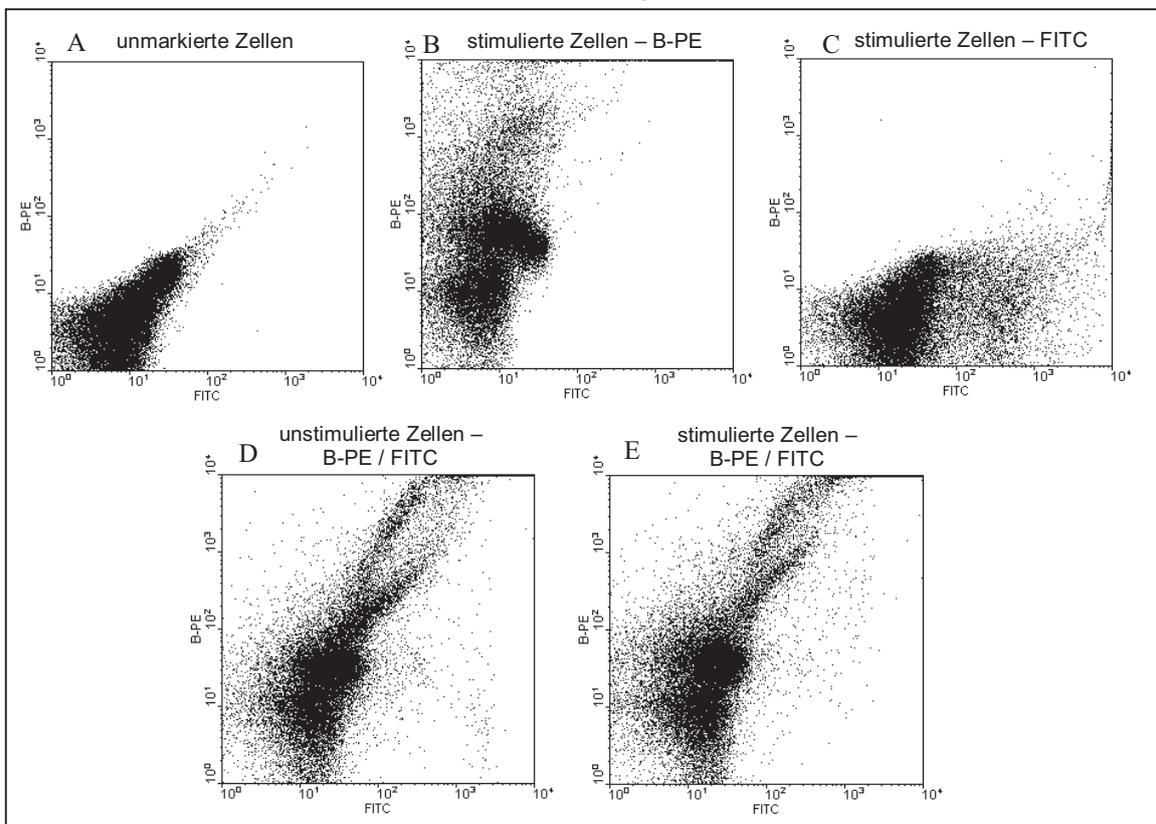
Abbildung C.35 zeigt ein Streubild einer Ratten-Vollblutprobe nach der Lyse der Erythrozyten. Mit den dargestellten Parametern der Seitwärtsstreuung auf der Abszissenachse und der Vorwärtsstreuung auf der Ordinatenachse sind deutlich die einzelnen Zellpopulationen der Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten zu erkennen. Darüber hinaus sind zwei weitere Populationen, die zum einen den Zellbruchstücken, die zum großen Teil aus der Erythrozytenlyse resultieren und zum anderen toten Zellen zuzuordnen sind.



**Abbildung C.35: Streubild einer Vollblutprobe von Ratten nach Erythrozytenlyse**

Für die Untersuchung der mit den Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern markierten Zellen, wurden die Einstellungen zur Darstellung der B-PE und der FITC-Fluoreszenz mithilfe verschiedener Kontrollen vorgenommen. Anhand der Eigenfluoreszenz der Zellen wurden die Intensitäten der B-PE- und der FITC-Fluoreszenz kompensiert und angeglichen, dass die detektierten Signale wie in Abbildung C.36 A dargestellt werden konnten. Die Signale bilden in einem Diagramm, in dem die B-PE- über der FITC-Fluoreszenzintensität aufgetragen wird, nahezu einer Diagonalen. In zwei

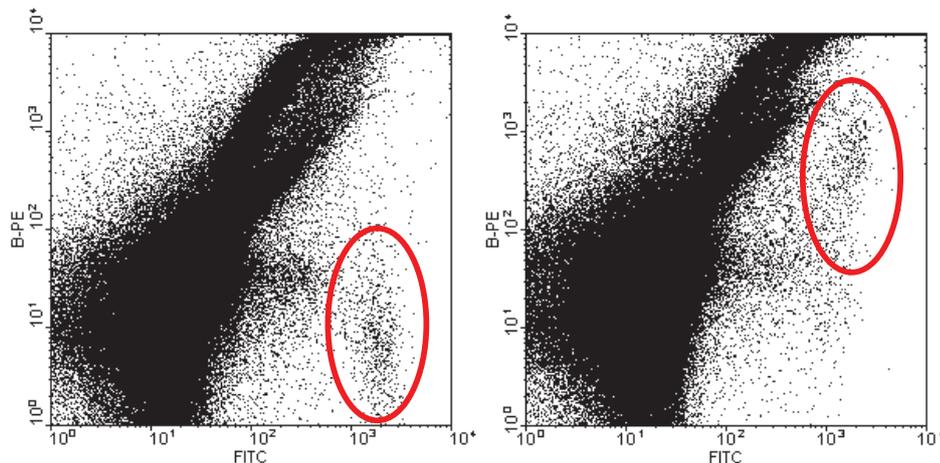
weiteren Kontrollen wurden die präparierten Blutzellen der OVA-sensibilisierten Ratten nach Stimulation mit dem Allergen OVA einzeln mit den anti-CD63-B-PE- und anti-IgE-FITC-Antikörpern inkubiert, um die Eignung der Antikörper zu testen (Abbildung C.36 B und C). In der Darstellung B ist deutlich zu erkennen, dass B-PE-markierte Zellen Signale unterschiedlicher Intensität oberhalb der Diagonalen liefern. Abbildung C verdeutlicht, dass anti-IgE-FITC-markierte Zellen hauptsächlich im Fluoreszenzbereich des Farbstoffes FITC Signale liefern. In den Abbildungen D und E sind die Verteilungen der doppelt markierten Zellen von sensibilisierten und nicht sensibilisierten Tieren dargestellt. Abbildung D zeigt die Fluoreszenzsignalverteilung der Zellen von nicht sensibilisierten Tieren, die nicht mit dem Allergen OVA stimuliert worden sind. In Abbildung E hingegen sind die B-PE- und FITC-Fluoreszenzsignale der stimulierten Zellen von Tieren, die systemisch mit OVA immunisiert wurden. Bei den dargestellten 25.000 Signalen je Plot sind kaum Unterschiede zwischen den Abbildungen D und E zu erkennen.



**Abbildung C.36: Darstellung der B-PE- und der FITC-Fluoreszenz**

A: unmarkierte Zellen; B: Stimulierte Zellen PE-markiert; C: Stimulierte Zellen FITC-markiert; D: Nicht stimulierte Zellen B-PE und FITC-markiert; E: Stimulierte Zellen B-PE und FITC-markiert

Werden jedoch 250.000 Signale je Plot dargestellt, ist bei den doppelt markierten Ansätzen zwischen den unstimulierten und den stimulierten Zellen eine Verlagerung einer Population (siehe Markierung in Abbildung C.37) zu erkennen.



**Abbildung C.37: Verlagerung einer Population zwischen nicht stimulierten und stimulierten Zellen**

*Links: Nicht stimulierte Zellen B-PE- und FITC-markiert; Rechts: Stimulierte Zellen B-PE- und FITC-markiert*

Die markierte Population in der linken Abbildung (nicht stimulierte Zellen) hat eine FITC-Fluoreszenzintensität von etwa  $10^3$  und eine B-PE-Fluoreszenzaktivität von  $10^0$  bis etwa  $10^2$ . Bei den stimulierten Zellen verschiebt sich die B-PE-Fluoreszenzaktivität in einen Bereich von  $10^{1,5}$  bis  $10^{3,5}$ . Eine Verschiebung der B-PE-Intensität dieser Population lässt auf eine verstärkte Expression des allergiespezifischen Oberflächenmoleküls CD63 schließen.

Die Überstände der konzentrierten weißen Blutzellen wurden nach der Stimulation mit dem Allergen OVA zur Leukotrienbestimmung aufbewahrt. Die Leukotrienquantifizierung erfolgte mithilfe eines kommerziellen kompetitiven ELISA. Für die positiven Ansätze konnten Konzentrationen von 27,8 bis 34,2 ng/ml und für die Überstände der unstimulierten Zellen konnten Konzentrationen von 2,9 bis 3,0 ng/ml detektiert werden.

Der basophile Degranulationstest kam zur Untersuchung der einzelnen Modellproteine in den Kartoffelpflanzen nicht zur Anwendung, da die Methode aufgrund der geringen Anzahl an basophilen Zellen im Blut mit einem erhöhten tiermanipulativem Aufwand verbunden ist. Aus Gründen des Tierschutzes wurde auf weiterführende Versuche zur Eignungsprüfung anderer Proteine neben dem Modellallergen OVA verzichtet.

## D Diskussion

Gentechnisch modifizierte Pflanzen (GMP) müssen sich vor ihrer Markteinführung einer strengen Risikoanalyse und -bewertung stellen. Ein wichtiger Aspekt, gerade bei der Zulassung von GMP als Lebensmittel, ist die Analyse der potenziellen Allergenität.

Ziel dieser Arbeit war es, ausgehend von Vorschlägen verschiedener Richtlinien der IFBC/ILSI, FAO/WHO und der EFSA zur Risikoanalyse von GMP standardisierte Verfahren zu entwickeln, die eine Untersuchung der potenziellen Allergenität von GMP ermöglichen. Dabei sollten nicht nur die transgenkodierte Proteine, sondern auch eventuell durch pleiotrope Effekte verursachte Veränderungen des allergenen Potenzials der gesamten Pflanze berücksichtigt werden. Es konnte eine neuartige Standardverfahrensweise zur Prüfung der potenziellen Allergenität von GMP im Vergleich zu ihren nahen isogenen Varianten entwickelt werden, die es ermöglicht die Anwesenheit von bekannten und unbekanntem Allergenen in transgenen Pflanzen zu erkennen. Die Verfahren wurden in einem Entscheidungsbaum miteinander verknüpft, um einen möglichst geringen und kostengünstigen Untersuchungsumfang bei gleichbleibender Sicherheit zu ermöglichen.

### D 1 Quantifizierungssysteme für die Modellproteine

Für die Entwicklung und die Risikoanalyse von transgenen Pflanzen sind Quantifizierungssysteme für die transgenkodierte Proteine unverzichtbare Werkzeuge. Diese Detektionsverfahren müssen in der Lage sein die Proteine in Substanzgemischen wie Pflanzenextrakten spezifisch nachweisen zu können. In dieser Arbeit wurden für die Modellproteine CTxB, VP60 und NPTII Nachweissysteme auf ELISA-Basis entwickelt. Ob die gewählten Antigene zur Herstellung von immunochemischen Nachweisverfahren der Modellsubstanzen geeignet sind, soll nachfolgend diskutiert werden. Für die Quantifizierung der Substanz Cyanophycin war ein ELISA-System aufgrund der geringen Löslichkeit der Substanz unter physiologischen Bedingungen nicht geeignet.

#### D 1.1 CTxB-ELISA – Verwendung eines bakteriellen Proteins zur Assay-Entwicklung

Die Tatsache, dass im Gegensatz zu prokaryotischen Proteinen etwa 50 % der in Eukaryonten exprimierten Proteine Glykoproteine sind (Apweiler *et al.* 1999), wirft die Frage auf, ob das bakterielle CTxB zur Produktion von Antikörpern mit Spezifität gegen das pflanzliche CTxB geeignet ist. Das zur Immunisierung der Labortiere eingesetzte Protein war eine kommerziell erhältliche (Sigma-Aldrich), affinitätschromatographisch aufgereinigte, unglykosilierte Form aus dem Cholera-Erreger *Vibrio cholerae*. Es muss damit gerechnet werden, dass nicht alle Epitope des pflanzlichen CTxB von diesen Antikörpern erkannt werden, da einige Epitope von eventuellen Glykosylierungen verdeckt und für Antikörper unzugänglich sein könnten. So könnte der Einsatz des bakteriellen CTxB als Standardmaterial im ELISA zur Quantifizierung des Proteins in Pflanzenextrakten zu falschen Ergebnissen führen. Die pflanzliche Expression des Modellproteins CTxB erfolgte über den sekretorischen Bildungsweg (Mikschofsky 2006). Der sekretorische Expressionsweg über das endoplasmatische Retikulum (ER) und den Golgi-Apparat für die Bildung von pentamerem CTxB in Pflanzenzellen ist aus zweierlei Hinsicht unentbehrlich. Zum einen demonstrierten Untersuchungen zur Expression von

CTxB im cytoplasmatischen Bildungsweg in Pflanzenzellen, dass weder Monomere, noch biologisch wirksame Pentamere des Proteins im Cytoplasma in nachweisbaren Mengen gebildet wurden (Mikschofsky 2006). Des Weiteren ist das Milieu im endoplasmatischen Retikulum essentiell für die Bildung von Disulfidbrücken zwischen Cysteinen (Noiva 1994). Bei einem sekretorischen Bildungsweg von Proteinen muss allerdings mit einer posttranslationalen Modifikation, der kovalenten Anlagerung von Kohlenhydratgruppen an die Aminosäuren Asparagin (bei Glykosylierungssequenz Asn/Aminosäure-X\*<sup>1</sup>-Ser/Thr; N-glycosidisch; ER) und Serin, Threonin (O-glycosidisch; ER und Golgi-Apparat) gerechnet werden (Gomord *et al.* 2010). Die Aminosäuresequenz des Proteins CTxB beinhaltet eine potenzielle Glykosylierungsstelle für N-glykosidische (Gupta *et al.* in prep. 2004) und eine O-glykosidische (Julenius *et al.* 2005) Bindungsmöglichkeit von Kohlenhydratgruppen. Klassischerweise erfolgt der Nachweis von Glykoproteinen in SDS-Gelen durch Färbung der Periodat-oxidierten Proteine mit Arsenit und Schiffreagenz (Fairbanks *et al.* 1971) oder mittels nicht-selektiver Glykoprotein-Färbung (Heimgartner *et al.* 1989) oder selektiver Lektinfärbung (Rohringer und Holden 1985) auf einer Blotmembran. Diese Methoden waren aber zur Klärung der Frage des Einflusses einer eventuellen Glykosylierung auf den quantitativen Nachweis des pflanzlichen CTxB ungeeignet. Aus diesem Grund wurden in einem Experiment die Glykosylierungen des pflanzlich exprimierten CTxB mit Hilfe von Glykosidasen entfernt. Eine anschließende Quantifizierung mittels ELISA zeigte jedoch keinen Unterschied zu unbehandeltem pflanzlichen CTxB. Daraus lässt sich schließen, dass eventuelle Glykosylierungen der in den Pflanzen gebildeten transgenkodierte Substanz CTxB keinen Einfluss auf eine quantitative Bestimmung mittels ELISA haben. Es konnte somit gezeigt werden, dass mit dem bakteriellen CTxB und den damit erzeugten Antikörpern ELISA-Systeme für einen quantitativen Nachweis des Modellproteins in verschiedenen Matrices, wie Extrakten der GMP entwickelt werden konnten (siehe Tabelle C 1.1). Um neben der Konzentrationsbestimmung auch der Frage der Funktionalität des CTxB-Pentamers nachzugehen, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Quantifizierungssysteme zum Nachweis von CTxB etabliert. Zum einen ein Sandwich-ELISA aus zwei polyklonalen Kaninchen-Antikörpern und zum anderen ein ELISA-Assay auf Basis des bovinen mGM1-Monogangliosid-Rezeptors und eines polyklonalen Kaninchen-Antikörpers. Mit dem auf dem mGM1-Rezeptor basierendem ELISA ist neben der Konzentrationsbestimmung ein Funktionsnachweis der pentameren CTxB-Proteine möglich, da die CTxB-Untereinheit nur in Form des Pentamerkomplexes an den Gangliosid-GM1-Rezeptor binden kann (Svennerholm, 1976). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl das in den Kartoffelpflanzen exprimierte CTxB als auch das kommerzielle Protein mit beiden Systemen gebunden und detektiert werden können. Daraus lässt sich schließen, dass auch das transgenkodierte im Expressionssystem Pflanze produzierte Protein CTxB in der funktionalen Pentamerstruktur, der Form in der das Protein auch durch den Cholera-Erreger *Vibrio cholerae* gebildet wird, vorliegt.

### D 1.2 VP60-ELISA – Verwendung von Substanzgemischen

Für die Herstellung eines quantitativen Nachweissystems auf ELISA-Basis für das Modellprotein VP60 stand das Protein nicht in Reinform zur Verfügung. Die Herausforderung bestand darin, anhand zweier VP60-haltiger Substanzgemische einen

---

\*<sup>1</sup> Aminosäure-X = beliebige Aminosäure; aber ≠ Prolin

ELISA-Assay aufzubauen und den Nachweis zu erbringen, dass das Zielmolekül spezifisch detektiert und quantifiziert werden kann. Besonders beleuchtet werden sollte dabei die Frage, ob die in den Gemischen vorhandenen Fremdstoffen sich negativ auf die Spezifität des Assays auswirken. Die zur Produktion polyklonaler Antikörper eingesetzten Substanzen waren zum einen ein Homogenisat eines Insektenzellkultur-Baculovirus-System in welchem VP60 exprimiert wurde und zum anderen der aus Leberhomogenisaten von experimentell mit dem RHD-Virus infizierten Kaninchen gewonnene Impfstoff RIKA VACC (Riemser Arzneimittel AG, Insel Riems). Nach Immunisierung von Labortieren wurden Antikörper aus Kaninchenserum und den Eiern von Legehennen gewonnen. Aufgrund der weit entfernten evolutionären Verwandtschaft der beiden zur Produktion des VP60 verwendeten Expressionssysteme Insektenzellkultur und Kaninchen, ging ich davon aus, dass die gegen die proteinogenen Verunreinigungen in den Immunisierungslösungen gebildeten Antikörper nur geringste Kreuzreaktivitäten aufweisen. Bewiesen werden konnte diese Theorie anhand des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten VP60-ELISA, der durch Kombination der beiden polyklonalen Antikörper einen spezifischen Nachweis des Proteins in Extrakten transgener Pflanzen ermöglichte. Nachgewiesen wurde die spezifische Detektion des Zielmoleküls VP60 anhand des analysierten Pflanzenmaterials der Events *D-VP60-SEK-6* und *-17*. Die eindeutig positiven Reaktionen des VP60-haltigen Pflanzenmaterials können nur dem transgenkodierten Zielmolekül zugeordnet werden, weil die Negativkontrollen *D-NIV* und *D-35S-6* im verwendeten Assay nur sehr schwache Signale zeigten. In diesem ELISA konnten weiterhin das VP60-haltige Homogenisat des Insektenzellkultur/ Baculovirus-System (Sf9 Pos) als Positivkontrolle und ein Insektenzellkultur/ Baculovirus-Homogenisat, welches kein VP60 enthielt (Sf9 Neg), als Negativkontrolle eingesetzt werden. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass die Verunreinigungen in der Immunisierungslösung keinen starken Einfluss auf die Spezifität des Immunoassays haben, sofern zwei verschiedene Immunisierungslösungen verwendet werden. Verglichen mit dem Nachweissystem des FLI-Riems wurden ähnliche OD-Werte für VP60-haltiges Pflanzenmaterial über den kompletten Konzentrationsbereich erzielt (siehe Abbildung C.9). Mit dem FLI-Riems-Assay konnten für die mitgeführte Positivkontrolle (Sf9 Pos) höhere und die Negativkontrolle (Sf9 Neg) niedrige OD-Werte gemessen werden, was gegenüber dem selbst entwickelten Assay für eine gesteigerte VP60-Spezifität im Homogenisat der Insektenzellen spricht. Dies ist mit der Verwendung von monoklonalen Detektions-Antikörpern (anti-VP60 aus Maus) zu erklären. Diese binden nur an ihr Zielmolekül und unspezifische Kreuzreaktionen werden somit minimiert. Da die Werte der Positiv- als auch der Negativkontrolle in die Berechnung des Zahner-Index einfließen, ergeben sich für beide Assays unterschiedliche Steigungen für die untersuchten Verdünnungsreihen (siehe Abbildung C.10). Das bedeutet, dass im höheren Konzentrationsbereich des selbst entwickelten ELISA größere und im niedrigen Konzentrationsbereich kleinere Zahner-Indices erreicht werden als bei dem FLI-ELISA. Durch die Wahl von anderen Positiv- und Negativkontrollen könnten die Assays anders charakterisiert werden. Beide Testverfahren können bei der Verwendung von definiertem VP60-haltigen Pflanzenmaterial (*D-VP60-SEK-6* und *-17*) als Positivkontrolle und Material der Vergleichspflanzen (*D-NIV* und *D-35S-6*) als gleichwertig angesehen werden. Mit beiden Assays wurden ähnliche Zahner-Indices für die verschiedenen Konzentrationen der Pflanzenextrakte ermittelt (siehe Abbildung C.9). Ein wesentlicher Vorteil der gewählten Strategie der ELISA-Entwicklung mittels Substanzgemischen war hier, dass

das Zielprotein nicht aufwendig aufgereinigt werden und das nicht mit viel Aufwand monoklonale Antikörper produziert werden mussten. Diese Strategie kann als Modellverfahren für die relativ schnelle und kosteneffiziente Herstellung von quantitativen Nachweisverfahren von Substanzen, die in verschiedenen Substanzgemischen vorliegen, genutzt werden.

Obwohl die Strategie der Immunisierung von Labortieren mit Substanzgemischen zur Herstellung eines ELISA erfolgreich war, wird die Frage aufgeworfen, warum vor der Applikation das Protein nicht weiter aufgereinigt wurde. Zur Erstellung eines ELISA-Systems hätten auch polyklonale Antikörper aus einem Individuum herangezogen werden können, wenn dieses mit hochreinem Protein immunisiert worden wäre. Zum Zeitpunkt der Assay-Entwicklung standen noch keine Antikörper in ausreichenden Mengen zur spezifischen Aufreinigung z. B. mittels Affinitätschromatographie zur Verfügung. Es wurden Schritte unternommen mithilfe von immobilisierten anti-VP60-IgY-Antikörpern das Protein aus dem Insektenzellkultur/ Baculovirus-Homogenisat aufzukonzentrieren (Klüß und Prietzsch, unveröffentlichte Daten). Diese Versuche wurden jedoch aufgrund der Instabilität des VP60, der geringen Ausbeute sowie der unzureichenden Spezifität der Antikörper eingestellt. Gegenwärtig werden in Kooperation des Unternehmens BIOSERV A. & M. GmbH und der Professur Agrobiotechnologie der Agrar- und Umweltfakultät der Universität Rostock Strategien für die Aufreinigung des Fusionsproteins CTxB::VP60 aus transgenen Erbsen entwickelt. Dieses Molekül, welches als Impfstoff gegen die Kaninchenkrankheit RHDV Verwendung finden soll, könnte auch zur Antikörperherstellung und der ELISA-Assay-Entwicklung eingesetzt werden.

Auch bei der Testentwicklung für den VP60-Nachweis wurde der Frage nachgegangen, ob Glykosylierungen des pflanzenexprimierten Proteins eventuell einige Antikörper-Bindungsstellen überdecken können und die Konzentration des Zielmoleküls in Pflanzenproben ungenau angezeigt wird. Das Modellprotein VP60 wurde in den Kartoffelpflanzen über den cytoplasmatischen Bildungsweg exprimiert. Da das Protein kein Signalpeptid trägt, welches zu einem posttranslationalen Transport in das endoplasmatische Retikulum führt, sollten somit keine N- oder O-glycosidischen kovalenten Kohlenhydratanlagerungen am Protein, wie sie bei einem sekretorischen Bildungsweg entstehen können, vorhanden sein (Gomord *et al.* 2010). Lediglich O-GlcNAc-Glykosylierungen (O-gebundenes beta-N-Acetylglucosamin), welche im Cytoplasma gebildet werden, können am VP60-Protein vorliegen (Torres und Hart 1984). Anhand eines Experimentes, bei dem die Glykosylierungen der Proteine in Pflanzenextrakt unter Verwendung von Glykosidasen entfernt wurden, zeigte bei der Quantifizierung auch für VP60 keinen Unterschied zwischen behandeltem und unbehandeltem Protein. Daraus lässt sich schließen, dass eventuelle Glykosylierungen des in den Pflanzen gebildeten VP60 keinen Einfluss auf eine quantitative Bestimmung mittels ELISA haben.

### **D 1.3 NPTII-ELISA – Inclusionbodies und synthetische Peptide**

Zur Produktion von spezifischen polyklonalen Antikörpern gegen das Modellprotein NPTII, wurden zwei Strategien getestet. Zum einen wurde das Protein nach einem *E. coli*-Aufschluss aus gelösten Inclusionbodies mit Hilfe einer präparativen Gelelektrophorese aufgereinigt und zum anderen wurde ein synthetisches Polypeptid, gekoppelt an ein Trägerprotein (KLH) zur Immunisierung herangezogen. Warum jedoch beide Verfahren

nicht zu einer erfolgreichen Herstellung von spezifischen Antikörpern in ausreichenden Mengen führte, und ein NPTII-Assay nur unter Verwendung kommerzieller Immunglobuline entwickelt werden konnte, soll nachfolgend Gegenstand der Diskussion sein.

In der Literatur wurde bereits mehrfach beschrieben, dass Polyacrylamidgel-Banden nach einer elektrophoretischen Auftrennung von Proteingemischen zur Antikörperproduktion in Labortieren eingesetzt werden können (Boulard und Lecroisey 1982, Tracy *et al.* 1983). Die gelösten Inclusionbodies wurden mittels einer präparativen SDS-PAGE aufgetrennt, um das Zielmolekül NPTII in möglichst reiner Form darzustellen. Bei dieser Methode handelt es sich um eine denaturierende Elektrophorese, somit lagen die Proteine in ihrer Primärstruktur vor. Mögliche aus der Sekundär- oder Tertiärstruktur resultierende Konformationsepitope standen nicht mehr zur Verfügung (Siegenthaler 2006) und es konnten im immunisierten Tier dementsprechend keine Antikörper gegen diese Epitope gebildet werden. Gegen Bereiche der Primärstruktur vorhandene Immunglobuline im Antikörperpool der Kaninchen könnten ihre Epitope, die möglicherweise durch die räumliche Struktur im nativen Protein verdeckt sind, im ELISA nicht erkennen.

Für eine weitere Strategie zur Antikörperproduktion gegen das Modellprotein NPTII, wurde ein synthetisches Polypeptid, gekoppelt an ein Trägerprotein (KLH) zur Immunisierung herangezogen. Niedermolekulare, haptentartige Moleküle, wie Peptide, die selbst nicht antigen wirken, können für Immunisierungen von Tieren an dieses Trägerprotein gekoppelt werden (Müller-Esterl 2004). Das Peptid wurde über eine Disulfidbindung zweier Cysteine im Peptid und im KLH kovalent an das Trägerprotein gebunden. Die Antikörper gegen diese Sequenz wurden affinitätschromatographisch aufgereinigt, jedoch konnte keine Reaktivität gegen das komplette Protein weder im ELISA (natives Protein) noch im Westernblot (denaturiertes Protein) nachgewiesen werden. Ein Grund dafür liegt darin, dass im Serum der immunisierten Tiere ein hoher Antikörper-Titer gegen das KLH vorlag. Möglicherweise würde die Wahl eines anderen Trägerproteins als Kopplungspartner für das Peptid, auf welches das immunisierte Tier nicht mit einer all zu starken Immunglobulinbildung reagiert, bessere Ergebnisse erzielen. Von Xu *et al.* (2006) wurden verschiedene Proteine auf ihre Eignung als Kopplungspartner für ein niedermolekulares Hapten untersucht. In diesem Fall konnte dem Tetanus-Toxoid (TT) die verhältnismäßig geringste Immunogenität (Carrier vs. Hapten) zugeschrieben werden, was für die Verwendung als optimalen Carrier spricht.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Quantifizierungssystem auf ELISA-Basis, welches reproduzierbare Ergebnisse liefert und Unterschiede in der Höhe der NPTII-Expression der einzelnen Kartoffelyophilisate zuverlässig anzeigt, unter Verwendung von kommerziellen anti-NPTII-Antikörpern (Sigma-Aldrich) etabliert werden. Diese polyklonalen Antikörper sind durch den Hersteller ebenfalls unter Verwendung von synthetischen an KLH gekoppelten Polypeptiden in Kaninchen produziert worden. In affinitätschromatographisch aufgereinigter Form lagen diese jeweils in Konzentrationen von 1,0 bzw. 4,0 mg/ml vor. Inwieweit sich die Verfahrensparameter zur Erzeugung der hohen spezifischen Antikörperausbeuten in den Seren der immunisierten Tiere von den von den hier gewählten Parametern unterscheiden, bleibt jedoch ungeklärt. Möglicherweise konnten diese durch Erhöhung der Konzentration der applizierten

Proteine und die Wahl geeigneter Adjuvantien, die die Immunreaktion des Tieres verstärken, erreicht werden.

#### **D 1.4 Cyanophycin-Nachweis – Löslichkeitsproblem**

Die Substanz Cyanophycin ist unter physiologischen pH-Bedingungen, wie sie für Antigen-Antikörperbindung im Immuno-Assay nötig sind, schlecht löslich. Wie man dieser Problematik begegnen kann war die Herausforderung bei der Entwicklung eines Quantifizierungssystems für diese Substanz. Ein Nachweisverfahren für Cyanophycin auf ELISA-Basis im Sandwich-Assay konnte nicht entwickelt werden. Allerdings war ein quantitativer Nachweis von Cyanophycin im direkten Assay möglich, bei dem die Substanz bei saurem pH-Wert gelöst direkt an die Mikrotiterplatte gebunden wurde. Die Detektion erfolgte unter Verwendung von im Kaninchen produzierten Antikörpern. Jedoch lieferte dieses Verfahren bezüglich der Sensitivität nur unbefriedigende Resultate. Der Detektionsbereich in diesem Assay lag bei etwa 20 - 60 µg Cyanophycin/ml. Dieser Konzentrationsbereich wurde auch von Mackerras *et al.* (1990) für ihren direkten ELISA zur spezifischen Antikörperdetektion in Seren von Cyanophycin-immunisierten Mäusen angegeben. Mit diesem Nachweisbereich ist zwar eine Unterscheidung von sauren Extrakten von Cyanophycin-haltigem und Cyanophycin-freiem Pflanzenmaterial möglich, jedoch können Proben (Kot- und Urinproben aus Fütterungsstudien), bei denen der Cyanophycingehalt unter diesem Bereich liegt, nicht untersucht werden.

Da die polyklonalen Antikörper die Substanz Cyanophycin spezifisch erkennen, wurde der Frage nachgegangen, ob diese für biochemische Charakterisierungen der Substanz aus unterschiedlichen Expressionssystemen genutzt werden können. Dafür wurden zwei grob gereinigte Typen Cyanophycin (aus *E. coli* und aus *Solanum spec.*) elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend im Westernblot eingesetzt (siehe Abbildung C.4). In der Cyanophycin-Probe, die aus Kartoffeln aufgereinigt wurde, wurde eine Bande bei 25 kDa detektiert. Diese Molekulargröße der Kartoffel-exprimierten Substanz wurde auch durch Neubauer (Dissertation 2010) mittels SDS-PAGE nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurden in der Cyanophycin-Probe aus *E. coli* mehrere Banden verschiedener Größen nachgewiesen. Dies kann zum einen bedeuten, dass das Cyanophycin in diesem Expressionssystem in mehreren Größen gebildet wird oder, dass das rekombinante Polypeptid nach der Aufreinigung aus dem Expressionssystem *E. coli* nicht in ausreichend reiner Form vorlag. *E. coli* ist ein ubiquitär vorkommender Keim, der zur Normalflora des hinteren Dünndarms und des Dickdarms warmblütiger Organismen gehört (Steinmüller 2010). Daher kann man davon ausgehen, dass das Kaninchen unter normalen Haltungsbedingungen diesem Keim ausgesetzt war und Antikörper gegen Strukturen dieses Bakteriums gebildet hat. Bestätigt wurde diese Annahme durch eine Immunodetektion mehrerer Banden eines *E. coli*-Lysates (ohne Cyanophycin) mit den Antikörpern des Cyanophycin-immunisierten Kaninchens (Abbildung nicht dargestellt). Aus dem Vergleich der beiden Bakterien-Lysate konnte für das Cyanophycin eine Molekulargröße von ca. 40 kDa bestimmt werden. Laut Literatur hat bakterielles Cyanophycin aus *E. coli* eine Molekulargröße von 25 - 35 kDa (Ziegler *et. al.* 1998, Neubauer 2010). Diese Abweichung ist eventuell auf die Ungenauigkeit von bei elektrophoretischen Auftrennungen verwendeten Größenmarkern zurückzuführen.

Da Cyanophycin unter Verwendung von spezifischen Antikörpern zwar detektierbar, jedoch nicht quantifizierbar ist, wurde der Frage nach einer alternativen

Quantifizierungsmethode nachgegangen. Hier wurde die gute Löslichkeit der Substanz Cyanophycin bei saurem pH-Wert genutzt. Mittels Extraktion in 0,1 M HCl (pH<2) konnten aus Pflanzenmaterial die säurelöslichen Bestandteile extrahiert und in einem Proteinnachweis nach dem Bradford-Assay (Bradford 1979) nachgewiesen werden. Die Bradford-Methode ist eine gute Möglichkeit den Cyanophycin-Gehalt in sauren Proben-Extrakten zu bestimmen, ist jedoch dadurch limitiert, dass in der Proben-Matrix auch andere säurelösliche Proteine vorliegen können, die das Resultat verfälschen können. Diesem Unsicherheitsfaktor kann begegnet werden, wenn stets eine Cyanophycin-freie äquivalente Vergleichsprobe bei Extraktion und Proteinbestimmung mitgeführt wird. Parallele Extraktionen der Cyanophycin-exprimierenden Kartoffel-Pflanzen (*A-PsbY-12* und *-23*) und der nahen isogenen Variante (*A-NIV*) ergaben nach Berücksichtigung der aus *A-NIV* extrahierten säurelöslichen Bestandteile Cyanophycin-Konzentrationen von 4,81 (*A-PsbY-12*) und 1,45 mg/g Lyophilisat (*A-PsbY-23*). Anhand einer gravimetrischen Bestimmung (wiegen der extrahierten, geröckneten Substanz) wurde bei einer weiteren Cyanophycin-Aufreinigung mittels saurer Extraktion (0,1 M HCl) aus Kartoffellyophilisat (*A-PsbY-23*) eine Masse von 3,7 mg/g Lyophilisat ermittelt. Diese Resultate liegen im gleichen Größenbereich wie die mittels Bradford-Methode bestimmten Cyanophycin-Gehalte. Die Differenzen sind möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Quantifizierung im Bradford-Assay anhand einer BSA-Standardreihe erfolgte. Der Anteil an kationischen und unpolaren Seitenketten, mit denen der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250 Komplexe bildet, ist in beiden Substanzen nicht gleich groß und lässt daher nur einen relativen Vergleich zu. Bestätigt wurde diese Annahme durch Untersuchungen einer Cyanophycinprobe aus transgenem Tabak die im Bradford-Assay anhand einer BSA- und einer Cyanophycin-Standardreihe quantifiziert wurde. Bei dem Cyanophycin-Standard handelt es sich um ein mittels enzymatischer Methode nach Neumann *et al.* (2005) quantifiziertem Material. Mit der BSA-Standardreihe wurden 1,5 mg Cyanophycin / g Lyophilisat und anhand der Cyanophycin-Standardreihe 4,7 mg Cyanophycin / g Lyophilisat detektiert. Diese Differenz spiegelt den Unterschied der Cyanophycin-Quantifizierung im *A-PsbY-23*-Lyophilisat anhand der BSA-Reihe (1,45 mg/g) und der gravimetrischen Methode (3,7 mg/g) wieder. Wenn man davon ausgeht, dass die Mengenbestimmung des Cyanophycins anhand einer Cyanophycin-Standardreihe am genauesten ist, kommt das Resultat der gravimetrischen Bestimmung dem Ergebnis dieser Methode am nächsten. Anhand der BSA-Standardreihe werden tendenziell zu niedrige Cyanophycinwerte gemessen. Relative vergleichende Quantifizierungen sind also nur möglich, wenn immer dieselbe Methode angewendet bzw. Referenz herangezogen wird.

## D 2 Allergologische Risikobetrachtung von GMP

Das Einbringen transgenkodierter Proteine in Pflanzen kann ein erhöhtes Risiko eine allergische Reaktion auszulösen verursachen. Die allergische Reaktion kann bereits sensibilisierte allergische Individuen betreffen oder eine *de-novo*-Sensibilisierung auslösen. Das allergene Potenzial einer GMP kann im Vergleich zu ihrer nahen isogenen Vergleichsvariante in zweierlei Hinsicht erhöht werden. Zum einen kann die in die Pflanze neu eingebrachte genetische Sequenz für ein allergenes Protein kodieren. Zweitens kann die Expression des neuen Proteins unbeabsichtigte Effekte auf den Stoffwechsel der

Pflanze haben und zu einer Überexpression von Proteinen mit allergener Wirkung führen (Spök *et al.* 2005).

In Anlehnung an bestehende Richtlinien (IFBC/ILSI 1996, FAO/WHO 2001, Codex Alimentarius Guidelines 2003, EFSA 2006) zur allergologischen Risikobewertung von GMP, sind im Rahmen dieser Arbeit acht transgene Kartoffelpflanzen im Vergleich mit ihren nahen isogenen Varianten (*Albatros* und *Desiree*) auf ihr allergenes Potenzial untersucht worden. Anhand der Richtlinien und der darin empfohlenen Methoden und Vorgehensweisen sind Verfahren getestet und entwickelt und in einen erweiterten Entscheidungsbaum integriert worden.

## **D 2.1 Sind die gewählten Verfahren zur allergologischen Risikoanalyse von GMP geeignet?**

In dieser Arbeit wurden verschiedene Verfahren und Methoden zur Klärung des allergenisierenden Potenzials von Substanzen und GMP herangezogen und getestet. Das Spektrum der Verfahren reicht von computerbasierten *in silico*-Prüfungen, bei denen Homologien des rekombinanten Proteins zu bekannten Allergenen untersucht wurden, über physiko-chemische Analysen, die der Prüfung der Stabilität des Proteins dienen, bis hin zu Applikationen an Labortieren zur Untersuchung der sensibilisierenden Wirkung.

### **D 2.1.1 *In silico*-Sequenzanalyse**

Eine der ersten Untersuchungen bei der Risikoanalyse von GMP auf ein erhöhtes allergenes Potenzial als Folge der Integration eines oder mehrerer Transgene gilt den neu exprimierten transgenkodierten Proteinen. Schon bei der Entwicklung der Pflanze, bereits vor der Wahl der Rezipientenpflanze, kann eine Analyse auf Homologie der Aminosäuresequenz des transgenkodierten Proteins zu Sequenzen von Proteinen mit bekannter Allergenität erfolgen. Dafür stehen Datenbanken zur Verfügung, in denen die Sequenzen aller bekannten bislang sequenzierten Proteine auf Nukleinsäure- bzw. Aminosäureebene hinterlegt sind. Fraglich ist allerdings, ob alle Datenbanken zu den gleichen Ergebnissen führen und für die *in silico*-Sequenzanalyse die Verwendung einer einzelnen Datenbank ausreichend ist.

Die in dieser Arbeit für diese Analyse herangezogenen Datenbanken, wie SDAP, EVALLER™, Allermatch™ und AllergenOnline vergleichen eingegebene Aminosäuresequenzen mit den Sequenzen aller bislang bekannten Allergene und nutzen dabei verschiedene Server der Institutionen CBI, NCBI, PIR, BCM und EMBL-EBI. Für die Arbeit mit diesen Datenbanken stehen Werkzeuge zur Verfügung, die die geforderten Kriterien (35 % Identität in 80 AS-Fenster oder Homologie von 6 bzw. 8 aufeinanderfolgenden AS) des Alignment-Screenings zwischen dem untersuchten Protein und bekannten Allergenen bereits berücksichtigen. Die Sequenzvergleiche auf Homologie der untersuchten Modellproteine mit bekannten Allergenen unter Verwendung der genannten Datenbanken lieferten nicht alle die gleichen Ergebnisse. Für das Modellprotein CTxB wurden lediglich mit der Datenbank SDAP zwei Allergene detektiert, die jeweils eine Homologie von 6 aufeinanderfolgenden Aminosäuren aufweisen. Das sind zum einen das Allergen *Can f 3*, ein Albumin vom Hund und *Dic v a*, ein allergenes Protein aus dem bovinen Lungenwurm. Das Screening mit den anderen genannten Datenbanken lieferte für keines der Modellproteine Treffer. Diese Tatsache lässt den Schluss zu, dass für die *in*

*silico*-Prüfung transgenkodierter Proteine auf Homologien zu bekannten Allergenen mehrere Datenbanken herangezogen werden sollten, auch wenn diese teilweise auf die gleichen Server zugreifen. Auch die EFSA (2006) rät verschiedene Such-Strategien basierend auf den verfügbaren Sequenzen in relevanten Datenbanken durchzuführen. Anhand des hier vorliegenden Beispiels CTxB wird die Wichtigkeit der Verwendung mehrerer Informationsquellen für die *in silico*-Sequenzanalyse verdeutlicht.

### D 2.1.2 Seren-Screenings

Seren-Screenings - diese Art von *in vitro*-Tests können unter verschiedenen Gesichtspunkten der allergologischen Risikoanalyse von GMP herangezogen werden. Fragestellungen zur Kreuzreaktivität des transgenkodierten Proteins mit Seren von Patienten mit Allergie gegen sequenzhomologe Allergene (nach *in silico*-Sequenzanalyse) oder Allergie gegen die Transgenquelle können im spezifischen Screening analysiert werden (EFSA 2006). In der vorliegenden Arbeit wurden diese *in vitro*-Tests weiterhin auf ihre Tauglichkeit geprüft, eventuelle Veränderungen der Reaktivität der endogenen Allergene des Transgen-Rezipienten zu detektieren.

Wenn zwischen einem untersuchten Protein und einem bekannten Allergen Homologien in der Aminosäuresequenz festgestellt werden, sollten im Nachgang spezifische Serenscreenings durchgeführt werden, sofern Patientenserum verfügbar sind. Für die Modellsubstanz CTxB konnten bei einem Screening leicht positive IgE-Kreuzreaktivitäten mit Seren von *Can f 3*-positiven Hundeallergikern nachgewiesen werden. An dieser Stelle stößt die Methodik des Serumscreenings auf eine Problematik. Es bestehen zwar Möglichkeiten des Zugangs zu Serenbanken, jedoch werden die Seren, bzw. die Spezifikationen nicht zentralisiert, sondern von jeder Institution einzeln verwaltet (Thomas *et al.* 2007). Besteht also die Notwendigkeit ein Serum mit Reaktivität gegen ein Allergen heranzuziehen, für welches nur wenige bestätigte Fälle beschrieben wurden, sind mitunter viele Serenbanken auf ein passendes Serum zu durchsuchen. Thomas *et al.* beschreiben den Bedarf an der Etablierung einer internationalen Serenbank, auf die zur Untersuchung der potenziellen humanen Allergenität von transgenen Proteinen zugegriffen werden kann. In dieser Arbeit konnten beispielsweise keine Patientenserum mit Reaktivität gegen das Allergen *Dic v a* gefunden werden, sodass die Untersuchung auf Kreuzreaktivität zwischen dem Protein CTxB und diesem Allergen nicht durchgeführt werden konnte. Die in den einzelnen Serenbanken aufgeführten Patientenserum werden oftmals nicht detailliert genug charakterisiert. So war es notwendig die Patientenserum mit Reaktivität gegen das Hundeallergen *Can f 3* aus einem Pool von Seren von Hundeallergikern vorab zu identifizieren. Bislang sind die Allergene *Can f 1, 2, 3, 4, 5* und *5.0101* (SDAP, Stand 04-2010) aus dem Hund (Haare, Schuppen, Speichel) bekannt. Das Albumin *Can f 3* ist ein Allergen, auf das etwa 35 % aller Hundeallergiker reagieren (Spitzauer *et al.* 1994). Eine vorliegende Allergie wird bei Patienten oftmals nur unter Verwendung von Gesamtextrakten, also Lösungen, die eine Vielzahl von Substanzen der Allergenquelle enthalten, diagnostiziert. Für eine genauere Charakterisierung müssen dann mehrere Untersuchungen, die eine Spezifizierung ermöglichen würden, durchgeführt werden (Renz *et al.* 2010). Für die Identifizierung der *Can f 3* positiven Seren aus einem Pool von 100 Hundeallergiker-Seren wurde das rekombinante Protein *Can f 3* herangezogen. Es wurden 11 *Can f 3*-reaktive Seren ermittelt, von denen 8 positiv mit dem Modellprotein CTxB reagierten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei

Personen mit bestätigter Allergie gegen das Allergen *Can f 3* aus dem Hund eventuell auch bei Kontakt mit dem Protein CTxB allergische Reaktionen auftreten können und, dass IgE-Antikörper aus dem Patientenserum mit hoher Wahrscheinlichkeit mit der in der *in silico*-Sequenzanalyse identifizierten Sequenz VLLSSA im Protein CTxB reagieren. Die geringere Reaktionsstärke der IgE-Immunglobuline aus dem Serum der *Can f 3*-Allergiker mit dem Modellprotein CTxB ist damit zu erklären, dass das CTxB nur eine nachgewiesene Sequenz trägt, die mit dem *Can f 3*-spezifischen IgE reagieren kann. Zusätzlich können auch sterische Behinderungen eine Rolle spielen, bei denen die Antikörper die Epitope nur bedingt erreichen. Die Anzahl der IgE-Epitope des Allergens *Can f 3* sind nicht dokumentiert. Da es aber nachgewiesenermaßen allergische Reaktionen auszulösen vermag, muss es mindestens zwei Epitope tragen.

Seren-Screenings können auch daraufhin ausgerichtet sein zu untersuchen, ob das transgenkodierte Protein IgE im Serum von Patienten, die gegen die Quelle des Transgens allergisch sind, bindet. Dieser Analyse geht eine Recherche nach bekannter Allergenität des Spenderorganismus voraus. Die genetischen Informationen der in dieser Arbeit untersuchten Modellproteine stammen aus Bakterien, Viren bzw. Algen. Für diese Organismen ist kein allergenes Potenzial bekannt und es wurden keine Screenings mit Seren von Patienten mit Allergie gegen die Spenderorganismen durchgeführt.

Die gewählte Modellpflanze *Solanum spec.* ist eine Pflanze mit endogenen Allergenen *Sola t 1 – Sola t 4* (Seppälä *et al.* 2001) und es konnten vergleichende Untersuchungen auf IgE-Reaktivität der nahen isogenen Varianten (*Albatros* und *Desiree*) und den transgenen Pflanzen unter Verwendung von Seren von Kartoffelallergikern durchgeführt werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten, dass allein durch vergleichende Analyse verschiedener naher isogener Varianten von Kartoffeln Differenzen in der IgE-Reaktivität darstellbar sind. So wurden beispielsweise (siehe Tabelle C 2.4) Seren identifiziert, die gegen Extrakte der Kartoffelvariante *Linda* keine Reaktivität zeigten, jedoch mit Extrakten von *Albatros-NIV* und *Desiree-NIV* mit der RAST-Klasse I (sehr niedrig) beurteilt wurden. Auch wurden Seren identifiziert, die mit *Linda* als sehr niedrig (RAST-Klasse I) oder niedrig (RAST-Klasse II) eingestuft waren, jedoch mit *Albatros-NIV* und *Desiree-NIV* Reaktionen der Klasse III zeigten. Von den transgenen Pflanzen zeigte lediglich *Albatros-CTxB-SEK-204* im Vergleich mit ihrer nahen isogenen Variante eine leicht erhöhte Reaktivität (bei 2 Seren von RAST-Klasse III zu IV). Mit hoher Wahrscheinlichkeit ist diese leicht erhöhte Reaktivität auf die Allergene *Sola t 1 - Sola t 4* in den eingesetzten Kartoffelextrakten zurückzuführen und nicht auf eine direkte Reaktivität mit dem transgenkodierten Protein CTxB. Denn ein Unterschied in der IgE-Reaktivität zwischen Material der Linie *Albatros-NIV* und *Albatros-CTxB-SEK-218*, welche mehr als doppelt so viel CTxB exprimiert wie die Linie *Albatros-CTxB-SEK-204* (vgl. Abbildung C.5), wurde nicht festgestellt. Die TSP-Gehalte der Kartoffelextrakte wurden vor dem Einsatz im IgE-Bindungsassay auf die gleiche Konzentration eingestellt. Demnach müssen die Differenzen in den Reaktionsstärken auf unterschiedliche Allergenreaktivitäten zurückzuführen sein. Aus diesen Resultaten schließe ich, dass das Screening auf IgE-Reaktivität mit Seren von Patienten mit bekannter Allergie gegen die Transgen-Rezipientenpflanze Differenzen in der Reaktivität endogener Allergene anzuzeigen vermag. Da jedoch mit den zur Verfügung stehenden zehn Seren der Stichprobenumfang sehr klein war, liefern diese Ergebnisse lediglich einen Anhaltspunkt im Bezug auf eine veränderte Reaktivität der endogenen Allergene in den untersuchten

Kartoffelmaterialien. Dieses Verfahren bedarf unter Verwendung von entsprechenden Patientenseren und einer größeren Anzahl an verschiedenen Kartoffelextrakten einer umfangreichen Validierung. Dabei gilt es auch zu prüfen, ob diese Methode als Quantifizierungsverfahren für endogene Allergene Verwendung finden kann und Unterschiede im Allergengehalt von GMP und NIV zu detektieren vermag. Es wurde mehrfach gezeigt, dass das Auslösen einer *de-novo*-Sensibilisierung nicht direkt abhängig von einer applizierten Allergenkonzentration ist (Diesner *et al.* 2009, Ergebnisse dieser Arbeit), allerdings kann eine Quantifizierung von Allergenen anhand von IgE-Antikörpern vorgenommen werden. Nachgewiesen wurde diese Möglichkeit anhand eines im Rahmen eines Forschungsprojektes der Firma BIOSERV entwickelten Immuno-Chip-Assays (Multiparameter-Assay). Bei diesem Verfahren wurde ein Allergen (TNP - Trinitrophenyl) in verschiedenen Konzentrationen an die feste Phase gebunden, mit einer Konzentration von anti-TNP-IgE-Antikörpern (Maus) inkubiert und mit anti-Maus-IgE detektiert. Die verschiedenen Allergen-Konzentrationen lieferten in diesem Assay unterschiedlich starke Signale, was für eine Semiquantifizierbarkeit des Allergens spricht (siehe G 12.1).

### **D 2.1.3 Untersuchungen zur Stabilität transgenkodierter Proteine**

Bei der allergologischen Risikoanalyse von GMP sind Stabilitätsuntersuchungen des transgenkodierten Proteins durchzuführen. Diese Untersuchungen beinhalten Analysen der Stabilität des Proteins gegen Verdauungsenzyme und gegen Prozessierung, wie Hitzeeinwirkung auf das untersuchte Protein. Die Fähigkeit von Lebensmittelallergenen die Mucosamembran des Intestinaltraktes zu erreichen und zu passieren ist eine Grundvoraussetzung für ihre Allergenität. Intakte Proteine sind potenziell in der Lage die Mucosamembran des Darms zu passieren und in das zirkulierende Blutsystem einzudringen (Metcalf 1996). Ein Protein, das sehr stabil gegenüber den proteolytischen und sauren Bedingungen des Verdauungstraktes ist, hat eine erhöhte Wahrscheinlichkeit die Mucosamembran zu erreichen (Metcalf 1996). Es besteht eine Korrelation zwischen der Stabilität von Proteinen gegenüber Verdauung und allergenem Potenzial. So wurde beispielsweise gezeigt, dass die meisten bekannten Allergene oder proteolytischen Fragmente der Allergene in simulierter gastrischer Flüssigkeit (SGF) für mehr als 2 Minuten stabil sind gegen Verdauung. Einige starke oder „major“ Allergene sind sogar für mehr als eine Stunde in nachweisbaren Mengen stabil in SGF. Gewöhnliche Lebensmittelproteine hingegen werden unter gleichen Versuchsbedingungen in weniger als 15 Sekunden abgebaut (Metcalf 1996). Auf der anderen Seite wurde wiederholt nachgewiesen, dass eine Reihe von Allergenen aus Obst, Gemüse, Meeresfrüchten, Milch, Ei, Soja und Erdnuss, deren sensibilisierende Kapazität klinisch bewiesen wurde, nicht resistent gegen Verdauung in *in vitro*-Assays sind (Jensen-Jarolim und Untersmayr 2006). Auch Untersuchungen von Fu *et al.* (2002) zeigten, dass die Korrelation zwischen allergenem Potenzial von Proteinen und ihrer Stabilität gegen Verdauung nicht absolut ist. Dennoch sollten diese Untersuchungen in die allergologische Risikoanalyse von GMP einbezogen werden, denn sie liefern wertvolle Hinweise zum Verhalten der Proteine nach Aufnahme mit der Nahrung. Durch die FAO/WHO (2001) sind Methoden zur Stabilitätsanalyse gegen das Verdauungsenzym Pepsin beschrieben. Danach sollte aufgereinigtes transgen-kodiertes Protein im Vergleich mit nicht allergenen und allergenen Proteinen zur Analyse herangezogen werden. Nach definierten Zeitpunkten sollten Proben des Protein/Pepsin-Ansatzes entnommen, neutralisiert und mittels SDS-PAGE

und anschließend Immunoblot mit polyklonalen IgG-Antikörpern untersucht werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zum Teil die aufgereinigten transgenen Proteine auf Stabilität getestet und zusätzlich wurden die kompletten Kartoffellyophilisate zur Untersuchung herangezogen. Diese Vorgehensweise wurde aus zwei Gründen verfolgt. Erstens waren nicht alle Modellproteine in aufgereinigter Form verfügbar und zweitens konnte so die Proteinestabilität gegen Pepsinverdau unter annähernd realen Bedingungen des Verdauens von Nahrungsmitteln getestet werden. Ich gehe davon aus, dass unter diesen realen Bedingungen die Endopeptidase Pepsin nicht nur das untersuchte Protein, sondern auch alle weiteren mit der Nahrung aufgenommenen Proteine abbaut. So kann *in vitro* die Abbaukinetik der Modellproteine in Kombination mit der Pflanzenmatrix analysiert werden. Der Nachweis der Modellproteine in den einzelnen Proben erfolgte mit ELISA-Systemen unter Verwendung polyklonaler Antikörper. Ein Vorteil der Verwendung von ELISA-Assays gegenüber einer SDS-PAGE zum Nachweis immunogener Proteine bzw. Protein-Abbauprodukten (Peptiden) besteht in der Möglichkeit der quantitativen Darstellung der Abbaukinetik des transgenen Proteins.

Die Ergebnisse der durchgeführten *in vitro*-Untersuchungen der Stabilität der Modellproteine im Pflanzenmaterial gegen Verdauung durch das Enzym Pepsin zeigten, dass unter den gewählten Bedingungen des Versuchs die Modellproteine zwar abgebaut wurden, jedoch noch nach Minuten in nachweisbaren Mengen vorlagen. Beispielsweise waren die Proteine NPTII und VP60 im Pflanzenmaterial erst nach 8 bzw. 13 Minuten nicht mehr nachweisbar. Das Protein CTxB in den Proben des Pflanzenmaterials war bis zur 89. Minute detektierbar. Die Stabilitätsprüfung der reinen Substanzen hingegen zeigte, dass die Proteine bereits nach maximal 30 Sekunden nicht mehr nachweisbar waren, was mit der Abbaugeschwindigkeit von normalen Lebensmittelproteinen vergleichbar ist (Metcalfe 1996). Dieses Resultat deckt sich mit Ergebnissen aus *in vitro*-Verdauversuchen von NPTII aus der wissenschaftlichen Literatur. Fuchs *et al.* (1993) konnten zeigen, dass das Protein innerhalb weniger Sekunden in simulierter gastrischer Flüssigkeit (SGF) abgebaut wird. Die Modellsubstanz Cyanophycin wurde durch die Endopeptidase Pepsin weder in Reinform, noch im Pflanzenmaterial abgebaut. Die scheinbar erhöhte Stabilität der Substanz CTxB im Material der Pflanzen *A-CTxB-SEK 204* und *-218* könnte auf die höhere Konzentration an gesamlöslichem Protein (TSP) im Vergleich zu den anderen untersuchten Pflanzen zurückzuführen sein (siehe Tabelle G 11.1). Die TSP-Konzentration ist beispielsweise in der Pflanze *A-CTxB-218* etwa doppelt so hoch wie in den Pflanzen *D-VP60-SEK6* und *-17* (bestimmt mit der Methode nach Bradford). Demnach muss durch das Verdauungsenzym Pepsin eine größere Menge an Gesamtprotein verdaut werden und der Abbau der Substanz CTxB im Proteingemisch erfolgt entsprechend langsamer. Dieses Ergebnis stellt die Notwendigkeit dar, dass in Stabilitätsuntersuchungen nicht nur die aufgereinigten transgenkodierte Proteine, sondern auch das komplette Pflanzenmaterial betrachtet werden sollte. Es konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Modellproteine durch das Verdauungsenzym Pepsin abgebaut werden, dieser Abbau jedoch bei Vorhandensein der Lebensmittelmatrix langsamer vonstatten geht. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass das Verhältnis von Pepsidase zu TSP eine zentrale Komponente ist, die entscheidet, wie schnell ein transgenkodierte Protein abgebaut wird. Zur Vergleichbarkeit der Resultate müsste diese Methode mit Lebensmitteln, die bekannte Allergene beinhalten, und den aufgereinigten Allergenen durchgeführt werden. Die Stabilitätsprüfung transgenkodierter

Proteine unter Verwendung des Verdauungsenzyms Pepsin ist ein brauchbarer Bewertungsansatz der Allergenitätsprüfung von GMP, jedoch könnte dieses Untersuchungssystem durch andere Parameter, die beim Verdau eine Rolle spielen, erweitert werden. Beispielsweise ließe sich *in vitro* auch das basische Milieu des Dünndarms mit den entsprechenden Verdauungsenzymen nachstellen. Weiterhin könnte das System an unterschiedliche Verdauungsapparate angepasst werden. Bei geplanter Anwendung der GMP als Tierfutter könnte es beispielsweise durch Komponenten, die das Wiederkauen und die verschiedenen Mägen der Kuh simulieren, sowie einen bakteriellen Verdau ergänzt werden.

Die *in vitro*-Abbaubarkeit der Modellproteine wurde in dieser Arbeit durch *in vivo*-Fütterungsversuche, die durch die Primacyt GmbH, Schwerin durchgeführt worden sind, untermauert. Dafür wurden Ratten mit Kartoffelmaterial gefüttert und die Exkremente wurden in den Laboren der Firma BIOSERV auf Vorhandensein der Modellproteine unter Verwendung der entwickelten ELISA-Systeme analysiert. Es konnten minimale Mengen an den Proteinen CTxB und VP60 in den Kot- und Urinproben detektiert werden. Jedoch lagen die Konzentrationen dieser Substanzen unterhalb des kleinsten Standards der zur Quantifizierung herangezogenen Standardreihe. Die Standardabweichungen der einzelnen Gruppen überschneiden sich, sodass man bei den detektierten Werten nicht von signifikanten Mengen sprechen kann. In den *in vitro*-Studien konnte gezeigt werden, dass das Verdauungsenzym Pepsin die Substanz Cyanophycin innerhalb einer Reaktionsdauer von 1,5 Stunden nicht abzubauen vermag. Aus den Kotproben der mit Cyanophycin-haltigem Kartoffelmaterial gefütterten Ratten konnte jedoch kein Cyanophycin in nachweisbaren Mengen extrahiert und im Bradford-Assay bestimmt werden. Die Frage nach dem Grund der unterschiedlichen Ergebnisse der *in vitro*- und der *in vivo*-Verdauung der Substanz Cyanophycin lässt sich durch zwei mögliche Punkte beleuchten. Bei der *in vivo*-Verdauung wirken neben dem Enzym Pepsin noch weitere Enzyme und Mechanismen auf Substanzen, die mit der Nahrung aufgenommen werden ein. So werden Proteine und Proteinbruchstücke nach Pepsin-Verdau im Magen durch weitere Peptidasen und Proteasen wie Trypsin, Chymotrypsin, Carboxypeptidasen A und B etc. bis hin zu Oligopeptiden und einzelnen Aminosäuren abgebaut (Löffler *et al.* 2007). Weiterhin kann durch Mikroorganismen im Darm die Metabolisierung von mit der Nahrung aufgenommenen Substanzen beeinflusst werden. Arbeiten von Sallam und Steinbüchel (2008) haben gezeigt, dass die Substanz Cyanophycin durch Bakterien der Darmflora verstoffwechselt werden kann. Es konnte nachgewiesen werden, dass isolierte Darmbakterien die Substanz Cyanophycin unter anaeroben und aeroben Bedingungen innerhalb einiger Stunden bis auf Dipeptide abbauen können.

Neben der Untersuchung der Proteinstabilität gegen Verdau durch Pepsin, wurde die Stabilität gegen Prozessierung, wie Hitzeeinwirkung untersucht. Es ist bekannt, dass die meisten Nahrungsmittelallergene durch Hitzeeinwirkung inaktiviert werden und ihre allergene Wirkung verlieren (zusammengefasst in Fiocchi *et al.* 2004). Da auch hier die Untersuchung des Proteins in seiner natürlichen Matrix von Interesse war, wurde auf die Analyse von aufgereinigtem Protein größtenteils verzichtet. Die Untersuchung der Stabilität der untersuchten Proteine gegen Hitzeeinwirkung erfolgte anhand von Pflanzenextrakten. Eine Bestimmung der Hitzestabilität von Proteinen kann nach zwei Gesichtspunkten gestaltet werden. Zum einen könnte die Temperatur interessieren, ab der das Protein denaturiert oder es kann die Denaturierung bei einer definierten

Temperatur untersucht werden. Da Lebensmittel wie Kartoffeln vor dem Verzehr Temperaturen von 100 °C (Kochen in Wasser) oder höher ausgesetzt sind, wurde hier die Temperatur von 100 °C definiert, um die Stabilität der Modellproteine in der Kartoffelextrakten zu untersuchen. Die Proben wurden nach bestimmten Zeiten bei Hitzeeinfluss sofort abgekühlt und anschließend quantitativ mittels ELISA auf die Proteine VP60, CTxB bzw. NPTII untersucht. Unter den gewählten Versuchsbedingungen waren die Proteine VP60 und NPTII bereits nach 2 Minuten nicht mehr nachzuweisen. CTxB war nach 3 Minuten noch zu 5,9 % der Ausgangskonzentration und nach 4 Minuten nicht mehr detektierbar. Diese Ergebnisse zeigen, dass wenn die Pflanzen, die die Modellproteine VP60, CTxB und NPTII exprimieren versehentlich in die Nahrungskette gelangen sollten, die Aufnahme dieser Substanzen in ihrer aktiven bzw. nativen Form minimiert ist, wenn die Kartoffeln vor dem Verzehr gekocht bzw. erhitzt werden. Weiterführende Analysen, wie Fütterungsstudien sollten durchgeführt werden, um eine herabgesetzte potenzielle Allergenität der denaturierten Proteine nachzuweisen. Für die Substanz Cyanophycin kann mit dem beschriebenen Verfahren keine Aussage zur denaturierenden Wirkung einer erhöhten Temperatur getroffen werden. Zum einen existiert kein sensitives immunologisches Nachweisverfahren und zum anderen besteht die Substanz lediglich aus einem Aspartat-Rückrest mit Arginin-Seitenketten (Simon *et al.* 1976). Bei der Hitzedenaturierung von Proteinen bzw. Peptiden bleiben die Primärstrukturen bestehen (Löffler *et al.* 2007). Es ist also davon auszugehen, dass die Wärmezufuhr keinen Einfluss auf die Struktur der Substanz Cyanophycin ausübt.

Diese Untersuchungen liefern Hinweise darüber, dass die Wahrscheinlichkeit einer allergenen Wirkung der Substanzen CTxB, VP60 und NPTII aufgrund ihrer Denaturierung herabgesetzt ist. Die Resultate dieser Versuche liefern jedoch kein Ausschlusskriterium dafür, dass die unprozessierten Modellproteine über den Darm aufgenommen werden und eine *de-novo*-Sensibilisierung auslösen könnten. Diese unbekannt Komponente kann erst durch Analysen von Seren von mit Kartoffelmateriale gefütterten Tieren auf Proteinspezifische Immunglobuline beantwortet werden. Die im Rahmen der Stabilitätsprüfung generierten Ergebnisse können für die Risikoanalyse lediglich als Anhaltspunkt im Bezug auf eine potenzielle Allergenität der untersuchten GMP gesehen werden.

#### **D 2.1.4 Tiermodelle und Nachweis allergenspezifischer Parameter**

Neben *in silico*- und *in vitro*-Verfahren der Allergenitätsprüfung transgenkodierter Proteine sind Tiermodelle wichtige Hilfsmittel zur Untersuchung des sensibilisierenden Potenzials dieser Substanzen (FAO/WHO 2001, Codex Alimentarius 2003, EFSA 2006). Anhand der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Labortierstudien sollte analysiert werden, ob die transgenen Pflanzen höhere sensibilisierende Wirkungen haben als ihre nahen isogenen Vergleichsvarianten. Auf diese Art konnten die transgenkodierte Proteine und durch die genetische Modifikation der Empfängerpflanze eventuell verursachte unbeabsichtigte Effekte auf ihr allergenes Potenzial untersucht werden. Ein unbeabsichtigter Effekt könnte beispielsweise eine durch Pleiotropie verursachte vermehrte Expression endogener Allergene sein, die das allergene Potenzial einer Pflanze stark erhöhen würde (Spök *et al.* 2005). Auf der anderen Seite besteht die Möglichkeit, dass ein transgenkodierte Protein, das ursprünglich nicht für ein Allergen kodiert, durch veränderte Expressionsbedingungen in einem anderen Organismus, zu

einem potenziellen Allergen werden kann (Presscott *et al.* 2005). Neben der Analyse der sensibilisierenden Wirkung der GMP im Vergleich mit ihren NIV sollte anhand dieser Untersuchungen eine Aussage zur Frage nach einem optimalen Tiermodell sowie allergierelevanter Parameter getroffen werden. Es existieren keine internationalen harmonisierten Richtlinien, die die Prüfung der potenziellen Allergenität von neuartigen Proteinen in Lebensmitteln an bestimmten Tiermodellen empfehlen (EFSA 2008). Kriterien, die ein Tiermodell, das zu einer Risikoanalyse des allergenen Potenzials von GMP herangezogen wird, erfüllen muss, wurden 2001 von Penninks und Knippels zusammengefasst. Unter anderem definieren sie, dass die Sensibilisierung und der wiederholte Kontakt (Challenge) der Tiere mit dem zu untersuchenden Protein bevorzugt auf oralem Wege erfolgen sollte, damit natürliche Barrieren, wie gastro-intestinale Säure-Denaturierung, enzymatischer Abbau und mukosale und epitheliale Schichten, welche schützende, reduzierende oder anderweitig die Proteinallergenität beeinflussende Eigenschaften hat, berücksichtigt werden. Knippels *et al.* (1998, 1999, 2002, 2003) haben die *Brown Norway Ratte* als geeignetes Modell für Betrachtungen der Allergenität nach oraler Applikation identifiziert und etabliert, da diese Linie auf Allergene verstärkt mit allergischen Symptomen, wie einer erhöhten Immunglobulin-E-Antwort reagiert. Bei oraler Applikation kann mitunter eine eventuelle sensibilisierende Wirkung nach unvollständigem Verdau der Proteine nicht berücksichtigt werden. Ein unvollständiger Proteinverdau nach Nahrungsaufnahme kann beispielsweise vorliegen, wenn die Milieubedingungen der Verdauungsenzyme außerhalb ihres Aktivitätsoptimums liegen (Jensen-Jarolim und Untersmayr 2006). Aus diesem Grund wurde in den vorliegenden Allergenitätsstudien neben der oralen Applikation auch eine systemische Sensibilisierung (*intra peritoneale* Applikation gelöster Substanzen) von Labortieren herangezogen. Von Dearman *et al.* (2003) wurde das Nagetiermodell *Balb/c Maus* erfolgreich etabliert, um Immunogenität und Allergenität von systemisch verabreichten Proteinen differenzieren zu können. Die *Balb/c Maus* ist eine Linie, die nach intraperitonealer Gabe von allergenen Proteinen vorwiegend mit der TH2-Typ-Immunantwort, d.h. der Bildung von IgE-Antikörpern reagiert. Wenn substanzspezifische IgE-Immunglobuline gebildet werden, kann von einer allergenisierenden Wirkung einer Substanz gesprochen werden und eine Immunogenität liegt vor, wenn gegen die applizierten Substanzen hauptsächlich IgG-Antikörper gebildet werden. Es ist bisher nicht bekannt welches dieser beiden Tiermodelle dem menschlichen Immunsystem ähnlicher ist und bevorzugt eingesetzt werden sollte. Ein Vorteil des Tiermodells *Balb/c Maus* ist, dass es kostengünstig zu halten ist und somit größere Versuchsreihen angelegt werden können. Die Grenzen eines Tiermodells zur Risikoanalyse bestimmter Substanzen sind jedoch damit gegeben, dass trotz *in vivo*-Prüfung nicht ausgeschlossen werden kann, dass Menschen auf den getesteten Stoff anders reagieren (Shanks *et al.* 2009). Variationen in der Organisation und Regulation des Genoms verschiedener Spezies könnten zu unterschiedlichen Ergebnissen zwischen Tiermodell und Zielorganismus führen (Wall und Shani 2008).

Für die allergologische Betrachtung der in dieser Arbeit analysierten Modellpflanzen wurden die genannten Tiermodelle herangezogen. Neben der oralen Sensibilisierung von *Brown Norway Ratten* in Fütterungsversuchen wurden *Balb/c Mäuse* mit Extrakten der Modellpflanzen systemisch sensibilisiert. Zur Bestimmung der Tauglichkeit der gewählten Tiermodelle für die allergologische Risikoanalyse sowie der Verfahren zur Detektion allergierelevanter Parameter wurde Ovalbumin (OVA) als Substanz mit bekannter

Allergenität eingesetzt. Es kamen verschiedene Methoden zum Nachweis des totalen und spezifischen IgE-Titers im Serum der Labortiere zur Anwendung. So wurde das ungebundene total-IgE (tlgE) im Serum der behandelten *Balb/c Mäuse* sowie der *Brown Norway Ratten* mithilfe von kommerziellen ELISA-Kits bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung liefern erste Anhaltspunkte darüber, ob eine allergische Reaktion durch die Applikation der Testsubstanz ausgelöst wurde (Johansson und Yman 1988). Die Detektion der Protein-spezifischen IgE-Titer wurden zum einen mit eigens entwickelten Nachweisverfahren auf ELISA-Basis und zum anderen mit dem zellbasierten  $\beta$ -Hexosaminidase-Assay (Hoffmann *et. al* 1997) durchgeführt. Zusätzlich wurden die Zellgebundenen spezifischen IgE-Antikörper im Vollblut der OVA-sensibilisierten *Brown Norway Ratten* im basophilen Degranulationstest nachgewiesen. Diese Methoden haben alle ihre Vor- und Nachteile, bedürfen unterschiedlicher Probenvorbereitung und liefern differente Informationen im Bezug auf die Allergenität der verabreichten Substanz. So können für die Bestimmung des tlgE und des spezifischen IgE (slgE) im ELISA sowie im  $\beta$ -Hexosaminidase-Assay die Serumproben der sensibilisierten Tiere bei -20 °C bis zur Untersuchung gelagert werden. Für die Bestimmung des auf den basophilen Zellen gebundenen slgE mittels basophilem Degranulationstest müssen die Vollblutproben der Labortiere sofort bearbeitet werden.

### **Total-IgE-Titer**

Die Applikation der Positivkontrolle OVA erfolgte bei den Mäusen in drei Konzentrationsstufen. Durch Verwendung dieser Positivkontrolle sollte analysiert werden, ob der Parameter total-IgE zur Beurteilung einer eventuell vorliegenden Allergie hinreichend aussagekräftig ist. Johansson und Yman wiesen bereits 1988 darauf hin, dass die Messung des total-Serum-IgE wichtige Informationen bei der Untersuchung von Patienten mit vermuteter Allergie liefert. Nach intraperitonealer Gabe des Allergens an die *Balb/c Mäuse* konnten im Serum signifikante Unterschiede in der total-IgE-Konzentration der OVA-behandelten Tiere zu den Tieren der Negativkontrolle (PBS-behandelt) festgestellt werden. Überraschender Weise war der Anstieg des IgE-Titers nicht abhängig von der verabreichten OVA-Konzentration. Der größte IgE-Anstieg war bei der OVA-Konzentration von 1,0 mg/ml zu verzeichnen. Jedoch überschneiden sich aufgrund der individuellen Tierabweichung die Fehlerbalken der drei gewählten Konzentrationen, sodass hier nicht signifikant unterschieden werden kann, welche OVA-Konzentration den stärksten tlgE-Anstieg ausgelöst hat. Auch die Extrakte der untersuchten Kartoffelpflanzen wurden den Mäusen in 3 Konzentrationsstufen verabreicht. Es ist kein proportionaler Trend zwischen total-IgE-Titer und verabreichten Extrakt-Konzentrationen zu erkennen. Die Schwankungen innerhalb der Gruppen sind so groß, dass die Titer sich nicht signifikant voneinander unterscheiden und nicht immer ist der Titer der Extrakt-behandelten Tiere höher als bei den Tieren der Negativkontrolle.

Im Gegensatz zur Konzentrationszunahme des total-IgEs bei den systemisch OVA-sensibilisierten *Balb/c Mäusen* im Vergleich zu den unbehandelten Tieren, konnte bei den Ratten, die das OVA oral verabreicht bekommen haben (10 % am Normalfutter), kein signifikanter Unterschied des tlgE-Titers im Vergleich zu den Tieren der Negativkontrolle (Normalfutter) festgestellt werden. Der mittlere tlgE-Titer der OVA-gefütterten Tiere ist zwar vom Tag 0 auf den Tag 42 auf einen Wert von 219 % und der Titer der

Negativkontrolle lediglich auf 127 % der Ursprungskonzentration angestiegen, jedoch sind diese Werte aufgrund der starken Schwankungen nicht signifikant voneinander verschieden. Die Differenzen zwischen den beiden Tiermodellen sind eventuell auf die unterschiedlichen Applikationsformen des OVA zurückzuführen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass das OVA bei oraler Aufnahme durch Vorgänge des Verdauung abgebaut wird und somit eine schwächere allergenisierende Wirkung zeigt. Für diese Annahme spricht, dass bei anderen Arbeitsgruppen bei Fütterungsversuchen Positivkontrollen durch systemische Applikation des zu untersuchenden Allergens gewonnen werden (Knippels *et. al* 1998, Pilegaard und Madsen 2003). Die Tiere dieser Positivkontrollen zeigen in der Regel höhere IgE-Konzentrationen als die Tiere der Fütterungsgruppen. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte für systemisch OVA-behandelte Ratten ein höherer IgE-Titer als für Ratten bestimmt werden, die das OVA oral verabreicht bekommen haben.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der tendenzielle Anstieg der tIgE-Konzentration nach Protein-Applikation auch im Tiermodell als Hinweis auf eine vorliegende Allergie vom Soforttyp dienen kann. Es reagieren jedoch nicht alle behandelten Individuen innerhalb der Gruppen gleichermaßen und die Intensität der IgE-Antwort hängt stark von der Applikationsform ab. Daraus kann geschlossen werden, dass wie bei der human-Allergie-Diagnostik, weitere Testverfahren herangezogen werden müssen, um eine endgültige Diagnose bezüglich einer vorliegenden Allergie stellen zu können.

### **Spezifisches IgE**

Neben der Untersuchung des total-IgE im Serum der systemisch und oral sensibilisierten Labortiere, wurden Analysen zur Bestimmung des Allergen-spezifischen IgE mittels ELISA als auch mit dem zellbasierenden  $\beta$ -Hexosaminidase-Assay durchgeführt. Anhand dieser Untersuchungen sollte die Fragestellung nach aussagekräftigen Informationen und Verfahren zur zweifelsfreien Diagnose einer *de-novo*-sensibilisierenden Wirkung von Substanzen im Tiermodell beleuchtet werden. Im besonderen wurde dabei die Intensität der IgE-Reaktion in Abhängigkeit von der Applikationsform des Allergens betrachtet.

Für die Ratten konnten hier anhand der ELISA-Verfahren im Gegensatz zur Bestimmung des total-IgE eindeutige Unterschiede im sIgE-Titer zwischen den OVA-behandelten und unbehandelten Tieren festgestellt werden. Auch bei den systemisch sensibilisierten *Balb/c Mäusen* wurden OVA-spezifische IgE-Titer im Serum nachgewiesen. Die spezifischen IgE-Titer der oral sensibilisierten *BN Ratten* lagen im Vergleich zu den systemisch behandelten *Balb/c Mäusen* etwas niedriger. Dies ist mit der Prozessierung des applizierten Allergens durch das Verdauungssystem der Ratten zu erklären. Bestätigt wurde diese Annahme durch Versuche bei denen *BN Ratten* systemisch (intra peritoneal), also unter Umgehung des Verdauungssystems, mit dem Allergen OVA behandelt wurden. Der spezifische anti-OVA-IgE-Titer dieser Tiere lag mit einem Wert von 4 im Bereich der sIgE-Konzentrationen der systemisch behandelten *Balb/c Mäuse*. Die systemische Sensibilisierung der Ratten kann demnach als geeignete Kontrolle neben der oralen Applikation herangezogen werden, um die Funktionalität des Analyseverfahrens zu prüfen. Diese Resultate zeigen, dass die *Brown Norway Ratte* ein geeignetes Tiermodell zur allergologischen Analyse von GMP nach oraler Sensibilisierung darstellt. Mit der ohne den Einsatz von Adjuvantien erfolgten Applikation des Proteins auf oralem Wege und der

nachfolgenden Bildung von spezifischem IgE sind wichtige durch Penninks und Knippels (2001) aufgestellte Kriterien an ein Tiermodell zur allergologischen Analyse von GMP erfüllt. Doch auch die systemische Sensibilisierung der *Balb/c Maus* hat neben Fütterungsstudien an der *BN Ratte* zur Analyse der potentiellen Allergenität von GMP seine Berechtigung. Bei der oralen Applikation des Untersuchungsmaterials am Tiermodell wird von einem intakten, funktionierenden Verdauungssystem ausgegangen. Ist das Verdauungssystem eines Individuums jedoch dahingehend beeinträchtigt, dass Proteine in intakter Form die Mukosamembran erreichen können, ist ihr Sensibilisierungspotenzial erhöht (Untersmayr und Jensen-Jarolim 2006). Beispielsweise ist bei hypoaziden Bedingungen im Magen, wie sie nach Einnahme von Magensäure-neutralisierenden Medikamenten vorliegen können, der Abbau von mit der Nahrung aufgenommenen Proteinen nicht gewährleistet (Diesner *et al.* 2009). Ich schließe daraus, dass eine systemische Applikation von Proteinen bzw. Extrakten die Aufnahme intakter, unprozessierter Substanzen nachstellt, was eine Berücksichtigung dieses Szenariums in der Risikoanalyse ermöglicht. Darüberhinaus birgt die systemische Applikation die Möglichkeit die Immunogenität (IgG-Nachweis) bestimmter Substanzen zu untersuchen. Diese könnte bei der Charakterisierung von transgenkodierten Proteinen, die in der Pharmaka-Entwicklung Anwendung finden sollen, von Wichtigkeit sein.

Der zur sIgE-Bestimmung neben den eigens entwickelten ELISA-Systemen herangezogene  $\beta$ -Hexosaminidase-Assay ist aufgrund seiner zellbasierenden Verfahrensweise weniger flexibel einsetzbar. Eine gute Funktionalität zeigte das Verfahren, wenn ein zu untersuchendes Protein (OVA und Papain) in Reinform eingesetzt wurde. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die RBL-Zellen bei Inkubation mit Pflanzenextrakt sehr empfindlich reagieren und  $\beta$ -Hexosaminidase freisetzen (siehe Abbildung C.34). Diese falsch positive Reaktivität der Zellen könnte auf Inhaltsstoffe im Pflanzenextrakt zurückzuführen sein, die in Konzentrationen außerhalb der physiologischen Bedingungen der Zellen vorliegen und die Zellen somit durch osmotische Einflüsse schädigen. Weiterhin ist auch zu berücksichtigen, dass in den Extrakten Substanzen mit zytotoxischem Potenzial, wie Solanin und weitere Alkaloidide vorhanden sind (Phillips *et al.* 1996). Auch nach Vorbehandlung eines Pflanzenextraktes mittels Membranfiltration, bei der alle Substanzen kleiner als 5 kDa abgetrennt wurden, blieb eine falsch positive Reaktion des Testsystems bestehen. Ob diese zellschädigende Wirkung bestimmten Proteinen, wie Enzymen oder anderen Substanzklassen zuzuschreiben ist, bleibt an dieser Stelle ungeklärt. Um anhand dieses Assays zu untersuchen, ob die verschiedenen in dieser Arbeit untersuchten Kartoffel-Linien unterschiedliche *de-novo*-sensibilisierende Eigenschaften im Labortier haben, müssten zur Inkubation mit den Zellen die aufgereinigten Allergene Sola t1 – t4 eingesetzt werden. Nur so könnte sichergestellt werden, dass keine anderen Substanzen aus dem Kartoffelmaterial die  $\beta$ -Hexosaminidase-Freisetzung aus den Zellen beeinflusst. Diese Allergene waren jedoch in der benötigten Reinheit nicht zu beziehen.

### **FACS-Analysen**

In diesem Teil der Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob der in der Human-Allergiediagnostik bewährte Basophilen-Degranulationstest (Bühning *et al.*, 2006; Nebe und Hartmann 1997) auch zur Allergenitätsprüfung an einem Tiermodell herangezogen

werden kann. Der mittels ELISA ermittelte spezifische IgE-Titer der systemisch OVA-sensibilisierten *BN Ratten* wurde durch FACS-Analysen nach Allergen-Stimulation basophiler Zellen aus dem Vollblut der Tiere bestätigt. Anhand dieser Versuche konnten mithilfe spezifischer fluoreszenzmarkierter Antikörper diejenigen basophilen Zellen, die nach OVA-Stimulation den Allergiemarker CD63 auf der Zelloberfläche exprimieren, detektiert werden (siehe Abbildung C.37). Im Rahmen dieser Arbeit konnten Analysen an basophilen Zellen der *Balb/c Maus* nicht erfolgreich durchgeführt werden. Eine Limitierung des Testverfahrens liegt darin, dass Spezies-spezifische Antikörper zum Nachweis der Oberflächenmarker und IgE-Antikörper eingesetzt werden müssen. Zum einen stehen fluoreszenzmarkierte Antikörper gegen Strukturen auf basophilen Zellen der Spezies Maus und Ratte kommerziell nur begrenzt zur Verfügung. Auf der anderen Seite ist aufgrund der geringen Größe der basophilen Granulozytensubpopulation an den Leukozyten eine relativ große Menge an Vollblut für eine reproduzierbare Analyse nötig. Die geringe Körpergröße und Gesamtblutmenge limitieren die zur Untersuchung einsetzbaren Blutvolumina, die bei der Ratte noch etwas größer gewählt werden können als bei der Maus. Werden die im FACS detektierten B-PE und FITC-Signale von unstimulierten Zellen und mit OVA-stimulierten Zellen in einem Plot dargestellt (siehe Abbildung C.37), ist die Verschiebung einer kleinen Zellpopulation erst ab einer sehr großen Zahl von Signalen auszumachen.

Die Positionsverschiebung der Zellpopulation im B-PE/FITC-Plot resultiert aus der verstärkten CD63-Expression auf der Zelloberfläche nach OVA-Stimulation und der damit verbundenen Zunahme der B-PE-Fluoreszenz. Idealerweise sollten die doppelt markierten (anti-CD63-B-PE und anti-IgE-FITC) unstimulierten Zellen ein im B-PE/FITC-Plot dargestelltes Streubild wie die FITC-einzel-markierten Zellen (Abbildung C.36 C) ergeben. Denn mit dem FITC-anti-IgE-Antikörper sollten lediglich die am FcεRI-Rezeptor gebundenen IgE-Moleküle markiert werden. Die B-PE-Markierung sollte bei den unstimulierten Zellen nicht vorliegen, da der Oberflächenmarker CD63 bei diesen Zellen nicht so häufig vorhanden ist (Bühring *et al.* 2006). Die relativ zahlreichen B-PE-Signale bei den unstimulierten Zellen, die sich auch bei den stimulierten Zellen finden lassen, sind demnach durch Fehlbindungen bzw. Kreuzreaktivitäten der B-PE-markierten Antikörper mit anderen Zellmolekülen zu erklären. Die Anzahl an FITC-Signalen in den Plots der stimulierten und unstimulierten Zellen ist etwa gleich groß, denn die Menge der an den FcεRI-Rezeptoren gebundenen IgE-Antikörper ist unabhängig von der Behandlung der Zellen mit dem Allergen. Die Ergebnisse der FACS-Analysen von Blutproben von systemisch mit OVA behandelten Ratten zeigen, dass der in der Human-Allergiediagnostik bewährte Basophilen-Degranulationstest auch zur Allergenitätsprüfung an einem Tiermodell herangezogen werden kann. Ein immenser Vorteil der Anpassung dieser Methodik an tierisches Untersuchungsmaterial liegt darin, dass die potenzielle Allergenität von Proteinen bestimmt werden kann, bevor sie in Kontakt mit dem Verbraucher kommen.

Für einen erfolgreichen Einsatz dieses Verfahrens in der Routineanalytik müssen noch einige Verbesserungen getroffen werden, die im Folgenden diskutiert werden. Aufgrund des geringen Anteils der basophilen Granulozytensubpopulation am Vollblut wurde eine Aufkonzentrierung der Leukozyten und eine Lyse der Erythrozyten vorgenommen. Die Genauigkeit der FACS-Analyse könnte durch Optimierung dieser beiden Parameter verbessert werden. Das Streubild der Rattenblutprobe nach Erythrozytenlyse (vgl.

Abbildung C.35) zeigt, dass sich noch viele Zellbruchstücke und tote Zellen im Probenmaterial befinden. Diese könnten sich störend auf die Messung auswirken, denn um eine ausreichende Anzahl an markierten Zellen zu detektieren, muss eine große Menge an Gesamtzellen und -partikeln gemessen werden. Die Aufreinigung bzw. Konzentrierung der Zielzellen könnte beispielsweise durch Dichtegradientenzentrifugation mit Percoll, wie sie bereits 1982 von Raghuprasad für humanes Vollblut beschrieben wurde, verbessert werden. Gibbs *et al.* (1989) beschreiben eine Drei-Schritt-Methode zur Konzentrierung von basophilen Zellen, bei der nach einer Ficoll-Gradientenzentrifugation und anschließender Gegenstrom-Zentrifugal-Abtrennung (O'Keefe *et al.* 1989) eine Separation der übrigen Zellen vorgenommen wird. Diese negative Selektion erfolgt unter Verwendung von immunomagnetischen Dynal-Beads, die gegen bestimmte Antigene gerichtet sind, die nicht auf basophilen Zellen vorkommen (CD2, CD14, CD16 und CD19). Diese beschriebenen Methoden können nicht ohne Weiteres auf Ratten- oder Mäuseblut angewendet werden, weil Blutmengen von mehreren 100 ml benötigt werden. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Zellpopulation der Granulozyten mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern gegen Strukturen, die nur diese Zelltypen tragen, markiert werden. Mithilfe des FACS-Gerätes und des entsprechenden Auswerteprogrammes könnten dann diejenigen Zellen, die das Zell-spezifische Signal tragen von den Gesamt-Zellen selektiert werden. Im Anschluss daran könnten in dieser Population die Zellen identifiziert werden, die einerseits den FcεRI tragen und andererseits nach OVA-Stimulation beispielsweise ein CD63-Signal emittieren. Auf diese Weise würden unspezifische und spezifische Kreuzreaktionen der anti-CD63-Antikörper mit anderen Zelltypen selektiert werden. Solche Bindungen können mit aktivierten Thrombozyten, Monozyten und Makrophagen auftreten, denn diese Zellen tragen ebenfalls den CD63-Oberflächenmarker (<http://www.immunodefekt.de/cd.shtml>; Stand 03-2011). Eine weitere Verbesserungsmöglichkeit der Methodik wäre die Markierung anderer Allergie-spezifischer Oberflächenmoleküle auf den basophilen Zellen. Eine Reihe von potenziellen Zielmolekülen auf basophilen Granulozyten, die mit allergischen Reaktionen in Verbindung stehen wurde bei Screeninganalysen im Rahmen einer Dissertation von Hennerdorf identifiziert. Durch vergleichende Reaktivitätsmessungen von ruhenden und aktivierten Basophilen konnten drei neue Aktivierungsmarker (CD13, CD107b und CD164) identifiziert werden (Hennerdorf 2006). Es könnte durch weiterführende Untersuchungen analysiert werden, ob sich diese Strukturen auch auf Ratten-Basophilen befinden und als Aktivierungsmarker für Sensibilisierungsstudien herangezogen werden können.

### **Tierzahl**

Nicht nur bei der Planung von Labortierstudien für Untersuchungen zur potenziellen Allergenität von GMP steht die Frage nach der einzusetzenden Tierzahl im Raum. In dieser Arbeit wurden in Anlehnung an die Medizinprodukte-Prüfnorm DIN EN ISO 10993-10, welche die Prüfkriterien für die Untersuchung auf Allergien vom verzögerten Typ (Typ IV) festlegt, Gruppen von je 10 Tieren eingesetzt. Diese Tierzahl stellt eine statistisch auswertbare Größe einer Gruppe dar. Sollte abweichend von den hier gewählten Bedingungen die Versuchsdauer derart verlängert werden, dass während der Applikationsphase mit dem Ableben der Tiere aufgrund ihres Alters zu rechnen ist, sollten die Gruppen entsprechend größer zusammengestellt werden, um bei Versuchsende eine

statistische Auswertung sicherzustellen. Um die Anzahl der für die Erreichung des wissenschaftlichen Zieles zu verwendenden Tiere auf ein Minimum zu reduzieren, sollten Überlegungen zur Ausschließung unnötiger Versuche getroffen werden (DIN EN ISO 10993-2:2006). Die Ergebnisse der Untersuchungen auf spezifisches IgE im Serum der *Balb/c Mäuse* gegen OVA oder Kartoffelproteine (Kartoffelallergene) mittels ELISA-Assay zeigen, dass die spezifischen IgE-Titer der Einzelindividuen innerhalb der Gruppen um ein Vielfaches unterschiedlich sein können (siehe Abbildung C.29 und Abbildung C.30). Außerdem ist zu erkennen, dass, mit Ausnahme für die 2. Gruppe, sich die Mittelwerte der sIgE-Titer und die Standardabweichungen der einzelnen Gruppen im gleichen Größenbereich bewegen. Das lässt darauf schließen, dass die gewählte Zahl von 10 Tieren je Gruppe eine brauchbare Größe ist.

Ein weiterer wichtiger Punkt der bei der Planung von Fütterungsstudien eine wichtige Rolle spielt, ist die Fragestellung, ob es zwingend erforderlich ist, Tiere unterschiedlichen Geschlechts in die Untersuchung mit einzubeziehen. Pilegaard und Madsen (2004) konnten nach OVA-Sensibilisierung von *BN Ratten* zeigen, dass weibliche Tiere statistisch signifikant höhere Titer an spezifischem IgE und IgG als männliche Tiere bilden und dass unter den weiblichen Tieren eine höhere Zahl an Respondern (38 - 75 %) zu finden ist als bei den männlichen Tieren (13 - 38 %). Im Hinblick auf diese Fragestellung, wurden die Vorversuche mit OVA-Sensibilisierung von *BN Ratten* sowohl an weiblichen als auch an männlichen Tieren durchgeführt. Da sich jedoch weder Unterschiede im Total-IgE-Titer noch im spezifischen anti-OVA-IgE-Titer detektieren ließen, wurden alle nachfolgenden Sensibilisierungsstudien mit *BN Ratten* aus Gründen der leichteren Haltung an weiblichen Tieren durchgeführt. Sämtliche Sensibilisierungsstudien der *Balb/c Mäuse* wurden an weiblichen als auch an männlichen Tieren durchgeführt. Jedoch konnten auch bei dieser Labortierspezies keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in der IgE-Reaktivität festgestellt werden. Weibliche Tiere der Spezies *Balb/c Maus* und *Brown Norway Ratte* tragen für gewöhnlich keine Revierkämpfe aus, bei denen Gefahr bestehen würde, dass die Tiere sich gegenseitig verletzen. Es kann demnach für die allergologische Risikoanalyse ausreichend sein, wenn für die *in vivo*-Sensibilisierungen ausschließlich weibliche Tiere eingesetzt werden.

## **D 2.2 Welche Aussagen können anhand der durchgeführten Untersuchungen für die einzelnen Modellpflanzen bzw. Modellproteine getroffen werden?**

Das Modellprotein **NPTII** war in jeder der untersuchten transgenen Pflanzen vorhanden, da es sich bei diesem Protein um den Selektionsmarker handelt. Nach Angaben der Europäischen Lebensmittelsicherheitsbehörde EFSA (2004, 2006) stellt die Nutzung des *nptII*-Gens in transgenen Pflanzen kein Sicherheitsrisiko für die menschliche Gesundheit und die Umwelt dar, da die Antibiotika Kanamycin und Neomycin, welche durch NPTII inaktiviert werden, in der Human- und Tiermedizin in nur sehr geringem Umfang eingesetzt werden. Darüber hinaus ist NPTII in der Natur ubiquitär vorhanden, da es von vielen Mikroorganismen exprimiert wird (EFSA 2004). Anhand von DNA-basierten Methoden konnten in einer Reihe von Umweltisolaten von verschiedenen Standorten in Westeuropa (Smalla *et al.* 1993) und den USA (Leff *et al.* 1993) das *nptII*-Gen nachgewiesen werden. Das Protein NPTII wurde von der EFSA im Bezug auf sein allergenes Potenzial auf Grund folgender Aspekte als unbedenklich für die Erzeugung gentechnisch veränderter Pflanzen eingestuft: 1.) In *in vitro*-Verdauungsuntersuchungen

wird es schnell abgebaut; 2.) Glycosilierungen und eventuell damit verbundene Erhöhungen der antigenen Kapazität treten nicht auf, da es die notwendige Sequenz für den Transport in die entsprechenden Zellkompartimente nicht beinhaltet (Redenbaugh *et al.* 1994); 3.) Es bestehen keine signifikanten Homologien der Aminosäuresequenz zu bekannten Allergenen; 4.) Bei humanen Genterapie-Studien wurden keine allergischen Symptome gegen NPTII festgestellt (EFSA 2009). In dieser Arbeit konnte der schnelle Abbau des Modellproteins NPTII im Pflanzenmaterial durch das Verdauungsenzym Pepsin bestätigt werden. Darüber hinaus konnte das NPTII in *in vivo*-Verdauungsstudien in Exkrementen von mit NPTII-haltigem Kartoffelmaterial gefütterten Ratten nicht nachgewiesen werden. Nach gegenwärtigem Stand von Wissenschaft und Technik kann dieses Protein als Selektionsmarker für die Entwicklung von gentechnisch veränderten Nutz-, Futter- und Nahrungspflanzen als unbedenklich eingestuft und weiterhin verwendet werden.

Die Kartoffel-exprimierten transgenen Proteine VP60 und CTxB sollen als Pharmaka, insbesondere in der Veterinärmedizin Anwendung finden (siehe A 3.2 und A 3.3). Von Castañón (1999) wurden erste subkutane Immunisierungen mit Pflanzen-exprimiertem VP60 erfolgreich durchgeführt. CTxB ist die nicht toxische Untereinheit des Cholera-toxins (CTx), dem eine außergewöhnlich starke Wirkung als oral-mukosales Immunogen und Adjuvants für viele co-applizierte Antigene zugesprochen wird (Sánchez und Holmgren 2008). Da jedoch auch die Pflanzen, die diese transgenkodierte Proteine exprimieren versehentlich in die Nahrung gelangen könnten, müssen sie auf ihr allergenes Potential untersucht werden. Darüberhinaus sollten frühzeitig Analysen zur potentiellen Allergenität des pflanzen-exprimierten Modellproteins CTxB zum Einsatz als Vaccine gegen die Krankheit Cholera durchgeführt werden. Es gilt Risiken für Patienten abzuwägen, wenn das Protein der human-Pharmaka-Produktion Anwendung finden soll.

Der Ursprungsorganismus des CTxB-Gens - das Bakterium *Vibrio cholerae* - ist recht stabil gegen den Abbau durch Proteasen und andere Komponenten des Verdauungstraktes, denn das Cholera-toxin soll erst im Darm an GM1-Rezeptoren binden (Sánchez und Holmgren 2008). Das Protein CTxB war noch nach 89 Minuten bei den gewählten Parametern des *in vitro*-Verdauversuches in den Pflanzenextrakten nachweisbar. Das reine Protein hingegen war nach 30 Sekunden nicht mehr detektierbar. Die Verdaubarkeit des Modellproteins CTxB konnte auch anhand von *in vivo*-Untersuchungen am Tiermodell nachgewiesen werden. In den Exkrementen von mit CTxB-haltigen Kartoffelmaterial gefütterten Ratten war das Protein lediglich in nicht signifikanten Mengen, die unterhalb des kleinsten im Messsystem mitgeführten Standards lagen, nachzuweisen. Untersuchungen von Rattensereren ergaben, dass nach oraler Applikation von CTxB-haltigem Futter spezifische IgE- und IgG-Antikörper gebildet wurden. Das bedeutet im Gegensatz zu den *in vitro*- und *in vivo*-Verdauversuchen, dass zumindest allergene und immunogene Strukturen des Proteins die Mukosa erreichen und vom Körper aufgenommen werden.

Für das Modellprotein CTxB wurden anhand eines Sequenzvergleiches 2 Homologien von jeweils 6 aufeinanderfolgenden Aminosäuren zu den Allergenen *Can f 3* und *Dic v a* festgestellt. Es wurden spezifische *Can f 3*-reaktive Seren aus einem Seren-Pool von Patienten mit Hundeallergie herangezogen und Untersuchungen auf Kreuzreaktivitäten

zwischen dem Allergen und dem Modellprotein durchgeführt. Von 11 der *Can f 3*-positiven Seren zeigten 8 Seren leichte positive Reaktionen mit CTxB. Dieses Resultat deutet darauf hin, dass in *Can f 3*-allergischen Individuum spezifisches IgE durch CTxB gebunden werden könnte, sofern das Epitop VLLSSA präsentiert wird. Um allerdings allergene Wirkung zu haben, muss ein Protein mehrere IgE-Epitope besitzen, um die auf Mastzellen oder basophilen Zellen rezeptorgebundenen IgE-Antikörper vernetzen zu können. Diese Vernetzung führt dann zu einer Histaminfreisetzung und der allergietypischen Entzündungsreaktion (Knol 2006, Salinas *et al.* 2008). Arbeiten von DeLinsi und Siragagnian (1979) zeigten, dass der Abstand zweier IgE-Epitope zwischen 5 und 24 nm (entspricht ca. 37 – 180 kDa ([www.geochemie.uni-bremen.de/koelling/dalton.html](http://www.geochemie.uni-bremen.de/koelling/dalton.html); Stand:02-2011)) betragen muss. Weiterhin muss die Allergenkonzentration entsprechend hoch sein, denn erst ab 100 IgE-Vernetzungen pro Zelle wird die allergiespezifische biochemische Kaskade ausgelöst. Das CTxB aus dem natürlichen Cholera-Erreger *Vibrio cholerae* und das CTxB, welches in den untersuchten Pflanzen über den sekretorischen Bildungsweg produziert wurde, liegt als Pentamer mit einem Molekulargewicht von etwa 58 kDa vor. In dieser Form und Größe könnte das Molekül theoretisch 5 IgE-Antikörper binden und vernetzen. Anhand der Analysen der Seren der sensibilisierten *Balb/c Mäuse* auf spezifisches IgE konnte bestätigt werden, dass durch systemische Applikation des Kartoffel-exprimierten CTxB die Bildung von Antikörpern der IgE-Klasse ausgelöst werden kann. Für das Screening der Seren der mit CTxB-haltigem Kartoffelmaterial sensibilisierten *Balb/c Mäuse* auf CTxB-spezifische IgE-Reaktivität mittels  $\beta$ -Hexosaminidase-Assays wurde das reine CTxB-Protein aus *Vibrio cholerae* eingesetzt. Der *in vitro* - *ex vivo*-Test basiert auf der Kreuzvernetzung der im Serum vorliegenden, an der Oberfläche von RBL-Zellen gebundenen IgE-Antikörpern durch das Allergen und der daraus resultierenden Freisetzung von  $\beta$ -Hexosaminidase aus den Zellen. Anhand des Tests konnte keine CTxB-spezifische IgE-Reaktivität und damit verbundene Freisetzung der  $\beta$ -Hexosaminidase nachgewiesen werden. Diese Resultate legen den Schluss nahe, dass die Substanz CTxB zwar sensibilisierend wirken und im Organismus die Bildung von IgE-Immunglobulinen auszulösen vermag, jedoch bei wiederholtem Kontakt die auf Mastzellen bzw. basophilen Zellen gebundenen spezifischen IgE-Antikörper nicht kreuzvernetzen kann. Die Substanz CTxB führt also nicht zu einer Degranulation dieser Zellen und somit nicht zur Ausschüttung von Histamin und weiteren allergiespezifischen Symptomen verursachenden Stoffen.

Für das Protein **VP60** wurden beim *in silico*-Vergleich der primären Aminosäuresequenz des Proteins mit bekannten Allergenen keine Homologien identifiziert. Demzufolge wurden keine spezifischen Screenings auf IgE-Kreuzreaktivität mit humanen Allergikerseren durchgeführt. Bei der Stabilitätsuntersuchung im *in vitro*-Assay war das Protein in den untersuchten Pflanzenextrakten durch das Verdauungsenzym Pepsin nach 8 Minuten nicht mehr nachzuweisen. Hingegen wurde das gereinigte RHDV unter den gewählten Bedingungen in weniger als 30 Sekunden vollständig abgebaut. Die Untersuchung der Kot- und Urinproben der mit VP60-haltigem Kartoffelmaterial gefütterten Ratten ergab, dass das Protein nicht in signifikanten Mengen zu bestimmen war. Die detektierten Konzentrationen in den Urinproben der Tiere sind auf störende Einflüsse der Matrix des Probenmaterials zurückzuführen, denn auch in den Proben der Tiere, die lediglich mit Material der Line *D-NIV* gefüttert wurden, war der Nachweis von

VP60 positiv. Bei der Untersuchung der Seren der oral bzw. systemisch sensibilisierten Tiere auf spezifisches IgE und IgG gegen das Modellprotein VP60 konnten keine positiven Reaktivitäten detektiert werden. Die Resultate der vorliegenden Arbeit lieferten keinen Anhaltspunkt dafür, dass das untersuchte Protein VP60 ein allergenes Potenzial trägt. Von den untersuchten VP60-exprimierenden GVP geht bezüglich des transgenkodierte Proteins VP60 kein allergisches Risiko aus.

In den beiden Pflanzen *A-35S-PsbY-12* und *-23* wird das Protein Cyanophycin-Synthetase exprimiert. Die durch dieses Enzym nicht ribosomal gebildete Substanz **Cyanophycin** soll als biologisch abbaubarer Polymer-Rohstoff Anwendung finden. Diese Substanz besteht aus einem Aspartat-Rückgrat mit Arginin-Seitenketten und ist hauptsächlich bei sauren (<2) und basischen (>9) pH-Werten löslich. *In vitro*-Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit ergaben, dass Cyanophycin auch stabil gegen das Verdauungsenzym Pepsin ist. Diese Tatsache ist dadurch zu erklären, dass die Substanz Cyanophycin keine der bevorzugten Spaltstellen der Endopeptidase Pepsin trägt (<http://www.uniprot.org/uniprot/P00791>; Stand: 04/11). In Exkrementen von Ratten nach Fütterung mit Cyanophycin-haltigem Kartoffelmaterial konnte die Substanz nach saurer Extraktion nicht nachgewiesen werden. Dieses Resultat ist eventuell darauf zurückzuführen, dass die Darmflora der Tiere die Substanz abzubauen vermag. Untersuchungen von Sallam und Steinbüchel (2008) zeigten, dass Cyanophycin durch Mikroorganismen unter aeroben und anaeroben Bedingungen abgebaut werden kann. Der Abbau erfolgt erst im Darm, wo der pH-Wert im neutralen Bereich liegt, sodass die Substanz im ungelösten Zustand vorliegt. Aufgrund der Stabilität gegen das Verdauungsenzym Pepsin besteht die Möglichkeit, dass Cyanophycin die Mukosamembran im Darm unprozessiert erreicht. Solche Substanzen haben ein erhöhtes Potenzial allergen zu wirken (Metcalf *et al.* 1996). Bei Untersuchungen der Seren der systemisch sensibilisierten Mäuse und der oral gefütterten Ratten konnte allerdings kein Cyanophycin-spezifisches IgE, welches ein eindeutiger Nachweis einer vorliegenden allergischen Sensibilisierung wäre, nachgewiesen werden. In beiden Tiermodellen konnten jedoch spezifische IgG-Titer detektiert werden. Diese Ergebnisse sprechen für eine durch die Substanz Cyanophycin erfolgte Immunisierung, jedoch nicht für eine Allergenisierung (Dearman *et al.* 2003).

Zusammenfassend kann geschlossen werden, dass von den transgenkodierte Proteinen NPTII, VP60, CTxB und der nicht ribosomal gebildete Substanz Cyanophycin nach heutigem Stand von Wissenschaft und Technik kein allergenes Risiko ausgeht.

### **Einfluss der Transgen-Integration auf die endogenen Allergene**

Um einen Einfluss der Integration der Fremdgene in das Genom der Empfängerpflanzen auf die endogenen Allergene zu untersuchen, wurden Analysen zur IgE-Reaktivität mit Kartoffelproteinen unter Verwendung von Seren von Patienten mit Kartoffelallergie durchgeführt. Veränderungen in der IgE-Reaktivität der Allergikerseren konnten jedoch nur für Material der Pflanzen *A-CTxB-SEK-204* (2/10 Humanseren) und der Cyanophycin-exprimierenden Pflanzen (1/10 Humanseren) im Vergleich mit Material der nahen isogenen Pflanzen detektiert werden. Ob diese Reaktivitätsveränderungen auf den Transgen-Integrationsort im Genom der Pflanze oder auf somaklonale Variationen, wie

sie bei *in vitro*-Kultivierung von Pflanzenzellen auftreten können ([www.biosicherheit.de](http://www.biosicherheit.de); Lexikoneintrag „somaklonale Variation“; Stand: 07-2011) zurückzuführen sind, bleibt an dieser Stelle ungeklärt. Darüber hinaus ist fraglich, ob eine Erhöhung der IgE-Reaktivität bei den Patientenseren aussagekräftig genug ist. Da Patientenseren mit definierter Reaktivität stets schwierig zu beziehen sind und die Anzahl somit beschränkt ist, liefern die generierten Ergebnisse dieser Methode lediglich Indizien auf eine eventuelle Erhöhung der Reaktivität endogener Allergene durch die *in vitro*-Kultivierung bzw. Transgenintegration.

Verglichen wurden diese Ergebnisse mit der Analyse auf Kartoffel-spezifische IgE-Antikörper im Serum der Labortiere, die mit Extrakten der Kartoffelmaterialien sensibilisiert worden sind. Eventuelle Veränderungen der Reaktivitäten der endogenen Allergene sollten sich im IgE-Titer der Seren widerspiegeln. Die relativen Kartoffel-spezifischen IgE-Serum-Titer der *Balb/c Mäuse*, die mit Extrakten der Pflanzen *A-NIV* und *A-CTxB-SEK-218* behandelt wurden, liegen etwa im gleichen Bereich. Der mittlere relative IgE-Titer der Tiere, die mit Material der Pflanze *A-CTxB-SEK-204* behandelt wurden ist fast doppelt so hoch (22,1). Es ist jedoch zu beachten, dass die Fehlerindikatoren der Ergebnisse der Labortierstudie sich stark überlappen, sodass man hier nicht von signifikanten Unterschieden sprechen kann. Demnach bewegen sich die Differenzen in der IgE-Reaktivität der beiden CTxB-exprimierenden und den beiden Kontrolllinien *A-35S-205* und *A-NIV* in einem vernachlässigbaren Rahmen.

Die Ergebnisse der IgE-Titer-Bestimmung aus den Seren der Tiere, die mit Extrakten der Pflanzen *D-VP60-SEK-6* und *D-VP60-SEK-17* sowie der Vergleichspflanzen *D-NIV* und *D-23S-205* sensibilisiert wurden, zeigen, dass die transgenen VP60-exprimierenden Linien stärkere IgE-Reaktionen ausgelöst haben als die nahisogene Pflanze. Der durch das Vergleichsmaterial der Pflanzen, welche nur das Protein NPTII zusätzlich exprimieren, resultierende mittlere Titer liegt etwas niedriger, aber im gleichen Bereich wie die Titer der Tiere, die mit VP60-haltigem Pflanzenmaterial behandelt wurden. Da diese Unterschiede jedoch bei dem Screening mit humanen Kartoffel-Allergikerseren nicht nachgewiesen wurden, deuten die Ergebnisse auf Unregelmäßigkeiten im ELISA-Messsystem mit den Labortierseren hin.

Anhand des Nachweises spezifischen IgEs gegen Kartoffelproteine im Serum der mit Material der Cyanophycin-exprimierenden Kartoffeln sensibilisierten *Balb/c Mäuse* konnten die Ergebnisse der *in vitro*-Tests mit Humanseren teilweise bestätigt werden. In den Seren der Tiere die mit Extrakten der Pflanze *A-PsbY-Cyel-23* behandelt wurden, lag der IgE-Titer im gleichen Bereich wie bei den Tieren, die mit Extrakten der Linien *A-NIV* und *A-35S-205* behandelt wurden. Hingegen lag der Serum-IgE-Titer der Tiere, die mit Material der Pflanze *A-PsbY-cyel-12* behandelt wurden, weit unter dem Titer der NIV-behandelten Mäuse. Diese Differenz war bei dem Screening mit den humanen Seren jedoch nicht so stark ausgeprägt, was auf eine unzureichende Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der beiden Methoden hinweist. Eine Verbesserung des Verfahrens zur Untersuchung der IgE-Reaktivität könnte durch Standardisierung der humanen Seren erreicht werden. Ob durch die gentechnische Veränderung der Pflanzen die Reaktivität der endogenen Allergene beeinflusst wird bleibt weitestgehend unbeantwortet. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass anhand von Screenings mit Seren von Kartoffelallergikern bzw. sensibilisierten Labortieren eventuell nachgewiesene Differenzen in der IgE-Reaktivität auf somaklonale Variation, wie sie bei der *in vitro*-Kultivierung von

Kartoffeln auftritt, zurückzuführen ist. Die Variabilität der Expression der endogenen Allergene in nicht-transgenen Pflanzen kann mitunter größer sein als der Unterschied zwischen einer transgenen Pflanze und ihrer konventionellen Vergleichspflanze (EFSA 2009). Diese Tatsache macht es notwendig, dass für derartige Untersuchungen des Einflusses eines Transgens auf Reaktivität und Quantität der endogenen Allergene, mehrere konventionelle Sorten analysiert und die Grenzwerte der natürlichen Variabilität definiert werden. Es existieren analytische Methoden, die eine vergleichende und relative Quantifizierung der relevanten bekannten endogenen Allergene erlauben (EFSA 2009). Diese Methoden könnten, auch wenn sie noch nicht komplett validiert sind, zur Bewertung der in dieser Arbeit zur Anwendung gekommenen Verfahren herangezogen werden.

### D 2.3 Modellsystem - Entscheidungsbaum

Ziel der Entwicklung eines Modellsystems zur allergologischen Risikobetrachtung einer GMP sollte sein, dass es standardisierte und kostengünstige Verfahren beinhaltet, anhand derer schnell und zuverlässig Aussagen über potenzielle Gefahren bezüglich der Allergenität getroffen werden können. In der Abbildung D.1 ist ein auf den Ergebnissen und den Recherchen zu dieser Arbeit basierender Entscheidungsbaum zur allergologischen Risikoanalyse einer GMP dargestellt. Das Schema stellt verschiedene Untersuchungsmethoden der Allergenitätsprüfung, die in zwei aufeinander aufbauenden Stufen untergliedert sind, dar. In der ersten Stufe sind alle *in vitro*- und *in silico*-Untersuchungen für eine erste Entscheidungsfindung in der allergologischen Risikoanalyse von GMP zentriert. Die Verfahren der 2. Stufe beinhalten *in vivo*-Untersuchungen, mit denen die sensibilisierende Wirkung der GMP im Vergleich zu ihrer nahen isogenen Variante an Labortieren analysierbar ist. Liefern die Analysen der ersten Stufe negative Resultate, liegt ein geringes allergenes Potenzial vor und der Umfang der *in vivo*-Studien in der zweiten Stufe kann verringert werden.

Ein wichtiger Unterschied des hier dargestellten Entscheidungsbaumes zu bestehenden Systemen besteht darin, dass positive Ergebnisse der *in vitro*- und *in silico*-Methoden nicht zwangsläufig ein Abbruchkriterium in der Risikoanalyse darstellen, sondern weitere Verfahren zur Analyse des allergenen Potenzials nach sich ziehen. In den Entscheidungsbäumen zur Bewertung der potenziellen Allergenität transgener Pflanzen der IFBC/ILSI von 1996 und der FAO/WHO von 2001 werden ausschließlich die transgen exprimierten Proteine berücksichtigt. Bei einer Betrachtung der transgenkodierte Proteine muss berücksichtigt werden, dass Proteine, die gegebenenfalls keine allergenen Eigenschaften haben, durch veränderte Expressionsbedingungen ein allergenes Potenzial entwickeln können. Beispielsweise können transgenkodierte Proteine, exprimiert in anderen Organismen, eine starke Allergenität entwickeln, wenn sie durch die veränderten Expressionsbedingungen die Mukosa des Konsumenten erreichen und unprozessiert resorbiert werden können (Spök *et al.* 2005). Unterschiede bei der Translation und posttranslationalen Modifikationen zwischen verschiedenen Spezies können zu Veränderungen im molekularen Aufbau des exprimierten Proteins und damit auch in seiner Funktion und Antigenität führen. Deutlich gezeigt wurde diese Tatsache bei der transgenen Expression eines pflanzlichen Proteins ( $\alpha$ -Amylase Inhibitor-1) aus der Bohne (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Tendergreen) in Erbse (*Pisum sativum* L.), die zur Synthese einer strukturell modifizierten Form des Inhibitors führte. Die orale Aufnahme des

transgenkodierten Proteins führte im Maus-Modell zu einer Th2-Typ-Entzündung der Lunge (Prescott *et al.* 2005).

Ein entscheidender Unterschied des hier beschriebenen Analyseschemas zu den genannten existierenden Modellen besteht darin, dass neben der Analyse der Allergenität eines einzelnen bzw. mehrerer transgen exprimierter Proteine, auch einen ganzheitlichen Einfluss der Integration der Fremd-DNA auf das allergene Potenzial der Pflanze berücksichtigt. Bei der Entscheidungsfindung in der allergologischen Risikoanalyse von GMP berücksichtigt eine ausschließliche Untersuchung der transgenen Proteine nicht, dass durch die Integration neuer genetischer Information einzelne Stoffwechselwege der Pflanze beeinflusst sein können (EFSA 2011). Durch die genetische Modifikation könnte die Expression von Substanzen, wie endogener Allergene beispielsweise durch pleiotrope Effekte verstärkt werden. Es wird berichtet, dass bei der Produktion von gentechnisch modifizierten Pflanzen etwa ein Drittel aller Pflanzen pleiotrope Effekte aufweisen, die nicht in Verbindung mit dem Transgen oder dem transgenkodierten Protein stehen (Lips 1998). Auch wenn diese Pflanzen bei der Entwicklung der transgenen Linien weitgehend aussortiert werden, könnten Effekte auftreten, die nicht identifiziert wurden und sich eventuell erst durch veränderte Wachstumsbedingungen und Umwelteinflüsse ausprägen. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass bei anderen Pflanzenzüchtmethoden mit Gewebekulturen derartige Effekte ebenfalls auftreten. Dort werden diese oftmals für praktische Züchtungen genutzt und sogar durch künstliche Mutationsauslösung (z.B. UV- oder radioaktive Strahlung) weiter gesteigert (Käppeli und Schulte 1998).

Im Rahmen der Untersuchungen zur substanziellen Äquivalenz, also der vergleichenden Inhaltsstoffanalyse von GMP und NIV-Material, sollten spezifische Nachweissysteme zur Detektion von endogenen Allergenen eingesetzt werden. Weitere Punkte die für den Einsatz von komplettem Pflanzenmaterial für die allergologische Risikoanalyse von GMP, besonders in Verdauungs- und Fütterungsstudien sprechen, sind, dass neben dem transgenkodierten Protein weitere Substanzen aus der Pflanze vorliegen, die eventuell einen gewissen protektiven Einfluss haben. Eigene Untersuchungen haben gezeigt, dass Stabilitätsprüfungen der Modellproteine stark abweichende Resultate liefern, wenn die Proteine in Reinform oder komplettes Pflanzenmaterial eingesetzt wird. In Reinform wird das untersuchte Protein durch das Verdauungsenzym Pepsin schneller abgebaut, als wenn noch weitere Pflanzenbestandteile vorliegen. Würde das Protein also in Fütterungsstudien in aufgereinigter Form oder dem standardisierten Tierfutter beigemischt eingesetzt werden, lägen veränderte Bedingungen vor.

Die im Nachfolgenden dargestellte Risikoanalyse der potenziellen Allergenität einer GMP sieht aus den genannten Gründen eine parallele Untersuchung des transgenkodierten Proteins und der gesamten Pflanze bzw. Pflanzenteilen im Vergleich mit einer bzw. mehreren nahen isogenen Varianten (NIV) vor. Die Analyse des transgenkodierten Proteins startet mit einem Datenbank-basierenden *in silico*-Sequenzvergleich. Diese Untersuchung dient dem Nachweis von Homologien zu bekannten Allergenen und der Detektion möglicher IgE-Bindungs epitope in den neu exprimierten Proteinen. Parallel dazu werden Studien zu physiko-chemischen Eigenschaften, wie Stabilität gegen Verdau und Prozessierung durchgeführt. Diese Analyse basiert auf der Annahme, dass Proteine, die den Transport durch den Magen-Darm-Trakt in einer intakten Konformation überstehen, über den oralen Weg sensibilisierend wirken können (Astwood *et al.* 1996). Werden anhand des Sequenzvergleiches Ähnlichkeiten zu bekannten Allergenen

nachgewiesen, wird hier im Gegensatz zum FAO/WHO-Entscheidungsbaum ein spezifisches Serenscreening durchgeführt. Ein positives Ergebnis des Sequenzvergleiches führt nach FAO/WHO-Entscheidungskriterien zur Einstufung des transgenen Proteins als Substanz mit wahrscheinlicher Allergenität, ohne dass weitere Untersuchungen vorgenommen werden. Beim spezifischen Serumscreening wird lediglich die IgE-Bindungsfähigkeit bestimmt, die Anzahl der Bindungsepitope wird jedoch nicht ermittelt. Weil ein Protein jedoch erst eine allergische Reaktion auslösen kann, wenn es mindestens zwei IgE-Epitope trägt, sind im vorliegenden Entscheidungsbaum bei nachgewiesener IgE-Reaktivität des transgenkodierten Proteins mit Patientenserum (spezifisches Serumscreening), weitere Analysen, wie eine *in vivo*-Untersuchung auf sensibilisierende Wirkung im Tiermodell angedacht. Nur so kann untersucht werden, ob durch das Protein zwei IgE-Immunglobuline auf der Oberfläche von Mastzellen oder basophilen Zellen vernetzt werden (Bühning *et al.* 2006). Negative Resultate des spezifischen Serumscreenings führen im vorliegenden Entscheidungsbaum nicht zwangsläufig zu aufwendigen und kostenintensiven Tierversuchen. Anhand einer Reihe von negativen Resultaten in der 1. Stufe des Entscheidungsbaumes, könnte die GMP bereits als Pflanze mit geringer Wahrscheinlichkeit allergene Reaktionen auszulösen klassifiziert werden. *In vivo*-Studien zum sensibilisierenden Potenzial von Pflanzenextrakten sollten in einem geringeren Umfang dennoch durchgeführt werden, da Substanzen, wenn sie in einem Fremdorganismus unter veränderten Bedingungen exprimiert werden, allergene Strukturen entwickeln könnten (Prescott *et al.* 2005, Spök *et al.* 2005). Diese Strukturen, wie beispielsweise veränderte Glykosylierungsmuster, können *de novo*-Sensibilisierungen auslösen (Gomord *et al.* 2010). Prescott *et al.* (2005) zeigten, dass bei der transgenen Expression eines pflanzlichen Proteins aus der Bohne in Erbse, die Struktur des Proteins modifiziert war, was nach Aufnahme im Tiermodell zu allergischen Reaktionen führte.

Die zur Analyse des transgenkodierten Proteins parallel begonnene Untersuchung des allergenen Potenzials der gesamten Pflanze im Vergleich mit nahen isogenen Varianten, startet mit der Recherche, ob die Quelle des Transgens oder die Empfängerpflanze ein Organismus mit bekannter Allergenität ist. Sofern Seren von Patienten mit IgE-vermittelter Allergie gegen die Transgenquelle verfügbar sind, sind damit *in vitro*-Untersuchungen auf IgE-Kreuzreaktivität mit dem GMP-Material angedacht. Mit dieser Methode lässt sich untersuchen, ob eventuell allergene Strukturen aus dem Ursprungsorganismus auf die Empfängerpflanze übertragen worden sind. Das Potenzial des Transfers eines Allergens von einem Spenderorganismus auf einen Empfänger wurde 1996 im Fall transgenen Sojas gezeigt. Das Gen für ein 2S-Albumin aus der Paranuss wurde transferiert, um den Methioningehalt für Tierfutter zu erhöhen. Eine vom Hersteller (Pioneer Hi-Bred International) gesponserte Studie ergab, dass Seren von Paranuss-allergischen Patienten mit Extrakten der transgenen Pflanze reagierten. Anhand dieses Versuches konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei dem transgenkodierten Protein um das Allergen *Ber e 1* aus der Paranuss handelte (Nordlee *et al.* 1996).

Ist für den Transgen-Rezipienten eine allergene Wirkung bekannt, werden für die Untersuchung des Pflanzenmaterials mit Patientenserum mit bestätigter Allergie gegen die Empfängerpflanze positive Resultate erwartet. Es kann analysiert werden, ob sich die IgE-Reaktivitäten der endogenen Allergene zwischen Pflanzenmaterial der GMP und der NIV unterscheiden. Ziel dieses *in vitro*-Verfahrens soll sein, zu untersuchen ob durch die

Transgenintegration die Reaktivität der endogenen Allergene erhöht wurde und die GMP somit potenziell bei Konsumenten verstärkte allergische Reaktionen auslösen kann. Wenn die IgE-Reaktivität des GMP-Materials stärker als die IgE-Reaktivität des NIV-Materials ist, sollte auch hier in einem nächsten Schritt vergleichend die sensibilisierende Wirkung der Pflanzenextrakte im Tiermodell untersucht werden. Wenn sich die Reaktivität der GMP auf dem gleichen Niveau der NIV befindet, kann davon ausgegangen werden, dass die GMP kein erhöhtes allergenes Potenzial birgt. Die IgE-Reaktivität der GMP kann im Vergleich zur NIV aber auch schwächer ausfallen. Solche Fälle können zielgerichtet aber auch ungewollt passieren. Beispielsweise können Gene, die für Allergene kodieren gezielt durch Genesilencing stillgelegt werden. Als Folge wird die Expressionsstärke des Zielgens stark bis komplett herabgesetzt und die IgE-Reaktivität wird minimiert (Morandini 2010). In diesem Fall sind die vergleichenden *in vitro*-Untersuchungen zur IgE-Reaktivität mit Seren von Patienten mit Allergie gegen die Empfängerpflanze und gegebenenfalls vergleichende Quantifizierungen der endogenen Allergene für eine Risikoanalyse ausreichend. Da keine zusätzlichen transgenkodierten Proteine exprimiert werden, bräuchten hier keine aufwendigen Fütterungsstudien durchgeführt werden. Um relative Rückschlüsse auf die Reaktivität der endogenen Allergene in den unterschiedlichen Kartoffel-Pflanzen ziehen zu können, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Extrakte der transgenen und der nahen isogenen Kartoffeln *Balb/c Mäusen* appliziert und im Anschluss vergleichend die Reaktivität der Mäuseseren mit Kartoffelproteinen getestet (siehe Abbildung C.30). Vergleichende *in vitro*-Versuche unter Verwendung humaner Seren von Kartoffelallergikern haben gezeigt, dass anhand dieser Verfahrensweise eine relative Aussage zur Allergenreaktivität im Probenextrakt getroffen werden kann (siehe C 2.3.2). Es konnte gezeigt werden, dass der relative sIgE-Titer gegen Kartoffelproteine der *Balb/c Mäuse*, die mit den zehn Varianten der Kartoffel-Extrakte behandelt wurden, unterschiedlich stark sind (Abbildung C.30). Die spezifischen anti-Kartoffelprotein-IgE-Titer der Tiere schwanken von  $1,1 \pm 1,36$  (*D-NIV*) bis  $29,2 \pm 21,5$  (*A-CTxB-204*). Allerdings sind die Schwankungen der IgE-Reaktivitäten in den einzelnen Gruppen so groß, dass die Unterschiede zwischen den Kartoffel-Varianten nicht immer signifikant sind. Da die TSP-Gehalte der Kartoffelextrakte vor der Applikation an die Labortiere auf die gleichen Konzentrationen gebracht wurden, könnten die unterschiedlichen IgE-Titer auf schwankende Reaktivitäten bzw. Konzentrationen der endogenen Allergene zurückzuführen sein.

Wenn weder dem Spenderorganismus noch der Empfängerpflanze ein bekanntes allergenes Potenzial zugeschrieben wird, können somit keine spezifischen Allergikerseren für *in vitro*-Untersuchungen zur Analyse einer IgE-Kreuzreaktivität herangezogen werden. In diesem Fall könnten *in vitro*-Analysen anhand von Multiallergikern, wie sie im FAO/WHO-Entscheidungsbaum (FAO/WHO 2001) genannt werden, eine Alternative sein. Es besteht die Möglichkeit, dass anhand von Multiallergikerseren Proteine als Allergene identifiziert werden könnten, deren allergenes Potenzial noch nicht bekannt war. Weiterhin ließe sich mit dieser Analyse die theoretische Möglichkeit, dass Proteine, die in anderen Organismen bzw. Geweben exprimiert werden, durch die veränderten Expressionsbedingungen allergene Eigenschaften annehmen können, untersuchen.

Die Resultate der *in vitro*-Versuche mit den Patientenseren sind ausschlaggebend für den Umfang der im nächsten Schritt durchzuführenden vergleichenden Untersuchungen der sensibilisierenden Wirkung von Pflanzenextrakten der GMP und der NIV in Labortieren.

Werden bei den *in vitro*-Versuchen keine IgE-Reaktivitäten nachgewiesen, ist die Wahrscheinlichkeit, dass die GMP gegenüber der NIV eine erhöhte potenzielle Allergenität hat, als gering zu betrachten und es können weniger Tiere für die Sensibilisierungsstudien herangezogen werden. Sind jedoch bei den vergleichenden *in vitro*-Versuchen positive bzw. erhöhte IgE-Reaktivitäten nachgewiesen worden, ist das allergene Potenzial der GMP gegenüber ihrer NIV erhöht und die Zahl der zur Sensibilisierung heranzuziehenden Labortiere sollte größer gewählt werden.

Für eine vergleichende Untersuchung der sensibilisierenden Wirkung von Pflanzenextrakten der GMP und der NIV im Labortier stehen verschiedene gut untersuchte Spezies zur Verfügung. Für die Analyse des allergensierenden Potenzials des GMP-Materials über den oralen Applikationsweg können beispielsweise Fütterungsstudien mit *Brown Norway Ratten* (Knippels *et al.* 1999, 2003) durchgeführt werden. Es kann lyophilisiertes Pflanzenmaterial zu bestimmten Konzentrationen dem Normalfutter der Labortiere beigemischt werden und an die Tiere verfüttert werden, um die sensibilisierende Wirkung der GMP im Vergleich zur NIV über die Aufnahme mit der Nahrung zu analysieren. Dabei muss beachtet werden, dass der Anteil des Pflanzenmaterials am Futter gerade so groß ist, dass Mangeldiäten vermieden werden, die zu falschen Ergebnissen führen könnten. Die Menge an Pflanzenmaterial im Futter sollte jedoch auch einen gewissen Prozentsatz nicht unterschreiten, damit die Wirkung realistischer Aufnahmemengen untersucht werden kann. Weiterhin sollte Beachtung finden, dass bei suboptimalen Bedingungen der Verdauung, die mit der Nahrung aufgenommenen Proteine unprozessiert die Mukosamembran im Darm erreichen und passieren können. Auch GMP die zur Produktion von Pharmaka, Biologika oder nachwachsenden Rohstoffen erzeugt werden, sollten unter diesem Gesichtspunkt untersucht werden, denn auch diese Pflanzen könnten versehentlich in die Nahrung gelangen. Transgenkodierte Proteine, die zur Impfstoff-Produktion entwickelt worden, sollten auf ihr allergenisierendes Potenzial auch nach systemischer Applikation untersucht werden. Eine Option, mit der auch das „worst case scenario“ untersucht werden kann, bei dem Proteine unverdaut und unprozessiert vom Körper aufgenommen und von Zellen des Immunsystems als potenzielle Allergene erkannt werden, ist mit der systemischen Applikation am Labortiermodell Maus gegeben. Eine gut untersuchte und auch für diese Arbeit herangezogene Linie ist die *Balb/c Maus* (Dearman *et al.* 2003). Mit diesem Tiermodell lässt sich untersuchen, ob sich durch Pflanzenextrakte der GMP und der NIV allergiespezifische Symptome bzw. Reaktionen hervorrufen lassen. Als allergiespezifische Merkmale können unter anderem der Total-IgE-Titer (tIgE) im Serum der Tiere, der spezifische IgE-Titer (sIgE) gegen endogene Allergene oder das transgenkodierte Protein herangezogen werden. Lassen sich durch die Applikation des Pflanzenmaterials am Tiermodell keine allergischen Symptome induzieren, kann die GMP als Pflanze ohne allergenes Risiko eingestuft werden. Werden durch die Applikation am Tiermodell jedoch allergische Reaktionen gegen das transgenkodierte Protein induziert, wird die GMP als Pflanze mit potenziellem allergenem Risiko eingestuft. Werden im Tiermodell nach Applikation der GMP gegenüber den NIV-behandelten Tieren signifikant erhöhte allergiespezifische Symptome ausgelöst, sollte die GMP als Pflanze mit potenziellem allergenem Risiko eingestuft werden.



## E Ausblick

### E 1 Durch welche Verfahren könnte das Modellsystem ergänzt werden?

Die *in silico*-Sequenzanalyse der transgenen Proteine mit bekannten Allergenen anhand von Datenbanken, berücksichtigt lediglich die Primärstruktur der Aminosäuresequenz (Zusammenfassung der linearen IgE-Bindungsepitope der häufigsten Allergene in: Bannon und Ogawa, 2006). Diskontinuierliche IgE-Epitope, die aus der Faltung bzw. der 3D-Struktur des Proteins resultieren, werden nicht berücksichtigt. Um mit einem *in silico*-Verfahren aussagekräftigere Ergebnisse zu erhalten, sollten Methoden mit denen sich T-Zell und B-Zell-Epitope zur Identifizierung immunogener Regionen auf allergenen Proteinen vorhersagen lassen, in eine Risikoanalyse miteinbezogen werden. In Allergendatenbanken sind Daten über IgE-Epitope erfasst, jedoch ist die Qualität der Daten aufgrund unterschiedlicher Identifizierungsmethoden sehr schwankend (Thomas *et al.* 2007). Die meisten der dokumentierten IgE-Epitope basieren auf der Primärstruktur der Allergene. Es ist bislang wenig Information verfügbar über Konformationsepitope. Alle neu gewonnenen Erkenntnisse über T- und B-Zell-Epitope und das Bindungsverhalten von IgE-Antikörpern an Proteine sollten in Epitop-Datenbanken einfließen und könnten der allergologischen *in silico*-Analyse von GMP beitragen.

Ein weiterer Schwachpunkt im Analysesystem ist die Verfügbarkeit und die Qualität geeigneter Patientenserum für die Untersuchung der IgE-Kreuzreaktivitäten zwischen dem transgenen Protein und strukturell ähnlichen Allergenen bzw. Seren mit Reaktivitäten gegen Substanzen der Transgenquelle oder der Empfängerpflanze. Seren von Allergikern sind oftmals nicht ausreichend genau charakterisiert. Allergenquellen tragen häufig mehrere allergene Strukturen (z.B. Kartoffel: *Sola t 1 - Sola t 4*). Diagnosen werden aber in den meisten Fällen unter Verwendung von Extrakten der Allergenquelle (z.B. Kartoffelextrakt) gestellt und weiterführende Charakterisierungen werden nicht durchgeführt. So müssen Serenpools zur Verwendung in der Untersuchung auf IgE-Kreuzreaktionen zwischen dem transgenen Protein und dem identifizierten Allergen vorab selektiert werden. Weiterhin könnte sich die Anzahl der zur Verfügung stehenden Seren und deren Reaktivität als limitierend erweisen. Serenbanken werden nicht zentralisiert, sondern von jeder Institution einzeln geführt. Gut charakterisierte Seren sind demnach nur mit immensem Rechercheaufwand zu finden. Aus naheliegenden Gründen sind Patientenserum auch nur in begrenzten Mengen erhältlich. Diese Kriterien sprechen für die Notwendigkeit der Etablierung einer internationalen Serenbank, auf die für Risikoanalysen von transgenen Proteinen zugegriffen werden kann (Thomas *et al.* 2007). Im Rahmen des Projektes EuroPrevall, an welchem 67 Mitgliedsorganisationen in 24 Ländern mitwirkten, wurde eine Serenbank erstellt ([www.euoprevall.org](http://www.euoprevall.org); Vieths und Hoffmann-Sommergruber 2008).

Eine genaue Kenntnis der kontinuierlichen und der diskontinuierlichen IgE-Epitope in bekannten Allergenen könnte nicht nur der bereits angesprochenen genaueren Vorhersage eines potenziellen Sensibilisierungsverhaltens neuer Proteine, sondern weiterhin auch der Entwicklung einer Masterzellbank zur Produktion monoklonaler IgE-Antikörper nützlich sein. Über die Anwendung des Phagen-Display konnten Braren *et al.* (2007) beispielsweise spezifische humane IgE und IgG-Antikörper gegen drei Allergene identifizieren und anschließend produzieren. Die monoklonalen Antikörper könnten zusätzlich zu den Screenings an Seren von allergischen Patienten herangezogen werden

und einer Standardisierung der *in vitro*-Allergiediagnostik dienen. Vorteile die für eine Nutzung rekombinanter spezifischer IgE-Antikörper in der humanen Allergiediagnostik sprechen, sind definierte Qualität und Spezifität und gesicherte Verfügbarkeit der IgE-Immunglobuline für *in vitro*-Untersuchungen. Aufgrund der bekannten Reaktivität der Antikörper wären Untersuchungsergebnisse gut reproduzierbar. Man könnte weiterhin definierte Referenzseren erstellen, anhand derer Intra- und Interassay-Vergleichsuntersuchungen von serologischen Allergietests durchführbar wären.

Als eine der ersten Instanzen der allergologischen Risikoanalyse wird auch im vorliegenden Modellsystem die Untersuchung der Stabilität der transgen-kodierten Proteine gegen das Verdauungsenzym Pepsin herangezogen. Die derzeitigen *in vitro*-Methoden berücksichtigen lediglich den Einfluss von Pepsin auf die Proteindegradation unter optimalen Reaktionsbedingungen. Aussagen über das allergene Potenzial der Proteine bei unvollständiger Verdauung, verursacht durch hypoazide Bedingungen, wie sie bei Individuen mit beeinträchtigter gastrischer Funktion vorliegen können, wird hierbei nicht berücksichtigt. Durch Hypoazidität verursachte unvollständige Verdauung ist beispielsweise bei älteren Menschen, bei kleinen Kindern, bei chronischer atopischer Gastritis und Einnahme von magensäureneutralisierender oder -inhibierender Medikamente keine Seltenheit. Es wird von Patienten berichtet, bei denen nach magensäureneutralisierender Medikation *de-novo*-Sensibilisierung und IgE-Bildung gegen Lebensmittelproteine festgestellt wurden (Jensen-Jarolim und Untersmayr 2006). Medikamente mit säureneutralisierender Wirkung (H<sub>2</sub>-Rezeptor-Blocker, Protonenpumpen-Inhibitoren) sind teilweise nicht verschreibungspflichtig und können ohne Konsultation eines Arztes eingenommen werden. Bestätigt wurde die sensibilisierende Wirkung von Lebensmittelallergenen bei unvollständiger Verdauung, verursacht durch medikative Änderung des pH-Wertes im Magen, anhand des Tiermodells *Balb/c-Maus* (Schöll *et al.* 2005; Diesner *et al.* 2008). Das vorliegende Modellsystem zur allergologischen Risikoanalyse von GMP könnte dahingehend erweitert werden, dass orale Fütterungsstudien an Mäusen miteinbezogen werden, bei denen suboptimale Bedingungen des Verdauens Berücksichtigung finden. Weiterhin könnten auch die *in vitro*-Methoden zur Untersuchung der Stabilität der transgenen Proteine gegen Verdauung zusätzlich unter Bedingungen durchgeführt werden, die denen im Verdauungstrakt von Individuen mit beeinträchtigter gastrischer Funktion nahe kommt.

Die Problematik der Aufnahme von (transgen-kodierten) Proteinen über die Mukosamembran nach unvollständiger Verdauung (z.B. durch nicht optimale Bedingungen für das Verdauungsenzym Pepsin) könnten auch mit dem *in vitro*-Modell der Ussingkammer untersucht werden. Durch den Einsatz dieses Modells könnten aufwendige Fütterungsstudien verringert werden. Es könnten Transportraten der transgen-kodierten Proteine im Darm untersucht und Fragestellungen zum Resorptionsverhalten beantwortet werden. Der Aufbau der Ussing-Kammer besteht aus zwei separaten Kompartimenten, die durch einen eingespannten Abschnitt eines Schweinedarms voneinander getrennt werden. Die zwei Kammern simulieren die luminale bzw. „innere“ und die serosale „äußere“ Seite des Darms. Auf die luminale Seite des Puffer-gefüllten Systems werden bestimmte Mengen des zu untersuchenden Proteins bzw. des Pflanzenmaterials gegeben. Von beiden Seiten des Systems wurden zu Beginn des Versuchs und nach bestimmten Zeitabständen Proben entnommen, die quantitativ auf das Protein untersucht. Eine Weiterentwicklung des Ussingkammer-Systems, bei der

auf tierisches Material (Abschnitt eines Schweinedarms) verzichtet werden kann, liegt in der Etablierung einer Zellkulturmembran, die im Aufbau dem Darmgewebe sehr ähnlich ist. So kann nicht nur tierisches Gewebe eingespart werden, sondern man ist in der Versuchsdurchführung zeitlich unabhängig von Schlachtungen und die Versuche werden aufgrund der gezüchteten Membran reproduzierbarer. Unter der Voraussetzung, dass in dem künstlichen Membranmodell die gleichen Zelltypen wie im natürlichen Darmgewebe vorkommen und die gleichen Transportmechanismen nachgestellt werden, kann die Sicherheit der Ergebnisse erhöht werden.

Die Untersuchung des allergenen Potenzials von neuen Proteinen oder gentechnisch veränderten Pflanzen, die als Lebensmittel Verwendung finden, im Tiermodell über die orale Applikation spiegelt das klassische Szenario der Nahrungsaufnahme dar. Sie berücksichtigt jedoch nicht, dass potenzielle Allergene auch auf anderem Wege sensibilisierend wirken können. Pflanzenpollen bergen eine größere Menge an bekannten Allergenen als pflanzliche Lebensmittel. Daher sollte auch die Möglichkeit Berücksichtigung finden, dass neu exprimierte Proteine mit dem Pollen von GMP freigesetzt und über den respiratorischen Trakt aufgenommen werden können (Moneret-Vautrin 2006). Des Weiteren besteht beispielsweise für Arbeiter der Lebensmittelproduktion und -verarbeitung ein erhöhtes Risiko der Sensibilisierung gegen Pflanzenbestandteile, da sie diesen in erweitertem Maße ausgesetzt sind. So können vor allem zermahlene Lebensmittel, wie Mehl, über die Atemwege aufgenommen werden und sensibilisierend wirken. Über den Respirationstrakt aufgenommene Allergene müssen zwar Abwehrmechanismen überwinden, jedoch umgehen sie auf diesem Wege dem Abbau des Verdauungssystems. Um das potenzielle Risiko einer Allergenisierung von GMP über den Atemweg zu untersuchen, könnten im Labortierversuch beispielsweise Applikationen von Pflanzenmaterial über den Respirationstrakt oder auf der Haut in die Bewertung einbezogen werden. Anwendungsmodelle zu verschiedenen Expositionsszenaria, beispielsweise der Applikation über den Respirationstrakt von *Balb/c-Mäusen* (Pucheu-Haston *et al.* 2010) sind bekannt. Diese Form der Labortieruntersuchung sollte allerdings nur in Betracht kommen, wenn der Verdacht einer Erhöhung der potenziellen Allergenität der GMP bzw. einer allergenisierenden Wirkung der transgenen Proteine über en Respirationstrakt begründet ist.

**F Literaturverzeichnis**

- Aalberse, Rob C.; Stadler, Beda M. (2006): In silico predictability of allergenicity: from amino acid sequence via 3-D structure to allergenicity. In: *Molecular nutrition & food research*, Vol. 50(7): 625–627.
- Abrantes, J.; Esteves, P. J.; van der Loo, W. (2008): Evidence for recombination in the major capsid gene VP60 of the rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV). In: *Archives of virology*, Vol. 153(2): 329–335.
- Apweiler, R.; Hermjakob, H.; Sharon, N. (1999): On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. In: *Biochimica et biophysica acta*, Vol. 1473(1): 4–8.
- Arakawa, T.; Chong, D. K.; Merritt, J. L.; Langridge, W. H. (1997): Expression of cholera toxin B subunit oligomers in transgenic potato plants. In: *Transgenic research*, Vol. 6(6): 403–413.
- Arakawa, T.; Chong, D. K.; Langridge, W. H. (1998): Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine. In: *Nature biotechnology*, Vol. 16(3): 292–297.
- Astwood, J. D.; Leach, J. N.; Fuchs, R. L. (1996): Stability of food allergens to digestion in vitro. In: *Nature biotechnology*, Vol. 14(10): 1269–1273.
- Bailey, M.; Miller, B. G.; Telemo, E.; Stokes, C. R.; Bourne, F. J. (1993): Specific immunological unresponsiveness following active primary responses to proteins in the weaning diet of piglets. In: *International archives of allergy and immunology*, Vol. 101(3): 266–271.
- Bannon, Gary A.; Ogawa, Tadashi (2006): Evaluation of available IgE-binding epitope data and its utility in bioinformatics. In: *Molecular nutrition & food research*, Vol. 50(7): 638–644.
- Bardor, Muriel; Faveeuw, Christelle; Fitchette, Anne-Catherine; Gilbert, Danièle; Galas, Ludovic; Trottein, Francois et al. (2003): Immunoreactivity in mammals of two typical plant glyco-epitopes, core alpha(1,3)-fucose and core xylose. In: *Glycobiology*, Vol. 13(6): 427–434.
- Berg, H.; Ziegler, K.; Piotukh, K.; Baier, K.; Lockau, W.; Volkmer-Engert, R. (2000): Biosynthesis of the cyanobacterial reserve polymer multi-L-arginyl-poly-L-aspartic acid (cyanophycin): mechanism of the cyanophycin synthetase reaction studied with synthetic primers. In: *European journal of biochemistry / FEBS*, Vol. 267(17): 5561–5570.
- Bertagnoli, S.; Gelfi, J.; Le Gall, G.; Boilletot, E.; Vautherot, J. F.; Rasschaert, D. et al. (1996): Protection against myxomatosis and rabbit viral hemorrhagic disease with recombinant myxoma viruses expressing rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein. In: *Journal of virology*, Vol. 70(8): 5061–5066.
- bioSicherheit.de: Gentechnik - Pflanzen - Umwelt. Online verfügbar unter [www.biosicherheit.de](http://www.biosicherheit.de), zuletzt geprüft am 09-2011.
- Boga, J.A.; Casais, R.; Marin, M.S.; Martin-Alonso, J.M.; Carmenes, R.S.; Prieto, M.; Parra, F. (1994): Molecular cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the capsid protein gene from rabbit haemorrhagic disease virus (Spanish isolate AST/89). In: *The Journal of general virology*, Vol. 75 (9): 2409–2413.
- Boga, J.A.; Martín Alonso, J.M.; Casais, R.; Parra, F. (1997): A single dose immunization with rabbit haemorrhagic disease virus major capsid protein produced in *Saccharomyces cerevisiae* induces protection. In: *The Journal of general virology*, Vol. 78 (Pt 9): 2315–2318.
- Brandtzaeg, P.E.R. (2002): Current understanding of gastrointestinal immunoregulation and its relation to food allergy. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 964): 13–45.

- Braren, I.; Blank, S.; Seismann, H.; Deckers, S.; Ollert, M.; Grunwald, T.; Spillner, E. (2007): Generation of human monoclonal allergen-specific IgE and IgG antibodies from synthetic antibody libraries. In: *Clinical chemistry*, Vol. 53(5): 837–844.
- Bruijnzeel-Koomen, C.; Ortolani, C.; Aas, K.; Bindslev-Jensen, C.; Björkstén, B.; Moneret-Vautrin, D.; Wüthrich, B. (1995): Adverse reactions to food. European Academy of Allergology and Clinical Immunology Subcommittee. In: *Allergy*, Vol. 50(8): 623–635.
- Buchanan, B.B.; Frick, O.L. (2002): The dog as a model for food allergy. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 964): 173–183.
- Bühning, J.; Rathke, G.; Valent, P. (2006): Allergeninduzierte Aktivierung von Basophilen. In: Sack; Tarnok; Rothe (Hg.): *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*: Karger, Basel
- Carnés, J.; Fernández-Caldas, E.; Gallego, M.T.; Ferrer, A.; Cuesta-Herranz, J. (2002): Pru p 3 (LTP) content in peach extracts. In: *Allergy*, Vol. 57(11): 1071–1075.
- Castañón, S.; Marín, M. S.; Martín-Alonso, J.M.; Boga, J.A.; Casais, R.; Humara, J.M. et al. (1999): Immunization with potato plants expressing VP60 protein protects against rabbit hemorrhagic disease virus. In: *Journal of virology*, Vol. 73(5): 4452–4455.
- Christou, P.; Capell, T.: Genetically Modified Plants. DOI: 10.1002/9780470015902.a0003362. In: Wiley online library, zuerst veröffentlicht: 16.07.2007.
- Clive, J. (2010a): Global status of commercialized biotech/GM crops: 2009. Ithaca, N.Y.: International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA Briefs, 41).
- Clive, J. (2010b): Global status of commercialized biotech/GM crops: 2010. Ithaca, N.Y.: International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA Briefs, 42).
- Corry, D.B.; Kheradmand, F. (1999): Induction and regulation of the IgE response. In: *Nature*, Vol. 402(6760 Suppl): B18-23.
- DAS EUROPÄISCHE PARLAMENT UND DER RAT DER EUROPÄISCHEN UNION (2001): Richtlinie 2001/18/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 12. März 2001 über die absichtliche Freisetzung genetisch veränderter Organismen in die Umwelt und zur Aufhebung der Richtlinie 90/220/EWG des Rates. Richtlinie 2001/18/EG, (2001).
- DAS EUROPÄISCHE PARLAMENT UND DER RAT DER EUROPÄISCHEN UNION: Verordnung Nr. 1829/2003/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über genetisch veränderte Lebensmittel und Futtermittel. Verordnung Nr. 1829/2003/EG, (2003).
- Davies, J.E. (1991): Aminoglycoside-aminocyclitol antibiotics and their modifying enzymes. 3. Aufl. Herausgegeben von Lorian V. (Hrsg.) *Antibiotics in laboratory medicine*. Baltimore: Williams and Wilkins): 691–713.
- Dearman, R.J.; Stone, S.; Caddick, T.; Basketter, D.A.; Kimber, I. (2003): Evaluation of protein allergenic potential in mice: dose-response analyses. In: *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, Vol. 33(11): 1586–1594.
- Delisi, C.; Siraganian, R.P. (1979): Receptor cross-linking and histamine release. II. Interpretation and analysis of anomalous dose response patterns. In: *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), Vol. 122(6): 2293–2299.
- Diesner, C.; Knittelfelder, R.; Krishnamurthy, D.; Pali-Schöll, I.; Gajdzik, L.; Jensen-Jarolim, E.; Untersmayr, E. (2008): Dose-dependent food allergy induction against ovalbumin under acid-suppression: a murine food allergy model. In: *Immunology letters*, Vol. 121(1): 45–51.
- DIN EN ISO 10993-10:2010-12: Biologische Beurteilung von Medizinprodukten - Teil 10: Prüfungen auf Irritation und Hautsensibilisierung. Beuth-Verlag

DIN EN ISO 10993-2:2006-10: Biologische Beurteilung von Medizinprodukten - Teil 2: Tierschutzbestimmungen. Beuth-Verlag

EFSA (2004): Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants. In: The EFSA Journal(48): 1–18. ([http://www.gmo-compass.org/pdf/documents/efsa\\_marker.pdf](http://www.gmo-compass.org/pdf/documents/efsa_marker.pdf))

EFSA (2006): Guidance Document of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms for the Risk Assessment of Genetically Modified Plants and Derived Food and feed.

EFSA (2007) Statement of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on the safe use of the nptII antibiotic resistance marker gene in genetically modified plants. (<http://www.efsa.europa.eu/de/efsajournal/doc/742.pdf>)

EFSA (2008): GMO Panel Working Group on Animal Feeding Trials (2008): Safety and nutritional assessment of GM plants and derived food and feed: the role of animal feeding trials. In: Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association, Vol. 46: 2-70.

EFSA (2009a): Scientific Opinion on Guidance for the risk assessment of genetically plants used for non-food or non feed purposes. In: The EFSA Journal(1164): 1–42. (<http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/1164.pdf>)

EFSA (2009b): Statement of EFSA on the consolidated presentation of opinions on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants. In: The EFSA Journal(1108): 1–8. (<http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/1108.pdf>)

EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO Panel) (2010): Scientific Opinion on the assessment of allergenicity of GM plants and microorganisms and derived food and feed, Vol. 8(7): 1-168. (<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1700.pdf>)

Eissen, M.; Metzger, J.O.; Schmidt, E.; Schneidewind, U. (2002): 10 years after rio-concepts on the contribution of chemistry to a sustainable development. In: Angewandte Chemie (International ed. in English), Vol. 41(3): 415–436.

Ermel, R.W.; Kock, M.; Griffey, M.; Reinhart, G.A.; Frick, O.L. (1997): The atopic dog: a model for food allergy. In: Laboratory animal science, Vol. 47(1): 40–49.

Ewen, W.; Pusztai, A. (1999): Effect of diets containing genetically modified potatoes expressing Galanthus nivalis lectin on rat small intestine. In: The Lancet, Vol. 354(9187): 1353–1354.

Fairbanks, G.; Steck, T.L.; Wallach, D.F. (1971): Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. In: Biochemistry, Vol. 10(13): 2606–2617.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization): Evaluation of Allergenicity of Genetically Modified Foods. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology (22 - 25 January 2001); Rome, Italy.

Farnós, O.; Boué, O.; Parra, F.; Martín-Alonso, J.M.; Valdés, O.; Joglar, M. et al. (2005): High-level expression and immunogenic properties of the recombinant rabbit hemorrhagic disease virus VP60 capsid protein obtained in *Pichia pastoris*. In: Journal of biotechnology, Vol. 117(3): 215–224.

Faye, L.; Boulaflous, A.; Benchabane, M.; Gomord, V.; Michaud, D. (2005): Protein modifications in the plant secretory pathway: current status and practical implications in molecular pharming. In: Vaccine, Vol. 23(15): 1770–1778.

Fernández-Fernández, M.R.; Mouriño, M.; Rivera, J.; Rodríguez, F.; Plana-Durán, J.; García, J.A. (2001): Protection of rabbits against rabbit hemorrhagic disease virus by immunization with the VP60 protein expressed in plants with a potyvirus-based vector. In: Virology, Vol. 280(2): 283–291.

- Fiers, M.W.; Kleter, G.A.; Nijland, H.; Peijnenburg, A.A.; Nap, J.P.; van Ham, R.C. (2004): Allermatch, a webtool for the prediction of potential allergenicity according to current FAO/WHO Codex alimentarius guidelines. <http://www.allermatch.org/>. In: BMC bioinformatics, Vol. 5: 133.
- Fiocchi, A.; Bouygue, G.R.; Sarratud, T.; Terracciano, L.; Martelli, A.; Restani, P. (2004): Clinical tolerance of processed foods. In: Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology, Vol. 93(5) Suppl 3: 38-46.
- Flavell, R.B.; Dart, E.; Fuchs, R.L.; Fraley, R.T. (1992): Selectable marker genes: safe for plants. In: Bio/technology (Nature Publishing Company), Vol. 10(2): 141–144.
- Food Allergy Research and Ressource Program (FARRP): AllergenOnline. <http://www.allergenonline.org/>. Unter Mitarbeit von J. Wise und R. Goodman. Herausgegeben von University of Nebraska in Lincoln und Department of Food Science and Technology.
- Frey, K.M.; Oppermann-Sanio, F.B.; Schmidt, H.; Steinbüchel, A. (2002): Technical-scale production of cyanophycin with recombinant strains of Escherichia coli. In: Applied and environmental microbiology, Vol. 68(7): 3377–3384.
- Fu, T.J. (2002): Digestion stability as a criterion for protein allergenicity assessment. In: Annals of the New York Academy of Sciences, Vol. 964: 99–110.
- Fuchs, R.L.; Heeren, R.A.; Gustafson, M.E.; Rogan, G.J.; Bartnicki, D.E.; Leimgruber, R.M. et al. (1993): Purification and characterization of microbially expressed neomycin phosphotransferase II (NPTII) protein and its equivalence to the plant expressed protein. In: Bio/technology (Nature Publishing Company), Vol. 11(13): 1537–1542.
- Gell, P.G.H.; Coombs, R.R.A. (1963): Clinical Aspects of Immunology: Blackwell Science Ltd.
- [geochemie.uni-bremen.de/koelling/dalton.html/](http://geochemie.uni-bremen.de/koelling/dalton.html/). Universität Bremen - Fachbereich Geowissenschaften, zuletzt geprüft am 02-2011.
- Gibbs, B.F.; Noll, T.; Falcone, F.H.; Haas, H.; Vollmer, E.; Vollrath, I. et al. (1997): A three-step procedure for the purification of human basophils from buffy coat blood. In: Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society, Vol. 46(4): 137–142.
- Gil, F.; Titarenko, E.; Terrada, E.; Arcalís, E.; Escribano, J.M. (2006): Successful oral prime-immunization with VP60 from rabbit haemorrhagic disease virus produced in transgenic plants using different fusion strategies. In: Plant biotechnology journal, Vol. 4(1): 135–143.
- Gilissen, L.J.W.J.; Bolhaar, S.T.H.P.; Matos, C.I.; Rouwendal, G.J.A.; Boone, M.J.; Krens, F.A. et al. (2005): Silencing the major apple allergen Mal d 1 by using the RNA interference approach. In: The Journal of allergy and clinical immunology, Vol. 115(2): 364–369.
- Gomord, V.; Fichette, A.C.; Menu-Bouaouiche, L.; Saint-Jore-Dupas, C.; Plasson, C.; Michaud, D.; Faye, L. (2010): Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production. In: Plant biotechnology journal, Vol. 8(5): 564–587.
- Goodman, R.E.; Vieths, S.; Sampson, H.A.; Hill, D.; Ebisawa, M.; Taylor, S.L.; van Ree, R. (2008): Allergenicity assessment of genetically modified crops-what makes sense. In: Nature biotechnology, Vol. 26(1): 73–81.
- Gromadzka, B.; Szewczyk, B.; Konopa, G.; Fitzner, A.; Kesy, A. (2006): Recombinant VP60 in the form of virion-like particles as a potential vaccine against rabbit hemorrhagic disease virus. In: Acta biochimica Polonica, Vol. 53(2): 371–376.
- Gupta, R.; Jung, E.; Brunak, S.: Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. (2004) In preparation

- Heimgartner, U.; Kozulić, B.; Mosbach, K. (1989): Polyacrylic polyhydrazides as reagents for detection of glycoproteins. In: *Analytical biochemistry*, Vol. 181(1): 182–189.
- Hein, M.B.; Yeo, T.C.; Wang, F.; Sturtevant, A. (1996): Expression of cholera toxin subunits in plants. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 792): 50–56.
- Hennersdorf, I.F. (2006): Dissertation: Identifizierung und Charakterisierung neuer Aktivierungsmarker auf basophilen Granulozyten. Universität Tübingen, Medizinische Fakultät.
- Hirst, T.R.; Holmgren, J. (1987): Conformation of protein secreted across bacterial outer membranes: a study of enterotoxin translocation from *Vibrio cholerae*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 84(21): 7418–7422.
- Hoffmann, A.; Vieths, S.; Haustein, D. (1997): Biologic allergen assay for in vivo test allergens with an in vitro model of the murine type I reaction. In: *The Journal of allergy and clinical immunology*, Vol. 99(2): 227–232.
- Holtzhauer, M. (1997): *Biochemische Labormethoden*. Mit 79 Tabellen. 3., korr. Aufl. Berlin: Springer (Springer-Labor-Manual).
- Immundefektzentrum der Charité: Die CD-Nomenklatur. <http://www.immundefekt.de/cd.shtml>; Stand 09/2011.
- Jackson, W.F. (2003): *Food Allergy*. ILSI Europe Publication, In: ILSI Press.
- Jäger, L.; Wüthrich, B.; Bergmann, R. (1998): *Nahrungsmittelallergien und -intoleranzen*. Immunologie, Diagnostik, Therapie, Prophylaxe / 1. Aufl. Ulm: G. Fischer.
- Jani, D.; Meena, L.S.; Rizwan-ul-Haq, Q.M.; Singh, Y.; Sharma, A.K.; Tyagi, A.K. (2002): Expression of cholera toxin B subunit in transgenic tomato plants. In: *Transgenic research*, Vol. 11(5): 447–454.
- Jani, D.; Singh, N.K.; Bhattacharya, S.; Meena, L.S.; Singh, Y.; Upadhyay, N. et al. (2004): Studies on the immunogenic potential of plant-expressed cholera toxin B subunit. In: *Plant cell reports*, Vol. 22(7): 471–477.
- Jarvis, D.L.; Howe, D.; Aumiller, J.J. (2001): Novel baculovirus expression vectors that provide sialylation of recombinant glycoproteins in lepidopteran insect cells. In: *Journal of virology*, Vol. 75(13): 6223–6227.
- Jensen-Jarolim, E.; Untersmayr, E. (2006): Food safety: in vitro digestion tests are non-predictive for allergenic potential of food in stomach insufficiency. In: *Immunology letters*, Vol. 102(1): 118–119.
- Joentgen, W.; Groth, T.; Steinbüchel, A.; Hai, T.; Oppermann F.B. (2001): Polyasparaginic acid homopolymers and copolymers, biotechnical production and use thereof. Veröffentlichungsnummer: US Patent 6,180,752.
- Julenius, K.; Mølgaard, A.; Gupta, R.; Brunak, S. (2005): Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. In: *Glycobiology*, Vol. 15(2): 153–164.
- Käppeli, O.; Schulte, E. (1998): *Bio- und Gentechnologie*. 2. Technikbeurteilung offener Systeme. Zürich: vdf Hochsch.-Verl. an der ETH.
- Kennedy, M.W.; Britton, C.; Price, N.C.; Kelly, M.; Cooper, A. (1995): The DvA-1 polyprotein of the parasitic nematode *Dictyocaulus viviparus*. A small helix-rich lipid-binding protein. In: *The Journal of biological chemistry*, Vol. 270(33): 19277–19281.
- Kim, Y.S.; Kim, M.Y.; Kim, T.G.; Yang, M.S. (2009): Expression and assembly of cholera toxin B subunit (CTB) in transgenic carrot (*Daucus carota* L.). In: *Molecular biotechnology*, Vol. 41(1): 8–14.
- Kimber, I.; Dearman, R.J.; Penninks, A.H.; Knippels, L.M.; Buchanan, R.B.; Hammerberg, B.; Jackson, H.A.; Helm, R.M. (2003): Assessment of protein allergenicity on the basis of

immune reactivity: animal models. In: Environmental health perspectives, Vol. 111(8): 1125–1130.

Knippels, L.M.; Penninks, A.H.; Spanhaak, S.; Houben, G.F. (1998): Oral sensitization to food proteins: a Brown Norway rat model. In: Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology, Vol. 28(3): 368–375.

Knippels, L.M.; Houben, G.F.; Spanhaak, S.; Penninks, A.H. (1999): An oral sensitization model in Brown Norway rats to screen for potential allergenicity of food proteins. In: Methods (San Diego, Calif.), Vol. 19(1): 78–82.

Knippels, L.M.; Penninks, A.H. (2002): Assessment of protein allergenicity: studies in brown norway rats. In: Annals of the New York Academy of Sciences, Vol. 964: 151–161.

Knippels, L.M.; Penninks, A.H. (2003): Assessment of the allergic potential of food protein extracts and proteins on oral application using the brown Norway rat model. In: Environmental health perspectives, Vol. 111(2): 233–238.

Knippels, L.M.; Penninks, A.H. (2005): Recent advances using rodent models for predicting human allergenicity. In: Toxicology and applied pharmacology, Vol. 207(2 Suppl): 157–160.

Knol, E.F. (2006): Requirements for effective IgE cross-linking on mast cells and basophils. In: Molecular nutrition & food research, Vol. 50(7): 620–624.

Krehenbrink, M.; Steinbüchel, A. (2004): Partial purification and characterization of a non-cyanobacterial cyanophycin synthetase from *Acinetobacter calcoaceticus* strain ADP1 with regard to substrate specificity, substrate affinity and binding to cyanophycin. In: Microbiology (Reading, England), Vol. 150(Pt 8): 2599–2608.

Labib, M.; Hedström, M.; Amin, M.; Mattiasson, B. (2009): A capacitive immunosensor for detection of cholera toxin. In: Analytica chimica acta, Vol. 634(2): 255–261.

Lang, Norma J. et al (1972): Correspondence of Cyanophycin Granules with Structured Granules in *Anabena cylindrica*. In: Archives of microbiology(83): 313–320.

Laurent, S.; Vautherot, J.F.; Madelaine, M.F.; Le Gall, G.; Rasschaert, D. (1994): Recombinant rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein expressed in baculovirus self-assembles into viruslike particles and induces protection. In: Journal of virology, Vol. 68(10): 6794–6798.

Leff, L.G.; Dana, J.R.; McArthur, J.V.; Shimkets, L.J. (1993): Detection of Tn5-like sequences in kanamycin-resistant stream bacteria and environmental DNA. In: Applied and environmental microbiology, Vol. 59(2): 417–421.

Li, D.F.; Nelssen, J.L.; Reddy, P.G.; Blecha, F.; Klemm, R.D.; Giesting, D.W. et al. (1991): Measuring suitability of soybean products for early-weaned pigs with immunological criteria. In: Journal of animal science, Vol. 69(8): 3299–3307.

Lipman, D.J.; Pearson, W.R. (1985): Rapid and sensitive protein similarity searches. In: Science (New York, N.Y.), Vol. 227(4693): 1435–1441.

Lips, J. (1998): Pleiotrope Effekte und genetische Stabilität transgener Pflanzen. In: Schütte, G.; Heidenreich, B.; Beusmann, V. (1998): Nutzung der Gentechnik im Agrarsektor der USA - Die Diskussion von Versuchsergebnissen und Szenarien zur Biosicherheit. In: UBA-Texte, Vol. 47/98): 121–156.

Liu, J.; Xue, P.; Pu, B.Q.; Quian, N.H. (1984): A new viral disease in rabbits. In: Animal Husbandry Vet Med, Vol. 16): 253–255.

Löffler, G.; Heinrich, P.C.; Petrides, P.E. (2007): Biochemie und Pathobiochemie. 8., völlig neu bearbeitete Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg (Springer-Lehrbuch).

- Mackerras, A.H.; Dechazal, N.M.; Smith, G.D. (1990): Transient accumulations of cyanophycin in *Anabena cylindrica* and *Synechocystis* 6308. In: *J. Gen. Microbiol.*(136): 2057–2065.
- Madsen, C.; Pilegaard, K. (2003): No priming of the immune response in newborn brown norway rats dosed with ovalbumin in the mouth. In: *International archives of allergy and immunology*, Vol. 130(1): 66–72.
- Martinez Barrio, A.; Soeria-Atmadja, D.; Nistér, A.; Gustafsson, M.G.; Hammerling, U.; Bongcam-Rudloff, E. (2007): EVALLER: a web server for in silico assessment of potential protein allergenicity. <http://www.slv.se/en-gb/Group1/Food-Safety/e-Testing-of-protein-allergenicity/>. In: *Nucleic acids research*, Vol. 35(Web Server issue): W694-700.
- McDowall, J. (2005): Cholera Toxin. An Information Portal to Biological Macromolecular Structures. Herausgegeben von PROTEIN DATA BANK.
- Merritt, M.V.; Sid, S.; Mesh, L.; Allen, M.M. (1994): Variations in the amino acid composition of cyanophycin in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6308 as a function of growth conditions. In: *Archives of microbiology*, Vol. 162(3): 158–166.
- Metcalfe, D.D.; Astwood, J.D.; Townsend, R.; Sampson, A.; Taylor, L.; Fuchs, R.L. (1996): Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. In: *Critical reviews in food science and nutrition*, Vol. 36: 165-86.
- Mikschofsky, H. (2006): Dissertation: Charakterisierung des Produktionssystems Pflanze für die rekombinante Impfstoffherzeugung. Logos-Verlag Berlin; ISBN: 3-8325-1385-X
- Mikschofsky, H.; Schirmeier, H.; Keil, G.M.; Lange, B.; Polowick, P.L.; Keller, W.; Broer, I. (2009): Pea-derived vaccines demonstrate high immunogenicity and protection in rabbits against rabbit haemorrhagic disease virus. In: *Plant biotechnology journal*, Vol7(6): 537-549
- Moneret-Vautrin, D. (2006): Transgenic plants (GM plants): what we do and what we don't know about the risk of allergenicity. In: *Revue Francaise d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*(46): 85–91.
- Morandini, P. (2010): Inactivation of allergens and toxins. In: *New biotechnology*, Vol 27(5): 482-493
- Mowat, A. (1999): Correspondence - GM food debate. In: *The Lancet*, Vol. 354(9191): 1725.
- Müller-Esterl, W.; Brandt, U. (2004 /// 2009): *Biochemie - Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*; Korrigierter Nachdr. 2009 der 1. Aufl. 2004. Unter Mitarbeit von Anderka, O.; Brandt, U.. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, München/Heidelberg; Spektrum Akad. Verl.
- Nebe, C.T.; Hartmann, K. (1998): Basophil Degranulation Test. Patent; angemeldet durch ORPEGEN PHARMA GmbH, Heidelberg, DE; Nebe, C. T.; Hartmann, K. Veröffentlichungsnummer: WO/1998/032014.
- Nelson, D.L.; Cox, M.M.; Lehninger, A.L.; Beginnen, K. (2005): *Lehninger Biochemie*. Mit 40 Tabellen. 3., vollst. überarb. und erw. Aufl., 1. korrigierter Nachdr. Berlin: Springer (Springer-Lehrbuch).
- Neubauer, K. (2009): Dissertation: Isolierung eines Biopolymers aus gentechnisch veränderten Pflanzen. Universität Rostock, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät.
- Neumann, K.; Stephan, D.P.; Ziegler, K.; Hühns, M.; Broer, I.; Lockau, W.; Pistorius, E.K. (2005): Production of cyanophycin, a suitable source for the biodegradable polymer polyaspartate, in transgenic plants. In: *Plant biotechnology journal*, Vol. 3(2): 249–258.
- Nordlee, J.A.; Taylor, L.; Townsend, J.A.; Thomas, L.A.; Bush, R. K. (1996): Identification of a Brazil-nut allergen in transgenic soybeans. In: *The New England journal of medicine*, Vol. 334(11): 688–692.

- Obst, M.; Krug, A.; Luftmann, H.; Steinbüchel, A. (2005): Degradation of cyanophycin by *Sedimentibacter hongkongensis* strain KI and *Citrobacter amalonaticus* strain G Isolated from an anaerobic bacterial consortium. In: *Applied and environmental microbiology*, Vol. 71(7): 3642–3652.
- OECD (1993a): *Safety considerations for biotechnology: Scale-up of crop plants*. Organisation for Economic Co-operation and Development. Paris.
- OECD (1993b): *Safety evaluation of foods derived by modern biotechnology: concept and principles*. Organisation for Economic Co-operation and Development. Paris.
- O'Keefe, R.J.; Crabb, I.D.; Puzas, J.E.; Rosier, R.N. (1989): Countercurrent centrifugal elutriation. High-resolution method for the separation of growth-plate chondrocytes. In: *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, Vol. 71(4): 607–620.
- Parra, F.; Prieto, M. (1990): Purification and characterization of a calicivirus as the causative agent of a lethal hemorrhagic disease in rabbits. In: *Journal of virology*, Vol. 64(8): 4013–4015.
- Pearson, W.R.; Lipman, D.J. (1988): Improved tools for biological sequence comparison. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 85(8): 2444–2448.
- Pérez-Filgueira, D.M.; Resino-Talaván, P.; Cubillos, C.; Angulo, I.; Barderas, M.G.; Barcena, J.; Escribano, J.M. (2007): Development of a low-cost, insect larvae-derived recombinant subunit vaccine against RHDV. In: *Virology*, Vol. 364(2): 422–430.
- Phillips, B.J.; Hughes, J.A.; Phillips, J.C.; Walters, D.G.; Anderson, D.; Tahourdin, C.S. (1996): A study of the toxic hazard that might be associated with the consumption of green potato tops. In: *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, Vol. 34(5): 439–448.
- Pilegaard, K.; Madsen, C. (2004): An oral Brown Norway rat model for food allergy: comparison of age, sex, dosing volume, and allergen preparation. In: *Toxicology*, Vol. 196(3): 247–257.
- Plana-Duran, J.; Bastons, M.; Rodriguez, M.J.; Climent, I.; Cortés, E.; Vela, C.; Casal, I. (1996): Oral immunization of rabbits with VP60 particles confers protection against rabbit hemorrhagic disease. In: *Archives of virology*, Vol. 141(8): 1423–1436.
- Potrykus, I. (2010): Regulation must be revolutionized. In: *Nature*, Vol. 466(7306): 561.
- Prescott, V.E.; Campbell, P.M.; Moore, A.; Mattes, J.; Rothenberg, M.E.; Foster, P.S.; Higgins, T.J.V.; Hogan, S.P. (2005): Transgenic expression of bean alpha-amylase inhibitor in peas results in altered structure and immunogenicity. In: *Journal of agricultural and food chemistry*, Vol. 53(23): 9023–9030.
- Pucheu-Haston, C.M.; Copeland, L.B.; Vallanat, B.; Boykin, E.; Ward, M.D.W. (2010): Biomarkers of acute respiratory allergen exposure: screening for sensitization potential. In: *Toxicology and applied pharmacology*, Vol. 244(2): 144–155.
- Raghuprasad, P.K. (1982): A rapid simple method of basophil purification by density centrifugation on Percoll. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, Vol. 129(5): 2128–2133.
- Redenbaugh, K.; Hiatt, W.; Martineau B.; Emlay, D. (1994): Regulatory assessment of the FLAVR SAVR tomato. In: *Trends in Food Science and Technology*, Vol. 5: 105–110.
- Renz, H.; Biedermann, T.; Bufe, A.; Eberlein, B.; Jappe, U.; Ollert, M. et al. (2010): Leitlinien-Update 061/017 *In-vitro*-Allergiediagnostik. Renz, H.; Biedermann, T.; Bufe, A.; Eberlein, B.; Jappe, U.; Ollert, M.; Petersen, A.; Kleine-Tebbe, J.; Raulf-Heimsoth, M.; Saloga, J.; Werfel, T.; Worm, M. DOI: 10.1515/JLM.2010.034. In: *LaboratoriumsMedizin*, Vol. 34(4): 177–195.
- Richter, R.; Hejazi, M.; Kraft, R.; Ziegler, K.; Lockau, W. (1999): Cyanophycinase, a peptidase degrading the cyanobacterial reserve material multi-L-arginyl-poly-L-aspartic

- acid (cyanophycin): molecular cloning of the gene of *Synechocystis* sp. PCC 6803, expression in *Escherichia coli*, and biochemical characterization of the purified enzyme. In: *European journal of biochemistry / FEBS*, Vol. 263(1): 163–169.
- Rohringer, R.; Holden, D.W. (1985): Protein blotting: detection of proteins with colloidal gold, and of glycoproteins and lectins with biotin-conjugated and enzyme probes. In: *Analytical biochemistry*, Vol. 144(1): 118–127.
- Rothbard, J.B.; Geftter, M. L. (1991): Interactions between immunogenic peptides and MHC proteins. In: *Annual review of immunology*, Vol. 9: 527–565.
- Salinas, E.; Quintanar-Stephano, A.; Córdova, L.E.; Quintanar, J.L. (2008): Allergen-sensitization increases mast-cell expression of the exocytotic proteins SNAP-23 and syntaxin 4, which are involved in histamine secretion. In: *Journal of investigational allergology & clinical immunology: official organ of the International Association of Asthmology and Sociedad Latinoamericana de Alergia e Inmunología*, Vol. 18(5): 366–371.
- Sallam, A.; Steinbüchel, A. (2009): Cyanophycin-degrading bacteria in digestive tracts of mammals, birds and fish and consequences for possible applications of cyanophycin and its dipeptides in nutrition and therapy. In: *Journal of applied microbiology*, Vol. 107(2): 474–484.
- Sampson, A.; Burks, A.W. (1996): Mechanisms of food allergy. In: *Annual review of nutrition*, Vol. 16: 161–177.
- Sánchez, J.; Holmgren, J. (2008): Cholera toxin structure, gene regulation and pathophysiological and immunological aspects. In: *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, Vol. 65(9): 1347–1360.
- Schöll, I.; Untersmayr, E.; Bakos, N.; Roth-Walter, F.; Gleiss, A.; Boltz-Nitulescu, G.; Scheiner, O.; Jensen-Jarolim, E. (2005): Antiulcer drugs promote oral sensitization and hypersensitivity to hazelnut allergens in BALB/c mice and humans. In: *The American journal of clinical nutrition*, Vol. 81(1): 154–160.
- Schütt, C.; Broeker, B. (2009): *Grundwissen Immunologie: Spektrum Akademischer Verlag*.
- Scott, E.; Peter, F.; Sanders, J. (2007): Biomass in the manufacture of industrial products - the use of proteins and amino acids. In: *Applied microbiology and biotechnology*, Vol. 75(4): 751–762.
- Seiberler, S.; Scheiner, O.; Kraft, D.; Lonsdale, D.; Valenta, R. (1994): Characterization of a birch pollen allergen, Bet v III, representing a novel class of Ca<sup>2+</sup> binding proteins: specific expression in mature pollen and dependence of patients' IgE binding on protein-bound Ca<sup>2+</sup>. In: *The EMBO journal*, Vol. 13(15): 3481–3486.
- Seppälä, U.; Majamaa, H.; Turjanmaa, K.; Helin, J.; Reunala, T.; Kalkkinen, N.; Palosuo, T. (2001): Identification of four novel potato (*Solanum tuberosum*) allergens belonging to the family of soybean trypsin inhibitors. *Allergy* 56(7): 619-626
- Shanks, N.; Greek, R.; Greek, J. (2009): Are animal models predictive for humans. In: *Philosophy, ethics, and humanities in medicine : PEHM*, Vol. 4: 2.
- Sicherer, H.; Muñoz-Furlong, A.; Burks, A. W.; Sampson, A. (1999): Prevalence of peanut and tree nut allergy in the US determined by a random digit dial telephone survey. In: *The Journal of allergy and clinical immunology*, Vol. 103(4): 559–562.
- Simon, C.; Stille, W. (Hg.) (1995): *Antibiotika-Therapie in Klinik und Praxis*. 8., neubearb. und erw. Aufl., 4., unveränd. Nachdr. Stuttgart: Schattauer.
- Simon, R.D. (1971): Cyanophycin Granules from the Blue-Green Alga *Anabaena cylindrica*: A Reserve Material Consisting of Copolymers of Aspartic Acid and Arginine. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 68(2): 265–267.

Simon, R.D.; Weathers, P. (1976): Determination of the structure of the novel polypeptide containing aspartic acid and arginine which is found in Cyanobacteria. In: *Biochimica et biophysica acta*, Vol. 420(1): 165–176.

Smalla, K.; van Overbeek, L. S.; Pukall, R.; van Elsas, J.D. (1993): Prevalence of nptII and Tn5 in kanamycin-resistant bacteria from different environments. In: *FEMS Microbiology Ecology*, Vol. 13(1): 47–58.

Soeria-Atmadja, D.; Lundell, T.; Gustafsson, M.G.; Hammerling, U. (2006): Computational detection of allergenic proteins attains a new level of accuracy with in silico variable-length peptide extraction and machine learning. In: *Nucleic acids research*, Vol. 34(13): 3779–3793.

Spitzauer, S.; Schweiger, C.; Sperr, W. R.; Pandjaitan, B.; Valent, P.; Mühl: et al. (1994): Molecular characterization of dog albumin as a cross-reactive allergen. In: *The Journal of allergy and clinical immunology*, Vol. 93(3): 614–627.

Spök, A.; Gaugitsch, H.; Laffer, S.; Pauli, G.e; Saito, H.; Sampson, H.; Sibanda, E.; Thomas, W.; van Hage, M.; Valenta, R. (2005): Suggestions for the assessment of the allergenic potential of genetically modified organisms. In: *International archives of allergy and immunology*, Vol. 137(2): 167–180.

Steinmüller, R. (2010): *Escherichia coli* (Teil 1). Enterobakterien und coliforme Bakterien. Herausgegeben von Ernährungslehre und - praxis / Ernährungsumschau: Umschau Zeitschriftenverlag GmbH; B16 - 4/10.

Teuber, S.S. (2002): Hypothesis: the protein body effect and other aspects of food matrix effects. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 964: 111–116.

The University of Texas Medical Branch: SDAP - Structural Database of Allergenic Proteins. <http://fermi.utmb.edu/SDAP/index.html>, zuletzt geprüft am 09/2011.

Thiagarajah, J.R.; Verkman, A.S. (2005): New drug targets for cholera therapy. In: *Trends in pharmacological sciences*, Vol. 26(4): 172–175.

Thomas, K.; Bannon, G.; Herouet-Guicheney, C.; Ladics, G.; Lee, L.; Lee, S.-II ; Privalle, L.; Ballmer-Weber, B.; Vieths, S. (2007): The utility of an international sera bank for use in evaluating the potential human allergenicity of novel proteins. In: *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, Vol. 97(1): 27–31.

[transgen.de/](http://transgen.de/). Forum Bio- und Gentechnologie - Verein zur Förderung der gesellschaftlichen Diskussionskultur e.V.

Trieu-Cuot, P.; Arthur, M.; Courvalin, P. (1987): Origin, evolution and dissemination of antibiotic resistance genes. In: *Microbiological sciences*, Vol. 4(9): 263–266.

UniProt. <http://www.uniprot.org/>. Herausgegeben von European Bioinformatics Institute (EBI), Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) und Protein Information Resource (PIR), zuletzt geprüft am 09-2011.

Vieths, S.; Jankiewicz, A.; Schöning, B.; Aulepp, H. (1994): Apple allergy: the IgE-binding potency of apple strains is related to the occurrence of the 18-kDa allergen. In: *Allergy*, Vol. 49(4): 262–271.

Vieths, S.; Hoffmann-Sommergruber, K. (2008): EuroPrevall food allergen library. In: *Molecular nutrition & food research*, Vol. 52 Suppl 2): S157-8.

Wall, R.J.; Shani, M. (2008): Are animal models as good as we think. In: *Theriogenology*, Vol. 69(1): 2–9.

Wang, X.G.; Zhang, G.H.; Liu, C.X.; Zhang, Y.H.; Xiao, C.Z.; Fang, R.X. (2001): Purified cholera toxin B subunit from transgenic tobacco plants possesses authentic antigenicity. In: *Biotechnology and bioengineering*, Vol. 72(4): 490–494.

Xu, Q.H.; Zhao, X.N.; Cheng, J.P.; Wei, C.H.; Zhang, Q.H.; Rong, K.T. (2006): Influence of carrier proteins on the immunologic response to haptenic antitetradotoxin vaccine. In: *Bioconjugate chemistry*, Vol. 17(6): 1508–1513.

Young, E.; Stoneham, M.D.; Petruckevitch, A.; Barton, J.; Rona, R. (1994): A population study of food intolerance. In: *Lancet*, Vol. 343(8906): 1127–1130.

Ziegler, K.; Diener, A.; Herpin, C.; Richter, R.; Deutzmann, R.; Lockau, W. (1998): Molecular characterization of cyanophycin synthetase, the enzyme catalyzing the biosynthesis of the cyanobacterial reserve material multi-L-arginyl-poly-L-aspartate (cyanophycin). In: *European journal of biochemistry / FEBS*, Vol. 254(1): 154–159.

Ziegler, K.; Deutzmann, R.; Lockau, W. (2002): Cyanophycin synthetase-like enzymes of non-cyanobacterial eubacteria: characterization of the polymer produced by a recombinant synthetase of *Desulfitobacterium hafniense*. In: *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences*, Vol. 57(5-6): 522–529.

## G Anhang

### G 1 Wachstumskern BioOK

2005 wurde der innovative regionale Wachstumskern BioOK mit dem Ziel gegründet eine Organisation aufzubauen, die die Risikobewertung und Zulassungsverfahren für gentechnisch veränderte Pflanzen (GMP) durchführt. Der Wachstumskern BioOK ist ein Zusammenschluss von Unternehmen und Vertretern verschiedener Arbeitsgruppen der Universität Rostock. Mit der gemeinsam gegründeten BioOK GmbH wurde eine Anlaufstelle für Unternehmen geschaffen, die GMP entwickelt haben und wirtschaftlich nutzen wollen.

Das Dienstleistungsangebot des Wachstumskernes zielt darauf ab, für Züchter und Importeure die notwendigen Untersuchungen im Rahmen der Entwicklung von GMP, die Prüfungen für deren Marktzulassung sowie die Überwachung (Monitoring) nach Marktzulassung zu konzipieren, durchzuführen und zu dokumentieren. Im Zuge von Labor- und Freilandversuchen für die Entwicklung von GMP kann BioOK zusätzlich anbieten, bei der Optimierung der Pflanzen hinsichtlich Anwendungszweck und Umwelt-/Verbraucherverträglichkeit beratend zu unterstützen. Das Serviceangebot ist derzeit als Baukastensystem (siehe

Abbildung) aus verschiedenen Verfahren zur Analyse von GMP aufgebaut, aus dem ein Kunde je nach Bedarf Leistungen von der Beratung über einzelne Analysen aus dem Portfolio bis hin zur gesamten Strecke der Bewertung beauftragen kann.

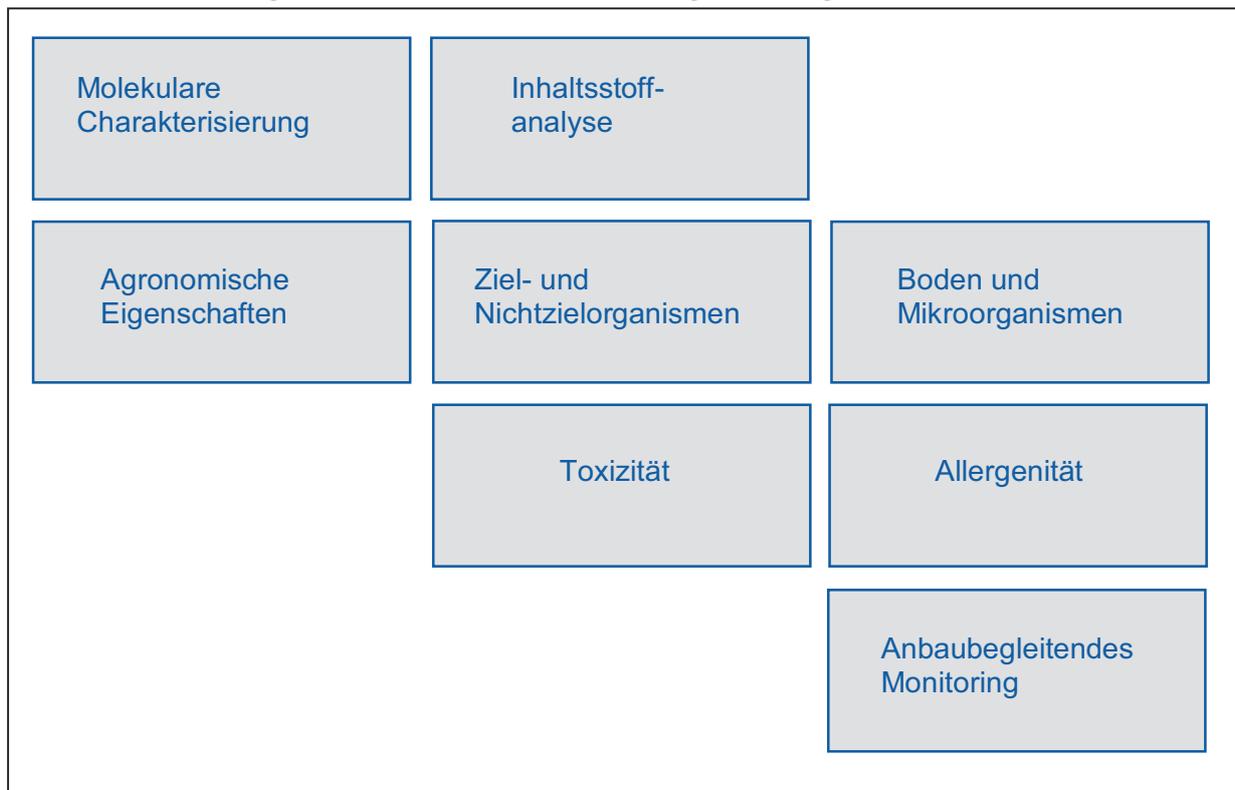
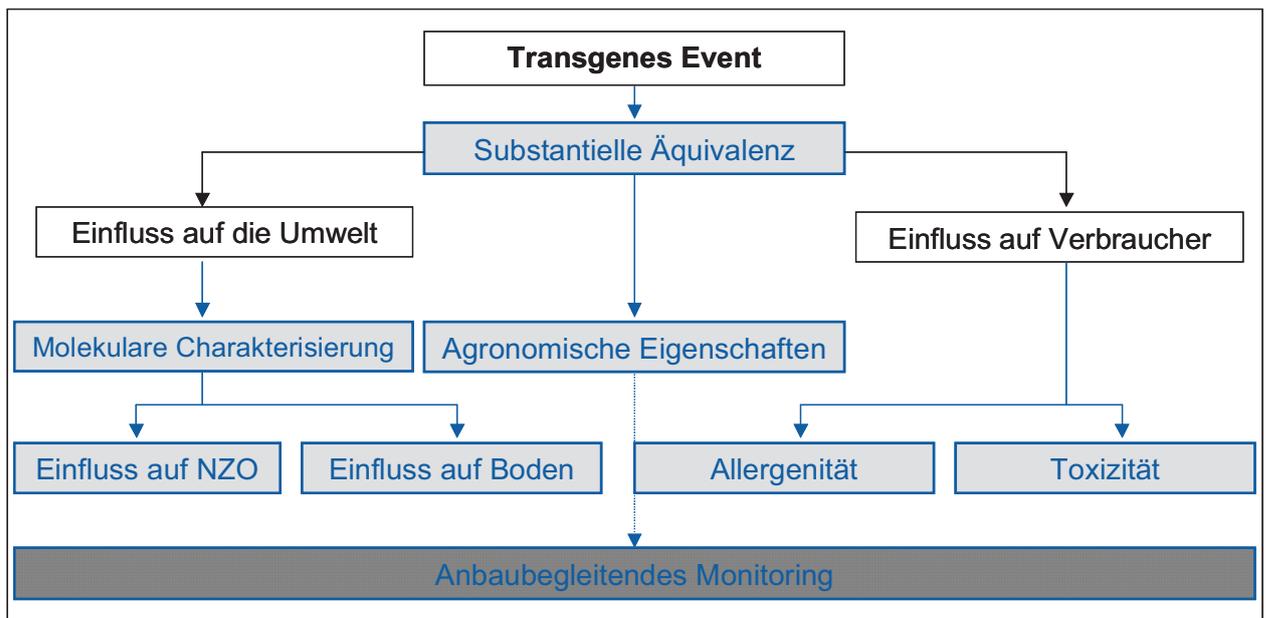


Abbildung G.1: Modulares Baukastensystem des Wachstumskernes BioOK zur Bewertung von GMP (Phase I)

Der Wachstumskern BioOK verknüpft in einem weiteren innovativen Schritt die einzelnen Module des Baukastensystems zu einem Integrierten Prüfsystem, wodurch der Gesamtprüfprozess von Entscheidungen in einem Entscheidungsbaum abhängt.

Der innovative Grundgedanke besteht darin, ein System zu entwickeln, das abweichend von der heute praktizierten Durchführung aller verfügbaren Untersuchungsverfahren, eine sinnvolle Abfolge der Analysen ermöglicht. Bedingt durch die Untersuchungsergebnisse und auf Basis von Ja – oder Nein – Entscheidungen werden die Module zu einem integrierten gesteuerten Prüfsystem (Decision Support System – DSS) vernetzt.

Die einzelnen Analyse-Bausteine des Baukastensystems des Wachstumskernes BioOK werden über Entscheidungsbäume miteinander zu sinnvollen Prozessabläufen verknüpft, sodass eine weitgehend softwarebasierte dynamische Planung des Untersuchungsablaufs der Risikobewertung einer GMP etabliert werden kann. Die Bausteine und Verfahren werden in einem Basisablauf (siehe **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**) kombiniert und werden an konkrete eventspezifische Fragestellungen angepasst. Es werden nur noch die während des Untersuchungsprozesses als sicherheitsrelevant eingestuft Analysen durchgeführt.



**Abbildung G.2: Basisablauf der Risikobewertung im Wachstumskern BioOK (aus dem BioOK-Projektantrag 2008)**

Die Entscheidungsbäume bedingen eindeutige Definitionen von Verzweigungspunkten und Entscheidungsregeln. Die Entscheidungskriterien müssen mithilfe von Baseline-Daten und Schwellenwerten zur Definition eines potenziellen Risikos entwickelt werden. Die Baseline-Daten beruhen dabei auf der Schwankungsbreite bestimmter Merkmale konventioneller Pflanzen. Die Baseline-Daten werden aus Literaturlauswertungen und eigenen analytischen, vergleichenden Untersuchungen mehrerer konventioneller Sorten einer Pflanzenart (z.B. Kartoffel) generiert. Schwankungen der Werte bestimmter Merkmale einer Pflanze können zum einen durch einwirkende Umweltfaktoren oder durch einen genetischen Einfluss bedingt sein. Um transgenspezifische Analysen durchführen zu können, muss die substantielle Äquivalenz der GMP zu konventionellen Sorten nachgewiesen werden. Merkmale, die entscheidende Differenzen aufweisen, die auf den

Einfluss von Umwelteinflüssen oder den genetischen Hintergrund zurückzuführen sind, werden als Zeigermerkmale definiert.

Das wichtigste Kriterium der Entscheidungsregeln bei der Bewertung biologisch relevanter Risiken sind Schwellenwerte. Schwellenwerte sind nicht die Grenzwerte der Baselines konventioneller Sorten, sondern Werte die eine physiologische bzw. biologische Relevanz haben. Für die Ermittlung der natürlichen Variabilität isogener Pflanzen werden zur Generierung von Baseline-Daten, bereits durch Literatursauswertung und Versuche generiert Ergebnisse herangezogen. Darüber hinaus werden zur Vervollständigung der relevanten Baseline-Daten weitere vergleichende Versuche an konventionellen und transgenen Sorten durchgeführt. Alle erhobenen Daten, sowohl der konventionellen als auch der transgenen Pflanzen werden in eine Datenbank eingepflegt und dienen zur Definition der Schwankungsbreiten isogener Pflanzen.

## G 2 Verwendete Antigene und Antikörper

Für die Entwicklung der in dieser Arbeit verwendeten immunologischen Quantifizierungssysteme wurden folgende Substanzen eingesetzt:

**Tabelle G 2.1: Bezeichnung und Herkunft der verwendeten Antigene (bekannte Allergene und Modellproteine)**

Antigen	Herkunft, Artikel-Nr.
Ovalbumin (OVA)	Carl-Roth GmbH, A5253
Papain	Sigma-Aldrich, P4762
Gliadin	Sigma-Aldrich, G3375
CTxB	Sigma-Aldrich, 029K4065
VP60	
- aus Baculovirus-Insektenzellkultur (SF9)	FLI-Insel Riems, DE
- Rika-Vacc (kommerzieller Impfstoff aus Leber experimentell infizierter Kaninchen)	FLI-Insel Riems, DE
- dichtegradientengereinigtes RHDV	FLI-Insel Riems, DE
NPTII	
- komplettes Protein	aus <i>E. coli</i> TG1, AUF Universität Rostock, BIOSERV GmbH, Rostock, DE
- synthetisches Polypeptid (gekoppelt an KLH)	BMFZ – Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, DE
Cyanophycin	Prof. Dr. Lockau, Humboldt-Universität, Institut für Biologie, Berlin, DE

**Tabelle G 2.2: Bezeichnung und Eigenschaften der verwendeten Modellprotein-spezifischen Antikörper**

Antikörper	Spezies	Verwendetes Antigen	Herkunft
anti-CTxB	Kaninchen (pAb)	CTxB (Sigma-Aldrich)	BIOSERV GmbH, Rostock
	Kaninchen (pAb)	unbekannt	NatuTec GmbH, 20-CR18
	Maus (mAb)	unbekannt	Acris Antibodies GmbH, GTX21003
	Huhn (pAb)	CTxB (Sigma-Aldrich)	Ovalehn GmbH, Kloster Lehnin
anti-VP60	Kaninchen (pAb)	Baculovirus-Insektenzellkultur	ZIKA-Kaninchenbetrieb, Götting
	Kaninchen (pAb)	RIKA-VACC (Riemser Arzneimittel GmbH)	BIOSERV GmbH, Rostock
	Huhn (pAb)	RIKA-VACC (Riemser Arzneimittel GmbH)	Ovalehn GmbH, Kloster Lehnin

anti-NPTII	Kaninchen (pAb)	komplettes Protein (elektrophoretisch getrennt)	ZIKA-Kaninchenbetrieb, Göttingen
	Kaninchen (pAb)	synthetisches Polypeptid (Aminosäuren 250-264)	BIOSEV GmbH, Rostock
	Kaninchen (pAb)	synthetisches Polypeptid (Aminosäuren 250-264)	Sigma-Aldrich, N6412
	Kaninchen (pAb)	synthetisches Polypeptid (Aminosäure 133-150)	Sigma-Aldrich, N6534
anti-Cyanophycin	Kaninchen (pAb)	Lösliche Substanz (Humboldt Universität Berlin)	BIOSEV GmbH, Rostock
	Huhn (pAb)	Lösliche Substanz (Humboldt Universität Berlin)	Ovalehn GmbH, Kloster Lehnin

**Tabelle G 2.3: Bezeichnung und Eigenschaften der sonstigen verwendeten Antikörper**

Antikörper	Konjugat	Spezies	Herkunft, Artikel-Nr.
Maus-IgE	unkonjugiert unkonjugiert	Maus Maus	BD Pharmingen, 553481 BD Pharmingen, 51-26551E aus Quantifizierungskit 555248
anti-Maus-IgE	Biotin	Ratte	BD Pharmingen, 553419 aus Quantifizierungskit 51-26552E
	POD unkonjugiert	Ziege Ratte	Sigma-Aldrich, A4416 BD Pharmingen, 553419
anti-Maus-IgG	unkonjugiert POD	Ziege Ziege	Sigma-Aldrich, M8642 Sigma-Aldrich, A4416
Ratten-IgE	unkonjugiert	Ratte	Bethyl Laboratories Inc., Quantifizierungskit E110-117
anti-Ratten-IgE	POD	Schaf	Bethyl Laboratories Inc., A-110-117A
anti-Ratten-IgG	unkonjugiert POD	Ziege Ziege	Sigma-Aldrich, R5130 Sigma-Aldrich, A9037
anti-Kaninchen-IgG	POD	Ziege	Sigma-Aldrich, A0545
anti-Huhn-IgG/IgY	POD	Kaninchen	Sigma-Aldrich, A9046

### G 3 Zellen, Bakterien und Medien

RBL-Zellen:

Für die Etablierung des  $\beta$ -Hexosaminidase-Assays, einem *ex vivo-in vitro*-Test zum Nachweis von spezifischem IgE im Serum der sensibilisierten Labortiere wurden basophile Ratten Leukämie Zellen (RBL-Zellen; DSMZ ACC 312) in einem Zellkulturmedium aus 70% MEM Medium (Invitrogen GmbH), 20 % RPMI 1640 Medium (Invitrogen GmbH) und 10 % FKS (Invitrogen GmbH) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

*E. coli*:

Zur Aufreinigung von NPTII aus „Inclusionbodies“ wurde der Bakterienstamm *E. coli* TG1 auf Caso-Agar (Oxoid GmbH) mittels Quadrantenausstrich ausplattiert, um die Zellen zu vereinzeln. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C wurde eine Kolonie in LB-Flüssigmedium (Carl-Roth GmbH & Co. KG) für weitere 24 Stunden bei 37 °C kultiviert. Nach Zentrifugation und Lyse der Bakterienzellen konnten die Inclusionbodies zur Proteinaufreinigung gewonnen werden (siehe B 2.2.1).

**G 4 Verwendete Chemikalien, Medien und Kits**

Chemikalien:

Substanz	Summenformel	Lieferant	Artikelnummer
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	$C_8H_{18}N_2O_4S$	Sigma-Aldrich	83264
Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung		Carl-Roth GmbH & Co. KG	A124.2
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	$H_8N_2O_8S_2$	Sigma-Aldrich	A3678
Biotin	$C_{10}H_{16}N_2O_3S$	Roche Diagnostics GmbH	11418165001
Calciumchlorid Dihydrat	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	Sigma-Aldrich	C8106
Caso			
Chloroform	$CHCl_3$	Carl-Roth GmbH & Co. KG	3313.2
Coomassie Brilliant Blue R 250	$C_{45}H_{44}N_3NaO_7S_2$ (Na-Salz)	Carl-Roth GmbH & Co. KG	3862.1
Essigsäure	$C_2H_4O_2$	Sigma-Aldrich	242853
Ethanol (96 %)	$C_2H_6O$	Merck	1.00983.1011
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	$C_{10}H_{16}N_2O_8$	Sigma-Aldrich	431788
Formaldehyd	$CH_2O$	Sigma-Aldrich	252549
Glutardialdehyd	$C_5H_8O_2$	Sigma-Aldrich	G6257
Glycerin	$C_3H_8O_3$	Sigma-Aldrich	G5516
Kaliumchlorid	KCl	Sigma-Aldrich	P9333
Komplettes Adjuvants		BioGenesis GmbH	
Methanol	$CH_3OH$	Sigma-Aldrich	32213
Magnesiumchlorid	$MgCl_2$	Sigma-Aldrich	M8266
Natriumacetat	$C_2H_3NaO_2$	Sigma-Aldrich	S2889
Natriumazid			
Natriumcarbonat	$Na_2CO_3$	Sigma-Aldrich	223484
Natriumchlorid	NaCl	Sigma-Aldrich	S3014
Natriumthiosulfat	$Na_2S_2O_3$	Sigma-Aldrich	HT1005
Natriumdodecylsulfat (SDS)	$C_{12}H_{25}NaO_4S$	Sigma-Aldrich	L3771
Natriumhydrogencarbonat	$NaHCO_3$	Sigma-Aldrich	S5761
Natriumhydroxid	NaOH	Sigma-Aldrich	221465
Ovalbumin (OVA)		Sigma-Aldrich	A5253
Ovalbumin (OVA) endotoxinarm		Profos AG	321000
pNAG (p-Nitrophenyl-N-acetylglucosaminid)	$C_{14}H_{18}N_2O_8$	Sigma-Aldrich	N9376
Roti-load 1 (Probenpuffer für SDS-PAGE)		Carl-Roth GmbH & Co. KG	K929.1
Salzsäure	HCl	Sigma-Aldrich	H1758
Silbernitrat	$AgNO_3$	Sigma-Aldrich	209136
Stimulationspuffer		Bühlmann Laboratories AG	B-CAST-STP
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	$C_6H_{16}N_2$	Sigma-Aldrich	T9281
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	$C_4H_{11}NO_3$	Sigma-Aldrich	252859
Triton-X-100	$C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$	Sigma-Aldrich	T9284
Zitronensäure	$C_6H_8O_7$	Sigma-Aldrich	251275

Medien:

Caso-Agar	Oxoid GmbH	PO5012A
Fetales Kälberserum (FKS)	Invitrogen GmbH	26140
LB-Flüssigmedium	Carl Roth GmbH & Co. KG	X964.1

Minimal Essential Medium (MEM)	Invitrogen GmbH	42360081
RPMI 1640 Medium	Invitrogen GmbH	11879020

Kits:

Biotin Protein Labeling Kit	Roche	1418165/001
IgE-Quantifizierungskit (Maus)	BD Biosciences Pharmingen	555248
IgE-Quantifizierungskit (Ratte)	Biomol	E110-117
Leukotrien-Quantifizierungskit	Neogen	406410

## G 5 Verwendete Geräte

Chromatographieanlage	ECONO System	Bio-Rad
Durchflusszytometer	FACS Calibur	Becton Dickinson
Elektrophorese-Kammer	SE 300 mini	SERVA Electrophoresis GmbH
ELISA-Reader	EL808	BioTek
Eppendorfreaktionsgefäß-Schüttler	REAX 2000	Heidolph
Lyophilisationsanlage	LYOVAC GT2	FINN-Aqua
Photometer	Helios Gamma UV/VIS	Thermo Fisher
Pipetten	Research	Eppendorf
Stromversorgungsgerät für Elektrophorese und Westernblot	E815	Consort
Ultraschallbad	Sonorex Digitec DT 106	Bandelin
Ultraschallrührer	T25	IKA Labortechnik
Vortexer	REAX 2000	Heidolph
Waagen	MC 210P - Halbmikrowaage	Sartorius AG
Wärmeschrank	BP 500	memmert
Westernblot-Anlage	V20-SDB	Scie-Plas Ltd.
Zentrifugen	3K15 Biofuge pico Biofuge Stratos	Sigma Laborzentrifugen GmbH Heraeus Heraeus

## G 6 Abkürzungsverzeichnis

35S	35S-Promotor
A	Albatros (Kartoffelsorte)
AG	Antigen
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
aqua dest.	Demineralisiertes Wasser
AS	Aminosäure
BSA	Bovines Serum Albumin
<i>Can f 3</i>	Allergen aus dem Hund ( <i>Canis domesticus</i> )
CBI	Centre de Biochimie Structurale
CTxB	Choleratoxin Untereinheit B
D	Desiree (Kartoffelsorte)
<i>Dic v a</i>	Allergen aus dem bovinen Lungenwurm ( <i>Dictyocaulus viviparus</i> )
EAACI	Europäische Akademie für Allergologie und Klinische Immunologie
EBI	European Bioinformatics Institute
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
FKS	Fetales Kälberserum
GMP	Gentechnisch modifizierte Pflanze
HCl	Salzsäure
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G

KVP	Konjugatverdünnungspuffer
MEM	Minimal Essential Medium
MMP	Magermilchpulver
N	Numerus (Anzahl der Messungen)
NaOH	Natronlauge
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NIV	Nahe isogene Variante
NPT II	Neomycinphosphotransferase II
NZO	Nichtzielorganismus
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PIR	Protein Information Recource
POD	Peroxydase
PVDF	Poly-vinyl-di-fluorid
RPMI	Roswell Memorial Park Institute
SDAP	Sequence Database of Allergenic Proteins
SDS	Sodium-dodecyl-sulphate
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TMB	Tetramethylbenzidin
TM	Trade Mark
NCBI	National Center for Biotechnology Information
VP60	Virus-Protein 60 (Virushüll-Protein mit einer Molekulargröße von 60 kDa)
RBL	Rat basophilic leucemia (Zell-Linie)
RT	Raumtemperatur
WT	Wildtyp

## G 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung A.1: Einteilung der Unverträglichkeitsreaktionen nach den Empfehlungen der EAACI (Bruijnzeel-Koomen <i>et al.</i> 1995).....	5
Abbildung A.2: Entscheidungsbaum der IFBC/ILSI zur allergologischen Bewertung gentechnisch veränderter Pflanzen für die Lebensmittelproduktion (Metcalf <i>et al.</i> 1996) .	8
Abbildung A.3: FAO/WHO Entscheidungsbaum zur Bewertung der Allergenität von transgenen Proteinen in GMP (FAO/WHO 2001) .....	9
Abbildung A.4: Mögliches Schema zur vergleichenden Untersuchung der allergenen Aktivität und der Allergenität einer GMP und ihrer nahen isogenen Variante (NIV) nach Spök <i>et al.</i> (2005) .....	11
Abbildung A.5: Wirkprinzip des Cholera-toxins .....	17
Abbildung B.1: Reaktionsschema der Kopplung von NH <sub>2</sub> -reaktivem B-PE an Antikörper	44
Abbildung C.1: Kontrolle der Reinheit des aufgereinigten Cyanophycins aus transgenem Kartoffelmaterial (Albatros-PsbY-cy1-12) mittels SDS-PAGE .....	49
Abbildung C.2: Aufreinigung des Proteins NPTII, exprimiert in <i>E. coli</i> .....	50
Abbildung C.3: Verwendung des synthetischen Polypeptids aus den Aminosäureresten 250-264 der Sequenz des Proteins NPTII zur Herstellung spezifischer Antikörper .....	51
Abbildung C.4: Immunodetektion (Westernblot) von Cyanophycin, aufgereinigt aus transgenen <i>E. coli</i> (Prof. Lockau, HU Berlin) und Kartoffel ( <i>Albatros-PsbY-cy1-12</i> ; K. Neubauer; Universität Rostock), nach elektrophoretischer Trennung (SDS-PAGE, 12 %-iges Gel).....	52
Abbildung C.5: Darstellung der CTxB-Konzentration in Extrakten der Pflanzen <i>Albatros-CTxB-SEK-204</i> ( <i>A-CTxB-SEK-204</i> ) und <i>Albatros-CTxB-SEK-218</i> ( <i>A-CTxB-SEK-218</i> )....	54
Abbildung C.6: Verlauf der Standardkurven in den beiden verwendeten CTxB-ELISA-Systemen .....	55
Abbildung C.7: Berechnung des VP60-ELISA-Index („Zahner-Index“) des FLI .....	56
Abbildung C.8: Elektrophoretische Auftrennung und Immunodetektion von RHDV-Proteinen.....	56
Abbildung C.9: Darstellung der relativen VP60-Konzentration in Extrakten der Pflanzen <i>Desiree-VP60-SEK-6</i> ( <i>D-VP60-SEK-6</i> ) und <i>Desiree-VP60-SEK-17</i> ( <i>D-VP60-SEK-17</i> ) ...	57

Abbildung C.10: Darstellung der VP60-Konzentration von Kartoffelextrakten und RHDV-Proben anhand des Zahner-Index.....	58
Abbildung C.11: NPTII-Konzentrationen in Extrakten aller in dieser Arbeit untersuchten Kartoffellinien.....	59
Abbildung C.12: Elektronenmikroskopische Aufnahme (40.000 x) eines Schnittes einer Cyanophycin-exprimierenden Kartoffel.....	60
Abbildung C.13: Abbaukinetik des Modellproteins CTxB durch das Verdauungsenzym Pepsin, gemessen mit zwei unterschiedlichen Detektionssystemen.....	63
Abbildung C.14: Abbau des Modellproteins VP60 durch das Verdauungsenzym Pepsin.....	63
Abbildung C.15: Abbau des Modellproteins NPTII durch den Einfluss des Enzyms Pepsin.....	64
Abbildung C.16: Pepsin-Behandlung von gereinigtem Cyanophycin.....	65
Abbildung C.17: <i>In vivo</i> -Verdau des Modellproteins CTxB.....	66
Abbildung C.18: <i>In vivo</i> -Verdau des Modellproteins VP60 - Detektierte VP60-Konzentrationen in Kotextrakten und Urin der Versuchstiere ( <i>WF</i> = <i>Wiederfindung</i> ).....	67
Abbildung C.19: <i>In vivo</i> -Verdau des Modellproteins NPTII - Detektierte NPTII-Konzentrationen in Kotextrakten und Urin der Versuchstiere.....	68
Abbildung C.20: <i>In vivo</i> -Verdau der Modells substanz Cyanophycin.....	69
Abbildung C.21: Denaturierung des Modellproteins CTxB durch Hitze einwirkung.....	69
Abbildung C.22: Denaturierung des Modellproteins VP60 durch Hitze einwirkung.....	70
Abbildung C.23: Denaturierung des Modellproteins NPTII durch Hitze einwirkung.....	70
Abbildung C.24: Entwicklung des Gesamt-IgE Titers in der Maus nach Sensibilisierung mit verschiedenen Konzentrationen des Allergens Ovalbumin.....	76
Abbildung C.25: Entwicklung des Gesamt-IgE-Titers in der Maus nach Applikation mit verschiedenen Konzentrationen eines Extraktes des Kartoffelyophilisates der nahen isogenen Variante <i>Desiree</i> ( <i>D-NIV</i> ).....	77
Abbildung C.26: Ratio der Gesamt-IgE-Titer in den Rattenserum nach Fütterung mit Knollenmaterial verschiedener transgener Kartoffellinien und der nahen isogenen Varianten <i>Albatros</i> und <i>Desiree</i> .....	80
Abbildung C.27: Darstellung der 95 %-Konfidenzintervalle der Gesamt-IgE-Titer im Serum der Ratten nach 42 Tagen Fütterung mit transgenem und nahe isogenem Kartoffelmaterial.....	81
Abbildung C.28: Relative anti-OVA-IgE-Titer in den Seren der Ovalbumin-sensibilisierten <i>Balb/c-Mäuse</i> .....	82
Abbildung C.29: Relativer anti-OVA-IgE-Titer der Einzelindividuen der Versuchsgruppe 2.....	83
Abbildung C.30: IgE-Titer in Mäuseserum mit Reaktivität gegen Kartoffelproteine.....	85
Abbildung C.31: $\beta$ -Hexosaminidase-Freisetzung aus den RBL-Zellen durch Sensibilisierung mit Papain.....	87
Abbildung C.32: Hexosaminidase-Freisetzung aus RBL-Zellen durch Sensibilisierung mit OVA.....	88
Abbildung C.33: $\beta$ -Hexosaminidase-Freisetzung aus RBL-Zellen nach Sensibilisierung mit Kartoffelextrakt.....	90
Abbildung C.34: $\beta$ -Hexosaminidase-Freisetzung nach Behandlung der RBL-Zellen mit Positiv- und Negativseren und RBL-Medium und Sensibilisierung mit verschiedenen Konzentrationen an Kartoffel-Extrakt.....	91
Abbildung C.35: Streubild einer Vollblutprobe von Ratten nach Erythrozytenlyse.....	92
Abbildung C.36: Darstellung der B-PE- und der FITC-Fluoreszenz.....	93
Abbildung C.37: Verlagerung einer Population zwischen nicht stimulierten und stimulierten Zellen.....	94
Abbildung D.1: Entscheidungsbaum zur allergologischen Risikoanalyse von GMP.....	125
Abbildung G.1: Modulares Baukastensystem des Wachstumskernes BioOK zur Bewertung von GMP (Phase I).....	140
Abbildung G.2: Basisablauf der Risikobewertung im Wachstumskern BioOK (aus dem BioOK-Projektantrag 2008).....	141

Abbildung G.3: Entwicklung des Gesamt-IgE-Titers in der Maus nach Applikation mit verschiedenen Konzentrationen eines Extraktes des Kartoffellyophilisates der nahen isogenen Variante Albatros ( <i>A-NIV</i> ).....	157
Abbildung G.4: Entwicklung des Gesamt-IgE-Titers in der Maus nach Applikation mit verschiedenen Konzentrationen eines Extraktes des Kartoffellyophilisates der Linie Albatros –NPTII ( <i>A-35S-NPTII</i> ).....	157
Abbildung G.5: Entwicklung des Gesamt-IgE-Titers in der Maus nach Applikation mit verschiedenen Konzentrationen eines Extraktes des Kartoffellyophilisates der Linie Albatros-CTxB-SEK-204 ( <i>A-CTB-SEK-204</i> ) .....	158
Abbildung G.6: Entwicklung des Gesamt-IgE-Titers in der Maus nach Applikation mit verschiedenen Konzentrationen eines Extraktes des Kartoffellyophilisates der Linie Albatros-CTxB-SEK-218 ( <i>A-CTB-SEK-218</i> ) .....	158
Abbildung G.7: Entwicklung des Gesamt-IgE-Titers in der Maus nach Applikation mit verschiedenen Konzentrationen eines Extraktes des Kartoffellyophilisates einer Cyanophycin-exprimierenden Albatros-Linie ( <i>A-PsbY-cyeI-12</i> ).....	158
Abbildung G.8: Entwicklung des Gesamt-IgE-Titers in der Maus nach Applikation mit verschiedenen Konzentrationen eines Extraktes des Kartoffellyophilisates einer Cyanophycin-exprimierenden Albatros-Linie ( <i>A-PsbY-cyeI-23</i> ).....	159
Abbildung G.9: Entwicklung des Gesamt-IgE-Titers in der Maus nach Applikation mit verschiedenen Konzentrationen eines Extraktes des Kartoffellyophilisates der nahen isogenen Variante Desiree ( <i>D-NIV</i> ) .....	159
Abbildung G.10: Entwicklung des Gesamt-IgE-Titers in der Maus nach Applikation mit verschiedenen Konzentrationen eines Extraktes des Kartoffellyophilisates der Linie Desiree-NPTII ( <i>D-35S-NPTII</i> ).....	160
Abbildung G.11: Entwicklung des Gesamt-IgE-Titers in der Maus nach Applikation mit verschiedenen Konzentrationen eines Extraktes des Kartoffellyophilisates der Linie Desiree-VP60-SEK6 ( <i>D-VP60-SEK-6</i> ).....	160
Abbildung G.12: Entwicklung des Gesamt-IgE-Titers in der Maus nach Applikation mit verschiedenen Konzentrationen eines Extraktes des Kartoffellyophilisates der Linie Desiree-VP60-SEK-17 ( <i>D-VP60-SEK-17</i> ).....	160
Abbildung G.13: Verschiebung der PE-Fluoreszenzintensität von nicht aktiviertem Vollblut (A) und aktiviertem Vollblut (B); Abbildung aus Testkit PM IM3575-CD203c der Firma Immunotech .....	163
Abbildung G.14: Proteingehalte der 10 Kartoffellyophilisate bestimmt nach Kjeldahl (Gesamtprotein) und Bradford (TSP).....	164
Abbildung G.15: Darstellung eines Allergen-Multiparameter-Assay und Vergrößerung eines Teilbereiches .....	165
Abbildung G.16: Polyaspartatkette mit L-Argininresten.....	166
Abbildung G.17: Potenzielle Produkte, die aus dem Produkt Cyanophycin gewonnen werden können.....	167

## G 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle A 2.1: Pathogene Immunreaktionen nach Coombs und Gell (modifiziert von Schütt und Bröker, 2009).....	5
Tabelle B 1.1: Untersuchte Modellpflanzen .....	21
Tabelle B 2.1: Zusammensetzung der SDS-PAGE-Gele .....	25
Tabelle B 2.2: Futterherstellung für Allergenitätsstudien (orale Applikation) .....	39
Tabelle C 1.1: Zusammenfassung der Ergebnisse zur ELISA-Entwicklung .....	60
Tabelle C 2.1: Ergebnisse des <i>in silico</i> -Vergleichs des Modellproteins CTxB mit bekannten Allergenen, Identität von 6 aufeinanderfolgenden Aminosäuren.....	72
Tabelle C 2.2: Einteilung der CAP-Klassen für spezifisches IgE.....	73
Tabelle C 2.3: Can f 3 (e221)-positive Patientenseren - getestet auf Reaktivität mit dem Modellprotein CTxB .....	73
Tabelle C 2.4: Ergebnisse des Serumscreenings .....	74

Tabelle C 2.5: Unterschiede der Serum-IgE-Titer der <i>Balb/c Mäuse</i> über die Versuchsdauer, Vergleiche innerhalb der einzelnen Linien.....	78
Tabelle C 2.6: Unterschiede der Serum-IgE-Titer der <i>Balb/c Mäuse</i> über die Versuchsdauer, paarweiser Vergleich der transgenen Linien zur jeweiligen <i>NIV</i> .....	79
Tabelle C 2.7: Untersuchung der Mäuseseren mit dem $\beta$ -Hexosaminidase-Assay .....	89
Tabelle G 2.1: Bezeichnung und Herkunft der verwendeten Antigene (bekannte Allergene und Modellproteine).....	142
Tabelle G 2.2: Bezeichnung und Eigenschaften der verwendeten Modellprotein-spezifischen Antikörper.....	142
Tabelle G 2.3: Bezeichnung und Eigenschaften der sonstigen verwendeten Antikörper	143
Tabelle G 9.1: Immunisierungsschema für Hühner und Kaninchen zur Antikörperproduktion.....	150
Tabelle G 9.2: Werte zur Charakterisierung der CTxB-ELISA-Assays .....	150
Tabelle G 9.3: Werte zur Charakterisierung der VP60-ELISA-Assays.....	150
Tabelle G 9.4: NPTII-Konzentrationen in Extrakten der in dieser Arbeit untersuchten Kartoffeln .....	151
Tabelle G 9.5: Intra-assay des NPTII-ELISA.....	151
Tabelle G 9.6: Intra-assay des CTxB-GM1-ELISA .....	152
Tabelle G 9.7: Intra-assay des CTxB-IgG:IgG-ELISA.....	152
Tabelle G 9.8: Intra-assay des VP60-ELISA (FLI-Riems).....	152
Tabelle G 9.9: Intra-assay des VP60-ELISA (eigener Assay; IgG:IgY).....	152
Tabelle G 9.10: CTxB-Abbau durch Pepsin bestimmt mit dem CTxB- (IgG-IgG) und mit dem GM1-ELISA.....	153
Tabelle G 9.11: Abbau des Modellproteins CTxB durch Hitze.....	153
Tabelle G 9.12: VP60-Abbau durch Pepsin bestimmt mit dem IgG:IgY-ELISA.....	153
Tabelle G 9.13: Abbau des Modellproteins VP60 durch Hitze (bestimmt mit IgG:IgY-ELISA).....	154
Tabelle G 9.14: NPTII-Abbau durch Pepsin bestimmt mit dem IgG:IgY-ELISA .....	154
Tabelle G 9.15: <i>In-vivo</i> -Verdau der Modellproteine .....	154
Tabelle G 9.16: <i>In silico</i> -Vergleich der Modellproteine mit bekannten Allergenen .....	155
Tabelle G 9.17: <i>In silico</i> -Vergleich der Modellproteine mit bekannten Allergenen .....	156
Tabelle G 9.18: $\beta$ -Hexosaminidase-Freisetzung [%] - Papain-Sensibilisierung .....	161
Tabelle G 9.19: $\beta$ -Hexosaminidase-Freisetzung [%] der 6 OVA-sensibilisierten <i>Balb/c-Maus</i> -Gruppen.....	161
Tabelle G 9.20: Intra-Assay des $\beta$ -Hexosaminidase-Assay (ermittelt unter Verwendung von Seren Papain-sensibilisierter Tiere); hellgraue Felder: Positivkontrolle, dunkelgraue Felder: Negativkontrolle; weiße Felder: Probe; gestrichelte Felder: freie Kavitäten.....	161
Tabelle G 9.21: Mittlere Werte der $\beta$ -Hexosaminidase-Freisetzung nach Sensibilisierung der RBL-Zellen mit Kartoffel-Extrakt.....	162
Tabelle G 9.22: $\beta$ -Hexosaminidase-Freisetzung nach Sensibilisierung der RBL-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Kartoffel-Extrakt.....	162
Tabelle G 11.1: Proteinbestimmung der 10 Kartoffellyophilisate .....	164
Tabelle G 12.1: Zu verwendende Mengen an festem Ammoniumsulfat für eine fraktionierte Proteinfällung .....	165

## G 9 Datenübersicht

### G 9.1 Immunisierungen zur Antikörperproduktion

Zur Antikörperproduktion zum Einsatz im ELISA wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Legehennen und Kaninchen mit den untersuchten Modellproteinen bzw. Teilstücken dieser Proteine nach folgendem Schema immunisiert. Vor der Grundimmunisierung und nach der 3. Boosterung wurden den Tieren Blutproben zur Bestimmung des Antikörper-Titers entnommen.

**Tabelle G 9.1: Immunisierungsschema für Hühner und Kaninchen zur Antikörperproduktion**

Immunsierung	Tag	Proteinkonzentration
Grundimmunsierung	Tag 0	100 µg Protein / komplettes Adjuvants
Boosterung 1	Tag 14	100 µg Protein / inkomplettes Adjuvants
Boosterung 2	Tag 28	
Boosterung 3	Tag 36	
Eventuell Boosterung 4	Tag 50	

**G 9.2 ELISA-Entwicklung****Tabelle G 9.2: Werte zur Charakterisierung der CTxB-ELISA-Assays**

Verdünnungs- faktor	A-CTxB-SEK204		A-CTxB-SEK218		A-35S-205		A-NIV	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
	IgG-Sandwich-ELISA							
1	0,288	0,007	0,690	0,036	0,144	0,023	0,055	0,007
2	1,145	0,032	3,757	0,089	0,058	0,040	0,061	0,005
4	0,621	0,017	3,673	0,108	0,027	0,003	0,055	0,011
8	0,287	0,014	2,291	0,042	0,021	0,006	0,048	0,007
16	0,130	0,022	1,192	0,070	0,009	0,011	0,048	0,008
32	0,054	0,005	0,608	0,023	0,005	0,007	0,046	0,007
64	0,040	0,024	0,327	0,030	0,021	0,018	0,038	0,000
	GM1-ELISA							
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
1	1,377	0,070	0,723	0,032	0,019	0,001	0,022	0,002
2	1,841	0,017	3,560	0,103	0,025	0,000	0,035	0,023
4	0,999	0,039	3,266	0,212	0,017	0,001	0,025	0,010
8	0,523	0,025	2,148	0,120	0,028	0,004	0,028	0,012
16	0,291	0,015	1,307	0,027	0,029	0,000	0,027	0,003
32	0,178	0,008	0,816	0,034	0,030	0,006	0,028	0,011
64	0,116	0,012	0,469	0,036	0,034	0,002	0,035	0,002

**Tabelle G 9.3: Werte zur Charakterisierung der VP60-ELISA-Assays**

IgG-IgY-ELISA		RHDV		D-VP60- SEK6		D-VP60-SEK17		D-35S-6		D-NIV		VF	
MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD		
OD450-630													
A			1,607	0,058	1,521	0,021	1,582	0,024	0,033	0,002	0,042	0,004	1
B	Positiv- Kontrolle:		1,065	0,040	1,539	0,007	1,646	0,003	0,024	0,001	0,032	0,008	2
C	1,956	0,072	0,623	0,001	1,394	0,013	1,487	0,008	0,021	0,002	0,034	0,010	4
D			0,347	0,011	1,113	0,048	1,387	0,013	0,021	0,001	0,028	0,009	8
E	Negativ- Kontrolle:		0,185	0,001	0,803	0,036	1,088	0,007	0,020	0,001	0,023	0,003	16
F	0,223	0,014	0,103	0,006	0,539	0,006	0,760	0,007	0,018	0,000	0,022	0,001	32
G			0,059	0,001	0,345	0,020	0,479	0,035	0,020	0,000	0,021	0,000	64
H			0,021	0,000	0,021	0,001	0,022	0,001	0,022	0,001	0,024	0,001	Blank

Zahner-Indices IgG-IgY-

0,798		0,749		0,784		0		0
0,485		0,759		0,821		0		0
0,230		0,675		0,729		0		0
0,071		0,513		0,671		0		0
0		0,334		0,499		0		0
0		0,182		0,310		0		0
0		0,070		0,147		0		0
0		0		0		0		0

FLI Assay		RHDV		D-VP60-		D-VP60-SEK17		D-35S-6		D-NIV			
OD450-630	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	VF
A	Positiv-		1,657	0,013	1,557	0,047	1,710	0,033	0,071	0,002	0,081	0,007	1
B	2,439	0,080	1,125	0,003	1,577	0,005	1,840	0,020	0,098	0,002	0,095	0,007	2
C			0,717	0,001	1,421	0,010	1,733	0,008	0,106	0,006	0,104	0,006	4
D	Negativ-		0,439	0,005	1,134	0,001	1,488	0,019	0,108	0,003	0,108	0,009	8
E	0,107	0,005	0,302	0,018	0,880	0,009	1,145	0,031	0,110	0,001	0,116	0,006	16
F			0,192	0,000	0,625	0,001	0,827	0,006	0,110	0,001	0,119	0,000	32
G			0,148	0,004	0,388	0,012	0,525	0,006	0,107	0,001	0,116	0,004	64
H			0,107	0,005	0,110	0,001	0,117	0,002	0,115	0,001	0,122	0,004	Blank

Zahner-Indices FLI-

0,665		0,621		0,687		0,000		0,000
0,436		0,630		0,743		0,000		0,000
0,262		0,563		0,697		0,000		0,000
0,142		0,440		0,592		0,000		0,000
0,084		0,331		0,445		0,001		0,004
0,036		0,222		0,309		0,001		0,005
0,017		0,120		0,179		0,000		0,004
0,000		0,001		0,004		0,003		0,006

**Tabelle G 9.4: NPTII-Konzentrationen in Extrakten der in dieser Arbeit untersuchten Kartoffeln**

Linie	NPTII-Konzentration	
	[pg/ml]	[ng/ml]
A-NIV	114	0,1
A-35S-205	14400	14,4
A-CTxB-204	6792	6,8
A-CTxB-218	3637	3,6
A-PsbY-12	6141	6,1
A-PsbY-23	4405	4,4
D-NIV	262	0,3
D-35S-6	453	0,5
D-VP60-6	5163	5,2
D-VP60-17	17895	17,9

Die entwickelten ELISA-Systeme zum quantitativen Nachweis der Modellproteine mussten sich einer Analyse der Reproduzierbarkeit stellen. Dafür wurden Intra-Assays, bei denen eine definierte Probe und ein Blank auf einer Mikrotiterplatte mehrfach aufgetragen wurde. Aus den Ergebnissen der Probe konnten der Variationskoeffizient ermittelt werden. Dieser liefert eine prozentuale Aussage über den Schwankungsbereich einer Probe, wenn diese mehrfach in einem Assay untersucht wird.

**Tabelle G 9.5: Intra-assay des NPTII-ELISA**

(graue Felder: Blank; weiße Felder: Probe)

OD450-630nm	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,034	0,994	1,009	0,932	0,025	0,967	0,890	0,979	0,030	0,850	0,893	0,901
B	0,031	0,940	0,969	0,907	0,024	0,951	0,939	0,933	0,026	0,862	0,864	0,850
C	0,961	0,027	0,947	0,906	0,948	0,025	0,935	0,909	0,877	0,027	0,787	0,798
D	0,932	0,027	0,937	0,890	0,951	0,023	0,905	0,890	0,859	0,026	0,815	0,768
E	0,927	0,918	0,028	0,883	0,913	0,922	0,025	0,876	0,876	0,837	0,030	0,801
F	0,896	0,904	0,026	0,835	0,924	0,899	0,022	0,890	0,855	0,845	0,029	0,811
G	0,919	0,914	0,878	0,026	0,905	0,860	0,868	0,026	0,803	0,767	0,749	0,055
H	0,942	0,985	0,914	0,031	0,940	0,884	0,908	0,030	0,823	0,849	0,789	0,038

**Tabelle G 9.6: Intra-assay des CTxB-GM1-ELISA**  
(graue Felder: Blank; weiße Felder: Probe)

OD450-630nm	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	0,072	1,702	1,731	1,563	0,075	1,738	1,667	1,635	0,076	1,762	1,762	1,818
<b>B</b>	0,072	1,588	1,628	1,533	0,075	1,634	1,628	1,558	0,074	1,637	1,58	1,646
<b>C</b>	1,667	0,076	1,565	1,524	1,455	0,075	1,589	1,465	1,512	0,073	1,618	1,63
<b>D</b>	1,76	0,075	1,57	1,539	1,537	0,076	1,476	1,48	1,411	0,075	1,574	1,636
<b>E</b>	1,602	1,556	0,073	1,556	1,599	1,498	0,071	1,474	1,545	1,65	0,074	1,593
<b>F</b>	1,627	1,487	0,074	1,522	1,498	1,417	0,073	1,376	1,47	1,575	0,074	1,53
<b>G</b>	1,736	1,58	1,54	0,075	1,475	1,514	1,503	0,074	1,472	1,617	1,531	0,074
<b>H</b>	1,87	1,587	1,442	0,078	1,543	1,516	1,518	0,072	1,513	1,565	1,597	0,073

**Tabelle G 9.7: Intra-assay des CTxB-IgG:IgG-ELISA**  
(graue Felder: Blank; weiße Felder: Probe)

OD450-630nm	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	0,065	0,474	0,485	0,512	0,067	0,485	0,473	0,476	0,067	0,487	0,504	0,504
<b>B</b>	0,065	0,476	0,476	0,471	0,065	0,479	0,462	0,466	0,067	0,535	0,474	0,49
<b>C</b>	0,487	0,065	0,462	0,461	0,462	0,066	0,447	0,452	0,461	0,066	0,503	0,488
<b>D</b>	0,497	0,066	0,457	0,46	0,454	0,066	0,452	0,453	0,457	0,067	0,475	0,482
<b>E</b>	0,468	0,483	0,066	0,471	0,457	0,469	0,065	0,467	0,516	0,466	0,066	0,49
<b>F</b>	0,482	0,491	0,066	0,5	0,472	0,48	0,066	0,483	0,523	0,462	0,067	0,533
<b>G</b>	0,473	0,493	0,549	0,065	0,473	0,465	0,505	0,066	0,481	0,555	0,548	0,066
<b>H</b>	0,535	0,55	0,593	0,067	0,597	0,514	0,521	0,068	0,535	0,639	0,562	0,067

**Tabelle G 9.8: Intra-assay des VP60-ELISA (FLI-Riems)**

OD450-630nm	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	0,087	1,921	1,949	1,763	0,059	1,963	1,884	1,848	0,077	1,986	1,991	2,061
<b>B</b>	0,074	1,788	1,838	1,725	0,052	1,841	1,838	1,760	0,057	1,844	1,776	1,860
<b>C</b>	1,874	0,043	1,771	1,719	1,633	0,049	1,788	1,641	1,706	0,074	1,828	1,853
<b>D</b>	1,984	0,049	1,773	1,739	1,729	0,067	1,663	1,667	1,582	0,089	1,775	1,856
<b>E</b>	1,812	1,753	0,067	1,744	1,799	1,688	0,067	1,662	1,738	1,879	0,047	1,789
<b>F</b>	1,854	1,674	0,052	1,733	1,691	1,608	0,091	1,550	1,657	1,786	0,043	1,724
<b>G</b>	1,963	1,778	1,732	0,066	1,671	1,706	1,687	0,043	1,664	1,813	1,727	0,054
<b>H</b>	2,118	1,800	1,631	0,069	1,738	1,707	1,728	0,073	1,696	1,759	1,815	0,070

**Tabelle G 9.9: Intra-assay des VP60-ELISA (eigener Assay; IgG:IgY)**

OD450-630nm	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	0,113	1,459	1,485	1,389	0,115	1,487	1,433	1,414	0,126	1,505	1,519	1,559
<b>B</b>	0,115	1,383	1,409	1,341	0,112	1,415	1,398	1,355	0,152	1,449	1,377	1,430
<b>C</b>	1,443	0,118	1,355	1,329	1,281	0,118	1,362	1,287	1,322	0,113	1,417	1,419
<b>D</b>	1,511	0,121	1,359	1,339	1,334	0,111	1,291	1,296	1,253	0,115	1,371	1,421
<b>E</b>	1,385	1,365	0,109	1,357	1,375	1,317	0,108	1,302	1,378	1,419	0,119	1,393
<b>F</b>	1,409	1,326	0,128	1,357	1,314	1,270	0,126	1,245	1,331	1,365	0,125	1,382
<b>G</b>	1,479	1,386	1,400	0,119	1,305	1,319	1,343	0,147	1,307	1,453	1,395	0,131
<b>H</b>	1,607	1,429	1,365	0,155	1,437	1,357	1,365	0,141	1,371	1,478	1,445	0,165

### G 9.3 Abbaustudien

**Tabelle G 9.10: CTxB-Abbau durch Pepsin bestimmt mit dem CTxB- (IgG-IgG) und mit dem GM1-ELISA**

CTxB-	A-NIV				A-CTxB-204				A-CTxB-218			
	M 1	M 2	MW	SD	M 1	M 2	MW	SD	M 1	M 2	MW	SD
0	0,007	0,006	0,007	0,001	1,431	1,439	1,435	0,0057	4,619	4,627	4,623	0,0057
1	0,014	0,007	0,011	0,005	1,339	1,344	1,342	0,0035	4,532	4,592	4,562	0,0424
2	0,002	0,000	0,001	0,001	1,146	1,138	1,142	0,0057	4,301	3,939	4,120	0,2560
3	0,004	0,000	0,002	0,003	0,995	0,999	0,997	0,0028	3,899	3,287	3,593	0,4327
5	0,014	0,002	0,008	0,008	0,856	0,874	0,865	0,0127	3,22	3,255	3,238	0,0247
8	0,002	0,000	0,001	0,001	0,673	0,696	0,685	0,0163	2,558	2,576	2,567	0,0127
13	0,000	0,000	0,000	0,000	0,450	0,457	0,454	0,0049	1,953	1,658	1,806	0,2086
21	0,011	0,014	0,013	0,002	0,421	0,428	0,425	0,0049	1,667	1,524	1,596	0,1011
34	0,002	0,000	0,001	0,001	0,306	0,336	0,321	0,0212	1,142	1,019	1,081	0,0870
55	0,000	0,021	0,011	0,015	0,174	0,165	0,170	0,0064	0,545	0,602	0,574	0,0403
89	0,021	0,000	0,011	0,015	0,097	0,097	0,097	0,0000	0,325	0,303	0,314	0,0156

GM1-	A-NIV				A-CTxB-204				A-CTxB-218			
	M 1	M 2	MW	SD	M 1	M 2	MW	SD	M 1	M 2	MW	SD
0	0,004	0,005	0,005	0,001	1,403	1,421	1,412	0,0127	4,623	4,654	4,639	0,0219
1	0,006	0,002	0,004	0,003	1,226	1,232	1,229	0,0042	4,395	4,452	4,424	0,0403
2	0,000	0,003	0,002	0,002	1,053	1,025	1,039	0,0198	3,453	3,418	3,436	0,0247
3	0,003	0,010	0,007	0,005	0,966	0,978	0,972	0,0085	3,145	3,201	3,173	0,0396
5	0,003	0,004	0,004	0,001	0,773	0,756	0,765	0,0120	2,534	2,647	2,591	0,0799
8	0,003	0,001	0,002	0,001	0,546	0,540	0,543	0,0042	1,689	1,752	1,721	0,0445
13	0,010	0,013	0,012	0,002	0,515	0,512	0,514	0,0021	1,425	1,428	1,427	0,0021
21	0,014	0,010	0,012	0,003	0,409	0,428	0,419	0,0134	0,847	0,845	0,846	0,0014
34	0,005	0,000	0,003	0,004	0,282	0,279	0,281	0,0021	0,354	0,341	0,348	0,0092
55	0,005	0,006	0,006	0,001	0,235	0,240	0,238	0,0035	0,254	0,242	0,248	0,0085
89	0,004	0,005	0,005	0,001	1,519	1,501	1,510	0,0127	4,820	4,785	4,803	0,0247

**Tabelle G 9.11: Abbau des Modellproteins CTxB durch Hitze**

Zeit	M 1 [ $\mu\text{g/ml}$ ]	M 2 [ $\mu\text{g/ml}$ ]	MW	SD
0	3,804	4,812	4,308	0,713
1	3,409	3,699	3,554	0,205
2	2,343	2,522	2,433	0,127
3	0,245	0,262	0,254	0,012
4	0,004	0,001	0,003	0,002
5	0,014	0,014	0,014	0,000
6	0,020	0,028	0,024	0,006
7	0,016	0,016	0,016	0,000
8	0,019	0,019	0,019	0,000
9	0,017	0,017	0,017	0,000
10	0,033	0,033	0,033	0,000

**Tabelle G 9.12: VP60-Abbau durch Pepsin bestimmt mit dem IgG:IgY-ELISA**

D-VP60-SEK-17		D-VP60-SEK-6		D-NIV	
MW	SD	MW	SD	MW	SD
2,3798	0,0773	2,2971	0,0463	0,0353	0,0093
1,7896	0,2087	1,8390	0,0019	0,0079	0,0037
1,4672	0,0580	1,3312	0,0241	0	0,0111
0,4235	0,0116	0,3887	0,0204	0	0,0056
0,3825	0,0116	0,3455	0,0111	0	0,0037
0,0984	0	0,0510	0,0130	0	0,0167
0	0	0	0,0093	0	0,0130
0	0	0	0,0296	0	0,0074
0	0	0	0,0056	0	0,0093
0	0	0	0,0130	0	0,0204

**Tabelle G 9.13: Abbau des Modellproteins VP60 durch Hitze (bestimmt mit IgG:IgY-ELISA)**

D-VP60-SEK-17		D-VP60-SEK-6		D-NIV	
MW	SD	MW	SD	MW	SD
3,007	0,044	0,019	0,023	0	0
1,806	0,100	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0

**Tabelle G 9.14: NPTII-Abbau durch Pepsin bestimmt mit dem IgG:IgY-ELISA**

Reaktionszeit	A-NIV		A-35S-205		A-PsbY-cyel-12		A-PsbY-cyel-23	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
0	0	0	991,547	6,402	309,690	7,965	373,349	0,000
1	0	0	380,087	4,423	122,408	0,000	150,456	11,411
2	0	0	260,881	3,782	107,394	1,636	93,481	6,026
3	0	0	173,808	0,542	40,167	1,155	89,992	6,582
5	0	0	146,881	2,731	0	0	21,347	3,050
8	0	0	67,696	4,079	0	0	0	0
13	0	0	16,817	2,079	0	0	0	0
21	0	0	1,643	0,964	0	0	0	0
34	0	0	0	0	0	0	0	0
55	0	0	0	0	0	0	0	0
89	0	0	0	0	0	0	0	0

**Tabelle G 9.15: In-vivo-Verdau der Modellproteine**

	CTxB-Kotproben		CTxB-Urinproben	
	MW	SD	MW	SD
Altromin	0,038	0,033	0,007	0,013
A-NIV 15 %	0,036	0,040	0,014	0,034
A-CTxB 5 %	0,068	0,047	0,029	0,022
A-CTxB 15 %	0,075	0,047	0,076	0,088

VP60-Proben

	MW	SD
Kot-NIV	0,000	0,000
Kot-5%	0,000	0,000
Kot-15%	0,119	0,160
Urin-NIV	1,367	0,346
Urin-5%	0,751	0,282
Urin-15%	1,446	0,483
WF Kot	7,457	1,083
WF Urin	7,236	0,496
WF Sollwert	5,000	

### G 9.4 Sequenzvergleich

**Tabelle G 9.16: *In silico*-Vergleich der Modellproteine mit bekannten Allergenen**

Homologien in einem sich fortbewegenden Fenster von 80 Aminosäuren; der besseren Übersichtlichkeit halber werden lediglich Alignments  $\geq 25\%$  dargestellt; Alignments made with FASTA 3.45

Protein	35 % Homologie in 80 AS-Fenster					
	Alignment	Homologie [%]	Allergen	Sequence	Herkunft	Proteinart
VP60 (sequenziertes Protein)	9	25,00	<i>Asp f 7</i>	O42799	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Allergen Asp f 7
	181-183 188-192 193	25,00 26,25 27,50	<i>Ory s1</i>	AAG1359 6	<i>Oryza sativa</i>	putatives Pollen Allergen; Beta Expansin
	285 286-289 301	30,00 28,75 28,75	<i>Ory s1</i>	AAF72990	<i>Oryza sativa</i>	
	194	26,25	<i>Cand a 1</i>	P43067	<i>Candida albicans</i>	Alcohol dehydrogenase 1
	237-251 271 274-276 277	25,00 27,50 27,50 30,00	<i>Hev b 6.01</i>	P02877	<i>Hevea brasiliensis</i>	Latex; Pro-hevein
	272-273 278-281	31,25 28,75	<i>Cap a 1</i>	AAG3408 7	<i>Capsicum annuum</i> ; Bell pepper	PR5-like Protein (pathogenesis related protein)
	292-298	25,00	<i>Gly m 2</i>	AAA5017 5	<i>glycine max</i> (Sojabohne)	cytokinin induced message
	341-342 343-347	26,25 25,00	<i>Hev b 8</i>	Q9M7M8	<i>Hevea brasiliensis</i>	Profilin-5
	373 374-375 376-391 392-396 397-402 403-404 405-406 425	25,00 26,25 27,50 28,75 30,00 28,75 27,50 25,00	<i>Lol p 5</i>	Q40237	<i>Lolium perenne</i> (Gras)	Major Pollen Allergen
	407-411 412 413 414-417 418-424 426 427 428-429	30 28,75 27,50 28,75 30,00 27,50 28,75 27,50	<i>Phl p 5.0101</i>	CA52753	<i>Phleum pratense</i> (Gras); timothy grass	Pollen Allergen
	468-469 470-473	26,25 27,50	<i>Asp f 13</i>	P28296	<i>Aspergillus fumigatus</i> ( <i>Sartorya fumigata</i> )	Oryzin (Precursor), Alkaline protease; Elastase; Elastinolytic serine proteinase

	490-493	28,75	<i>Asp f 15</i>	O60022	<i>Aspergillus fumigatus</i> ( <i>Sartorya fumigata</i> )	Allergen f 15
VP60 Sequenz nach UniProt Datenbank (zusätzliche Treffer)	356-357	25,00	<i>Ara h 8</i>	AAQ91847	<i>Arachis hypogaea</i> (Peanut)	Allergen Ara h 8
CTxB (sequenziertes Protein)	30-31	25,00	<i>Der p 11</i>	AAO73464	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> ; europäische Hausstaubmilbe	Paramyosin
NPT II - Sequenz nach UniProt Datenbank	19-20	26,25	<i>Aed a 2</i>	AAA29348	<i>Aedes aegyptii</i> ; Gelbfieber-Moskito	37 kDa salivary gland allergen Aed a 2 [Precursor]; Protein D7; Allergen Aed a 2
	84-91 98-101	25,00 25,00	<i>Mim n 1</i>	AAG08989	<i>Mimachlamys nobilis</i> ; Muschel	Tropomyosin
	85-91 98	26,25	<i>Ana o 1.0102</i>	AAM73729	<i>Anacardium occidentale</i> ; Cashew-Nuss	vicilin-like protein; Cupin-Domain

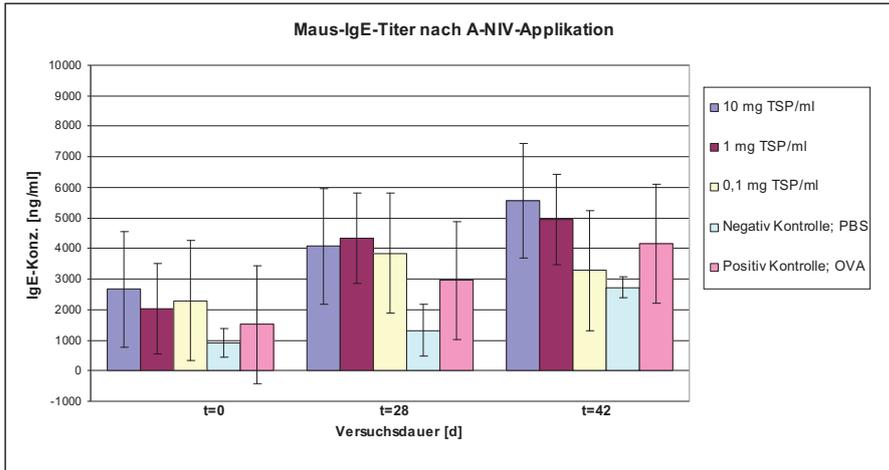
**Tabelle G 9.17: In silico-Vergleich der Modellproteine mit bekannten Allergenen**

Identität von 6 aufeinanderfolgenden Aminosäuren; Alignments made with FASTA 3.45 (Stand: August 2010)

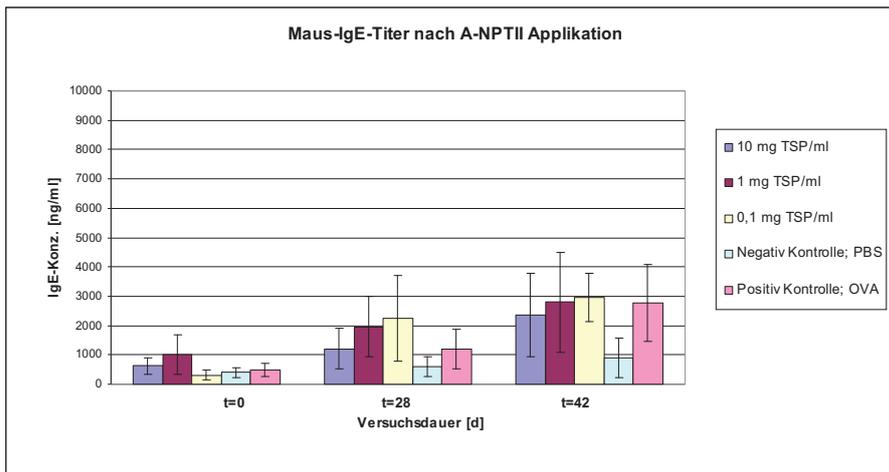
Protein	Identität bei 6 aufeinanderfolgenden AS			
	Allergen	Sequenz	Herkunft	Proteinart
VP60 (sequenziertes Protein)	kein Treffer	kein Treffer	kein Treffer	kein Treffer
VP60 Sequenz nach UniProt Datenbank (zusätzliche Treffer)	kein Treffer	kein Treffer	kein Treffer	kein Treffer
CTxB (sequenziertes Protein)	<i>Can f 3</i>	P49822	<i>Canis familiaris</i> ( <i>Canis domesticus</i> ); Hund	Serum Albumin (Precursor)
	<i>Dic v a</i>	AAC47403	<i>Dictyocaulus viviparus</i> ; Boviner Lungenwurm	Lipid-bindendes Protein; Nematode Polyprotein Antigen Precursor

CTxB - Sequenz nach UniProt Datenbank	hier nur Treffer für <i>Can f 3</i> , da 1 Aminosäureaustausch			
NPT II - Sequenz nach UniProt Datenbank	kein Treffer	kein Treffer	kein Treffer	kein Treffer

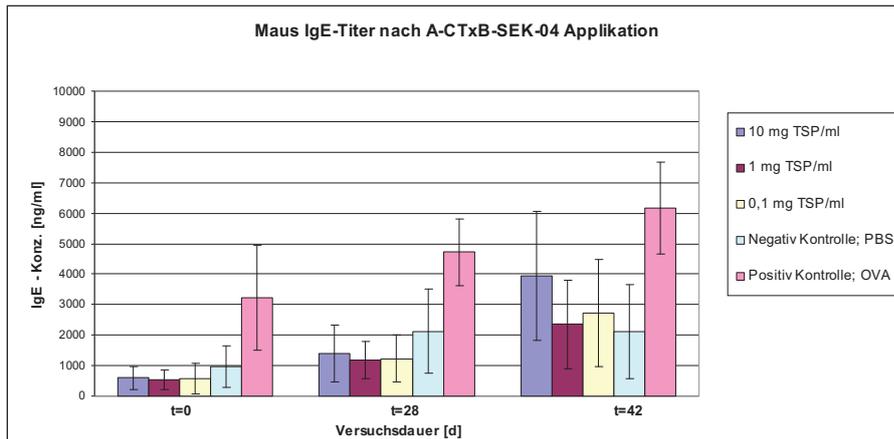
**G 9.5 Sensibilisierungsstudien – *Balb/c* Maus**



**Abbildung G.3: Entwicklung des Gesamt-IgE-Titers in der Maus nach Applikation mit verschiedenen Konzentrationen eines Extraktes des Kartoffelyophilisates der nahen isogenen Variante Albatros (A-NIV)**  
 N = 10 Seren, Doppelbestimmungen

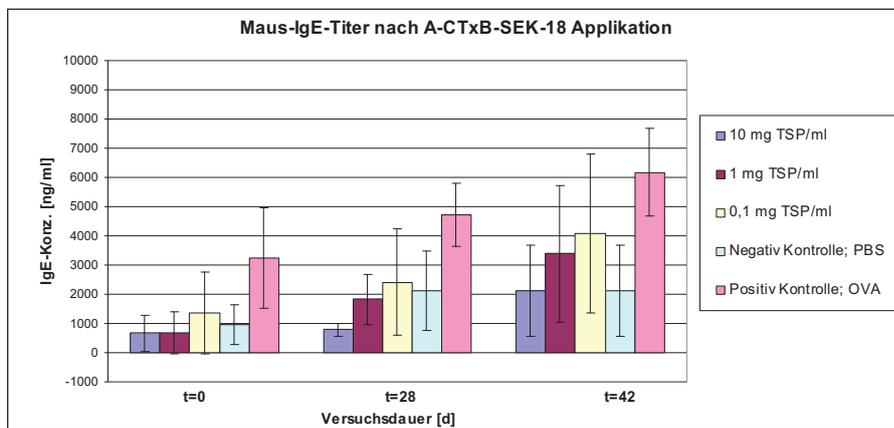


**Abbildung G.4: Entwicklung des Gesamt-IgE-Titers in der Maus nach Applikation mit verschiedenen Konzentrationen eines Extraktes des Kartoffelyophilisates der Linie Albatros –NPTII (A-35S-NPTII)**  
 N = 10 Seren, Doppelbestimmungen



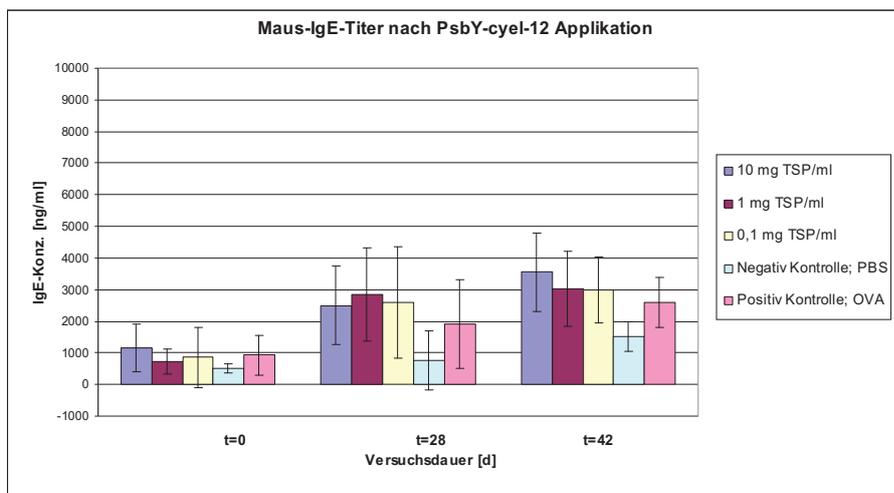
**Abbildung G.5: Entwicklung des Gesamt-IgE-Titers in der Maus nach Applikation mit verschiedenen Konzentrationen eines Extraktes des Kartoffellyophilisates der Linie Albatros-CTxB-SEK-204 (A-CTB-SEK-204)**

N = 10 Seren, Doppelbestimmungen



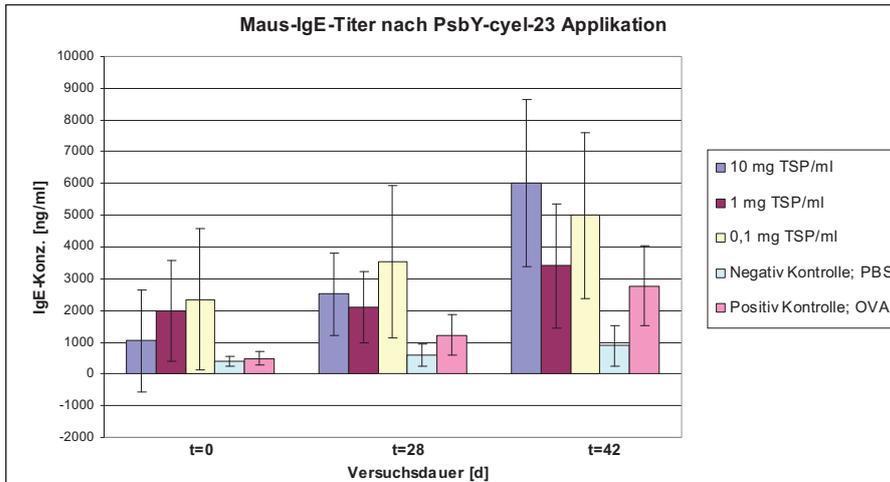
**Abbildung G.6: Entwicklung des Gesamt-IgE-Titers in der Maus nach Applikation mit verschiedenen Konzentrationen eines Extraktes des Kartoffellyophilisates der Linie Albatros-CTxB-SEK-218 (A-CTB-SEK-218)**

N = 10 Seren, Doppelbestimmungen

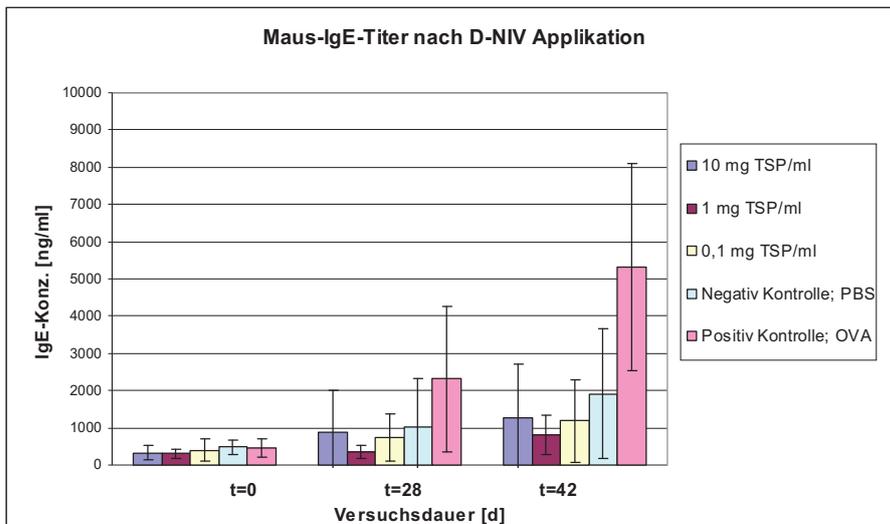


**Abbildung G.7: Entwicklung des Gesamt-IgE-Titers in der Maus nach Applikation mit verschiedenen Konzentrationen eines Extraktes des Kartoffellyophilisates einer Cyanophycin-exprimierenden Albatros-Linie (A-PsbY-cyel-12)**

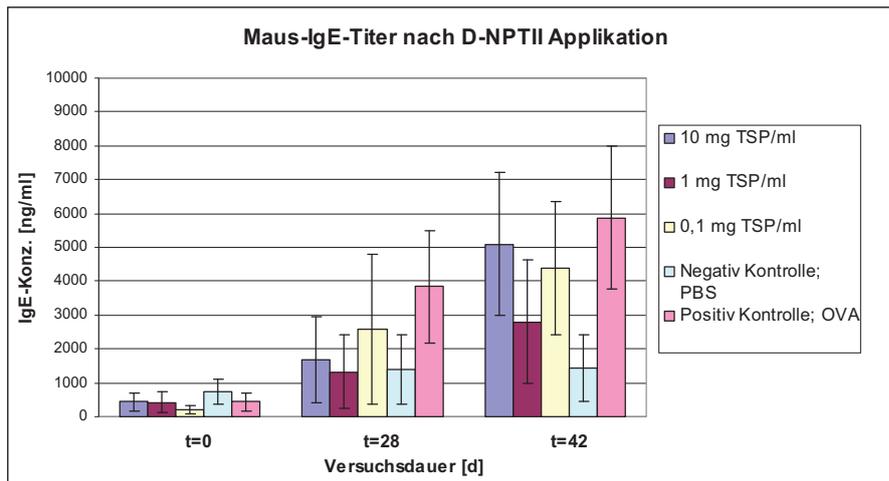
N = 10 Seren, Doppelbestimmungen



**Abbildung G.8: Entwicklung des Gesamt-IgE-Titers in der Maus nach Applikation mit verschiedenen Konzentrationen eines Extraktes des Kartoffellyophilisates einer Cyanophycin-exprimierender Albatros-Linie (*A-PsbY-cyeI-23*)**  
N = 10 Seren, Doppelbestimmungen

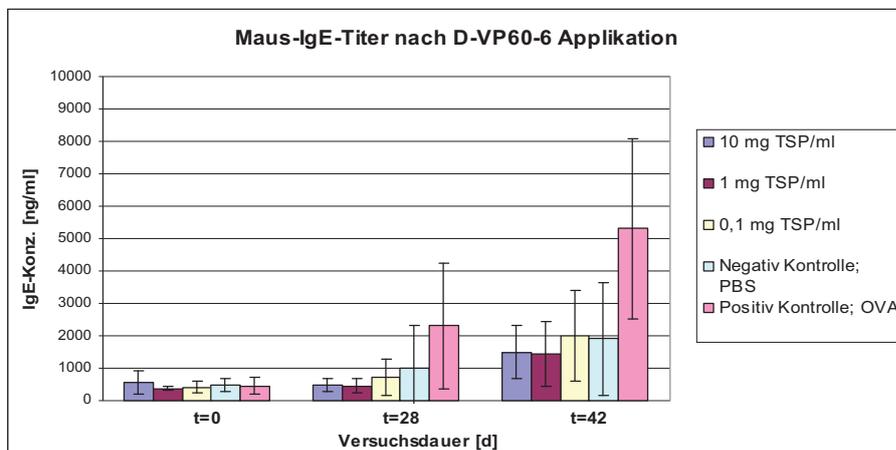


**Abbildung G.9: Entwicklung des Gesamt-IgE-Titers in der Maus nach Applikation mit verschiedenen Konzentrationen eines Extraktes des Kartoffellyophilisates der nahen isogenen Variante Desiree (*D-NIV*)**  
N = 10 Seren, Doppelbestimmungen



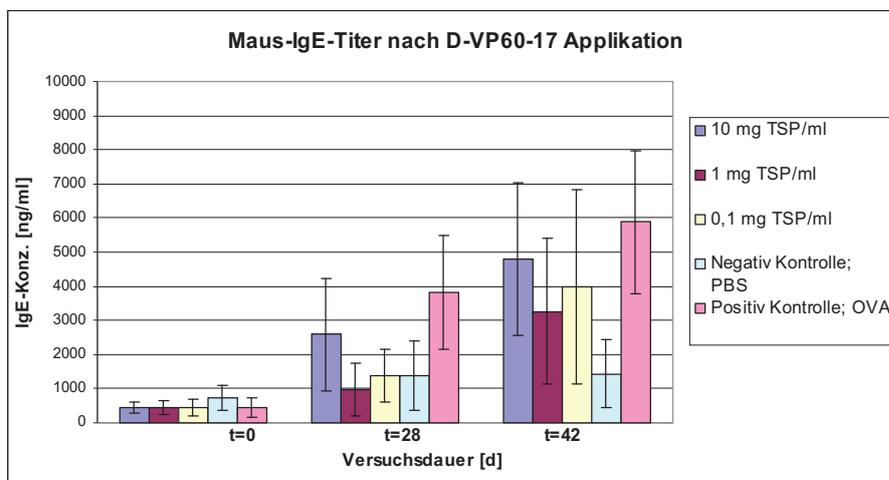
**Abbildung G.10: Entwicklung des Gesamt-IgE-Titers in der Maus nach Applikation mit verschiedenen Konzentrationen eines Extraktes des Kartoffellyphilisates der Linie Desiree-NPTII (D-35S-NPTII)**

N = 10 Seren, Doppelbestimmungen



**Abbildung G.11: Entwicklung des Gesamt-IgE-Titers in der Maus nach Applikation mit verschiedenen Konzentrationen eines Extraktes des Kartoffellyphilisates der Linie Desiree-VP60-SEK6 (D-VP60-SEK-6)**

N = 10 Seren, Doppelbestimmungen



**Abbildung G.12: Entwicklung des Gesamt-IgE-Titers in der Maus nach Applikation mit verschiedenen Konzentrationen eines Extraktes des Kartoffellyphilisates der Linie Desiree-VP60-SEK-17 (D-VP60-SEK-17)**

N = 10 Seren, Doppelbestimmungen



**Tabelle G 9.21: Mittlere Werte der  $\beta$ -Hexosaminidase-Freisetzung nach Sensibilisierung der RBL-Zellen mit Kartoffel-Extrakt**

Konz. [mg/ml]	MW	SD
PBS	11,582	1,205
0,1	9,865	1,244
1	9,335	0,995
10	9,295	1,162

**Tabelle G 9.22:  $\beta$ -Hexosaminidase-Freisetzung nach Sensibilisierung der RBL-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Kartoffel-Extrakt**

VF	TSP [mg/ml]	Pos		Neg		ohne Serum	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD
10	2,030	54,466	13,938	50,702	4,585	58,453	11,051
20	0,999	37,988	5,102	38,772	3,924	37,954	3,418
40	0,502	24,433	4,885	19,895	1,439	23,508	4,659
80	0,252	16,790	1,935	16,989	1,428	14,729	0,414
160	0,129	13,988	2,046	16,394	1,914	13,360	1,201
320	0,068	14,664	1,607	11,563	0,824	15,135	2,904
640	0,035	11,520	1,043	11,779	0,320	12,749	2,837

## G 10 Basophiler Degranulationstest

### Vorversuche mit human-reaktiven Antikörpern

Die ersten Untersuchungen zum Nachweis gebundener spezifischer IgE-Antikörper auf basophilen Zellen wurden mit heparinisierten Vollblutproben von mit OVA-sensibilisierten *Balb/c-Mäusen* durchgeführt. Zur Detektion der Fc $\epsilon$ RI-Rezeptor gebundenen IgE-Antikörper an der Oberfläche der basophilen Zellen und der allergiespezifischen Oberflächenmoleküle CD63 bzw. CD203c wurden Antikörper eingesetzt, die gegen humane Strukturen gerichtet sind. Aufgrund der Strukturähnlichkeit der Oberflächenmoleküle CD63 und CD203c aus Maus, Ratte und Mensch sollte untersucht werden, ob diese Allergiemarker mit human-reaktiven Antikörpern auch in murinem Untersuchungsmaterial nachweisbar sind.

Für diese Vorversuche wurde Untersuchungsmaterial von Mäusen, die nach OVA-Applikation einen stark erhöhten Gesamt-IgE-Titer aufwiesen, verwendet. Die heparinisierte Vollblutprobe wurde nach Laborvorschrift der Laborpraxis für Immunologie Dr. Walraph behandelt. 90  $\mu$ l Vollblut wurden mit 10  $\mu$ l Allergenlösung (OVA; Allergenstandard; Fa. BD) bzw. 10  $\mu$ l PBS mit 5 mmol Mg<sup>2+</sup> und Ca<sup>2+</sup> (Negativkontrolle) oder 10  $\mu$ l anti-IgE-Lösung (Positivkontrolle) versetzt. Nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurde dem Ansatz 1 ml 20 mmol PBS-EDTA hinzugegeben und die Probe wurde bei RT für 7 Minuten bei 1200 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und zu dem Pellet wurden jeweils 10  $\mu$ l fluoreszenzmarkierte Antikörperlösungen (anti-CD63-FITC und anti-IgE-PE) pipettiert. Nach 15 Minuten Inkubation im Dunkeln bei RT wurde den Ansätzen je 1 ml Lysepuffer (Lysereagenz Fa. BD coulter) hinzupipettiert und die Proben wurden weitere 10 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in je 2 ml Cell-Wash-Buffer (2 mg/ml BSA in PBS - Fa. BD coulter) resuspendiert und bei RT für 7 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet wurde in 250  $\mu$ l Cell-Wash-Buffer

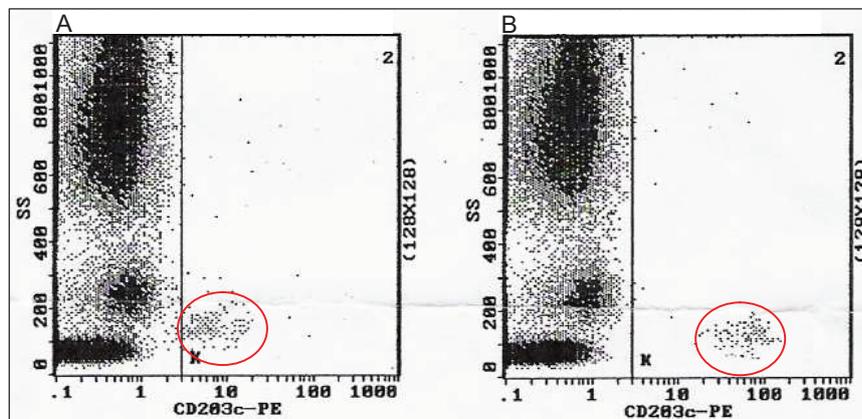
aufgenommen und zur Bestimmung am Durchflusszytometer eingesetzt (BD FACS coulter).

Es wurden Messungen an Blutproben von 9 OVA-sensibilisierten Mäusen durchgeführt. Jeweils eine Negativkontrolle, eine Positivkontrolle und Bestimmungen mit 3 Konzentrationen an OVA (1:10; 1:20 und 1:100) wurden gemessen.

Die Ergebnisse dieser Vorversuche lassen keine eindeutige Aussage darüber zu, ob nach Stimulation mit dem Allergen OVA mehr Zellen CD63 exprimieren als nicht stimulierte Zellen. Auch die Messungen der Positivkontrollen ließen keinen Unterschied zu den Negativkontrollen erkennen.

Da mit dieser Methode keine Aktivierung der basophilen Zellen weder mit dem Allergen OVA noch mit der Positivkontrolle anti-IgE-Antikörper (human) nachgewiesen werden konnte, wurde eine zweite Strategie untersucht. Dabei wurde anstelle des anti-gp53-Antikörpers (anti-CD63) ein Antikörper mit Reaktivität gegen das allergiespezifische Oberflächenantigen CD203c auf den basophilen Zellen und als weitere Positivkontrolle FMLP eingesetzt. FMLP (N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin) ist ein Chemoattraktant, der polymorphkernige und mononukleäre Zellen aktivieren kann (Panaro, Mitolo, 1999). So wird FMLP unter anderem in der Allergiediagnostik als Positivkontrolle zur Stimulation von basophilen Zellen und Mastzellen eingesetzt.

Der Versuch, bei dem ein PE-markierter anti-CD63-Antikörper zum Einsatz kam, basiert auf einem kommerziellen Testkit der Firma Immunotech. Bei dieser Methode wird lediglich eine (PE-Fluoreszenz) detektiert. Aktivierte und nicht aktivierte Proben können anhand einer Verschiebung der PE-Fluoreszenzintensität unterschieden werden.



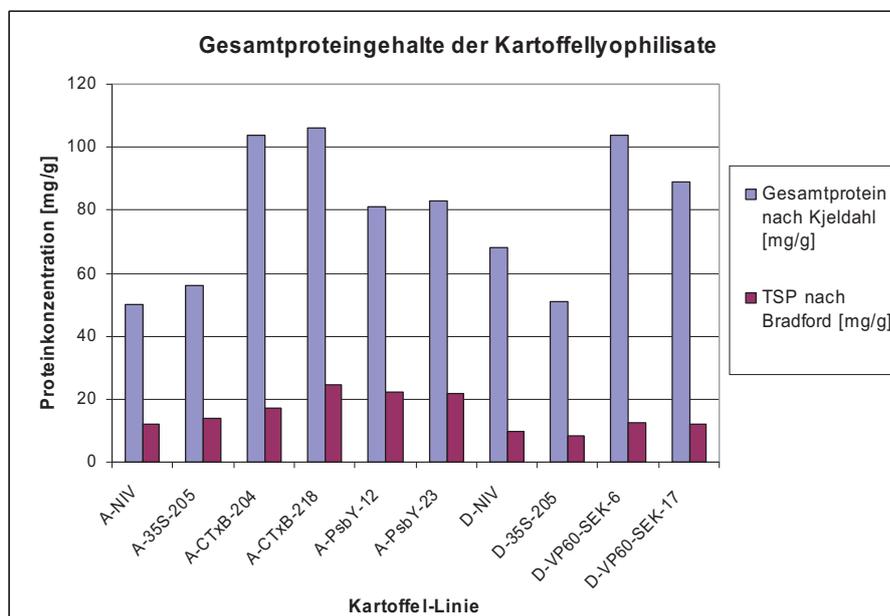
**Abbildung G.13:** Verschiebung der PE-Fluoreszenzintensität von nicht aktiviertem Vollblut (A) und aktiviertem Vollblut (B); Abbildung aus Testkit PM IM3575-CD203c der Firma Immunotech

Auch mit dieser Methode ließen sich keine Unterschiede zwischen Negativ- und Positivkontrolle und den OVA-behandelten Proben detektieren.

## G 11 Proteingehalte der Kartoffelyophilisate

**Tabelle G 11.1: Proteinbestimmung der 10 Kartoffelyophilisate**

Konstrukt	Proteingehalt (Kjeldahl)		TSP (Bradford)
	g/100g	mg/g	[mg/g]
A-NIV	5,0	50,0	12,12
A-35S-205	5,6	56,0	13,92
A-CTxB-204	10,4	104,0	17,16
A-CTxB-218	10,6	106,0	24,60
A-PsbY-12	8,1	81,0	22,45
A-PsbY-23	8,3	83,0	22,00
D-NIV	6,8	68,0	9,86
D-35S-205	5,1	51,0	8,25
D-VP60-SEK-6	10,4	104,0	12,29
D-VP60-SEK-17	8,9	89,0	12,07



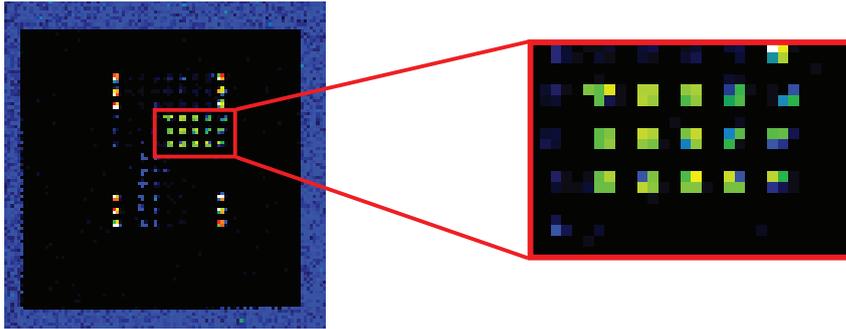
**Abbildung G.14: Proteingehalte der 10 Kartoffelyophilisate bestimmt nach Kjeldahl (Gesamtprotein) und Bradford (TSP)**

Kjeldahl: Einzelbestimmungen; Bradford: Doppelbestimmungen

## G 12 Hilfsmittel

### G 12.1 Multiparameter-Assay

Im Rahmen eines Forschungsprojektes der Firma BIOSERV A. & M. GmbH wurde ein Multiparameter-Assay zum Nachweis von spezifischem IgE und IgG im Serum sensibilisierter Labormäuse entwickelt. Zur Erstellung einer Standardreihe für das IgE-Mess-System wurde das Allergen TNP (Trinitrophenyl) konjugiert an BSA in fünf Konzentrationen von an die feste Phase gekoppelt. Der Nachweis erfolgte nach Inkubation mit Maus-anti-TNP-IgE mit fluoreszenzmarkiertem anti-Maus-IgE. Wie in Abbildung G.15 zu erkennen, liefern die verschiedenen gespotteten Allergenkonzentrationen unterschiedlich starke Fluoreszenz-Signale. Diese Verdünnungsreihe dient als Positiv- und Funktionalitätskontrolle im Multiparameter-Assay.



**Abbildung G.15: Darstellung eines Allergen-Multiparameter-Assay und Vergrößerung eines Teilbereiches**

Im vergrößerten Teilbereich ist das an BSA konjugierte Allergen TNP in fünf verschiedenen Konzentrationen (v.l.n.r.: 500 µg/ml; 250 µg/ml; 125 µg/ml; 62,5 µg/ml; 31,25 µg/ml) jeweils in Dreifachbestimmung gespottet.

## G 12.2 Fraktionierte Fällung

**Tabelle G 12.1: Zu verwendende Mengen an festem Ammoniumsulfat für eine fraktionierte Proteinfällung**

	Endkonzentration an $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (% Sättigung)																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
	Zuzugebende $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Menge in g pro l																
0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697
5	79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662
10	53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627
15	26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592
20	0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557
25		0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522
30			0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488
35				0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453
40					0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418
45						0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383
50							0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348
55								0	30	61	93	127	161	197	235	273	313
60									0	31	62	95	129	164	201	239	279
65										0	31	63	97	132	168	205	244
70											0	32	65	99	134	171	209
75												0	32	66	101	137	174
80													0	33	67	103	139
85														0	34	68	105
90															0	34	70
95																0	35
100																	0
↑																	
	Anfangskonzentration an $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (% Sättigung)																

## G 13 Proteinsequenzen

### VP60-SEK: 588 AS

sequenziert:

MASSEKARTAPQAGAAGTATTASVPGTTTDDGMDPGVVATTSVVTAESSASIASIATAGIGGPPQQV  
DQ  
QETWRTNFYNDVFTWSVADAPGSILYTVQHSPQNNPFTAVLSQMYAGWAGGMQFRFIVAGSG  
VF  
GGRLVAIVIPPGIEIGPGLEVRQFPVVIDARSLEPVTITMPDLRPNMYHPTGDPGLVPTLVLSVYN  
NLI

NPFGGSTSAIQVTVETRPSEDFEFVMIRTPSSKTVDSIYPAGLLTTPVLTGVGNDNRWNGQIVGLQ  
 PV  
 PGGFSTCNRHWNLNGSTYGWSSPRFADIDHRRGSASYPGSNATNVLQFWYANAGSAIDNPISQV  
 AP  
 DGFPDMSFVFPNGPGIPAAGWVGFAGIWNNSNGAPNVTTVQAYELGFATGAPGNLQPTTNTPGS  
 QT  
 VAKSIYAVVTGTAQNPAGLFVMASGVISTPSANAITYTPQPDRIVTTPGTPAAAPVGKNTPIMFASV  
 VR  
 RTGDVNATAGSANGTQYGTGSQPLPVTIGLSLNNYSSALMPGQFFVWQLTFASGFMEIGLSVDGY  
 FY  
 AGTGASTTLIDLTELIDVRPVGPRPSKSTLVFNLGGTANGFSYVSEKDEL

Sequenz laut Datenbank UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9WJS3>)  
 Capsid structural protein VP60 579 AS; 60,26 kDa

MEGKARTAPQ AGAAGTATTA SVPGTTTTDGM DPGVVATTSV VTAENSSASI ATAGIGGPPQ  
 QVDQQETWRT NFYYNDVFTW SVADAPGSIL YTVQHSPQNN PFTAVLSQMY AGWAGGMQFR  
 FIVAGSGVFG GRLVAAVIPP GIEIGPGLV RQFPHVVIDA RSLEPVTITM PDLRPNMYHP  
 TGDPLVPTL VLSVYNNLIN PFGGSTSAIQ VTVETRPSED FEFVMIRTPS SKTVDSIYPA  
 GLLTTPVLTG VGNDNRWNGQ IVGLQVPVGG FSTCNRHWNL NGSTYGWSSP RFADIDHRRG  
 SASYPGSNAT NVLQFWYANA GSAIDNPISQ VAPDGFDPMS FVFPNGPGIP AAGWVGFAGI  
 WNSNSGAPNV TTVQAYELGF ATGAPGNLQP TTNTSGSQTV AKSIYAVVTG TAQNPAGLFV  
 MASGVISTPS ANAITYTPQP DRIVTTPGTP AAAPVGKNTPI MFASVVRRT GDVNATAGSA  
 NGTQYGTGSQ PLPVTIGLSL NNYSSALMPG QFFVWQLTFA SGFMEIGLSV DGYFYAGTGA  
 STTLIDLTEL IDVRPVGPRP SKSTLVFNLG GTANGFSYV

### **CTB-SEK: 137 AS**

sequenziert:

MASSIKLKFGVFFTVLLSSAYAHGTPQNITDLCAEYHNTQIHTLNDKIFSYPESLAGKREMAITFKN  
 GAT  
 FQVEVPGSQHIDSQKKAIERMKDTLRIAYLTEAKVEKLCVWNNKTPHAIISMANGGPSEKDEL

Sequenz laut Datenbank UniProt:  
 (<http://www.uniprot.org/uniprot/P01556>)  
 Cholera enterotoxin subunit B; 124 AS; 13,96 kDa

MIKLFQGVFF TVLLSSAYAH GTPQNITDLC AEYHNTQIYT LNDKIFSYPE SLAGKREMAI  
 ITFKNGAIFQ VEVPGSQHID SQKKAIERMK DTLRIAYLTE AKVEKLCVWN NKTPHAIISMAN  
 SMAN

### **Cyanophycin: unterschiedliche Länge**

Aspartatkette (bzw. Rückrat) mit Argininseitenketten:

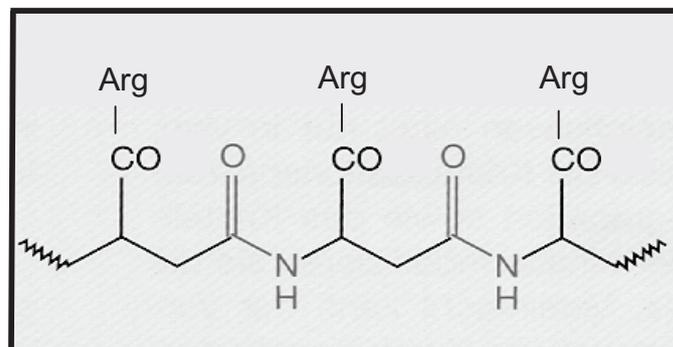
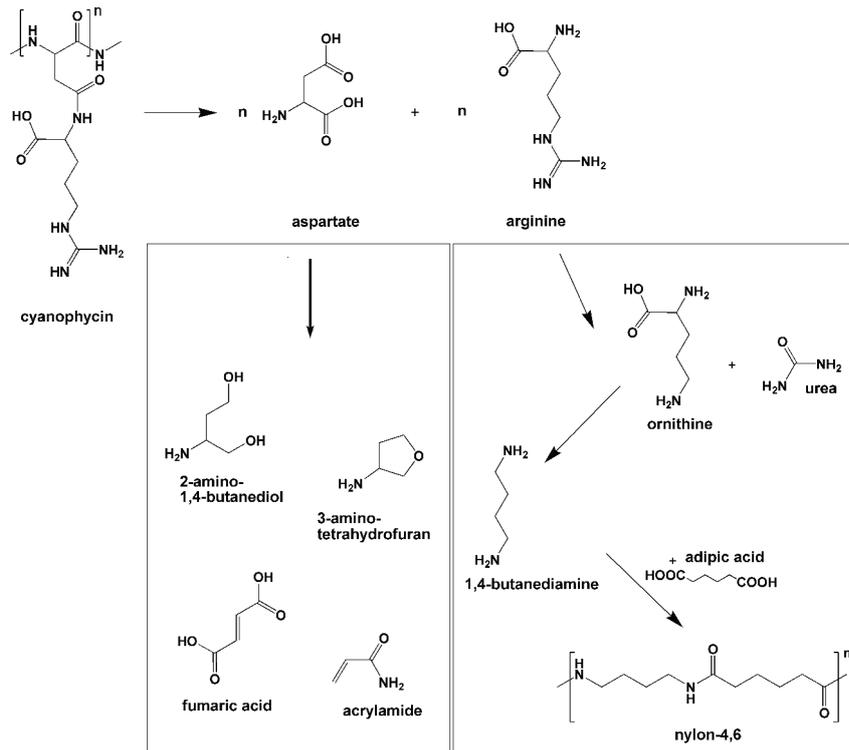


Abbildung G.16: Polyaspartatkette mit L-Argininresten



**Abbildung G.17: Potenzielle Produkte, die aus dem Produkt Cyanophycin gewonnen werden können**

**NPTII: 264 AS; 29,05 kDa**

(<http://www.uniprot.org/uniprot/Q08JA8>)

Neomycin-kanamycin phosphotransferase type II  
EC=2.7.1.95

Sequenz:

MIEQDGLHAG SPAAWVERLF GYDWAQQTIG CSDAAVFRSL AQGRPVLVFK TDLGALNEL  
QDEARLSWL ATTGMPCAAV LDVVTEAGRDL WLLGEPGQ DLLSSHLAPA EKVSIMADAM  
RRLHTLDPAT CPFQDHQAKHR IERARTRMEA GLVDQDDLDE EHQGLAPAE FARLKARMPD  
GEDLVVTHGD ACLPNIMVEN GRFSGFIDCG RLGVADRYQD IALATRDIAE ELGGEWADRF  
LVLYGIAAPD SQRIAFYRLL DEFF

**Synthetisches Polypeptid des Modellproteins NPTII:**

Cys-DSQRIAFYRLLDEFF

**Modellallergen OVA: 386 AS; 42,88 kDa**

(<http://www.uniprot.org/uniprot/P01012>)

Ovalbumin, Egg-albumin  
Allergen: Gal d 2

MGSIGAASME FCFDVFKEKLVH HANENIFY CPIAIMSALA MVYLGAKDST RTQINKVVRV  
DKLPGFGDSI EAQCGTSVNV HSSLRDILNQ ITKPNDVYSF SLASRLYAE RYPILPEYLQ  
CVKELYRGGLEPINFQTAAD QARELINSWV ESQTNGIIRN VLQPSSVDSQ TAMVLVNAIV  
FKGLWEKAFK DEDTQAMPFR VTEQESKPVQ MMYQIGLFRV ASMASEKMKI LELPFASGTM  
SMLVLLPDEV SGLEQLESII NFEKLTWETS SNVMEERKIK VYLPRMKMEE KYNLTSVLMA  
MGITDVFSS ANLSGISSAE SLKISQAVHA AHAEINEAGR EVVGSAAEAGV DAASVSEEFR  
ADHPFLFCIK HIATNAVLFF GRCVSP

**Kartoffelallergene Sola t 1 – t 4**

[UTMB – The University of Texas Medical Branch;  
([http://fermi.utmb.edu/cgi-bin/SDAP/sdap\\_06?dB\\_Type=0&Lett=s](http://fermi.utmb.edu/cgi-bin/SDAP/sdap_06?dB_Type=0&Lett=s))]

**Sola t 1: 386 AS; Sequenz 21514**

[UTMB – The University of Texas Medical Branch;  
([http://fermi.utmb.edu/cgi-bin/SDAP/sdap\\_13?Qtype=1&dB\\_Type=0&allid=333&seqid=628](http://fermi.utmb.edu/cgi-bin/SDAP/sdap_13?Qtype=1&dB_Type=0&allid=333&seqid=628))]

Protein: Patatin

MATTKSFLILFFMILATTSSTCATLGEMVTVLSIDGGGIKGIIPAIILEF  
LEGQLQEVDNNDARLADYFDVIGGTSTGGLLTAMITTPNENNRPF<sub>5</sub>AAK  
DIVPFYFEHGHIFNYSGSIFGPRYDGKYLQVLQEKLGETRVHQALTEV  
AISSFDIKTNKPVIFTKSNLAESPQLDAKMYDICYSTAAAPIYFPPHHFV  
THTSNGATYEFNLVDGAVATVGDPA<sub>1</sub>LLSLSVATRLAQDDPAFSSIKSLDY  
KQMLLLSLGTGTNSEFDKTYTAE<sub>1</sub>EAAKWGPLRWMLAIQQMTNAASSYMTD  
YYISTVFQARHSQNNYL<sub>1</sub>RVQENAL<sub>1</sub>TGTT<sub>1</sub>EMDDASEANMELLVQVGETLL  
KKPVSKDSPETYEEALKRFAKLLSDRKKLRANKASH

**Sola t 2: 188 AS; 20.59 kDa; Sequenz P16348 (SwissProt)**

[UTMB – The University of Texas Medical Branch;  
([http://fermi.utmb.edu/cgi-bin/SDAP/sdap\\_02?dB\\_Type=0&allid=334](http://fermi.utmb.edu/cgi-bin/SDAP/sdap_02?dB_Type=0&allid=334))]

Protein: Cathepsin D Inhibitor, Proteasehemmer

ESPLPKPULD TNGKELNPNS SYRIISIGRG ALGGDVYLGK SPNSDAPCPD GVFRYNSDVG  
PSGTPVRFIP LSGGIFEDQL LNIQFNIATV KLCVSYTIWK VG<sub>1</sub>NLNAYFRT M<sub>1</sub>LETGGTIG  
QADSSYFKIV KLSNFGYNLL YCPITPPFLC PFCRDDNFCA KVG<sub>1</sub>VVIQNGK RRLALVNENP  
LDVLFQEV

**Sola t 3: 222 AS; Sequenz 20141344**

[UTMB – The University of Texas Medical Branch;  
([http://fermi.utmb.edu/cgi-bin/SDAP/sdap\\_02?dB\\_Type=0&allid=335](http://fermi.utmb.edu/cgi-bin/SDAP/sdap_02?dB_Type=0&allid=335))]

Protein: Cystein Protease Inhibitor

MKSINILSFLLLSSTLSLVAFARSFTSENPIVLPTTCHDDDNLVLPEVYD  
QDGNPLRIGERYIINNPLL<sub>1</sub>GAGAVLYNIGNLQCPNAV<sub>1</sub>LQHMSIPQFLGE  
GTPVVFVRKSESDYGDVVRVMTVVYIKFFVKT<sub>1</sub>KLCVDQT<sub>1</sub>VW<sub>1</sub>KNDEQLV  
VTGGKVG<sub>1</sub>NENDIFKIMKTDLVT<sub>1</sub>PGGSKYVYKLLHCP<sub>1</sub>SHLGCKNIGGNFKN  
GYPR<sub>1</sub>LVTVDDDKDFIPFVFIKA

**Sola t 4: 221 AS; 20.009 kDa; Sequenz 21413**

[UTMB – The University of Texas Medical Branch;  
([http://fermi.utmb.edu/cgi-bin/SDAP/sdap\\_02?dB\\_Type=0&allid=336](http://fermi.utmb.edu/cgi-bin/SDAP/sdap_02?dB_Type=0&allid=336))]

Protein: Aspartat Protease Inhibitor, Serin Protease Inhibitor

MKCLFLLCLCLVPIVFSSTFTSKNPINLPSDATPVLDVAGKELDSR<sub>1</sub>LSY  
RIISTFWGALGGDVYLGKSPNSDAPCANGIFRYNSDVGPSGTPVRF<sub>1</sub>SHFG  
QGIFENELLNIQFAISTKLCVSYTIWKVGDYDASLGTMLLETGGTIGQA  
DSSWFKIVKSSQFGYNLLYCPVTSTMSCPFSSDDQFCLKVG<sub>1</sub>VVHQNGKRR  
LALVKDNPLDVSFKQVQ

**Vergleich des Oberflächenmarkers CD63 für Maus; Ratte, Mensch:**

- <http://www.uniprot.org/uniprot/?query=cd63+human&sort=score> (Eingabe: CD63 human)
- Sequenz P08962 (CD63\_human)

1. Ergebnis: CD63-human vs. CD63 Maus:

>>UNIPROT:CD63\_MOUSE\_P41731 CD63 antigen OS=Mus musculus (238 aa)

initn: 1305 init1: 1305 opt: 1305 Z-score: 1556.7 bits: 295.4 E(): 6.6e-78

Smith-Waterman score: 1305; **79.4% identity (95.4% similar)** in 238 aa overlap (1-238:1-238)

2. Ergebnis: CD63-human vs. CD63 Ratte

Uniprot: CD63\_RAT\_P28648 CD63 antigen OS=Rattus norvegi (238 aa)  
initn: 1296 init1: 1296 opt: 1296 Z-score: 1546.0 bits: 293.4 E(): 2.6e-77  
Smith-Waterman score: 1296; **78.6% identity (95.4% similar)** in 238 aa overlap (1-238:1-238)

3. Ergebnis: CD63 Ratte vs. CD63 Maus:

>>UNIPROT:Q549D0\_MOUSE\_Q549D0 Cd63 protein OS=Mus muscul (238 aa)  
initn: 1526 init1: 1526 opt: 1526 Z-score: 1859.0 bits: 351.3 E(): 9.6e-95  
Smith-Waterman score: 1526; 96.6% identity (98.7% similar) in 238 aa overlap (1-238:1-238)

## G 14 Summary

Developers of genetically modified plants (GMP) face the challenge to create plants with enhanced agronomic capacities or usable components respectively on the one hand and to take care that the modification does not increase the consumer's health risk due to these plants on the other hand. One of the basic risks given by the expression of novel proteins in transgenic plants is the potential allergenicity. There is a high demand on standardized methods to determine the allergenic potential of GMP before they become licensed for commercial use. Several *in vivo* and *ex vivo* methods as prick and scratch tests or determination of serum IgE-titre for diagnosis of existing allergies are established. These clinical diagnostic analyses can be adducted for routine investigation of allergic patients but are inapplicable for exploration of changed allergenic potential of GMP.

The aim of this thesis was the development of a model system for the investigation of GMPs allergenic potential in comparison with their near isogenic counterpart (NIC). To establish a decision tree based on *in silico*, *in vitro* and *in vivo*-methods two near isogenic and eight transgenic variants of the culture plant potato (*Solanum tuberosum*) were applied.

Based on several guide lines of IFBC/ILSI, FAO/WHO and EFSA a standard procedure for testing a potentially enhanced allergenicity of GMP before application to the consumer could be established. *In silico* methods that determine homologies of the novel protein with known allergens were linked with *in vitro* methods for the analyses of protein stability or cross-reactivity of the transgenic protein with human IgE and *in vivo* sensitizing studies using laboratory animal models *Balb/c mouse* and *Brown Norway rat*. Allergy specific parameters as total and specific serum IgE were determined using ELISA and the cell based  $\beta$ -hexosaminidase assay. In addition first indications for functionality of adoption of a Flow CAST method, which is well established in human allergy diagnostics, to animal material could be obtained.

The entire procedure enables a fast and cost effective investigation of the allergenic potential of the transgenic protein as well as the overall GMP in comparison with its near isogenic counterpart. It differs from existing schema (IFBC/ILSI, FAO/WHO) to the effect that a positive intermediate result is not a criterion for exclusion for the GMP but rather it will be tested with further analyses for its potential allergenicity. The scheme is divided into two levels. The first step contains extensive *in silico* and *in vitro* tests of the transgenic proteins and the entire plants. In the second level *in vivo* studies are considered. Laboratory animals are investigated for allergy specific parameters after sensitizing with plant material or transgenic protein respectively.

## G 15 Veröffentlichungen und Vorträge

### Projektberichte:

Abschlussbericht: „Entwicklung von Analyse- und Bewertungssystemen zur Ermittlung einer potentiellen Allergenität von gentechnisch veränderten Pflanzen“ im BioOK-Wachstumskern „Analyse- und Bewertungssysteme für den Einsatz von Agrobiotechnologien“ des BMBF-Förderprogramms „Innovative regionale Wachstumskerne“ (Laufzeit: 01.07.2005 – 30.06.2008), (Förderkennzeichen: 03WKS07E)

Abschlussbericht: „Entwicklung von Testsystemen zum quantitativen Nachweis von Substanzen in transgenen Pflanzen“ im BioOK-Wachstumskern „Analyse- und Bewertungssysteme für den Einsatz von Agrobiotechnologien“ des BMBF-Förderprogramms „Innovative regionale Wachstumskerne“ (Laufzeit: 01.07.2005 – 30.06.2008), (Förderkennzeichen: 03WKS07B)

### Poster und Vorträge:

Entzian, K.; Haufe, B.; Steinmann, A.; Meyer, U. (2006) Development of systems for analysis and assessment of the potential allergenicity of genetically modified (GM) plants; Dezember 2006, Poster, 1. BioOK-Statusseminar, Rostock

Entzian, K.; Grümmer, B.; Steinmann, A.; Meyer, U. (2007) Development of systems for analysis and assessment of the potential allergenicity of genetically modified (GM) plants; Oktober 2007, Poster, 2. BioOK-Statusseminar, Rostock

Klemke, T.; Steinmann, A.; Entzian, K.; Meyer, U. (2007) Development of test systems for quantitative evidence of substances in genetically modified plants; Oktober 2007, Poster, 2. BioOK-Statusseminar, Rostock

Steinmann, A. (2009) Approaches for quantitative evidence of substances of genetically modified plants and assessing their toxicological and allergenic potential; Mai 2009, Vortrag, 3. BioOK-Statusseminar, Dummerstorf

Steinmann, A.; Klemke, T.; Entzian, K.; Meyer, U. (2009) Development of test systems for quantitative evidence of substances in genetically modified plants; Mai 2009, Poster, 3. BioOK-Statusseminar, Dummerstorf

Steinmann, A. (2009) Nachweis eines allergenen Potentials gentechnisch veränderter Pflanzen - Etablierung eines Modellsystems; Vortrag Doktorandentag Berlin 09.11.2009

Steinmann, A. (2009) Allergological risk assessment of GM plants; Poster (AUF-workshop 1.-3.10.2009 HRO; Doktorandentag Berlin 09.11.2009)

Steinmann, A. *et al.* (2010) Allergological and toxicological risk assessment of genetically modified (GM) plants – Development of a model system. Presented at 4th Workshop on Post Market Environmental Monitoring of Genetically Modified Plants, 03 May 2010, Available from Nature precedings <<http://dx.doi.org/10.1038/npre.2010.4441.1>>

Steinmann, A.; Entzian, K.; Grümmer, B.; Meyer, U. (2011) Allergologische und toxikologische Risikoanalyse von gentechnisch veränderten Pflanzen (GVP); Poster (JKI-Workshop, 22.08.-23.08.2011, Üplingen und Quedlinburg),

Steinmann, A.; (2011) Neue Methoden zur Bewertung der Risiken für menschliche und tierische Gesundheit - Entwicklung eines Entscheidungsbaumes; (JKI-Workshop, 22.08.-23.08.2011, Üplingen und Quedlinburg)

**Artikel:**

Schmidt, K. *et al.* (2011) BioOK – a Comprehensive System for Analysis and Risk Assessment of Genetically Modified Plants. *Journal für Kulturpflanzen*, 63 (7): 232-248

Steinmann A., Entzian K., Grümmer B., Meyer U., Broer I. (2011) Assessment of the potential allergenicity of transgenic potatoes - Development of a decision tree. *Plant Biotechnology Journal* (**in preparation**)

**Weitere Veröffentlichungen - Patente:**

Meyer, U. *et al.* (2010) Verfahren zur Erkennung einer Salmonelleninfektion. Patent (DE 10 2010 018 085.8; PCT/DE 2011/000460)

Meyer, U. *et al.* (2010) Verfahren zur schnellen serologischen Diagnostik eines Salmonellensubtyps. Patent (DE 10 2010 026 269.2; BAM 02 PCT)

## **G 16 Lebenslauf**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf nicht veröffentlicht.

## **G 17 Danksagung**

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich bei der Ausarbeitung meiner Dissertation unterstützt haben.

Frau Prof. Dr. Broer gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas, die vielen wertvollen Anregungen, sowie die stete Diskussionsbereitschaft, das sorgfältige Korrekturlesen und die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit.

Mein Dank gilt Herrn Dr. Meyer sowie dem kompletten Kollegium der Firma BIOSERV A. & M. GmbH für die Ressourcenbereitstellung, die vielfältigen Möglichkeiten der beruflichen Weiterentwicklung als auch das angenehme Arbeitsklima. Ich bedanke mich für die praktische Unterstützung bei Versuchen und Experimenten sowie die wertvollen Anregungen und Gespräche mit meinen Kollegen.

Dr. Bittorf und Dr. Büchse danke ich für die fachliche Unterstützung und die Möglichkeit, Untersuchungen am Flowcytometer in ihrer Arbeitsgruppe an der medizinischen Fakultät der Universität Rostock durchführen zu können.

Bei Frau Dr. Dibbert von der Agrar- und Umweltwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock möchte ich mich für die praktische Hilfe bei der Färbung und Differenzierung von Blut-Zellpopulationen bedanken.

Mein Dank gilt allen Projektpartnern, die den Fortgang meines Promotionsvorhabens durch inspirierende und kritische Fachdiskussionen als auch durch Bereitstellung von Materialien und Technologien gefördert haben. Allen Partnern des Wachstumskernes BioOK danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Bei meinen Praktikanten Anne, Susanne, Ulrike, Juliane, Babette und Robert möchte ich mich für ihre sorgfältige Arbeitsweise, die gute Zusammenarbeit und für die unterhaltsamen Stunden in und außerhalb des Labores bedanken.

Ich danke Herrn Dr. Prietzsch und Herrn Dr. Meyer für das Lesen und Diskutieren der Dissertation und den daraus resultierenden Anregungen aus verschiedenen Sichtweisen.

Ein ganz liebes Dankeschön geht an meine Familie und meine Freunde, die mich stets unterstützt haben und mir immer zur Seite standen.

Mein größter Dank geht an Annika für ihre unentwegte seelische und moralische Unterstützung sowie für ihr Verständnis und ihre Geduld.