

**Etablierung von *in vitro*-Modellen
zur Reduktion des allergenen
Potentials pflanzlicher
Lebensmittel
am Beispiel der pollenassozierten
Lebensmittelallergie**



Projekt: 0312217

Abschlussbericht

Projektträger: Forschungszentrum Jülich GmbH Beo

Projektleiter: Dr. Johannes Jehle
Dienstleistungszentrum (DLR) Rheinland
Abt. Phytomedizin
AG Biotechnologischer Pflanzenschutz
Breitenweg 71
67435 Neustadt/Weinstraße

Telefon: 06321/671-482
Fax: 06321/671-222
Email: johannes.jehle@dlr.rlp.de

Projektpartner Prof. Dr. Stefan Vieths
Paul-Ehrlich-Institut (PEI)
Abteilung Allergologie
Paul-Ehrlich-Straße 51-59
63225 Langen

Telefon: 06103/77-2400
Fax: 06103/77-1258
Email: viest@pei.de

Kennzeichen/
Projekt-Nummer: 0312217

Auftragsbezeichnung: Etablierung von *in vitro*-Modellen zur Reduktion des allergenen Potentials pflanzlicher Lebensmittel am Beispiel der pollen-assoziierten Lebensmittelallergie

Laufzeit des Antrags: 01.07.2000 bis 30.06.2003; verlängert bis 30.09.03
Berichtszeitraum: 01.07.2000 bis 31.03.2004

Inhaltsverzeichnis

- I. Allgemeine Darstellung
 1. Aufgabenstellung
 2. Voraussetzungen, unter denen der FE-Antrag durchgeführt wurde
 3. Planung und Ablauf des Auftrags
 4. Wissenschaftlicher und technischer Stand
 5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

- II. Eingehende Darstellungen
 1. Erzieltes Ergebnis und voraussichtlicher Nutzen des Ergebnisses
 2. Fortschritt anderer Stellen auf dem Gebiet des FE-Antrags
 3. Erfolgte und geplante Veröffentlichungen des FE-Ergebnisses

- III. Erfolgskontrollbericht
 1. Wissenschaftlich-technische Ergebnisse des FE-Auftrags
 2. Erfindungen/Schutzrechtsanmeldungen und erteilte Schutzrechte
 3. Wirtschaftliche, wissenschaftliche und / oder technische Erfolgsaussichten nach Auftragsende
 4. Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit
 5. Arbeiten ohne Lösung
 6. Präsentationsmöglichkeiten
 7. Einhaltung der Kosten- und Zeitplanung

I. Allgemeine Darstellung

1. Aufgabenstellung

Pollenassoziierte Lebensmittelallergien gehören zu den häufigsten Allergien in Zentral- und Nordeuropa. Die Mehrheit der Birkenpollenallergiker zeigt allergische Reaktionen nach dem Genuss von Gemüse, Nüssen und einer Vielzahl von Früchten. Die primäre Sensibilisierung erfolgt hierbei meist über Pollenallergene. Allergische Reaktionen nach dem Genuss von Lebensmitteln werden dann durch homologe Allergene in den Nahrungsmitteln ausgelöst. Von ungefähr 8% der Gesamtbevölkerung Mitteleuropas, die allergische Reaktionen gegen Birkenpollen aufweisen, leiden ca. 70% auch an Lebensmittelallergien gegen Sellerie (*Apiaceae*), Karotten (*Umbelliferae*), Apfel, Pflaume und Kirsche (*Rosaceen*). Eine Vielzahl der allergischen Reaktionen auf diese Lebensmittel beruht auf Allergenen die stark homolog sind zu Bet v 1, dem Hauptallergen aus Birkenpollen. Mehr als 90% der Kirschallergiker in Gebieten mit Birken zeigen IgE-Reaktivität gegen Pru av 1, das Bet v 1 homologe Hauptallergen der Kirsche.

Am Modell der Süßkirsche (*Prunus avium* L.), die einen bedeutenden Markt bei Frischobst besitzt und dessen Hauptallergen Pru av 1 bereits kloniert und sequenziert wurde, sollte durch den gezielten Einsatz gentechnologischer Methoden eine Minimierung des allergenen Potentials erzielt werden. Dabei wurde in diesem Projekt durch den kombinierten Einsatz von Grüner und Roter Gentechnologie ein neuartiger Ansatz angewandt, die molekularen Eigenschaften des Hauptallergens Pru av 1 zu untersuchen und mittels antisense-RNA- und RNA-Interferenz-Technologie bzw. der Expression von pflanzlichen Anti-Allergen-Antikörpern hypoallergene Kirschlinien zu etablieren.

Dabei standen folgende Arbeitsziele im Vordergrund:

1. Molekulare und immunologische Charakterisierung des Hauptallergens der Kirsche Pru av 1
2. Etablierung von *in vitro*-Kulturen der Kirsche und deren Testung auf ihr allergenes Potential
3. Etablierung transgener Strategien zur Minimierung des transgenen Potentials der Süßkirsche

2. Voraussetzungen, unter denen der FE-Antrag durchgeführt wurde

3. Planung und Ablauf des Auftrags

Die geplanten Arbeitsschwerpunkte, deren genauer Zeitplan im Anhang 1 aufgeführt ist, umfassten folgende zu bearbeitende Aspekte:

- A Identifizierung des optimalen Wirtsorganismus
- B Entwicklung von *in vitro*-Kulturen der Süßkirsche
 - B1 Somatische Embryogenese an Kirschgewebe
 - B2 Etablierung von *in vitro*-Kulturen (Spross-, Kallus-, Zellsuspensionskulturen)
 - B3 Testung auf die Induzierbarkeit der Transkription und Expression von Pru av 1
- C Charakterisierung und Sequenzierung der Pru av 1-Gene und Transkripte
 - C1 Untersuchung der Kopienzahl der Pru av 1-Genfamilie
 - C2/3 Charakterisierung und Sequenzierung der Pru av 1-Transkripte
 - C3 Allergenitätstestung der Pru av 1-Isoformen
 - C4 *In vitro*-Mutagenese von Pru av 1
- D Herstellung monoklonaler Antikörper gegen Pru av 1
 - D1 Herstellung von monoklonalen Antikörpern (mAk)
 - D2 Reinigung der mAk, Isotypisierung, Spezifitätsanalyse
 - D3/8 Allergenitätstests mit mAk- und Fab-Pru av 1-Komplexen
 - D4 Klonierung von Fab-Fragmenten des mAk, Prüfung der Spezifität
 - D5 Alternativ: Herstellung einer scFv-Bibliothek
 - D6/7 Alternativ: Selektion eines scFv, Expression, Spezifitätsanalyse
- E
 - E1/1 Etablierung von Regenerationsprotokollen der Süßkirsche
 - E1/2 Klonierung eines Transfervektors zur Bildung von antisense-RNA- und RNA-Interferenz-Konstrukten
 - E1/3 Klonierung eines Transfervektors zur Expression eines pflanzlichen Antikörpers mit Pru av 1 Spezifität
 - E1/4 Etablierung von Transformationsprotokollen der Süßkirsche
- F Herstellung transgener Linien und deren *in vitro*-Testung auf Allergenität
 - F1 Transformation der *in vitro*-Kulturen
 - F2 Testung transgener Zelllinien auf Allergenität
- G Analyse ausgewählter Regenerate auf die Anwesenheit der übertragenen DNA-Sequenzen
- H Abschließende Erstellung von Publikationen und Berichten

Zu Beginn des Projektes im Juli 2000 zeigte sich, dass die Edelreiser der unterschiedlichen marktrelevanten Kirscharten schon der Knospenruhe unterlagen. Daher erfolgte die

Inkulturnahme und somit die Etablierung der Gewebekultur ca. ein halbes Jahr später als ursprünglich geplant. Dies führte dazu, dass manche Teile des Arbeitsprogramms zu einem früheren bzw. späteren Zeitpunkt bearbeitet wurden. Zum Ende der kostenneutralen Verlängerung (30.09.2003) konnten fast alle Aspekte des geplanten Projektes abgeschlossen werden.

Als Alternativstrategie zur Etablierung von antisense-RNA-Regeneraten war im Antrag die Expression eines pflanzlichen Antikörpers in Betracht gezogen worden. Da sich im Herbst 2002 jedoch herausstellte, dass die Regeneration der transformierten Pflanzen länger dauerte als angenommen, wurde diese Alternative nicht weiter verfolgt. Stattdessen wurde ein weiteres Konstrukt auf der Basis der RNA-Interferenz kloniert und zur Transformation eingesetzt.

Aufgrund der verzögerten Inkulturnahme konnte die eventuelle Beteiligung des Pru av 1 Allergens bei der Pathogen-Abwehr mittels Zellsuspensionskulturen nicht untersucht werden. Diese Arbeiten hätten parallel zu den Transformationsexperimenten und deren molekularbiologischen Charakterisierung durchgeführt werden müssen, was jedoch aufgrund des hohen Arbeitsaufwands der Transformationsexperimente nicht möglich war. Im Hinblick auf den erfolgreichen Abschluss des Gesamtprojektes wurde auf diesen Teilaspekt verzichtet.

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand

Mit zunehmenden Allergien gegenüber bestimmten Lebensmitteln erlangt die Etablierung hypoallergener Lebensmittel immer stärker an Bedeutung. Die in Zentral- und Nordeuropa wichtigste Form der pollenassoziierten Lebensmittelallergie ist das Birkenpollen-Nuss-Kernobst-Syndrom. Dabei weist die Mehrheit der Birkenpollenallergiker allergische Reaktionen nach dem Verzehr von Gemüse, Nüssen und einer Vielzahl von Früchten auf. Nach dem heutigen Kenntnisstand wird dieses typische Muster an 'birkenpollenassoziierten Lebensmittelallergien' von einer Familie von Lebensmittelproteinen ausgelöst, die eine große Sequenzidentität mit Bet v 1, dem Hauptallergen aus Birkenpollen, besitzen (vgl. Vieths, 1997). Nach der partiellen Sequenzierung der ersten dieser Lebensmittelallergene (Vieths *et al.*, 1994, Schöning *et al.*, 1995) und der Aufklärung der ersten vollständigen Sequenz von Mal d 1, dem Hauptallergen des Apfels (Schöning *et al.*, 1996), wurden inzwischen die wichtigsten Vertreter dieser Lebensmittelallergene kloniert und sequenziert. Bei der Süßkirsche wurde ein 17,7 kDa großes Protein als Hauptallergen Pru av 1 identifiziert und sequenziert (Scheurer *et al.*, 1997).

Die in diesem Projekt durchgeführte antisense-RNA-Strategie zur Reduktion des allergenen Gehalts bei der Kirsche, konnte bisher erfolgreich bei der gentechnischen Beeinflussung von Produkt- und Qualitätseigenschaften bei verschiedenen Nutzpflanzen eingesetzt werden (Hamilton *et al.*, 1995; Kuipers *et al.*, 1994). Gerade bei der in Europa relativ seltenen Reisallergie wurde durch die Anwendung dieser Strategie die Expression des 16 kDa-

Hauptallergens in Reiskörnern auf ca. 20% des ursprünglichen Niveaus verringert (Matsuda *et al.*, 1996; Tada *et al.*, 1996). Bei Obstallergikern mit birkenpollenassoziierter Allergie ist jedoch im Gegensatz zu dieser Reisallergie die Sensibilisierung gegen das Hauptallergen dominant. Somit kann durch eine Inaktivierung eines einzigen Gens die Verträglichkeit dieses Lebensmittels für die Mehrheit der Allergiker verbessert werden. Eine andere erfolgreiche Anwendung der antisense-RNA-Strategie betrifft die sehr häufig vorkommende Gräserallergie. Bhalla *et al.* (1999) konnten mittels eines pollenspezifischen Promotors eine deutlich reduzierte Allergenität in Gräserpollen erzielen, die das Hauptallergen Lol p 5 enthielten.

Die andere in diesem Projekt eingesetzte Strategie zur Reduzierung des allergenen Potentials bei der Süßkirsche beruht auf der RNA-Interferenz (RNAi). Diese Strategie wurde modellhaft bei *Arabidopsis* eingesetzt (Levin *et al.*, 2000). Dabei konnte die Expression des Cystathionine- β -lyase-Gens, welches für ein Enzym der Methionin-Biosynthese codiert, erfolgreich reduziert werden. Segal *et al.* (2003) transformierten Mais mit einem RNAi-Konstrukt und konnten hierbei eine Reduktion des Hauptproteins der Samenkomponente (α -Zein) erzielen. Weitere Untersuchungen, die die Etablierung hypopallergener Lebensmittel betreffen, werden derzeit an der Universität Hamburg in der Arbeitsgruppe von H. Lörz durchgeführt. Dabei sollen Gluten-freie Lebensmittel (zum Beispiel bei Weizen) auf der Basis der RNA-Interferenz-Strategie (RNAi) gentechnologisch hergestellt werden (Becker, D.; Vortrag auf der Tagung: 'Pflanzenbiotechnologie im Spannungsfeld von Forschung, Anwendung und fundamentaler Ablehnung', Geisenheim, September 2003). Hintergrund dieser Untersuchungen ist die als Zöliakie bekannte Lebensmittelallergie. Solche Menschen leiden an einer durch Gluten (sog. Kleberproteine) ausgelösten allergieähnlichen Erkrankung des Dünndarms.

Bhalla, P.R.; Swoboda, I. and M. B. B. Singh (1999). Antisense-mediated silencing of a gene encoding a major ryegrass pollen allergen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 96, pp 11676-11680. *Plant Biology*.

Hamilton, A.J., Fray, R.G. and D. Grierson (1995). Sense and antisense inactivation of fruit ripening genes in tomato. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 197: 77-89.

Kuipers, A.G., Soppe, W.J., Jacobsen, E. and R.G. Visser (1994). Field evaluation of transgenic potato plants expressing an antisense granule-bound starch synthase gene: increase of the antisense effect during tuber growth. *Plant. Mol. Biol.* 26: 1759-1773.

Levin, J.Z, de Framond, A.J., Tuttle, A., Bauer, M.W. and P.B. Heifetz (2000). Methodes of double-stranded RNA-mediated gene inactivation in *Arabidopsis* and their use to define an essential gene in methionine biosynthesis. *Plant Molecular Biology* 44 (6): 759-775.

Matsuda, T., Nakase, M., Adachi, T. and R. Nakumura (1996). Allergenic proteins in rice: strategies for reduction and evaluation. In: DFG-Symposium food allergies and intolerances. pp. 161-169. VCH Weinheim.

Scheurer, S., Metzner, K., Hauenstein, D. and S. Vieths (1997). Molecular cloning, expression and characterization of Pru a 1, the major cherry allergen. *Mol. Immunol.* 34: 619-629.

Schöning, B., Vieths, S., Petersen, A. and W. Baltes (1995). Identification and characterization of allergens related to Bet v 1, the major birch pollen allergen, in apple, cherry, celery and carrot by two-dimensional immunoblotting and microsequencing. *J. Sci. Food Agric.* 67: 431-440.

Schöning, B.; Ziegler, W.H., Vieths, S. and W. Baltes (1996). Apple allergy: The cDNA sequence determined by performing PCR with a primer based on the N-terminal amino acid sequence of the major allergen of apple is highly homologous to the sequence to the major birch pollen allergen. *J. Sci. Food. Agric.* 71: 475-482.

Segal, G., Song, R. and J. Messing (2003). A new opaque variant of maize by a single dominant RNA-interferenz-inducing transgene. *Genetics* 165: 387-397.

Tada, Y., Nakase, M. and T. Adachi (1996). Reduction of 14-16kDa allergenic proteins in transgenic rice plants by antisense genes. *FEBS Letters* 391: 341-345.

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

Vieths S. (1997). Allergens in fruits and vegetables. In: *Handbook of plant and fungal toxicants*. J.P.F.D'Mello (ed.). Cha. 11, pp. 157-174, CPR press, Boca Raton.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Durch den schon zuvor erwähnten kombinierten Einsatz von gentechnologischen und immunologischen Methoden konnte ein Erfolg dieses Projekts nur im Rahmen einer engen Kooperation zwischen der Pflanzenbiotechnologie und der molekularen Allergologie gewährleistet werden. Diese sehr wichtigen und ergänzenden immunologischen Aspekte wurden vom Paul-Ehrlich-Institut in Langen untersucht.

Die für die Klonierung der Transfervektoren zur Bildung des antisense-RNA- sowie des RNA-Interferenz-Konstrukts notwendigen Plasmide wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Prof. Dr. Töpfer und Herrn Dr. Hausmann von der Bundesanstalt für Züchtungsforschung, Institut für Rebenzüchtung, Geilweilerhof, in Siebeldingen zur Verfügung gestellt. Um die Transfervektoren in die pflanzlichen Zellen einzubringen, wurden verschiedene Stämme von *Agrobacterium tumefaciens* benötigt. Die beiden Stämme GV3101::pMP90 und LBA4404 haben wir von Herrn Dr. Jach und Herrn Dr. Koncz vom MPI in Köln bekommen.

II. Eingehende Darstellungen

1. Erzieltes Ergebnis und voraussichtlicher Nutzen des Ergebnisses

Am Modell der Kirsche sollte ein *in vitro* System etabliert werden, das die molekulare Charakterisierung, immunochemische Testung und die gentechnische Minimierung von Allergenen mittels gentechnologischer Methoden erlaubt. Die dabei in diesem Projekt angewandte antisense-RNA- und RNA-Interferenz-Strategie konnte erfolgreich etabliert werden, so dass zu Ende des Projektzeitraums gentechnisch veränderte Kirschpflanzen vorhanden sind. Da die Regeneration dieser Pflanzen jedoch erheblich länger dauerte als angenommen, kann eine immunologische Testung dieser Pflanzen am Paul-Ehrlich-Institut erst in den kommenden Wochen durchgeführt werden. Weisen diese Pflanzen dann einen deutlich reduzierten Gehalt an dem Hauptallergen der Kirsche Pru av 1 auf, so kann aufgrund der nahen Verwandtschaft mit dem Hauptallergen von zum Beispiel Apfel, Pflaume, Haselnuss und Sellerie die antisense-RNA- sowie RNA-Interferenz-Strategie auf diese Nutzpflanzen übertragen werden. Solche hypoallergene Nahrungsmittel haben eine gute Vermarktungsfähigkeit, da ca. 2-4 % der Bevölkerung Deutschlands an birkenpollenassoziierten Lebensmittelallergien leiden und somit ein großer potentieller Markt für diese neuen Lebensmittel besteht.

2. Fortschritt anderer Stellen auf dem Gebiet des FE-Antrags

siehe I. Allgemeine Darstellung Punkt 4. Wissenschaftlicher und technischer Stand.

3. Erfolgte und geplante Veröffentlichungen des FE-Ergebnisses

Bisherige Veröffentlichungen und Vorträge

- 1) A. Matt, A. Reuter, S. Vieths and J.A. Jehle. *Pollen related food allergy: Regeneration of sweet cherry (Prunus avium L.) as a first step to establish an in vitro model to reduce allergenicity by antisense RNA*. Plant Biotechnology 2002 and Beyond: Proceedings of the 10th IAPTC&B Congress, June 23-28, 2002, Orlando, Florida, USA. Poster presentation.
- 2) A. Matt, A. Reuter, S. Vieths und J.A. Jehle. *Molekulare und immunologische Charakterisierung des Hauptallergens der Kirsche Pru av 1*. First German Meeting on

Woody Plant Genomics (GWPG) in Großhansdorf / Ahrensburg 6. - 9. Oktober 2002. Vortrag.

- 3) A. Reuter, A. Matt, S. Scheurer, J.A. Jehle, S. Vieths. *Development of an in vitro Model to Reduce Allergenicity of Sweet Cherry (Prunus avium L.) by RNA Interference (RNAi)*. J Allergy Clin Immunol, 2003; 111 (supplement, S250). Poster presentation at the 60th annual meeting of the American Academy of Allergy Asthma & Immunology, March 2003

- 4) A. Matt, A. Reuter, S. Vieths und J.A. Jehle. *Gentechnische Reduktion von Lebensmittelallergenen am Beispiel der Kirsche*. Pflanzenbiotechnologie im Spannungsfeld von Forschung, Anwendung und fundamentaler Ablehnung. Geisenheim 10. September 2003. Vortrag. (<http://www.gruene-biotechnologie.de/inhalte/pbgsh.html>)

- 5) A. Matt, A. Reuter, S. Vieths und J.A. Jehle. *Molekulare und immunologische Charakterisierung des Hauptallergens der Kirsche Pru av 1*. Gesellschaft für Pflanzenzüchtung (GPZ); AG Obst / Gehölze der GPZ; Züchtung von Obst-, Reben und Zier- und anderen Gehölzen am BAZ-Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof. 9. September 2003. Vortrag.

- 6) A. Matt, A. Reuter, S. Vieths und J.A. Jehle. *Entwicklung von Regenerations- und Transformationsprotokollen zur Reduktion von Lebensmittelallergien bei Kirschen (Prunus avium L.)*. International Association for Plant Tissue Culture (IAPTC), Deutsche Sektion AK; Workshop: „Pflanzentransformationen: Wo stehen wir heute?“; Giessen; 17. – 18. Juli 2003. Poster Präsentation. (http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2003/1172/pdf/Workshop-2003-07-28_Abstracts.pdf)

- 7) A. Reuter, D. Fortunato, L. Perono Garoffo, L. Napolitano, S. Scheurer, M. G. Giuffrida, S. Vieths, A. Conti. *New isoforms of Pru av 1 with diverging IgE properties. Identification by a combination of proteomics and molecular biology*. Allergy, 2004 (supplement) accepted. Poster presentation at the 23rd annual congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology, June 2004

- 8) Andreas Reuter, Donatella Fortunato, Lorenza Perono Garoffo, Lorenzo Napolitano, Stephan Scheurer, Maria G. Giuffrida, Stefan Vieths, Amedeo Conti. *New isoforms of Pru av 1 with diverging IgE properties identified by a combination of molecular biology and proteomic tools*. Submitted.

Geplante und in Bearbeitung sich befindende Veröffentlichungen

- 1) A. Reuter, A. Matt, S. Scheurer, J.A. Jehle und S. Vieths. *Immunological and molecular characterization of Pru av 1 in market varieties of sweet cherry*. (In Vorbereitung) Veröffentlichung über die molekulare und immunologische Charakterisierung des Hauptallergens der Süßkirsche Pru av 1 bearbeitet. Dabei werden die im Erfolgskontrollbericht im Kapitel C (Charakterisierung und Sequenzierung der Pru av 1 Gene und Transkripte) aufgeführten Ergebnisse dargestellt.
- 2) A. Matt and J.A. Jehle. *In vitro plant regeneration from leaves and internodes sections of sweet cherry cultivars (Prunus avium L.)*. (in Vorbereitung). Diese Veröffentlichung betrifft die Etablierung eines Regenerationssystems ausgehend von Blättern und Internodien von fünf verschiedenen Süßkirschsornten. Diese Ergebnisse sind im Erfolgskontrollbericht im Kapitel E1/5 (Etablierung von Regenerationsprotokollen der Süßkirsche) aufgeführt.
- 3) Der Vergleich verschiedener Untersuchungen zur Etablierung eines Transformationsprotokolls der Süßkirschsornten ‘Sweetheart‘ und ‘Schneiders‘ (Erfolgskontrollbericht Kapitel E1/5 Etablierung von Transformationsprotokollen der Süßkirsche) wird in einer weiteren Veröffentlichung dargestellt. A. Matt and J.A. Jehle.
- 4) Eine weitere geplante Veröffentlichung beinhaltet die Transformation von Internodien der Süßkirschsornten ‘Schneiders‘ und ‘Sweetheart‘ sowie deren Regeneration zu Pflanzen und die anschließende molekulare und immunologische Charakterisierung der transgenen Pflanzen (Erfolgskontrollbericht Kapitel E1/2 Klonierung eines Transfervektors zur Bildung von antisense-RNA-Konstrukten; F1 Transformation von *in vitro* Kulturen, G Analyse ausgewählter Regenerate auf die Anwesenheit der übertragenen DNA-Sequenzen und F2 Testung transgener Zelllinien auf Allergenität). A. Matt, Z. Wang, A. Reuter, S. Scheurer, S. Vieths und J.A. Jehle.
- 5) Die Charakterisierung und Sequenzierung der Pru av 1 Gene und Transkripte sowie die Allergenitätstestung der Pru av 1 Isoformen (Kapitel C3 Allergenitätstestung der Pru av 1-Isoformen und C4 *In vitro* Mutagenese von Pru av 1) sollen ebenfalls veröffentlicht werden. A. Reuter, S. Scheurer und S. Vieths.

III. Erfolgskontrollbericht

1. Wissenschaftlich-technische Ergebnisse des FE-Auftrags

Inhaltsverzeichnis

- A Identifizierung des optimalen Wirtsorganismus (PEI)
- B Entwicklung von *in vitro*-Kulturen der Süßkirsche (DLR)
 - Pflanzliche Gewebekultur
 - B1 Somatische Embryogenese an Kirschgewebe (DLR)
 - B2 Etablierung von *in vitro*-Kulturen (Spross-, Kallus-, Zellsuspensionskulturen; DLR)
 - B3 Testung auf die Induzierbarkeit der Transkription und Expression von Pru av 1 (PEI/DLR)
- C Charakterisierung und Sequenzierung der Pru av 1-Gene und Transkripte (PEI/DLR)
 - C1 Untersuchung der Kopienzahl der Pru av 1-Genfamilie (DLR)
 - C2/3 Charakterisierung und Sequenzierung der Pru av 1-Transkripte (PEI)
 - C3 Allergenitätstestung der Pru av 1-Isoformen (PEI)
 - C4 *In vitro* Mutagenese von Pru av 1 (PEI)
- D Herstellung monoklonaler Antikörper gegen Pru av 1 (PEI)
 - D1 Herstellung von monoklonalen Antikörpern (PEI)
 - D2 Reinigung der mAk, Isotypisierung, Spezifitätsanalyse (PEI)
 - D3/8 Allergenitätstests mit mAk- und Fab-Pru av 1-Komplexen (PEI)
 - D4 Klonierung von Fab-Fragmentes des mAk, Prüfung der Spezifität (PEI)
 - D5 Alternativ: Herstellung einer scFv-Bibliothek (PEI)
 - D6/7 Alternativ: Selektion eines scFv, Expression, Spezifitätsanalyse (PEI)
- E
 - E1/1 Etablierung von Regenerationsprotokollen der Süßkirsche (DLR)
 - E1/2 Klonierung eines Transfervektors zur Bildung von antisense-RNA- und RNAi-Konstrukten (DLR)
 - Klonierung eines Kontrollkonstrukts (DLR)
 - Klonierung eines antisense-RNA-Konstrukts (DLR)
 - Klonierung eines RNAi (Interferenz)-Konstrukts (PEI; DLR)
 - E1/3 Klonierung eines Transfervektors zur Expression eines pflanzlichen Antikörpers mit Pru av 1 Spezifität (DLR)
 - E1/4 Etablierung von Transformationsprotokollen der Süßkirsche (DLR)
 - Entwicklung eines Phosphinothricin-Selektionssystems (DLR)
 - Etablierung eines *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten Transformationsprotokolls (DLR)
- F Herstellung transgener Linien und deren *in vitro*-Testung auf Allergenität (DLR)
 - F1 Transformation der *in vitro*-Kulturen (DLR)
 - F2 Testung transgener Zelllinien auf Allergenität (PEI)
- G Analyse ausgewählter Regenerate auf die Anwesenheit der übertragenen DNA-Sequenzen (DLR)

A Identifizierung des optimalen Wirtsorganismus (PEI)

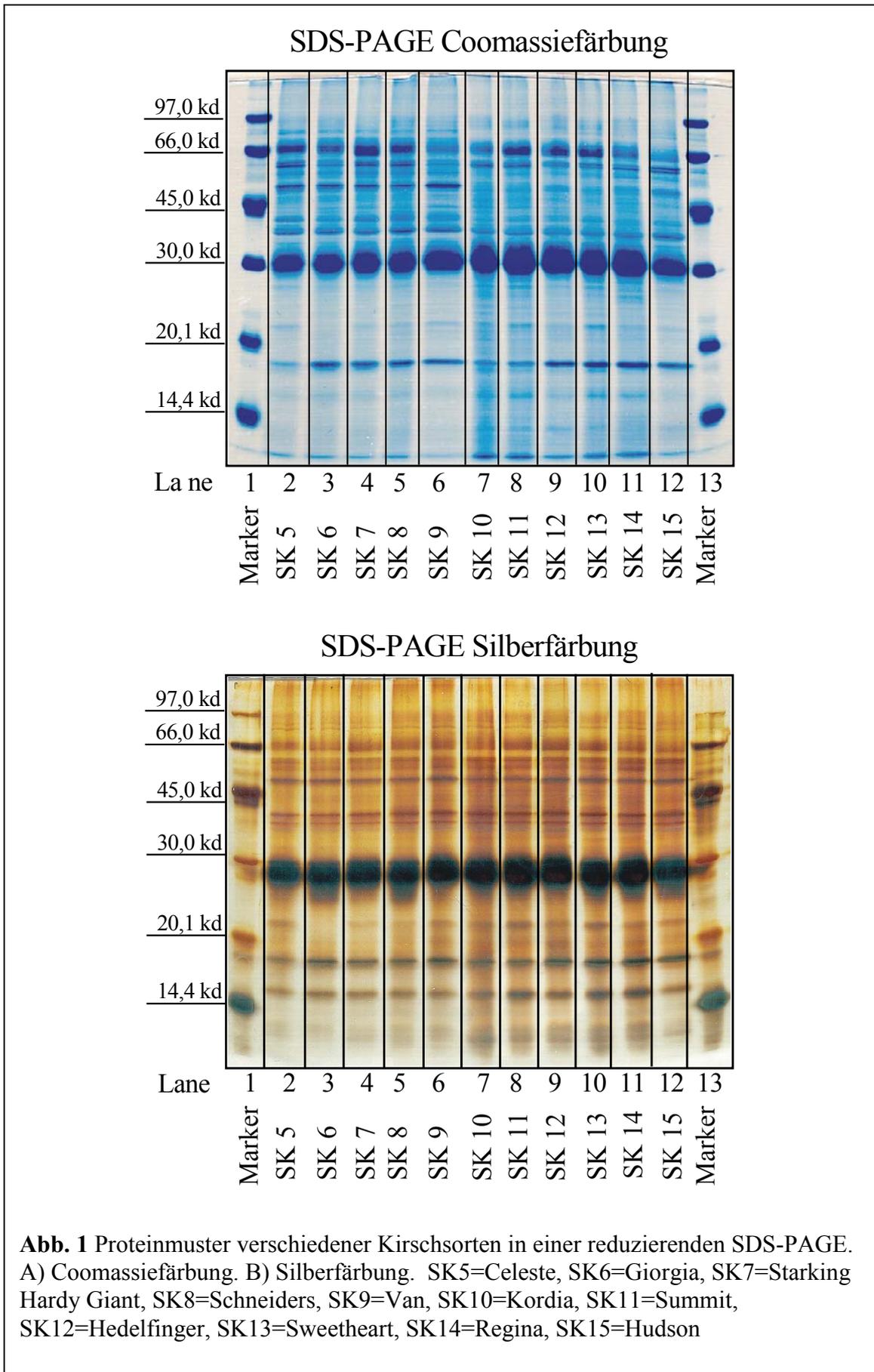
Die Proteinmuster verschiedener Kirschvarietäten

Das Ziel dieses Projektteiles war es, einen Wirtsorganismus zu finden, der hinsichtlich der Menge bzw. Reaktivität von Pru av 1 geeignet ist, für die spätere Regenerierung von gentechnisch veränderten Kirschlinien eingesetzt zu werden. Kirschvarietäten mit besonders hohem und besonders niedrigem Gehalt an immunreaktivem Hauptallergen (Pru av 1) waren dabei von besonderem Interesse, um den möglichen Effekt der gentechnischen Veränderung besonders gut dokumentieren zu können. Neben der Reaktivität der Allergene sollte auch die Marktrelevanz der einzelnen Kirschsornten hinsichtlich einer späteren Anwendung in Betracht gezogen werden. Für eine Beurteilung der allergenen Reaktivität bzw. Menge an Pru av 1 in verschiedenen Kirschsornten war es von Bedeutung, sortenreine sowie unter weitestgehend identischen Bedingungen angebaute, genussreife Früchte zu verwenden. Für die Experimente wurden daher elf Kirschvarietäten eingesetzt, die auf einem Versuchsfeld der Staatlichen Lehr- und Versuchsanstalt Oppenheim unter annähernd identischen Bedingungen angebaut wurden. Sie wurden je nach Reifungseigenschaften zu unterschiedlichen Zeitpunkten zwischen Anfang Juni bis Mitte Juli 2000 geerntet, um Unterschiede in der Allergenexpression aufgrund unterschiedlicher Reifezustände möglichst vollständig auszuschließen. Um Veränderungen der Allergenität durch Lagerung zu vermeiden, wurden die Früchte unmittelbar nach der Ernte weiterverarbeitet. In Tabelle 1 sind die Daten der untersuchten Sorten zusammengefasst.

Tab. 1: Charakteristika der verschiedenen Kirschsornten

Sorte	Ernte- datum	Alter der Sorte	Markt- relevanz
Celeste	06.06.00	6-8 J.	-
Giorgia	13.06.00	6-8 J.	-
Starking Hardy Giant	20.06.00	ca. 20 J.	+
Schneiders	20.06.00	ca. 100 J.	+++
Van	20.06.00	ca. 20 J.	+
Kordia	28.06.00	ca. 10 J.	+
Summit	28.06.00	?	+
Hedelfinger	10.07.00	ca. 100 J.	+++
Sweetheart	10.07.00	?	+
Regina	10.07.00	ca. 15 J.	+
Hudson	14.07.00	neu	-

Da Allergene mitunter nur in geringen Mengen im Ausgangsmaterial vorliegen und durch ungeeignete Bedingungen während der Extraktion an Aktivität verlieren können, bedarf es einer schonenden Extraktionsmethode, um ausreichende Mengen reaktiven Allergens zu



erhalten. Insbesondere müssen negative Einflüsse von Polyphenoloxidaseaktivitäten vermieden werden.

Für die Herstellung der Extrakte wurde daher eine im PEI entwickelte Methode angewandt, bei der Proteine in einem zeitaufwendigen Tieftemperaturverfahren, nach Abtrennung störender Substanzen, durch Aceton-Präzipitation der Proteine in physiologischem Puffer gelöst werden. Im Verlauf dieser Extraktionsmethode wird das Untersuchungsmaterial weitestgehend bei Temperaturen unter 0°C verarbeitet, nur das Lösen der Proteine in physiologischem Puffer muss bei Temperaturen über 0°C durchgeführt werden. Proteinextrakte, die mit dieser Methode hergestellt wurden, weisen dann eine hohe, für immunologische Untersuchungen notwendige Qualität auf. Die so hergestellten Proteinextrakte wurden dann mit SDS-Page kombiniert mit einer Silber- bzw. Coomassiefärbung (Abb. 1) untersucht, um die Qualität der Extrakte für nachfolgende Experimente sicherzustellen.

In Abb. 1 ist zu erkennen, dass in keinem der untersuchten Proteinextrakte Anzeichen einer Degradation zu erkennen waren. Es sind auch im hochmolekularen Bereich scharfe Banden zu erkennen und keine Abbauprodukte im niedermolekularen Bereich zu verzeichnen. Da das charakterisierende Allergen Pru av 1 ein Molekulargewicht von ca. 18 kD besitzt, war vor allem der Bereich unterhalb 20 kD für die Auswahl eines geeigneten Wirtsorganismus von Bedeutung. In diesem Bereich waren keine wesentlichen Unterschiede im Proteinmuster der verschiedenen Kirscharten zu erkennen. Aus der Untersuchung des Proteinmusters ließ sich die Eignung der hergestellten Extrakte für weitere Untersuchungen feststellen.

Immunoblotting

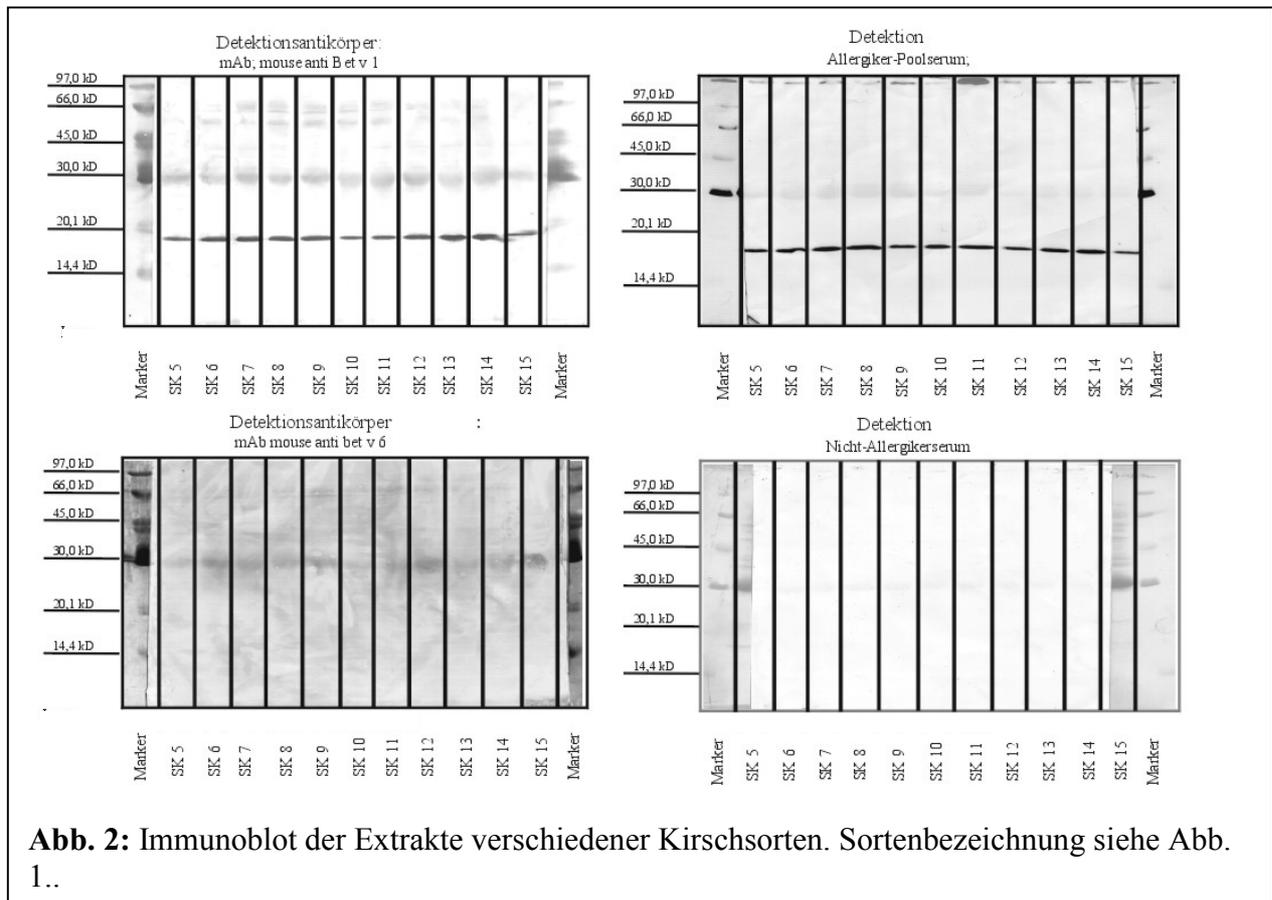
Für die Auswahl einer geeigneten Kirscharten waren die möglichen Sortenunterschiede in der Reaktivität oder Menge an Pru av 1 von besonderem Interesse. Deshalb wurden zunächst Immunoblots mit Extrakten aller 11 Kirscharten angefertigt. Um eine von einzelnen Serumcharakteristika unabhängige Aussage über die Reaktivität oder Menge an Pru av 1 zu erhalten, wurde mit einem Poolserum von 5 Patienten mit pollenassoziierter Kirschenallergie und IgE gegen Pru av 1, sowie einem kreuzreagierendem mAk, der gegen das verwandte Hauptallergen Bet v 1 aus Birkenpollen hergestellt wurde (maus anti-Bet v 1; Zellkulturüberstand), detektiert. Für die immunologische Untersuchung der Extrakte wurden Patientenserum gewählt, die stark mit dem Hauptallergen aus Kirschen (Pru av 1) bzw. mit dem rekombinant hergestelltes Allergen (rPru av 1) aber nicht mit den Minorallergenen rPru av 3 oder rPru av 4 reagieren. Zur Charakterisierung der Patientenserum wurde beim PEI unter anderem der Enzym Allergo-Sorbens-Test (EAST) eingesetzt. Mit dieser Methode ist es möglich allergenspezifisches IgE bzw. IgE gegen Allergene aus Proteinextrakten zu quantifizieren. Das Allergen oder die Proteine aus Extrakten werden dabei kovalent an Bromcyan-aktivierte Filterpapierscheiben gekoppelt und mit Patientenserum inkubiert. Mit einem enzymgekoppelten anti-human IgE Antikörper kann die Menge an gebundenem IgE nach einer Farbreaktion quantifiziert werden. Für die Untersuchung der Proteinextrakte im

Rahmen dieser Studie wurden gut charakterisierte Seren aus der Serenbank des PEI ausgewählt (Tabelle 2). Die Ergebnisse der Immunoblots mit dem Patientenpoolserum sowie mit dem mAk maus anti-Bet v 1 sind in Abb 2 dargestellt.

Tabelle 2: Charakteristika ausgewählter Patienten und derer Seren

Serum	EAST-Klassen			Extrakt	Symptomatik *
	rLTP	rPru av 1	rPru av 4		
PEI 50	0	4	0	3	Rh, Ls, Hs
PEI 79	0	3	0	3	Ms, Ls, Atem
PEI 147	0	4	0	3	Ms, Hj
PEI 160	0	3	0	2	Ls, Hj
PEI 165	0	3	0	2	Hs, Atem

*Atem: Atemnot; Hs: Halsschwellung; Hj: Halsjucken; Ls: Lippenschwellung;
Ms: Mundschwellung;
Rh: Rhinitis;



Die Proteinextrakte wurden zunächst durch eine reduzierende SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem Semidry-Blotting-Verfahren auf einer Nitrocellulosemembran immobilisiert. Sowohl mit dem Poolserum als auch mit dem mAk gegen Bet v 1 konnte in allen elf Extrakten eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 18 kD spezifisch detektiert werden. In den Kontrollexperimenten mit Nichtallergikerserum, sowie einem mAk gegen Bet v 6, einem Minorallergen aus Birkenpollen, konnten keine Proteinbanden detektiert werden. Die Kontrollexperimente stellten sicher, dass keine unspezifische Bindung von Serumbestandteilen oder Zellkulturüberständen für die Detektion verantwortlich ist. Die Bandenintensität der verschiedenen Kirschextrakte ließen keine bzw. nur geringfügige Unterschiede in der Reaktivität oder Menge an immunreaktivem Pru av 1 erkennen. Die untersuchten Kirschvarietäten waren daher alle gleichermaßen für eine gentechnische Veränderung geeignet.

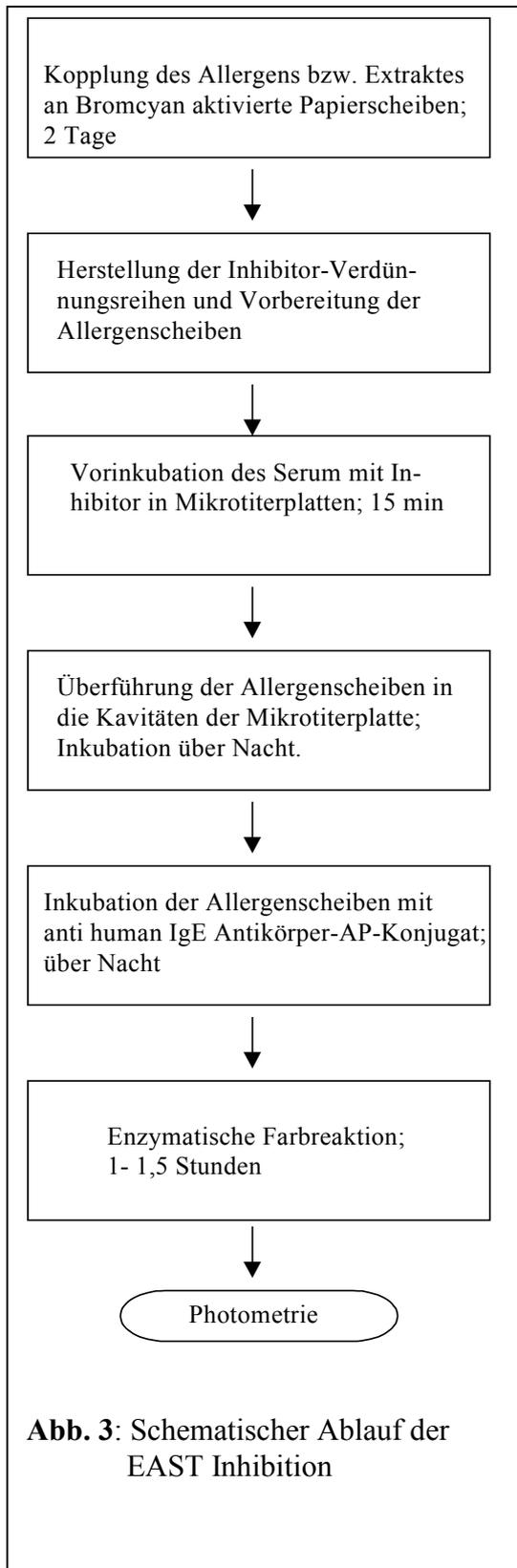
EAST-Inhibition

Um die Reaktivitäten der verschiedenen Extrakte näher zu untersuchen, wurden diese in Inhibitionsversuchen im Enzym-Allergo-Sorbent-Test (EAST) untersucht. Die Ergebnisse der Immunoblots können nur eine erste Orientierung über stark variierende Reaktivitäten liefern. Die EAST-Inhibition ermöglicht es hingegen Unterschiede quantitativ zu erfassen. Die dosisabhängige Inhibition (EAST-Inhibition) von spezifischem IgE dient primär zur vergleichenden Ermittlung der gesamten allergenen Aktivität von Allergenextraktchargen. Ferner können in diesem Inhibitions-ELISA kreuzreaktive Strukturen in Extrakten aus verschiedenen allergenen Materialien (z.B. Pollen und Früchten) bzw. auf verschiedenen Allergenen mit Hilfe von Patientenseren ermittelt werden. Dabei wird gemessen, in welchem Maße ein in Lösung befindliches Allergen oder ein Allergenextrakt die Bindung zwischen dem spezifischen IgE im Humanserum und dem immobilisierten Allergen (kovalent gebunden an aktivierte Papierscheiben) hemmen kann. Es handelt sich somit um einen kompetitiven Immuntest. Stark homologe Allergene oder identische Allergene inhibieren die Bindung spezifischen IgE vollständig bzw. erreichen eine Inhibition von über 90 %.

Das Grundprinzip der EAST-Inhibition

Der Ablauf der EAST- Inhibition ist in Abb. 3 schematisch dargestellt. Die Kopplung der Allergene erfolgt kovalent über freie Aminogruppen der Proteine an Bromcyan aktivierte Filterpapierscheiben. Der Immobilisierung der Allergene folgen mehrere Schritte, die der Deaktivierung von überschüssigen Bindungsstellen, sowie der Umpufferung der Scheiben in physiologische Lösung dienen. Verschiedene Verdünnungen der Inhibitoren (Allergene oder Extrakte) werden in 96-Well Mikrotiterplatten zusammen mit einer geeigneten Verdünnung Allergikerserum vorinkubiert, um die Bindung der IgE-Antikörper an die Inhibitoren zu ermöglichen. Im Anschluß werden die mit Allergen oder Extrakt belegten Scheiben in die Kavitäten gegeben und über Nacht mit der Inhibitor/Serum-Mischung inkubiert. In einer

Gleichgewichtsreaktion binden nun die IgE Antikörper, je nach Verhältnis und Reaktivität der gekoppelten Allergene und Inhibitoren an immobilisiertem Allergen oder frei in der Lösung vorliegenden Inhibitor. In einem Waschschrift werden dann Serum, Inhibitor und daran gebundenes IgE aus den Kavitäten entfernt.

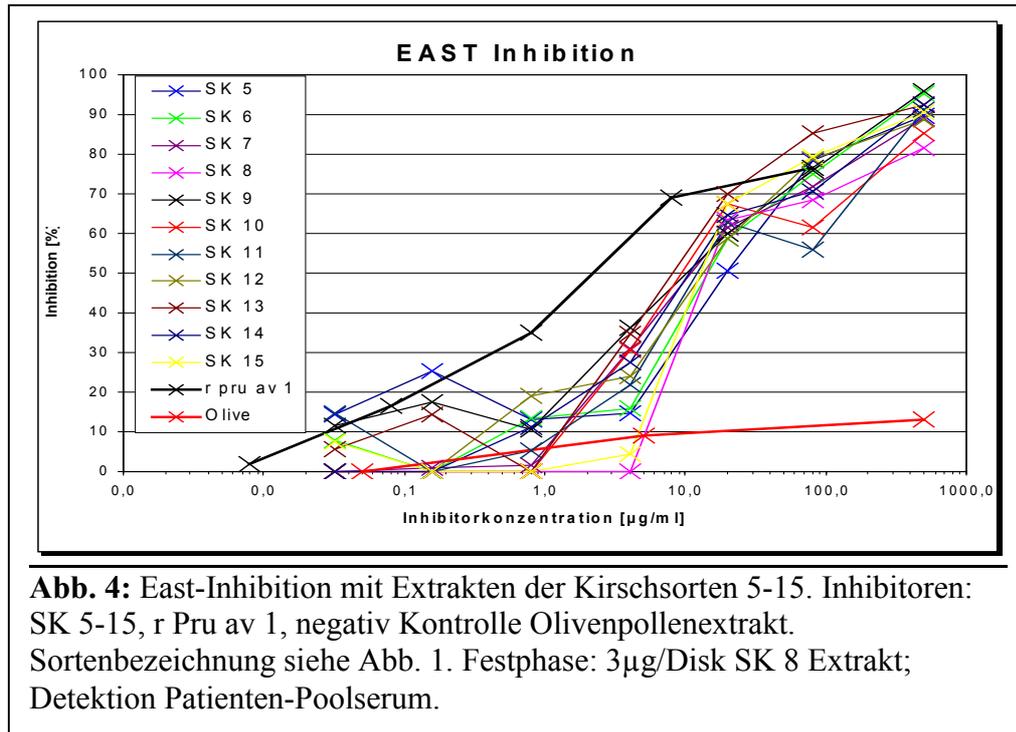


Nur von immobilisiertem Allergen oder Extrakt gebundenes IgE wird dann nach Inkubation mit enzymgekoppelten anti-human IgE Antikörpern durch eine Farbreaktion detektiert. Steigende Mengen an eingesetztem Inhibitor führen hierbei zu einer zunehmenden Abschwächung der Farbreaktion. Führen gleiche Mengen an als Inhibitor eingesetztem Extrakt zu verschiedenen starken Abschwächungen der Farbreaktion kann dies Aufschluss geben über Unterschiede in der darin enthaltenen Menge eines Allergens. Allergene mit unterschiedlichen Epitopen ergeben in der EAST Inhibition beispielsweise abweichende Steigungen in der Dosisabhängigkeit der Farbreaktion.

Konzeption und Ergebnisse der EAST-Inhibition

Ziel der Untersuchung war es zu ermitteln, ob und wie stark sich die verschiedenen Kirscharten in ihrem Gehalt an Pru av 1 oder dessen Immunreaktivität unterscheiden. Ausgehend von dieser Zielsetzung war es ausreichend, die Reaktivität oder Menge an Pru av 1 der Kirscharten relativ zueinander zu bestimmen.

Als immobilisierter Reaktionspartner wurde Extrakt der Varietät SK 8 (Schneiders) eingesetzt. Die Extrakte aller Sorten einschließlich SK 8 wurden in verschiedenen Verdünnungen als Inhibitoren eingesetzt. Als Positivkontrolle der Reaktion und um zu überprüfen, ob der Serum-Pool IgE gegen andere Allergene als Pru av 1 enthält, wurden Verdünnungen von rekombinantem Pru av 1



eingesetzt. Zur Kontrolle unspezifischer Bindungen wurde Extrakt aus Olivenpollen angewandt. Im Vorfeld des Experiments wurden die Serumverdünnung die Inhibitorkonzentration sowie die Proteinkonzentration zur Kopplung an Filterpapierscheiben in mehreren Untersuchungen optimiert. Die Ergebnisse der Inhibition sind in Abb. 4 dargestellt. Die Steigung der Geraden war zwischen den Extrakten und der Positivkontrolle sehr ähnlich. Rekombinantes Pru av 1 war in der Lage die Bindung von IgE im Vergleich zu einer nicht inhibierten Kontrolle vollständig zu unterdrücken. Die Inhibition war demnach in allen Fällen auf die Reaktivität von Pru av 1 Isoformen zurückzuführen. Das Serum wies offensichtlich kein oder nicht mehr messbar wenig IgE gegen andere Allergene aus Kirsche auf. Die verschiedenen Extrakte wiesen leichte Unterschiede in der Konzentration bei 50 % Inhibition auf. Die Unterschiede waren jedoch noch so gering, dass kein besonders stark reaktiver Extrakt oder eine Sorte mit ausgeprägt schwacher Reaktivität identifiziert werden konnte. Die Abweichungen der einzelnen Ergebnisse lagen innerhalb der Fehlergrenzen des Meßsystems und waren nicht zwingend auf Unterschiede im Allergengehalt oder der Reaktivität der Pru av 1 Isoformen zurückzuführen. Demnach eigneten sich aus allergologisch-biochemischer Sicht alle elf untersuchten Sorten gleichermaßen für einen Einsatz im weiteren Verlauf des Projektes. Die Arbeiten zum Punkt A1 (Identifizierung des optimalen Wirtsorganismus) waren damit abgeschlossen.

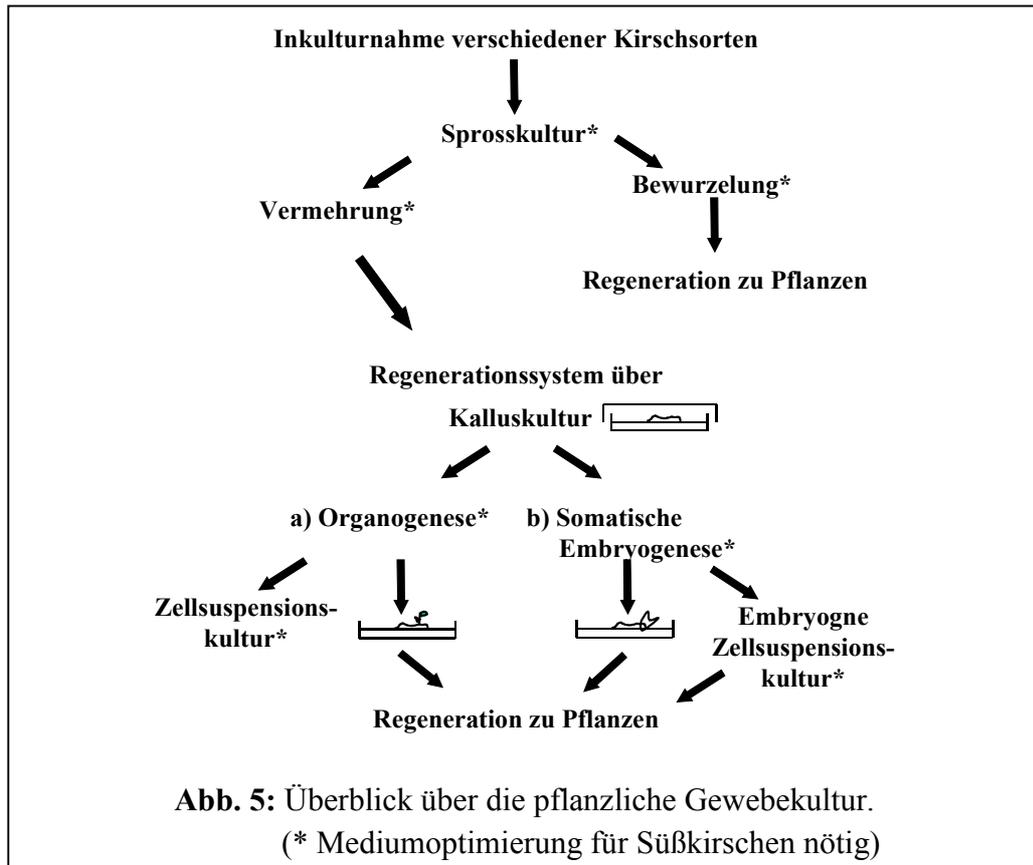
B Entwicklung von *in vitro*-Kulturen der Süßkirsche (DLR)

Pflanzliche Gewebekultur

Die wichtigsten Ausgangsexplantate zur Etablierung von *in vitro*-Kulturen sind Achselknospen mit ihrer hohen morphogenetischen Potenz. In Abbildung 5 ist eine Übersicht der pflanzlichen Gewebekultur dargestellt. Auf geeignetem Medium können die Achselknospen zu Sprosskulturen auswachsen, die dann wiederum in speziellen Nährmedien bewurzelt werden können. Eine klonale Massenvermehrung der etablierten Sprosskulturen erfolgt, indem durch geeignete Nährmedien die apikale Dominanz unterbunden wird, was zur Folge hat, dass die Seitentriebe auswachsen können. Diese werden in neues Medium überführt und weitervermehrt. Für die in diesem Projekt zu etablierenden Regenerations- und Transformationsprotokolle können aus dem Gewebe von Blättern oder auch anderen Pflanzenteilen auf unterschiedlichen Nährmedien Kalluskulturen induziert werden. Ausgehend davon ist es generell möglich auf zweierlei unterschiedlicher Arten neue intakte Pflanzen (= Regenerate) zu regenerieren.

Über die Organogenese werden Pflanzen über die Bildung von Adventivsprossen und Adventivwurzeln erzielt. Diese Adventivbildungen können entweder direkt aus einer Einzelzelle des verwendeten Pflanzenteils als auch aus Einzelzellen eines Kallus heraus induziert werden, welcher sich an den Wundrändern des verwendeten Pflanzenteils bildet. Ausgehend von diesem Kallus können in speziellen Nährmedien Zellsuspensionskulturen etabliert werden. Eine Regeneration zu Pflanzen aus den Zellaggregaten dieser Zellsuspensionskulturen ist normalerweise nicht möglich. Jedoch eignen sich diese Kulturen aufgrund ihrer relativen schnellen Verfügbarkeit hervorragend zur Testung auf die Induzierbarkeit der Transkription und Expression von Pru av 1.

Die andere Art der Regeneration von intakten Pflanzen verläuft über eine somatische Embryogenese und somit über die Entwicklung von Embryoiden. Embryoide sind embryoähnliche Bildungen bzw. Embryonen, die auf vegetativem Wege entstehen und bei denen keine Verbindungen über Leitbahnen mit dem Ausgangsgewebe vorhanden sind. Dazu müssen die Kulturbedingungen so ausgewählt werden, dass bestimmte Einzelzellen zu embryogenen Zellen determiniert werden, aus denen sich Embryoide bilden können. Diese Bedingungen zu evaluieren ist jedoch bei holzigen Gewächsen sehr schwierig, da hierbei das pflanzliche Ausgangsgewebe und ihre schon vorhandene Differenzierung eine große Rolle spielt. Ausgehend von embryoiden Strukturen können embryogene Zellsuspensionskulturen in geeigneten Flüssigmedien etabliert werden. Im Gegensatz zu den oben erwähnten nicht embryogenen Zellsuspensionskulturen, kann hierbei auf speziellen Nährmedien eine Konversion zu Pflanzen erzielt werden.



B1 Somatische Embryogenese an Kirschgewebe (DLR)

Die Entstehung somatischer Embryonen, die auch als Embryoide oder Adventivembryonen bezeichnet werden, verläuft entweder über Einzelzellen oder Zellverbände. Die Zellen die hierbei auf die eine oder andere Weise in die Embryoiden eingehen, nennt man embryogen. Sie befinden sich in der Regel an der Oberfläche der betreffenden Gewebekomplexe. Dabei entspricht die Entwicklung zu Embryoiden im Wesentlichen der Stadien der zygoten Embryonen. Um embryogene Zellen zu determinieren, müssen bestimmte sortenspezifische Kulturbedingungen ermittelt werden. Gerade bei holzigen Gewächsen, wie der Süßkirsche, zeigt sich die Induktion somatischer Embryonen als äußerst langwierig und schwierig. Verschiedene Arbeitsgruppen erzielten bei Unterlagssorten von Kirschen somatische Embryonen, wenn sie Wurzeln als Explantate einsetzten. Wurden jedoch unterschiedliche Edelreiser wie 'F12/1', 'Charger', 'FD1-57 4/122' und 'FD1-57 4/17' eingesetzt, so war keine Entwicklung zu Embryoiden zu beobachten. Lediglich aus Kotyledonen von Keimlingen unterschiedlicher Kirscharten war es möglich, somatische Embryonen zu gewinnen. Da jedoch in diesem Projekt reinen Linien benötigt werden und Kirscharten Fremdbefruchter sind, kann eine somatische Embryogenese nicht aus Kotyledonen induziert werden. Deshalb wurden in diesem Projekt *in vitro*-Wurzeln und Zellsuspensionskulturen zur Induktion somatischer Embryonen herangezogen.

Induktion somatischer Embryonen an Wurzeln

Bevor Experimente zur Induktion somatischer Embryonen durchgeführt wurden, war es notwendig die Wurzelbildung von *in vitro*-Kirschpflanzen durch geeignete Medienvarianten anzuregen. Dies wurde exemplarisch bei den Kirschsornten ‘Sweetheart‘ und ‘Schneiders‘ untersucht. Als geeignetste Methode wurde eine Kultivierung der Pflanzen in einem mit Mikroagar verfestigten Wassermedium mit 3-Indolylessigsäure (IBA; 170 mg/l) für 7 Tage bei 4°C in Dunkelheit und einem anschließenden Transfer der Pflanzen auf ½ MS ohne Hormone ermittelt. Der genaue Versuchsaufbau ist in Kapitel B2 (Bewurzelung von *in vitro*-Sprosskulturen und *in vitro*-Regenerate) beschrieben.

Vier Wochen alte Wurzeln wurden gerettet, nach Wurzelspitze und Wurzelmittelstück eingeteilt und auf drei unterschiedliche mit Gelrite verfestigte Medien (L, D, H) aufgelegt (Tabelle 3). Ein weiteres Medium ohne Hormone diente als Kontrolle. Um ebenfalls einen möglichen Lichteinfluß auf die Induktion somatischer Embryonen zu erfassen, wurde ein Teil der Wurzeln im Dunkeln, der andere Teil im Hell-Dunkel-Rhythmus (16h Fotoperiode) bei 24°C±2°C kultiviert. Nach zwei Wochen wurde ein Teil der Wurzeln auf dem gleichen Medium, der andere Teil auf einem Medium ohne Hormone weiterkultiviert. Der Dunkel bzw. Hell-Dunkel-Rhythmus wurde bei den anschließenden vier wöchentlichen Subkulturen beibehalten.

Tab. 3: Hormonvarianten zur Induktion somatischer Embryonen bei ‘Sweetheart‘

Medien- bezeichnung	Basalmedium	Phytohormone [mg/l]					
		BAP	IAA	2,4 D	IBA	NAA	Kinetin
L	Modifiziertes QL-Medium	0.04	-	-	0.06	1	-
D	Modifiziertes QL-Medium	0.2	0.05	-	-	-	-
H	Modifiziertes QL-Medium	-	-	2	0.1	-	1
BAP	6-Benzylaminopurin		IBA	3-Indolylbuttersäure			
IAA	3-Indolylessigsäure		NAA	1-Naphtalenessigsäure			
2,4 D	2,4 Dichlorphenoxyessigsäure						

Bei allen in Dunkelheit kultivierten Wurzelexplantaten, zeigte sich zwei Wochen nach Versuchsbeginn das stärkste Kalliwachstum auf den Medien H und D. Wurden die Explantate entweder auf das gleiche Medium oder auf ein hormonfreies Medium umgesetzt, so war das beste Kalliwachstum wiederum auf dem H-Medium zu beobachten. Mit Ausnahme des H-Mediums bildeten alle Explantate auf allen Medien zusätzliche Wurzeln aus (Ergebnisse nicht dargestellt).

Erfolgte eine Kultivierung der Wurzelstücke im Hell-Dunkel-Rhythmus, so waren zwei Wochen nach Induktionbeginn zunächst wiederum auf dem H-Medium am häufigsten Kalli zu beobachten. Bei einer anschließenden Subkultur der Kalli auf hormonfreiem bzw. auf gleichem Medium zeigte sich sechs Wochen nach Kulturbeginn das beste Kalliwachstum auf

dem L-Medium. Zusätzliche Wurzelbildungen konnten bei fast allen Kulturen festgestellt werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

Insgesamt war eine Kultivierung der Wurzelexplantate auf allen untersuchten Medien im Dunkeln besser als bei einem Hell-Dunkel-Rhythmus. Die angestrebte Induktion von somatischen Embryonen konnte allerdings auch nach einer 9-monatigen Kultivierung nicht beobachtet werden.

Induktion somatischer Embryonen in Zellsuspensionskulturen

Als Alternativmethode zur Gewinnung von Adventivembryonen, wurde die Kultivierung von Zellsuspensionskomplexen in Flüssigkulturen getestet. Hierbei wurden die Zellkomplexe durch Verwendung unterschiedlicher Phytohormone und Variationen von deren Konzentrationen angeregt, embryogene Strukturen zu bilden.

In den Optimierungsversuchen wurde als Basalmedium das MS-Medium (Murashige Skoog) verwendet, da es wegen seines hohen Ammoniumnitratgehalts die Embryogenese fördert. Die im Projekt eingesetzten Hormonkombinationen und -konzentrationen sind in Kapitel B2 (Etablierung von Zellsuspensionskulturen) aufgeführt.

Erste Zellstrukturen, die auf eine embryogene Kompetenz hinwiesen, waren bei der Induktion von Zellsuspensionskulturen unter der Verwendung des G-Mediums (MS-Salze mit 1 mg/l BAP; 6-Benzylaminopurin) bei allen eingesetzten Kirscharten zu sehen. Zur Überprüfung der potenziell embryogenen Strukturen, wurden diese auf ein mit Gelrite verfestigtes QL-Medium (Quoirin-Lepoivre-Medium) ohne Hormone und wahlweise mit 1 mg/l BAP überführt. Die Subkultur erfolgte alle 4 Wochen auf jeweils dem gleichen Medium. Eine Entwicklung dieser potenziell embryoiden Strukturen zu Pflanzen konnte nur in einem Fall beobachtet werden. Bei allen anderen Strukturen war eine Konversion zu Pflanzen auf den eingesetzten Medien nicht möglich. Diese Untersuchungen wiesen darauf hin, dass möglicherweise embryoide Strukturen vorliegen, die jedoch auf den eingesetzten Medienvarianten nicht zu Pflanzen regeneriert werden können.

Wie in Kapitel E1/5 (Etablierung von Regenerationsprotokollen) dargestellt, wurde über den Weg der Organogenese ein Regenerationssystem der Kirsche deutlich schneller und erfolgreicher etabliert als über den Weg der somatischen Embryogenese. Daher wurden die Untersuchungen zur somatischen Embryogenese nicht weiterverfolgt.

B2 Etablierung von *in vitro*-Kulturen (Spross-, Kallus-, Zellsuspensionskulturen; DLR)

Etablierung von *in vitro*-Sprosskulturen

Arbeiten zur Inkulturnahme unterschiedlicher Kirschsornten wurden, ausgehend von jungen Trieben aus dem Freiland, im Juli/August 2000 begonnen. Dabei zeigte sich allerdings, dass zu diesem Zeitpunkt die Knospen schon der winterlichen Vollruhe unterlagen. Deswegen konnte erst im Dezember 2000 (Ende der Knospenruhe) mit dem Aufbau der Gewebekultur begonnen werden. Da zu diesem Zeitpunkt die Allergenitäts-Untersuchungen des Paul-Ehrlich-Instituts keine quantitativen Unterschiede zwischen den einzelnen Kirschextrakten ergaben (A: Identifizierung des optimalen Wirtsorganismus), wurden die sieben wichtigsten Marktsorten in Gewebekultur genommen (Tabelle 4). Die Untersuchung der Kopienanzahl der Pru av1 Genfamilie (Kapitel C1; Untersuchungen der Kopienanzahl der Pru av 1-Genfamilie) erfolgte jedoch bei allen aufgeführten Süßkirschsornten.

Tabelle 4: Übersicht über die in der Gewebekultur und den molekularen Untersuchungen zur Kopienzahl von Pru av 1 eingesetzten Kirschsornten.

Kirschsornten	Bez. DLR	Bez. PEI	Gewebe- kultur	Untersuchung der Kopienanzahl der Pru av 1 Genfamilie (C1)
Celeste	Sorte 1	SK5	–	+
Giorgia	Sorte 2	SK6	+	+
Starking Hardy Giant	Sorte 3	SK7	+	+
Schneiders	Sorte 4	SK8	+	+
Van	Sorte 5	SK9	–	+
Kordia	Sorte 6	SK10	+	+
Summit	Sorte 7	SK11	–	+
Hedelfinger	Sorte 8	SK12	+	+
Sweetheart	Sorte 9	SK13	+	+
Regina	Sorte 10	SK14	+	+
Hudson	Sorte 11	SK15	–	+

* – Sorte wurde nicht eingesetzt + Sorte wurde eingesetzt

Zur Etablierung von Sprosskulturen wurde das meristematische Gewebe der sieben unterschiedlichen Kirschsornten eingesetzt. Dabei verhindert der Einsatz des meristematischen Gewebes Kontaminationen durch endogene Pilze und Bakterien. Die Meristeme wurden in ein mit Gelrite verfestigtes modifiziertes QL-Medium überführt (Abbildung 6). Die Wachstumsinduktion erfolgte zu Beginn der Sprosskulturen mit den Phytohormonen IBA (Indol-3-buttersäure; 0,1 mg/l), BAP (6-Benzylaminopurin; 1 mg/l) und GA₃ (Gibberellinsäure; 0,2 mg/l).



Abb. 6: *In vitro*-Knospe der Sorte *Prunus avium* cv. 'Schneiders' vor und zwei Wochen nach Inkulturnahme sowie eine *in vitro*-Pflanze der Sorte 'Hedelfinger'.

Um eine schnelle Massenvermehrung dieser Sprosskulturen zu erzielen, musste die apikale Dominanz, die den Austrieb von Seitenknospen hemmt, durch einen geeigneten Phytohormonzusatz verhindert werden. Dazu wurden die in Tabelle 5 aufgeführten Hormone getestet. Von jeder Sorte wurden ca. 30 Pflanzen zu Versuchsbeginn eingesetzt. Die Bonitur (durchschnittliche Seitentriebbildung (ST) pro Pflanze) erfolgte in einem 4 Wochen Intervall von jeder Subkultur.

Tabelle 5: Hormonvarianten zur klonalen Vermehrung von Sprosskulturen verschiedener Kirschsornten.

Medienbezeichnung	Basalmedium	Phytohormone [mg/l]		
		BAP	IBA	GA ₃
A	modifiziertes QL-Medium	1	–	–
B	modifiziertes QL-Medium	1	–	0.5
C	modifiziertes QL-Medium	–	–	1
D (Kontrolle)	modifiziertes QL-Medium	1	0.1	0.2

* Allen Basalmedien wurde eine zusätzliche Eisenquelle zugefügt. BAP: 6-Benzylaminopurin; IBA: 3-Indolylbuttersäure; GA₃: Gibberellinsäure

Bei allen eingesetzten Phytohormonvarianten und verschiedenen Kirschsornten erwies sich das Medium A hinsichtlich der Seitentriebbildung (ST) am effektivsten (Abb. 7). 'Sweetheart' produzierte bei der ersten Bonitur die häufigste Anzahl an ST (5,5 ST/Pflanze). Mit 0,5 ST/Pflanze bildete die Sorte 'Starking Hardy Giant' am wenigsten ST. Insgesamt entwickelten sich vier Wochen nach Versuchsbeginn bei fast allen Phytohormonvarianten mehr ST als nach acht Wochen. Alle anderen Medien (B, C, D) induzierten lediglich einige bzw. keine ST und wurden somit in weiteren Untersuchungen nicht berücksichtigt. Aufgrund

einer endogenen Bakterieninfektion und sehr langsamen Pflanzenwachstums fiel die Sorte ‘Giorgia‘ bei diesem Versuch aus.

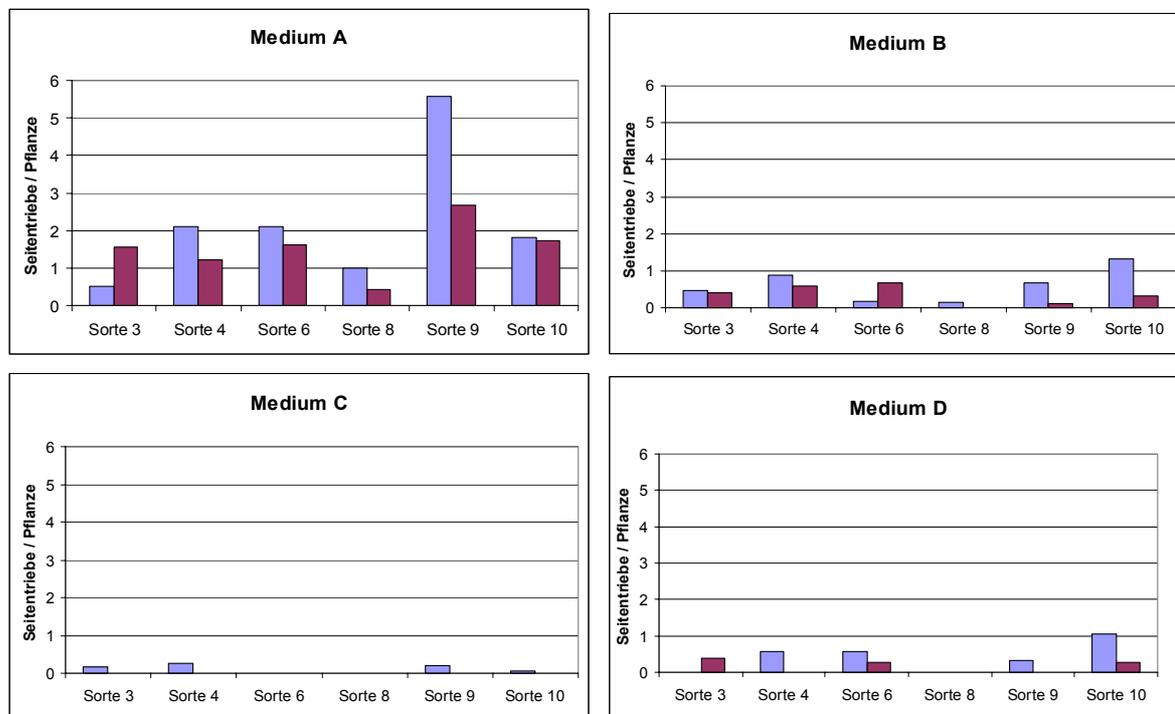


Abb. 7: Einfluss unterschiedlicher Phytohormonvarianten auf die klonale Vermehrung von Sprosskulturen verschiedener Kirscharten.

blauer Balken: 1. Bonitur: 4 Wochen nach Induktionsbeginn;

violetter Balken: 2. Bonitur: 8 Wochen nach Induktionsbeginn;

Sorte 3: Starking Hardy Giant; Sorte 4: Schneiders; Sorte 6: Kordia; Sorte 8: Hedelfinger; Sorte 9: Sweetheart; Sorte 10: Regina; Stichprobenumfang je Sorte n = 30

Um eine zusätzliche Steigerung der Anzahl an Seitenknospen zu erzielen, wurde das Medium A mit einem Medium A2, dem die Phytohormone BAP (2 mg/l) und Naphthyllessigsäure (NES; 0,1 mg/l) zugesetzt wurden, verglichen. Das Phytohormon NES konnte in einigen Arbeitsgruppen, die mit Sprosskulturen von Kirschen arbeiten, erfolgreich zur Induktion von Seitentrieben eingesetzt werden. Der Versuchsumfang jeder Sorte betrug 85 Pflanzen. Die Bonitur (durchschnittliche ST pro Pflanze) erfolgte 2-wöchentlich vor jeder Subkultur.

Bei allen untersuchten Sorten zeigte sich acht Wochen nach Versuchsbeginn eine höhere Anzahl von ST/Pflanze als beim ersten Boniturtermin. Dabei unterschied sich bei fast allen eingesetzten Kirscharten die Bildung von ST lediglich geringfügig auf den Medien A und A2 (Abbildung 8). Eine Ausnahme war ‘Kordia‘ mit 1,48 ST/Pflanze auf Medium A und 0,55 ST/Pflanze auf Medium A2 (2. Bonitur). ‘Sweetheart‘ bildete beim zweiten Boniturtermin ebenfalls auf Medium A (1,48 ST/Pflanze) mehr ST/Pflanze als auf Medium A2 (1,06 ST/Pflanze). Im Gegensatz dazu entwickelten sich bei der Sorte ‘Hedelfinger‘ mit 0,76

ST/Pflanze auf Medium A weniger zusätzliche Triebe als auf Medium A2 (1,13 ST/ Pflanze). Da diese sortenspezifische Ansprüche zur klonalen Vermehrung der unterschiedlichen Sprosskulturen lediglich sehr gering waren, wurde im Folgenden für die Vermehrung der Pflanzen das Medium A eingesetzt.

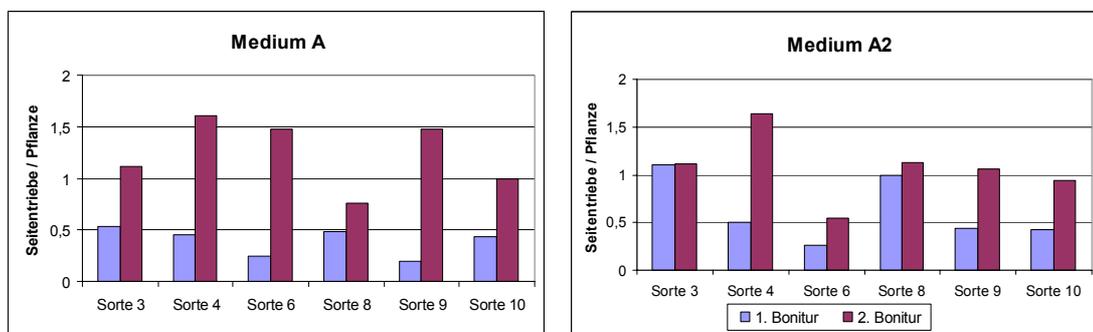


Abb. 8: Einfluss unterschiedlicher Phytohormonvarianten auf die klonale Vermehrung von Sprosskulturen verschiedener Kirschsorten.

* 1. Bonitur: 4 Wochen nach Induktionsbeginn;

2. Bonitur: 8 Wochen nach Induktionsbeginn;

Sorte 3: Starking Hardy Giant; Sorte 4: Schneiders; Sorte 6: Kordia; Sorte 8: Hedelfinger; Sorte 9: Sweetheart; Sorte 10: Regina; Stichprobenumfang je Sorte n = 85

Etablierung von *in vitro*-Kalluskulturen

Zur Etablierung von *in vitro*-Kalluskulturen dienten Kalli, die bei der Etablierung eines Regenerationsprotokolls aus Blattgewebe bzw. Internodien (Organogenese) erzielt wurden (Kapitel E1/5; Etablierung von Regenerationsprotokollen der Süßkirsche). Von den Kirschsorten ‘Starking Hardy Giant’ (SHG), ‘Sweetheart’, ‘Regina’, ‘Schneiders’ und ‘Kordia’ wurde Kalli entnommen und auf mit Gelrite verfestigtes QL-Medium mit 1 mg/L BAP ausplattiert. Die Subkultur erfolgte in einem vier Wochen Intervall auf das gleiche Medium.

Induktion von Zellsuspensionskulturen

Die Etablierung von Zellsuspensionen diente in diesem Projekt zweier verschiedener Untersuchungsansätze. Zum einen können in Zellsuspensionskulturen somatische Embryonen induziert werden (Kapitel B1; Somatische Embryogenese an Kirschgewebe), zum anderen sollte mit Hilfe der Zellsuspensionen untersucht werden, ob das Kirschallergen Pru av 1 an der Abwehrreaktion der Pflanze gegenüber Pathogenen eine Rolle spielt. So ist zum Beispiel bekannt, dass die Proteinsequenzen des Hauptallergen Bet v 1 der Haselnuss eine 40-60%-ige Sequenzidentität mit unterschiedlichen induzierbaren „pathogenesis related“ (PR) Proteinen

besitzt. Dies weist auf eine mögliche Beteiligung von Bet v 1 an Abwehrreaktionen der Pflanzen gegenüber Pathogenen hin.

Als Ausgangsmaterial zur Induktion von Zellsuspensionskulturen dienten Kalli, die bei der Etablierung eines Regenerationsprotokolls aus Blattgewebe bzw. Internodien (Organogenese) erzielt wurden (Kapitel E1/5; Etablierung von Regenerationsprotokollen der Süßkirsche). Von den Kirschsornten ‘Starking Hardy Giant’ (SHG), ‘Sweetheart’, ‘Regina’, ‘Schneiders’ und ‘Kordia’ wurde jeweils 1 g Kallus abgenommen und in 5 ml des jeweiligen Flüssigmediums in einem 25 ml Erlenmeyerkolben kultiviert (Tabelle 6). Zwei Wochen später wurden weitere 5 ml des jeweiligen Mediums zupipettiert. Die Überführung der Kalli jeder Versuchseinheit erfolgte nach 21 Tagen zusammen mit dem Kulturmedium in einen 100 ml Erlenmeyerkolben, indem sich 10 ml neues Flüssigmedium befanden. Die Subkultur wurde wöchentlich in Abhängigkeit des Zellwachstums durchgeführt.

Tabelle 6: Hormonvarianten zur Induktion von somatischen Embryonen in Zellsuspensionskulturen

Medien- bezeichnung	Basalmedium	Phytohormone [mg/l]				
		BAP	2,4 D	IBA	NAA	Kinetin
G	modifiziertes MS-Medium	1	-	-	-	-
H	modifiziertes MS-Medium	-	2	0.1	-	1
R	modifiziertes MS-Medium	1	-	0.1	-	0.2
L	modifiziertes MS-Medium	0.04	-	0.06	1	-
BAP	6-Benzylaminopurin		IBA	3-Indolylbuttersäure		
2,4 D	2,4 Dichlorphenoxyessigsäure		NAA	1-Naphtalenessigsäure		

Die eingesetzten relativ großlumigen Kalli aller Kirschsornten zerfielen 3 bis 4 Tage nach Induktionsbeginn in sehr viele kleine Aggregate (Tabelle 7). Wurde eine Subkultur dieser einzelnen Aggregate in Medium H bzw. L durchgeführt, blieben sehr viele Einzelzellen vorhanden. Erst nach ca. 4 Wochen bildeten sich größere Zellaggregate, wobei bei der Verwendung des Mediums L häufiger Zellkomplexe zu sehen waren als beim Medium H. Fand eine Subkultur der einzelnen Aggregate im Medium G bzw. R statt, so bildeten sich 4 bis 5 Wochen nach Kulturbeginn deutlich größere Komplexe als bei der Verwendung der anderen Medien. Einzelzellen waren sehr selten zu beobachten. Beim Einsatz des Mediums G wurden bei allen Kirschsornten Zellstrukturen beobachtet, die auf eine embryogene Kompetenz hinweisen. Bei weiteren langwierigen Untersuchungen konnte eine Konversion zu Pflanzen bei einigen potenziell embryogenen Strukturen erzielt werden.

Tabelle 7: Ergebnisse der Etablierung von Zellsuspensionskulturen verschiedener Kirschsornten

Medium	Bildung von Einzelzellen	Bildung von Zellaggregaten	Bildung embryoider Strukturen
H	++++	++	-
L	+++	+++	-
G	+	++++	+
R	+	+++	-

-	kein Wachstum	+	sehr geringes Wachstum		
++	geringes Wachstum	+++	mittleres Wachstum	++++	gutes Wachstum

Bewurzelung von *in vitro*-Sprosskulturen und *in vitro*-Regeneraten

Die Induktion von Wurzeln wurden bei den Kirschsornten ‘Sweetheart‘ und ‘Schneiders‘ exemplarisch untersucht. Dabei kamen auch deren Regenerate, welche aus Internodien erzielt wurden, zum Einsatz. Die Pflanzen wurden entweder eine Nacht oder aber eine Woche in ein mit Mikroagar verfestigtes Wassermedium mit 3-Indolylessigsäure (170 mg/l IES; RO Medium) gesteckt und in Dunkelheit bei 4°C kultiviert. Anschließend erfolgte ein Transfer der Pflanzen auf ½ MS ohne Hormone.

Einen Einfluss des Pflanzenalters auf die Bewurzelung konnte bei vier bzw. acht Wochen alten Pflanzen der Sorte ‘Sweetheart‘ nicht festgestellt werden, wenn die Pflanzen eine Nacht in RO Medium kultiviert und dann in ½ MS Medium überführt wurden. In beiden Versuchsansätzen bildeten ca. 60 % aller Pflanzen Wurzeln aus (Tabelle 8). Beim Einsatz von 11 bzw. 18 Tage alten Pflanzen war bei 18.8 % bis 31.3 % eine Wurzelbildung zu beobachten. Die Pflanzen sollten somit mindestens 4 Wochen alt sein bevor sie zur Bewurzelung eingesetzt werden können. Eine deutlich höhere Rate der Bewurzelung mit 87.6 % wurde bei einer Induktion der Wurzeln für 7 Tage bei 4°C bei vier Wochen alten Pflanzen beobachtet. Bei der Kirschsorte ‘Schneiders‘ hingegen zeigten 4 Wochen alte Pflanzen, die eine Nacht in RO Medium bei 4°C in Dunkelheit kultiviert wurden, mit 46.9 % eine geringere Fähigkeit Wurzeln auszubilden als ‘Sweetheart‘. Der Vergleich der Wurzelbildung der Regenerate beider Kirschsornten zeigte bei ‘Sweetheart‘ trotz einem jüngeren Pflanzenalter einen höheren Prozentsatz an Wurzelentwicklung (25 %) als bei ‘Schneiders‘ (12.5 %). Als Fazit für weitere Bewurzelungen sollten die einzusetzenden Kirschkpflanzen mindestens vier Wochen alt sein und die Induktion der Wurzeln auf RO Medium 7 Tage bei 4 °C in Dunkelheit dauern.

Tabelle 8: Ergebnisse der Bewurzelung von Sprosskulturen der Sorte ‘Sweetheart‘ und ‘Schneiders‘ sowie deren Regenerate

Kirschsorte	Induktionsdauer (RO Medium)	Kulturdauer [Tage]	Pflanzenalter zu Versuchsbeginn	bewurzelte Pflanzen [%]
Sweetheart	Übernachtkultur	38	4 Wochen	62.5
	Übernachtkultur	38	8 Wochen	68.8
	7 Tage bei 4°C	44	4 Wochen	87.6
	Übernachtkultur	28	11 Tage	18.8
	Übernachtkultur	28	18 Tage	31.3
Sweetheart Regenerate	Übernachtkultur	28	18 Tage	25.0
Schneiders	Übernachtkultur	28	4 Wochen	46.9
Schneiders Regenerate	Übernachtkultur	28	4 Wochen	12.5

Adaptation von *in vitro*-Pflanzen und *in vitro*-Regeneraten ins Gewächshaus

Die bewurzelten Pflanzen wurden im Kulturgefäß zur Aklimatisierung 48 Stunden vor dem Auspflanzen ins Gewächshaus gestellt. Es kamen 43 Pflanzen der Sorte ‘Sweetheart‘ und 17 Pflanzen der Sorte ‘Schneiders‘ zum Einsatz. Die Wurzeln wurden mit handwarmen Wasser von noch vorhandenen Agarresten befreit und gekürzt. Anschließend wurden die Pflänzchen in Jiffy-Pots entweder in ein wassersaugendes Perlit oder ein Erde-Perlit-Gemisch (3:1) überführt. Die Jiffy-Pots standen zudem in einem kleinen Gewächshaus, um eine 100% Luftfeuchtigkeit zu gewährleisten. Um die Pflanzen vor zu starker Lichteinstrahlung zu schützen, wurde das kleine Gewächshaus mit einem Schattierungsnetz bedeckt. Die Adaption an niedrigere Luftfeuchtigkeit und an die Umgebungstemperatur erfolgte schrittweise durch Entfernen des Schattierungsnetzes und Öffnen des kleinen Gewächshauses.

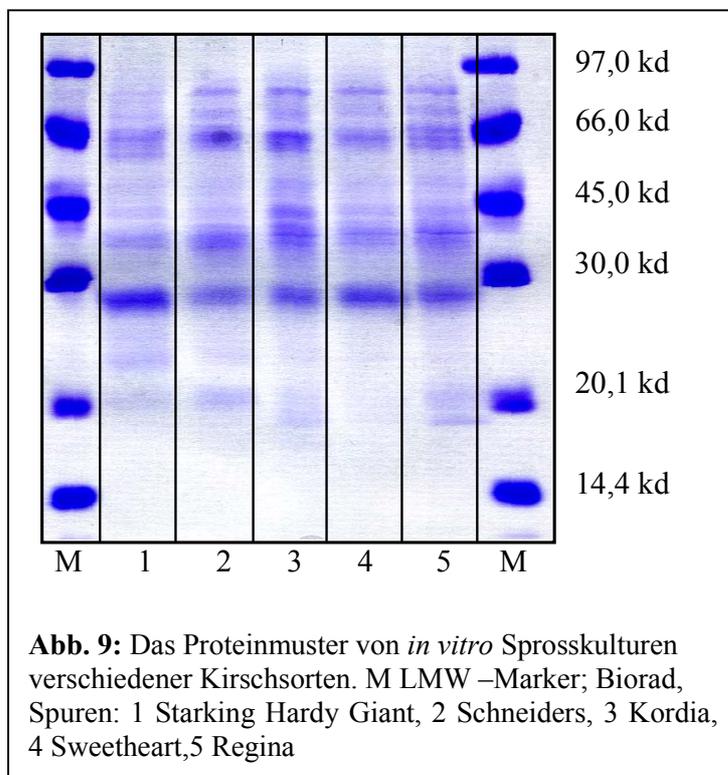
Trotz mehrfachen Besprühens der Pflänzchen mit einer 0.1% Rovral-Lösung gegen den Grauschimmelpilz zeigten viele Pflanzen schon nach einer Woche erste Befallserscheinungen und die zarten Stengel knickten ab. Des weiteren erwies sich eine Umgebungstemperatur von konstant 22°C im Gewächshaus als unzureichend. Zwar hatten die Kirschsprosse genügend Wärme, jedoch fehlte direkt an den Wurzeln eine konstante Temperatur, um das Wurzelwachstum anzuregen. Dies hatte zur Folge, dass die meisten Kirschkpflanzen nach spätestens zwei Wochen aufgrund mangelnder Ernährung starben. Um eine konstante Bodentemperatur der Wurzeln von ca. 22°C zu gewährleisten, wurde eine spezielle Bodenheizung auf einen Tisch im Gewächshaus eingebaut. Dadurch wurde der Prozentsatz an *in vitro*-Kirschkpflanzen, die in Erde adaptiert wurden, deutlich gesteigert.

Die Etablierung verschiedener *in vitro*-Kulturen (Spross-, Kallus-, Zellsuspensionskulturen) und die Adaptation von *in vitro*-Sprosskulturen ins Gewächshaus war damit erfolgreich abgeschlossen.

B3 Testung auf die Induzierbarkeit der Transkription und Expression von Pru av 1 (PEI/DLR)

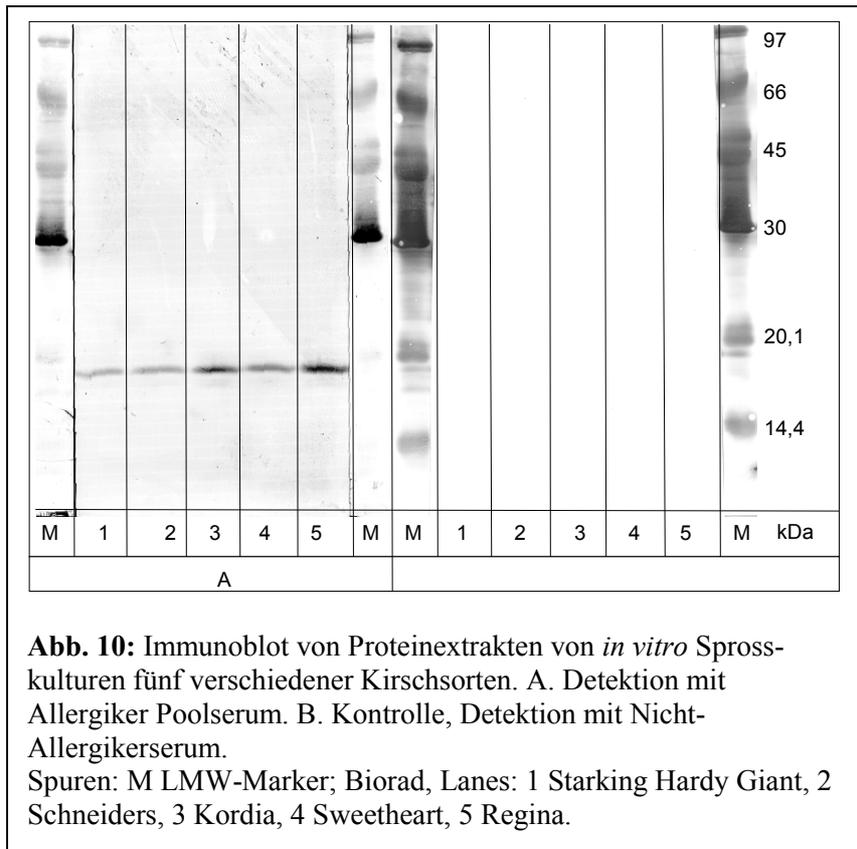
Allergologische Untersuchung von *in vitro*-Sprosskulturen (PEI)

Nach der Etablierung der *in vitro*-Sprosskulturen verschiedener Kirschsornten wurde geprüft, ob sich Pru av 1 auch in den Blättern der *in vitro* Sprosskulturen nachweisen lässt und sich die *in vitro* Kulturen eignen, die Reduktion des allergenen Potentials modellhaft zu zeigen. Hierzu wurden aus den Blättern der *in vitro* Pflanzen Proteinextrakte hergestellt und auf Anwesenheit von Pru av 1 geprüft. Untersucht wurden *in vitro*-Sprosskulturen von fünf verschiedenen Kirschsornten. Die Extraktion des Proteins erfolgte nach dem im Kapitel A beschriebenen Tieftemperaturverfahren. Zur Herstellung der Extrakte wurden die Blätter der *in vitro* Kirschkulturen eingesetzt. Aus ca. 6 g Blattmaterial konnten ca. 8 ml Proteinextrakt mit Konzentrationen zwischen 160 mg/ml und 310 mg/ml gewonnen werden. Die Proteinmuster der Extrakte wurde mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung überprüft.



In der Abbildung 9 ist zu erkennen, dass in keinem der Extrakte Anzeichen einer Degradation vorlagen. Es waren auch im hochmolekularen Bereich scharfe Banden zu erkennen und im niedermolekularen Bereich keine Abbauprodukte nachweisbar. Um zu untersuchen, ob Pru av 1 in den *in vitro*-Sprosskulturen enthalten war, wurden die Extrakte im Immunoblot untersucht. Die Proteinextrakte wurden mittels reduzierender SDS-PAGE aufgetrennt und durch Semi-Dry-Blotting auf Nitrocellulosemembranen übertragen. Die Detektion von

IgE reaktivem Kirschallergen Pru av 1 erfolgte mit Poolserum von Patienten, die gegen Pru av 1 mono-sensibilisiert sind.



Die Abbildung 10 zeigt leichte Abweichungen der verschiedenen Extrakte bezüglich der Reaktivität bzw. Menge an IgE-reaktivem Pru av 1. Für den weiteren Verlauf des Projekts waren diese Unterschiede jedoch nicht von Bedeutung.

Allergologische Untersuchung von Zellsuspensionskulturen (PEI)

Die Eignung von Zellsuspensionskulturen als Testsystem auf die Induzierbarkeit der Transkription und Expression von Pru av 1 wurde in einigen Experimenten untersucht. Der Proteinextrakt, der aus ca. 20 ml Zellsuspensionskultur hergestellt wurde, zeigte mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung scharfe Banden im hochmolekularen Bereich und keinerlei Degradation im niedermolekularen Bereich. In einem anschließenden Immunoblot konnte im Proteinextrakt dieser Zellsuspensionskultur das Pru av 1 mit einem Poolserum von Patienten, die gegen Pru av 1 monosensibilisiert sind, nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Weitergehende Untersuchungen, ob sich Zellsuspensionskulturen eignen, die Überprüfung der Beteiligung des Pru av 1 an Abwehrreaktion der Pflanzen gegenüber Pathogenen zu untersuchen, wurden wie eingangs dargestellt aus Zeitmangel nicht weiter verfolgt.

C Charakterisierung und Sequenzierung der Pru av 1-Gene und Transkripte (PEI/DLR)

C1 Untersuchung der Kopienzahl der Pru av 1-Genfamilie (DLR)

Untersuchung der Kopienzahl der Pru av 1 Genfamilie mittels quantitativer *Real-Time-PCR*

Die quantitative *Real-Time-PCR* (quantitative PCR) stellt ein neuartiges Verfahren dar, aus der Kinetik der PCR-Reaktion die Ausgangsmenge der DNA in einer PCR zu bestimmen. Damit erlaubt diese Methode DNA-Mengen zu quantifizieren. In dem von uns verwendeten Verfahren wurde SYBR-Green als Fluoreszenzfarbstoff verwendet, welches unspezifisch an doppelsträngige DNA bindet. Durch eine Fluoreszenzmessung nach jedem PCR-Zyklus lässt sich somit die Kinetik der PCR bestimmen. Da bei der Verwendung von SYBR-Green nur die Menge der amplifizierten DNA, nicht aber deren Spezifität gemessen werden kann, wurde letztere durch eine Schmelztemperaturanalyse der PCR-Produkte am Ende der PCR bestimmt.

Zur Identifikation der Kopienanzahl des Pru av 1 Allergens wurde zunächst genomische DNA von *in vitro*-Sprosskulturen der Kirschsorten ‘Giorgia’, ‘Starking Hardy Giant’, ‘Schneiders’, ‘Kordia’, ‘Hedelfinger’, ‘Sweetheart’ und ‘Hudson’ isoliert. Die anschließende Real-Time-PCR wurde mit SYBR-Green durchgeführt und nach Überprüfung der Schmelzkurven ausgewertet. Dabei zeigte die Analyse der Schmelzkurven aller eingesetzter Proben und Kontrollen ein einheitliches Bild, d. h. es wurden nur das gewünschte Pru av 1 Gen amplifiziert (Abbildung 11 und 12).

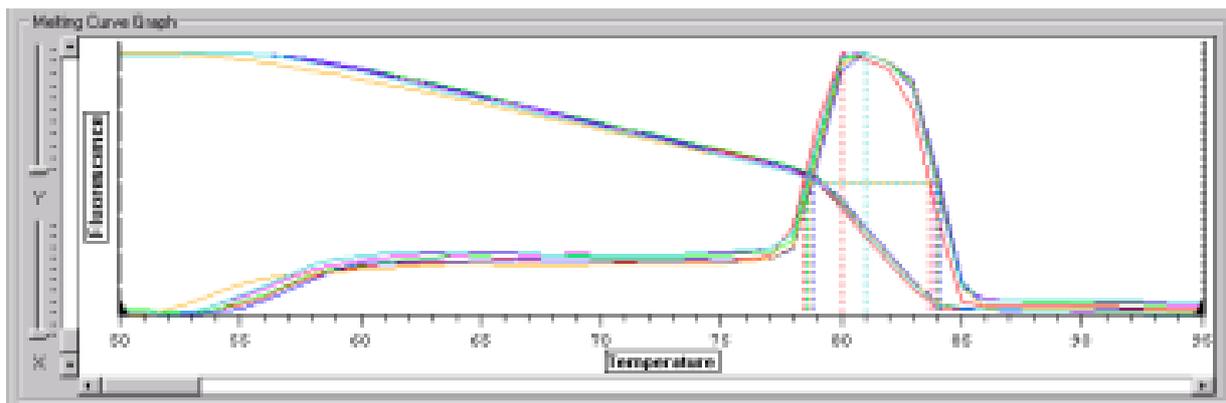


Abb. 11: Schmelzkurvenanalyse der Kontrolle

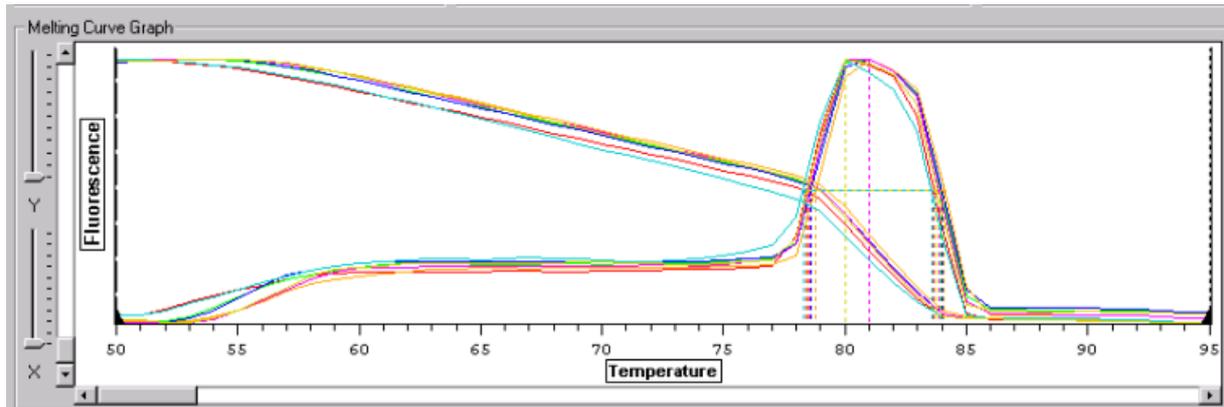


Abb. 12: Schmelzkurvenanalyse von *in vitro*-Kirschkpflanzen unterschiedlicher Kirschsorten

Aufgrund des bekannten Gewichts des gewünschten amplifizierten Genproduktes (219 bp) mit 2.4×10^{-7} pg und dem gesamten DNA-Gehaltes des Kirschengenoms von 0.7 pg / 2C sowie der eingesetzten DNA-Menge der verschiedenen Kirschsorten, konnte die Kopienanzahl des Pru av 1 Allergens im Kirschengenom berechnet werden (Tabelle 9). Diese lagen bei allen untersuchten Kirschsorten in der gleichen Größenordnung und schwankten zwischen vier ('Hudson' und 'Hedelfinger') und sieben ('Giorgia') Kopien.

Tabelle 9: Ermittlung der Kopienanzahl des Pru av 1 Allergens verschiedener Kirschsorten mittels quantitativer PCR.

Kirschsorten	Pru av 1 Kopien
Giorgia	7
Starking Hardy Giant	5
Schneiders	5
Kordia	6
Hedelfinger	4
Sweetheart	5
Hudson	4

Untersuchung der Kopienzahl der Pru av 1-Genfamilie mittels Southern-Blot-Analyse

Parallel zur Bestimmung der Pru av 1 Kopienzahl mittels *Real-Time* PCR wurden auch Southern-Blot-Analysen von Restriktionsendonukleaseverdaus von genomischer Kirsch-DNA durchgeführt. Hierzu wird die genomische DNA mit einer oder mehreren Restriktionsendonukleasen geschnitten, die erhaltenen Fragmente über eine Agarose-

Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Um das gewünschte Gen auf der Membran detektieren zu können, muss eine Sonde hergestellt werden. Dabei wird das zu detektierende Gen entweder radioaktiv (^{32}P) oder nicht-radioaktiv (Bsp. Digoxigenin) markiert. Zum Nachweis des Zielgens hybridisiert man die Einzelstränge der DNA-Fragmente auf der Membran mit den Einzelsträngen einer Sonde. Über die Markierung der Sonde lassen sich die DNA/DNA-Hybriden erfassen. Aus der Anzahl der Banden können vorsichtige Rückschlüsse über die Anzahl der Kopien gezogen werden.

Zur Ermittlung der Kopienanzahl des Pru av 1 Allergens wurde genomische DNA von *in vitro*-Sprosskulturen der Kirschsorten 'Giorgia', 'Starking Hardy Giant', 'Schneiders', 'Kordia', 'Hedelfinger', 'Sweetheart' und 'Hudson' isoliert. Anschließend wurden jeweils 40 µg der jeweiligen DNA mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *EcoRI* geschnitten und von jedem Restriktionsverdau eine Membran mittels Southern Blot hergestellt. Da sich eine *NdeI*-Schnittstelle am Anfang des Pru av 1 Allergens befindet, wird die genomische DNA immer am Anfang des zu identifizierenden Gens geschnitten. Damit lässt sich aus der Anzahl der Banden im *NdeI*-Verdau direkt auf die vorhandenen Genkopien schließen. *EcoRI*-Schnittstellen kommen hingegen nicht innerhalb des Pru av 1 Gens vor. Damit können sich auch mehr als ein Pru av 1 Gen auf einem *EcoRI*-Fragment befinden, wodurch im Southern-Blot weniger *EcoRI*-Signale als *NdeI*-Signale auftreten könnten. Die Detektion des Pru av 1 Allergens erfolgte zuerst mit einer nichtradioaktiven Sonde, die mit Digoxigenin markiert wurde. Da dies nicht zum gewünschten Erfolg führte und eine radioaktive Markierung der Sonde mit anschließender Detektion sensitiver sein kann, wurden in weiteren Experimenten eine ^{32}P markierte Sonde eingesetzt.

Die Anzahl der Genkopien des Pru av 1 Allergens in den verschiedenen Kirschsorten variiert von 9-10 bei den Sorten 'Giorgia' und 6-7 bei 'Sweetheart' beim Restriktionsverdau mit *NdeI* (Tabelle 10). Wurde die genomische DNA mit dem Enzym *EcoRI* geschnitten, so konnten im Allgemeinen weniger Genkopien nachgewiesen werden. Die Anzahl schwankte zwischen 4-7 bei 'Giorgia' und 3-4 bei 'Sweetheart'. Die untersuchten Kirschgenome besaßen jeweils 5-9 Pru av 1 Kopien, lediglich 'Giorgia' scheint 1-2 Kopien mehr als die übrigen Sorten zu besitzen.

Tab. 10: Kopienanzahl des Pru av 1 Allergens verschiedener Kirschsorten mittels Southern-Blot-Analyse

Freilandpflanzen	Pru av 1 Kopien (<i>NdeI</i> -Verdau)	Pru av 1 Kopien (<i>EcoRI</i> -Verdau)
Giorgia	9 – 10	4 – 7
Starking Hardy Giant	7 – 9	5 – 6
Schneiders	6 – 9	5 – 6
Kordia	9	5
Hedelfinger	8	5 – 6
Sweetheart	6 – 7	3 – 4
Hudson	7 – 8	4

Insgesamt zeigte sich bei beiden eingesetzten Methoden, dass bei allen untersuchten Kirschsornten die Pru av 1 Kopienanzahl sich in der gleichen Größenordnung befindet. Experimente zur Identifizierung des optimalen Wirtsorganismus (Kapitel A) bestätigen diese Ergebnisse. Dabei zeigte sich, dass lediglich sehr geringe Unterschiede an immunreaktivem Hauptallergen Pru av 1 zwischen den untersuchten Kirschsornten vorhanden waren.

C2/3 Charakterisierung und Sequenzierung der Pru av 1-Transkripte (PEI)

Arbeiten zur Etablierung einer cDNA-Expressionsbibliothek

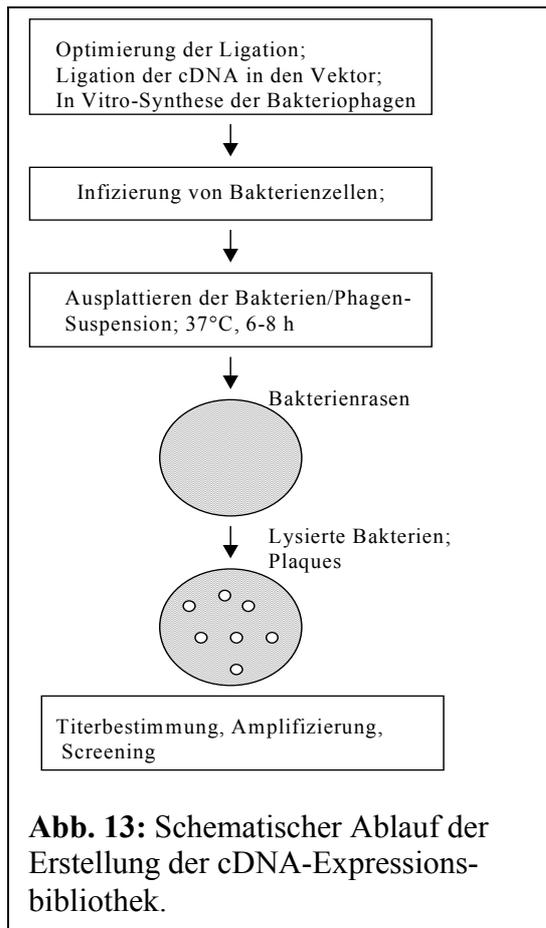
RNA Isolierung

Die Voraussetzung für die Etablierung einer cDNA-Bibliothek ist die Isolierung ausreichender Mengen an reiner mRNA. Mengen von ca. 2000 µg RNA sind erforderlich, um nach Abtrennung von rRNA- und DNA-Verunreinigungen eine ausreichende Menge an größenfraktionierter cDNA zu erhalten. Der Einsatz kommerzieller Kits zur RNA-Isolierung erwies sich als ungeeignet, um mit vertretbarem Zeitaufwand entsprechende Ausbeuten an reiner RNA zu erzielen. Zur Isolierung sehr sauberer RNA wurde daher ein Protokoll gewählt, das es erlaubt, große Mengen pflanzlichen Materials pro Isolierungsschritt einzusetzen und somit ausreichende Ausbeuten an RNA pro Arbeitsgang zu erzielen. Die RNA wird hierbei nach Zellaufschluß in GTC/ β-Mercaptoethanol Puffer durch isopyknische Zentrifugation in einem CsCl-Gleichgewichtsgradienten pelletiert. Bei Ultrazentrifugation einer homogenen CsCl-Lösung bildet sich ein linearer Gradient aus. Sedimentierende Teilchen sammeln sich entsprechend ihres spezifischen Gewichts an definierten Zonen des Gradienten. Hierzu wird die Dichte einer 5,7 M CsCl-Lösung durch Messung des Refraktionsindex bei 22°C präzise eingestellt. Nach 18 Stunden Ultrazentrifugation liegt RNA als Pellet unterhalb des Gradienten vor. Das Pellet wird im Anschluss mit 70% Ethanol mehrfach gewaschen und in DEPC-Wasser gelöst. Nach Natriumacetat/Ethanol-Fällung wird die RNA erneut mehrfach gewaschen und schließlich rekonstituiert.

Zur Isolierung cytoplasmatischer Gesamt-RNA aus Kirschen wurden 100 g Kirschen unter flüssigem Stickstoff feinst homogenisiert und anschließend zur Volumenreduktion lyophilisiert. Zum Zellaufschluß wurden je Arbeitsgang 2000 mg Kirsch-Lyophilisat der Varietät Schneiders pro 50 ml Lysispuffer eingesetzt. Die Suspension wurde ca. 30 min. bei 60°C inkubiert, die Zelltrümmer abzentrifugiert und der klare Überstand zur Ultrazentrifugation eingesetzt. Die CsCl-Lösung wird hierzu mit dem Überstand überschichtet und 18 h ultrazentrifugiert. Nach dem Dekantieren der Lösungen wurde die RNA wie oben beschrieben gereinigt. Die Ausbeute lag bei etwa 100µg RNA/mg Lyophilisat. Aus 48 RNA-Isolaten konnten nach Umfällung, Vereinigung der Ansätze gefolgt von einem DNase-

Verdau, zur Entfernung von Resten genomischer DNA, ca. 1600 µg Gesamt-RNA zur Isolierung von polyadenylierter (polyA) mRNA eingesetzt werden.

Die zur cDNA-Synthese erforderliche mRNA wurde mit einem kommerziellen Kit (Qiagen; Oligotex mRNA Kit) isoliert. Das Prinzip der Methode beruht auf der selektiven Hybridisierung polyadenylierter RNA an dC₁₀T₃₀-Oligonucleotiden. Die Nucleotide sind kovalent an Polystyrene Latex Partikel gebunden und ermöglichen so die selektive Anreicherung von polyadenylierter RNA. Aus ca. 1600 µg gesamt RNA konnten mit dieser Methode ca. 20 µg polyA mRNA isoliert werden.



cDNA-Synthese und Etablierung einer cDNA-Expressionsbibliothek

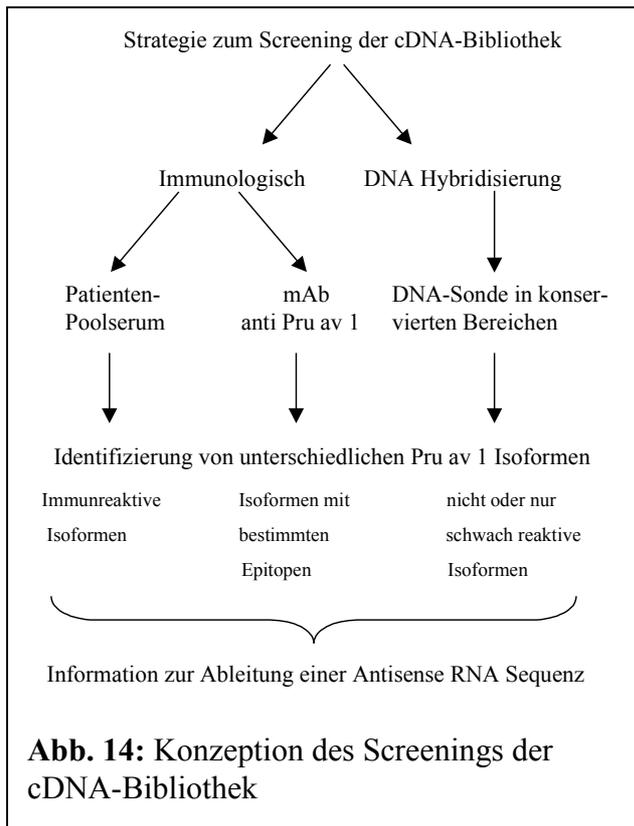
Die cDNA-Synthese wurde ebenfalls mit einem kommerziellen Kit durchgeführt und war bereits abgestimmt auf die spätere Verwendung eines λ -Bakteriophagen-Insertionsvektors zur Erstellung der cDNA-Bibliothek (Novagen; Orient Express Oligo-dT-Primer cDNA Library Construction System [λ -Screen]).

Nach Erststrangsynthese an Oligo-dT-Primern wurde die cDNA durch Blunt End Ligation von *EcoRI* und *HindIII* Linkern, sowie *EcoRI/HindIII*-Verdau und Größenfraktionierung zur Ligation in den λ -Bakteriophagen-Insertionsvektor vorbereitet. Aus 20 μg mRNA konnten so 410 ng cDNA mit einer durchschnittlichen Größe von etwa 1500 bp synthetisiert werden. Der Ablauf der Erstellung der cDNA-Bibliothek ist in Abb. 13 schematisch dargestellt und wird im Weiteren kurz erläutert.

Die cDNA wurde nach Optimierung der entsprechenden Parameter in den Vektor ligiert und Bakteriophagen *in vitro* synthetisiert. Der Ablauf der Titerbestimmung, der Amplifizierung und des Screenings sind prinzipiell gleich und unterscheiden sich nur in der Wahl von Medien und Bakterienstämmen. Nach Infizierung einer Bakterienkultur mit einer definierten Menge Phagen, wurde die Bakterien/Phagen-Suspension in Topagarose gegeben und auf LB-Agarplatten gleichmäßig ausgegossen. In der Folge wuchsen die Bakterien bei 37°C zu einem dichten Rasen aus. Nach etwa 6-8 Stunden erreichten Plaques um initial infizierte Bakterien eine visuell erkennbare Größe. Vor der Amplifizierung der Bibliothek wurde der Titer an Primär-Rekombinanten in *plaque forming units* pro ml (Pfu/ml) ermittelt. Der Titer an primär Rekombinanten betrug 3.5×10^6 Pfu/ml. Nach der Amplifizierung der primär Rekombinanten wurde der Titer der cDNA-Bank zu $1,1 \times 10^{10}$ Pfu/ml bestimmt. Die Erstellung der cDNA-Bibliothek war damit erfolgreich abgeschlossen.

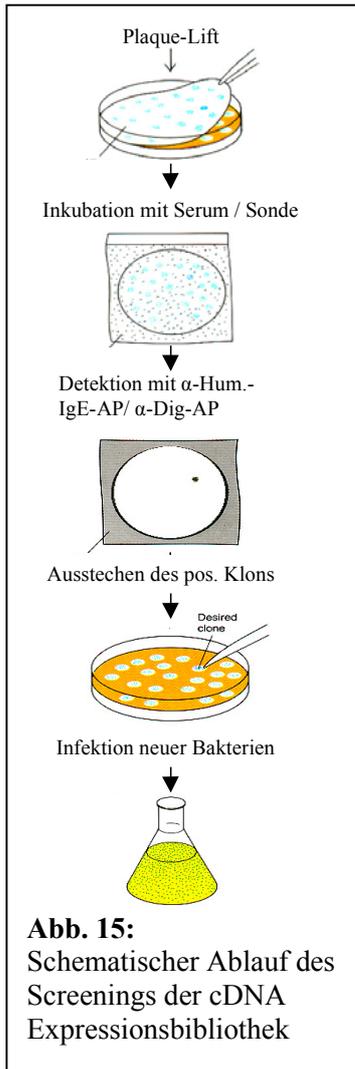
Konzeption zum Screening der cDNA-Bibliothek

Das Screening der cDNA-Bank sollte auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen. Zum einen wurde die Bank immunologisch und zum anderen mit DNA-Sonden untersucht. Der schematische Ablauf des Screenings ist in Abb. 14 dargestellt.



Das immunologische Screening von Plaque-Lifts sollte unter Verwendung des oben beschriebenen Patientenpoolserums, sowie eines ausgewählten mAk (Maus anti Pru av 1) durchgeführt werden. Die Verwendung von Patientenserum sollte zur Detektion von Klonen, die immunreaktive Pru av 1-Isoformen exprimieren führen. Im Gegensatz zur Detektion mit monoklonalen Antikörpern oder einem einzigen Serum sollte bei Verwendung eines Poolserum gewährleistet werden, Klone mit verschiedenen immunreaktiven Pru av 1-Isoformen identifizieren zu können. Dies sollte die Information für die Ableitung einer Antisense RNA-Sequenz liefern, um die Transkription von mRNA zu verhindern, die für stark immunreaktive Isoformen

kodiert. Eine Unterscheidung einzelner Klone hinsichtlich bestimmter Epitope ist hier jedoch nicht möglich. Über den Einsatz monoklonaler Antikörper sollten im Screening Pru av 1-Isoformen identifiziert werden, die ein bestimmtes Epitop tragen. Auf diese Weise sollten Sequenzen ermittelt werden, die besonders stark zur Reaktivität von Pru av 1 beitragen. Die Identifizierung von Klonen mit einer DNA-Sonde sollte darüber hinausgehend auch Sequenzen erfassen, die für nicht oder nur schwach reaktive Isoformen codieren. Um solche Klone detektieren zu können wurde ein Multisequenzalignment mit verschiedenen Bet v 1 Homologen durchgeführt. Diese Sequenzen wurden in der Annahme gewählt, dass konservierte Bereiche der Bet v 1-Homologen auch in den Sequenzen der Pru av 1-Isoformen nicht oder nur schwach variieren. Die DNA-Sonde wurde daher in einem hoch konservierten Bereich der Bet v 1-Homologen gewählt. Die Sonde sollte es ermöglichen auf diese Weise verschiedene Pru av 1-Isoformen unabhängig ihrer immunologischen Reaktivität zu detektieren.

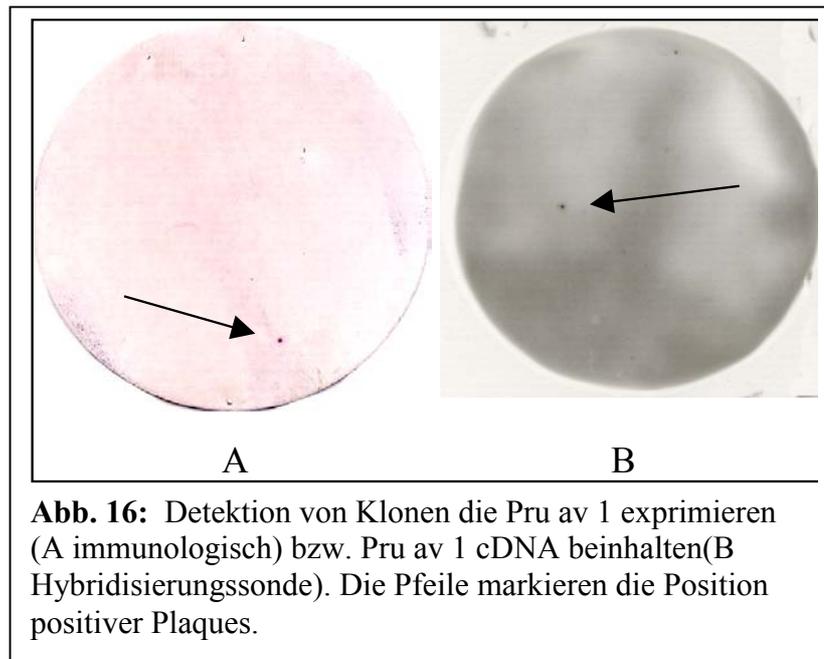


Die Bibliothek wurde mit zwei Screeningstrategien untersucht. In der Abb. 15 ist das Screening der cDNA-Expressionsbibliothek schematisch dargestellt.

Das Screening der Expressionsbibliothek mit Patientenserum und einer DNA Sonde unterscheidet sich nicht im prinzipiellen Ablauf sondern lediglich in Details der verschiedenen Arbeitsschritte. In beiden Fällen wurde eine transfektionskompetente Bakterienkultur mit Phagen infiziert und 1 h bei 37°C inkubiert. Nach dem Ausplattieren der Phagen/Bakteriensuspension in Top-Agarose auf LB-Agar wurden sie bis zum Auftreten gut sichtbarer Plaques bei 37°C inkubiert. Für das immunologische Screening wurden Nitrocellulose-membranen auf die Agar-Platten gelegt und eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Nach dem Waschen und Blockieren der Membran in TBST bzw. TBST mit 0.1% Gelatine wird die Membran über Nacht mit 2ml Patientenpoolserum (1:10 in TBST mit 0.1% BSA) inkubiert. Das Poolserum wurde vor der Verwendung, zur Vermeidung unspezifischer Bindung an *E. coli*-Bestandteile, an *E. coli*-Lysat und intakter *E. coli*-Kultur jeweils vier Stunden präabsorbiert. Nach Inkubation der Membran mit anti-human-IgE-alkalische-Phosphatase-Konjugat konnten positive Plaques durch eine Farbreaktion mit BCIP/NBT visuell identifiziert werden.

Zur Identifizierung positiver Plaques mittels einer DNA-Hybridisierungssonde wurde ein Verfahren gewählt, das die Detektion digoxigen markierter DNA mit einem anti-Dig-Fab-Fragment, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase (AP) ermöglicht. Die Detektion erfolgte über die Aufnahme von Chemilumineszenzsignalen nach enzymatischer Umsetzung von CSPD. Die DNA-Sonde, die in einem hochkonservierten Bereich der Bet v 1-Homologen bindet (Pru av 1 gehört zu dieser Proteinfamilie), wurde mit einem kommerziellen Kit hergestellt (PCR-Dig-Probe-Synthesis-Kit, Roche). Die Detektion erfolgte über die Visualisierung von Chemilumineszenz auf Röntgenfilm (Dig-Luminescent-Detection-Kit, Roche). Zu Beginn wurde hierbei ein DNA-Plaque-Lift durchgeführt. Eine Nylonmembran wurde 1 min bei RT auf die Agarplatten gelegt und nachfolgend alkalisch denaturiert und neutralisiert. Nach dem Waschen und Trocknen der Membran wurde die DNA durch UV-Strahlung auf der Membran fixiert. Die Membran wurde anschließend blockiert und bei 65°C mit der Hybridisierungssonde inkubiert. Nach mehreren Waschsritten wurde dann mit anti-Dig-Fab-Fragmenten-AP inkubiert, in Detektionspuffer equilibriert und für 5 min bei 37 °C in CSPD-Lösung inkubiert. Je nach Signalstärke wurden dann Röntgenfilme mit Zeiten zwischen 5 und 30 min belichtet.

In beiden Screening-Verfahren müssen die positiven Plaques ausgestochen werden und erneut ausplattiert werden, da positive Plaques nach dem primären Screening nur zusammen mit anderen Plaques ausgestochen werden können. Erst nach drei bis vier Screeningdurchgängen können die Plaques so weit vereinzelt werden, dass man einen echten Klon isolieren kann. Durch das Screening mit einem Poolserum von Patienten, die gegen Pru av 1 monosensibilisiert sind, konnten 19 unabhängige Klone isoliert werden, die IgE reaktives Pru av 1 exprimieren. Durch den Einsatz einer Hybridisierungssonde, die in einem hochkonservierten Bereich der Bet v 1-Homologen bindet, konnten 15 Klone isoliert werden. In der nachfolgenden Abbildung ist exemplarisch die Detektion von zwei Klonen dargestellt, die Pru av 1 exprimieren bzw. die cDNA-Sequenz von Pru av 1 beinhalten. Die Abbildungen zeigen jeweils die Detektion des primären Screenings der cDNA-Expressionsbibliothek. Auf das Screening mit einem monoklonalen Antikörper wurde verzichtet. Alternativ wurden proteinchemische Methoden (siehe unten) eingesetzt, um das Sequenzvarianz von Pru av 1 umfassend auf Proteinebene zu untersuchen.



Sequenzierung der Transkripte

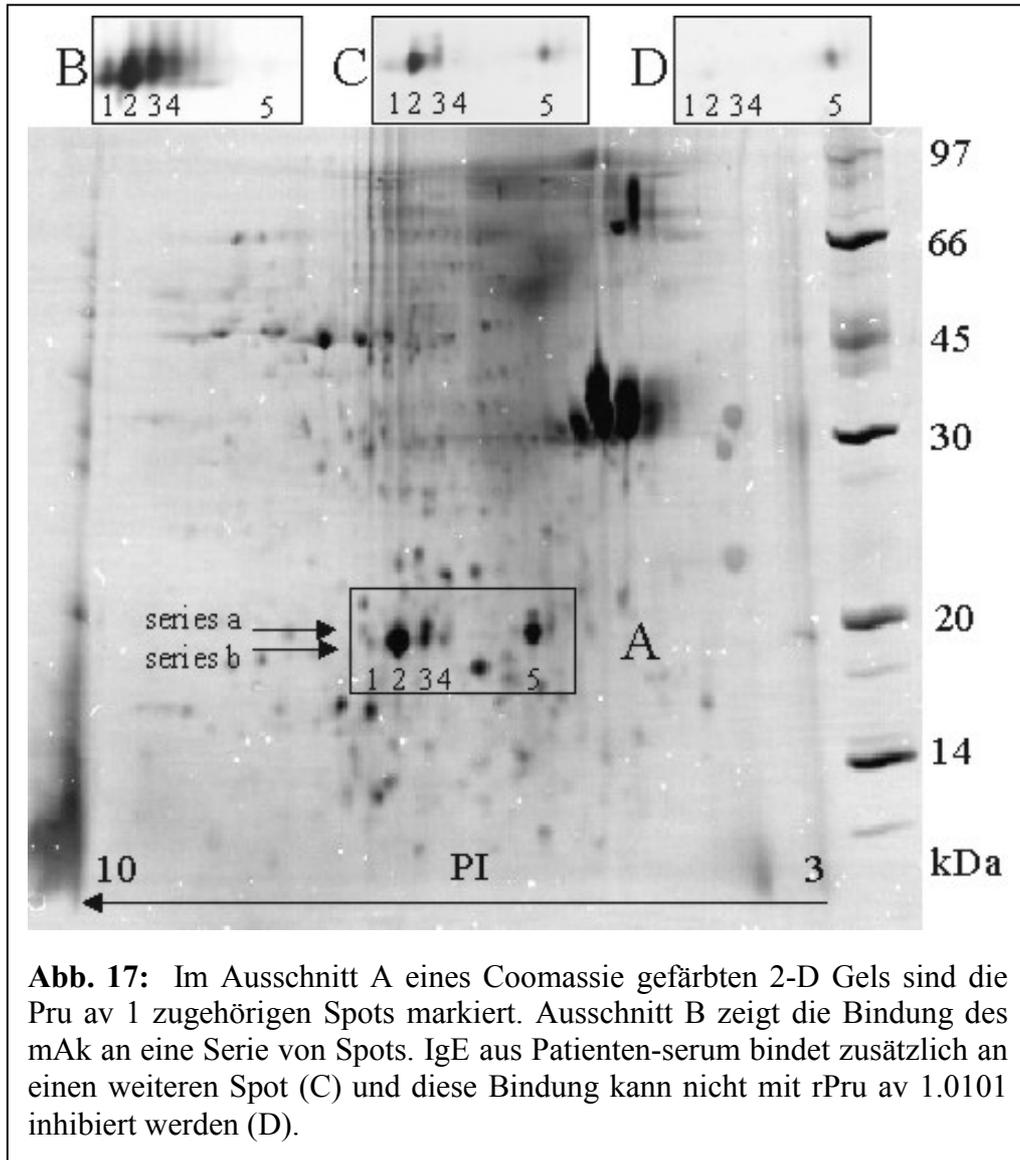
Nachdem positive rekombinante Phagen isoliert wurden, war es für Expression und Sequenzierung notwendig sie in Plasmidklone umzuklonieren. Der hier verwendete λ Screen Vektor bietet die Möglichkeit über ein loxP-cre System automatisch *in vivo* zu subklonieren. Der λ Screen-Vektor enthält ein vollständiges Plasmid, dass von zwei loxP-Schnittstellen flankiert wird. Bakterielle Plasmidklone erhält man durch Infektion von Bakterienstämmen die P1 Cre-Recombinase exprimieren. Die Cre-Recombinase erkennt dabei die lox-P Schnittstellen und generiert das Plasmid über Rekombination. Die auf diese Weise erhaltenen

bakteriellen Klone eignen sich zur Präparation ausreichender Mengen an Plasmid, das aber nicht zur Sequenzierung eingesetzt werden kann, denn die Cre-Rekombinase formt neben einfachen Plasmiden auch ein Gemisch von verschiedenen, nicht-sequenzierbaren Plasmidmultimeren. Zur Sequenzierung wurden daher Plasmide, die direkt nach der Subklonierung gewonnen wurden, in einem weiteren Bakterienstamm kloniert. Die hieraus präparierten Plasmide wurden dann zur Sequenzierung eingesetzt. Eine direkte Sequenzierung der so erhaltenen Klone mit vektorspezifischen Primern war zunächst nicht möglich. Die Elektropherogramme der Sequenzierreaktionen zeigten entweder keine oder nur unlesbare Sequenzen.

Erst ein weiteres umklonieren der Plasmide in einen weiteren Bakterienstamm erlaubte es sequenzierfähige Plasmide zu isolieren. Es wurden 19 Klone aus dem immunologischen Screening der cDNA Bank sequenziert. Fünfzehn dieser Klone zeigten die bereits bekannte DNA Sequenz von Pru av 1 (Scheurer S.; Metzner, K.; Haustein, D.; Vieths, S.; Molecular cloning, expression and characterization of Pru av 1, the major cherry allergen.; Mol. Immunol., 1997, Vol. 34, pp. 619-629). Vier Klone zeigten eine DNA Sequenz die nur zu 78% identisch mit der bereits publizierten Sequenz ist. Auf Aminosäureebene beträgt die Sequenzidentität nur 73%. Diese Isoform von Pru av 1 wird im weiteren als Pru av 1.0201 bezeichnet. Das 1997 publizierte Pru av 1 wird nunmehr als Pru av 1.0101 bezeichnet. Fünfzehn Klone die durch das Screening mit der Hybridisierungssonde isoliert wurden, zeigten ausnahmslos die Sequenz von Pru av 1.0101. Innerhalb der Klone, die Pru av 1.0101 repräsentieren, konnte in insgesamt 15 Fällen ein Basenaustausch an der Position 426 von A nach C beobachtet werden, der jedoch keinen Einfluss auf die abgeleitete Aminosäuresequenz hat.

2-D-PAGE und Massenspektrometrie

Um die Sequenzvariation von Pru av 1 umfassend zu untersuchen, wurden zusätzlich zu der ursprünglichen Projektplanung proteinchemische Methoden eingesetzt. Der Einsatz von 2-dimensionaler Polyacrylamidgelelektrophorese (2-D-PAGE) kombiniert mit Massenspektrometrie und N-Terminaler Microsequenzierung sollte Isoformen erfassen, die in der cDNA Bibliothek möglicherweise stark unterrepräsentiert sind. In der ersten Dimension wurde Proteinextrakt aus reifen Früchten der Varietät *Schneiders* mittels isoelektrischer Fokussierung in einem pH Gradienten von pH3-pH10 aufgetrennt. Nachfolgend wurden die Proteine mit SDS-PAGE in der zweiten Dimension aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen transferiert. Zur Immundetektion der Membranen wurde ein Poolserum gegen Pru av 1 monosensibilisierter Patienten, sowie ein gegen Pru av 1 gerichteter monoklonaler, Maus IgG Antikörper (mAk) eingesetzt. Der mAk detektierte eine Serie von Spots der Membran, währenddessen das Poolserum zusätzlich einen Spot mit einem deutlich abweichenden pI nachweisen konnte. Rekombinantes (r) Pru av 1.0101 konnte die Bindung des IgE aus dem Serum an die Serie von Spots inhibieren, nicht jedoch die Bindung an den Spot mit stark abweichendem pI. Ein repräsentatives 2-D-Gel sowie die Ergebnisse des Immunoblots und der Blotinhibition sind in Abb. 17 dargestellt.



Zur weiteren Untersuchung wurden 2-D-Gele für die N-terminale Microsequenzierung auf PVDF-Membranen transferiert und die immunologisch detektierten Proteine den jeweiligen Spots auf der Membran zugeordnet. Für die massenspektrometrische Analyse wurden die entsprechenden Spots direkt aus Coomassie gefärbten Gelen ausgeschnitten und im Gel tryptisch verdaut. Die N-terminalen Sequenzen der ersten fünf Aminosäuren aller Spots waren mit der Sequenz des bereits publizierten Pru av 1.0101 identisch. Die aus dem tryptischen Verdau resultierenden Peptide aller Spots wurden daher mit Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight MS (MALDI-TOF-MS) und Nano-Electro-Spray Ionization tandem MS (Nano-ESI-MS/MS) untersucht, um die interne Sequenz der Proteine aufzuklären. Die Spots 1 bis 4 in den Reihen a und b wurden als Pru av 1.0101 bestätigt. Zwischen 31% und 98% der Aminosäuresequenz wurden mit MALDI-TOF-MS nachgewiesen. Es konnten keine Peptide in diesen Spots mit Nano-ESI-MS/MS sequenziert werden die eine von Pru av 1.0101 abweichende Sequenz hatten. Das Auftreten von Spotserien mit unterschiedlichem pI bei identischer Sequenz kann durch teilweise Desamidierung von Asparagin erklärt werden. In jedem dieser Spots befinden sich sequenziell identische Proteine, die sich nur in der Zahl der

desamidierten Aspariginreste unterscheiden. Die Analyse der Peptide aus Spot 5 mit MALDI-TOF-MS bestätigte die aus der cDNA isolierte Sequenz von Pru av 1.0201 auf Proteinebene. 89% der Aminosäuresequenz von Pru av 1.0201 konnten mit MALDI-TOF-MS nachgewiesen werden. Die Sequenzierung einiger interner Peptide aus diesem Spot mit Nano ESI-MS/MS bestätigten die MALDI-TOF-MS Ergebnisse. Einige Peptidmassen aus den MALDI-TOF-MS Daten, die nicht Pru av 1.0201 zugeordnet werden konnten, stellten sich nach der Sequenzierung mit MS/MS als ähnlich aber nicht identisch zu Pru av 1.0201 heraus. Um diese Pru av 1 Variante auf cDNA Ebene nachweisen zu können, wurden in Spot 5 die ersten 20 Aminosäuren N-terminal sequenziert. Ausgehend von den Aminosäuresequenzen aus N-terminaler- und MS/MS-Sequenzierung wurden Primer zur Amplifizierung dieser Pru av 1 Variante aus cDNA abgeleitet. PCR-Produkte, die mit diesen Primern amplifiziert wurden konnten nach Klonierung in *E.-coli* sequenziert werden. Die resultierenden cDNA Sequenzen von Pru av 1.0202 und Pru av 1.0203 waren zu 94% bzw. 95% identisch zu Pru av 1.0201. Die Sequenzidentität zu Pru av 1.0101 beträgt 73% bzw. 74%. Eine erneute Analyse der bereits vorliegenden MALDI-TOF-MS Daten für Spot 5 zeigte, dass die Aminosäuresequenz von Pru av 1.0202 vollständig erfasst worden war. Pru av 1.0203 konnte auf Proteinebene nicht nachgewiesen werden. Pru av 1.0203 liegt möglicherweise auf Proteinebene nicht vor, oder zumindest in einer Menge unterhalb der Nachweisgrenze unseres Systems. Die Ergebnisse der N-terminalen Sequenzierung sowie der MS sind in Tabelle 11 und Abbildung 18 zusammengefasst. Durch die Kombination von molekularbiologischen und proteinchemischen Methoden konnte eine neue Isoform von Pru av 1 nachgewiesen werden. Diese Isoform umfasst drei Varianten Pru av 1.0201, Pru av 1.0202 und Pru av 1.0203.

	1			40
Pru av 1.01.01	<u>GVFTYSESEFT</u>	<u>SEIPPPRLFK</u>	AFVLDADNLV	<u>PKIAPQAIKH</u>
Pru av 1.02.01	*****SD*S*	*V*****	<u>L**E**T*I</u>	<u>**SV*T</u>
Pru av 1.02.02	<u>*****AD*S*</u>	*V*****	<u>L**E**T*I</u>	<u>**SV*S</u>
Pru av 1.02.03	*****AD*S*	*V*T*****	*L**E**T*I	*****SV*G
	41			80
Pru av 1.01.01	<u>SEILEGDGGP</u>	<u>GTIKKITFGE</u>	<u>GSQYGYVKHK</u>	<u>IDSIDKENYS</u>
Pru av 1.02.01	<u>A**V*****V</u>	<u>*****S***</u>	<u>**H*S***R</u>	<u>**GL**D*FV</u>
Pru av 1.02.02	<u>A**V*****V</u>	<u>*****S***</u>	<u>**H*S***R</u>	<u>**GL**D*FV</u>
Pru av 1.02.03	A**V*****V	*****S***	**H*S***R	**GL**D*FV
	81			120
Pru av 1.01.01	<u>YSYTLIEGDA</u>	<u>LGDTLEKISY</u>	<u>ETKLVASPSG</u>	<u>GSIIKSTSHY</u>
Pru av 1.02.01	<u>*N**V****</u>	<u>*S*KI**T*</u>	<u>*I*****AD*</u>	<u>*****N*</u>
Pru av 1.02.02	<u>***S*V****</u>	<u>*S*KV****</u>	<u>*I*****AD*</u>	<u>*****N*</u>
Pru av 1.02.03	***S*V****	*S*KV****	*I*****AD*	*****N*
	121			159
Pru av 1.01.01	<u>HTKGNVEIKE</u>	<u>EHVKAGKEKA</u>	<u>SNLFLKIETY</u>	<u>LKGHPDAYN</u>
Pru av 1.02.01	<u>**T*D****</u>	<u>*D*****</u>	<u>TG*****N*</u>	<u>*AAN***C*</u>
Pru av 1.02.02	<u>**T*D****</u>	<u>*D*****</u>	<u>TG*****N*</u>	<u>*VAN***Y*</u>
Pru av 1.02.03	**T*D****	*D*R*****	TG*****N*	*VAN***Y*

Abb. 18 Aminosäuresequenzen aller nachgewiesenen Pru av 1-Isoformen und Varianten. Peptide, die mit MALDI-TOF-MS nachgewiesen wurden sind unterstrichen. Im Fettdruck sind Peptide markiert, die mit MS/MS sequenziert wurden. N-terminal sequenzierte Peptide sind gelb markiert. Rot zeigt theoretische Trypsinschnittstellen an. Sterne kennzeichnen Aminosäuren, die identisch mit Pru av 1.0101 sind.

Tabelle 11: Zusammenfassung der massenspektrometrischen Ergebnisse.

Spot	1a	1b	2	3a	3b	4a	4b		5			
	Pru av 1.0101								Pru av 1.0201		Pru av 1.0202	
Peptid Position	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	Peptid Position	MS	MS/MS	MS	MS/MS
1-17	+	+	+	+	+	+	+	1-17	+		+	
21-32	+		+	+	+	+	+	18-20	+		+	
33-39	+	+	+	+	+	+	+	21-32	+	+	+	+
40-54	+	+	+	+	+	+	+	33-39	+		+	
40-55			+		+			40-55	+			+
55-68	+		+	+	+	+	+	40-54			+	+
56-68	+	+	+	+	+	+	+	40-55			+	
69-97			+	+	+			55-68	+		+	
71-97	+		+	+	+			56-68	+	+	+	+
77-97	+		+	+	+	+		69-76	+		+	
98-103	+	+	+	+	+	+	+	77-94	+	+	+	+
104-115	+		+	+	+	+	+	77-97			+	+
104-123			+					98-103			+	
116-123	+	+	+	+	+			98-115	+			
124-129			+					104-115	+	+	+	+
124-134	+	+	+	+	+			116-129	+	+	+	+
135-159			+	+	+			116-134	+	+	+	+
140-145		+	+	+	+	+		130-139	+		+	
146-152			+	+	+	+	+	135-139	+		+	
153-159			+	+	+			140-145	+		+	
								146-159			+	
Anteil der erfassten Sequenz	54%	31%	98%	98%	98%	70%	48%	Anteil der erfassten Sequenz	89%	47%	100%	58%

+ Peptide, die mit MALDI-TOF detektiert oder mit Nano-ESI MS/MS sequenziert wurden.

C3 Allergenitätstestung der Pru av 1-Isoformen (PEI)

Die Allergenitätstestung der Pru av 1 Isoformen konnte innerhalb des Projektzeitraums nicht abgeschlossen werden. Mit 2-D-Blot Inhibition konnten jedoch Unterschiede in der IgE Bindung zwischen der neuen Pru av 1 Isoform bzw. ihrer Varianten und Pru av 1.0101 gezeigt werden (Siehe Abschnitt C2/3). Alle Isoformen und die Varianten von Pru av 1 sollen bakteriell exprimiert und hinsichtlich ihrer Konformation und IgE-Reaktivität untersucht werden. Die Arbeiten zu diesem Punkt wurden bereits begonnen und werden erst nach Ende des Projektzeitraums beendet sein.

C4 *In vitro*-Mutagenese von Pru av 1 (PEI)

Ausgehend von der Analyse der Aminosäuresequenz verschieden stark immunreaktiver Isoformen des Hauptallergens aus Birkenpollen (Bet v 1) waren drei Bereiche aus der Sequenz von Bet v 1a und des damit verwandten Hauptallergens aus Kirsche (Pru av 1) als Ziele einer Mutagenese relevant. Es wurde untersucht, ob die stark konservierte P-loop Region, sowie die Aminosäure S112 und der C-terminale Rest 155-159 in ein IgE-Epitop

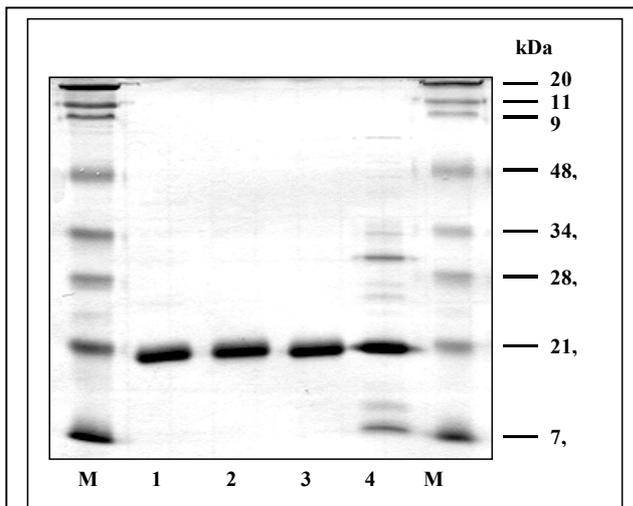
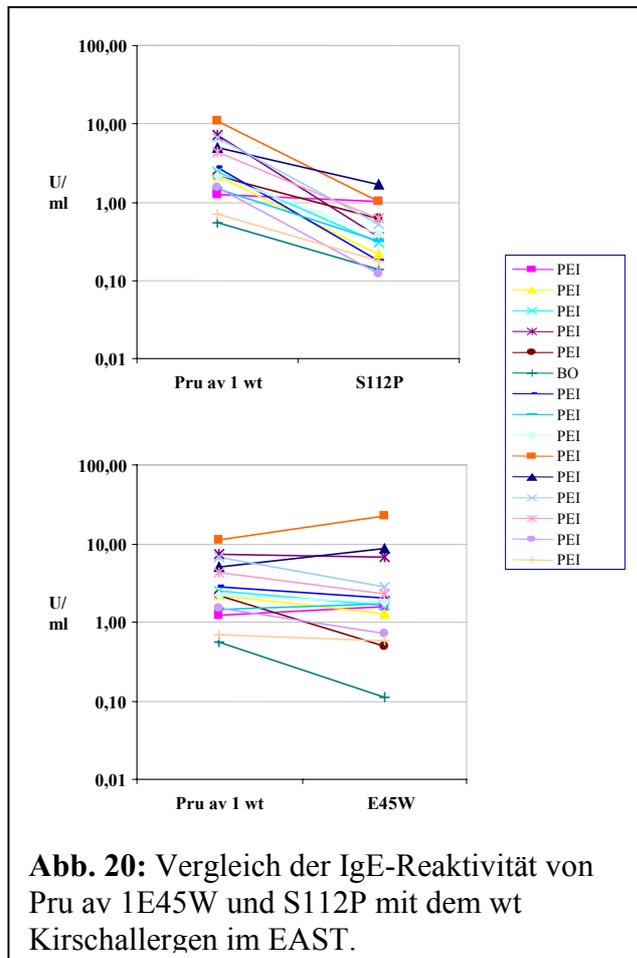


Abb. 19: Analyse des gereinigten rPru av 1 wt und des mutanten Proteins (2 µg Protein/Tasche) mittels SDS-PAGE (T=15%, nicht-reduzierenden Bedingungen) und Coomassie Färbung. M: Molekularmarker, „Broad Range“ (BioRad), 1: rPru av 1 wt, 2: rPru av 1 D155-159 3: rPru av 1 E45W, 4: rPru av 1 S112A.

involviert sind. Der Aminosäurerest E45 in zentraler Position der P-loop Region wurde kürzlich als Bestandteil eines Epitopes eines monoklonalen Antikörpers, der die IgE-Bindung an das Hauptallergen aus Birkenpollen Bet v 1 inhibiert, beschrieben. Im Vergleich mit Bet v 1a besitzt die schwach IgE-bindende Isoform Bet v 1d einen Austausch der Aminosäure in Position 112. Diese Position ist somit ein weiteres Ziel für die gerichtete Mutagenese. Der C-Terminus wurde ausgewählt, da das homologe Sellerieallergen Api g 1.0101 um diesem Sequenzabschnitt verkürzt ist. Die entsprechenden Pru av 1-Mutanten (E45W, S112P, S112A und Δ 155-159) wurden kloniert, als Nicht-Fusionsproteine exprimiert,

mittels Chromatofokussierung und Anionenaustauschchromatographie gereinigt und deren Reinheit anschließend in der SDS-PAGE kontrolliert (Abbildung 19). Alle Proteine, mit Ausnahme von Pru av 1 S112A wurden in einer Reinheit >98% präpariert. Die Reinheit von Pru av 112A beträgt ca. 88% (GelScan 5.0, BioScitec, Frankfurt), Pru av 1 S112P (<98%) ist nicht dargestellt.



wild-Typ (wt) Pru av 1 sensibilisiert ($n = 2$, 0.35 – 0.7 U/ml), 2 ($n = 8$, 0.7-3.5 U/ml) and 3 ($n = 5$, 3.5-17.5 U/ml) (Abbildung 20). Die IgE-Bindung an die S112P Mutante wurde bei allen getesteten Seren stark reduziert, während die IgE-Reaktivität durch die Substitution von Ser durch Ala nicht beeinflusst wurde (nicht dargestellt). Die Aufhebung der IgE-Reaktivität ist somit auf den Verlust der Tertärstruktur von Pru av 1 zurückzuführen. Neun Seren zeigten eine Reduktion der IgE-Reaktivität mit E45W, bei 4 Seren blieb die IgE-Reaktivität unverändert und bei 2 Seren wurde eine stärkere IgE-Bindung festgestellt. Die Deletion des C-Terminus hatte keinen Einfluss auf die Antikörperbindung (nicht dargestellt).

Die Ergebnisse sind ein starkes Indiz dafür, dass die Aminosäureposition 45 in der exponierten P-loop Struktur bei einem Teil der untersuchten Patienten für die IgE-Reaktivität relevant ist und somit an der Ausbildung eines IgE-Epitopes beteiligt ist. Die Ergebnisse wurden durch heteronukleare multidimensionale NMR-Spektroskopie der Pru av 1 E45W Mutante bestätigt (P. Neudecker, Lehrstuhl für Struktur und Chemie der Biopolymere, Uni Bayreuth). Die NMR-Spektren des ^{15}N -markierten Pru av 1 E45W waren für alle 7 Reste der P-loop-Region, mit Ausnahme des Lösungsmittel-exponierten Restes E45, mit der des wt-Proteins identisch. Die hydrophobe Seitenkette an Position 45 hat demnach durch sterische und elektrostatische Interaktion einen negativen Effekt auf die Affinität der IgE-Antikörper.

Alle unter nativen Bedingungen gereinigten Proteine, mit Ausnahme von Pru av 1 S112P zeigten ein identisches CD-Spektrum (nicht dargestellt). Der Erhalt der Sekundärstruktur ist ein starkes Indiz für eine intakte Tertiärstruktur der Proteine. Die Ergebnisse wurden durch 1D-NMR bestätigt (P. Neudecker, Lehrstuhl für Struktur und Chemie der Biopolymere, Universität Bayreuth).

Die Bestimmung der IgE-Reaktivität der Proteine erfolgte im EAST („Enzym Allergosorbent Test, Allergopharma, Reinbek). Die rekombinanten Allergene wurden an CNBr-aktivierte Trägerscheiben gekoppelt (0.5 μg /Scheibe) und mit Sera von Kirschallergikern inkubiert. Die Konzentration an Allergen-spezifischem IgE wurde mit dem „Allergopharma Spez.IgE ELISA“ semiquantitativ bestimmt.

Alle Patienten ($n = 15$) waren gegen

Durch die *in vitro*-Mutagenese von Pru av 1 konnte gezeigt werden, dass die IgE-Kreuzreaktivität partiell mit der Struktur der P-loop Region erklärbar ist. Die Modulation der IgE-Bindung ist zudem ein vielversprechender Ansatz zur Entwicklung hypoallergener Varianten für eine spezifische Immuntherapie. Die Arbeiten zu diesem Punkt waren damit abgeschlossen.

D Herstellung monoklonaler Antikörper gegen Pru av 1 (PEI)

D1 Herstellung von monoklonalen Antikörpern (PEI)

Zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern wurden im PEI Mäuse immunisiert und deren Milzzellen mit einer Myelomzelllinie fusioniert. Die daraus erhaltenen Klone wurden auf Antikörperreaktivität gegen Pru av 1 und Kreuzreaktivität mit dem verwandten Birkenpollenallergen Bet v 1 getestet.

Zur Immunisierung wurden Mäusen rPru av 1 und Proteinextrakt aus Kirschen (jeweils adsorbiert an Aluminiumhydroxid) intraperitoneal injiziert. Vor der letzten Boosterung wurde die Immunogenität von rPru av 1 und Proteinextrakt aus Kirschen getestet. Hierzu wurde immunisierten Mäusen Blut aus dem Retroorbitalplexus entnommen und die Reaktivität der Serum-Antikörper gegen rBet v 1 und rPru av 1 mit einem ELISA untersucht. Hierbei wurden rBet v 1 und rPru av 1 an Mikrotiterplatten adsorbiert und mit den Mausseren inkubiert. Zur Spezifitätskontrolle wurde mit Serum einer nicht immunisierten und einer mit Ovalbumin immunisierten Maus inkubiert. Die Detektion erfolgte über einen Peroxidase konjugierten anti Maus IgG (□ Chain) Antikörper. Zur Immunisierung wurden zwei Gruppen (n=3) von weiblichen Balb/c Mäusen eingesetzt. Eine Gruppe wurde mit Protein aus Kirschen, die andere mit rPru av 1 immunisiert. An Aluminiumhydroxid adsorbierter Kirschextrakt erwies sich hierbei als nicht ausreichend immunogen, r Pru av 1 war zur Immunisierung geeignet. Die Parameter der Immunisierung sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tab. 12: Immunisierungsschema zur Herstellung monoklonaler Antikörper

Maus-Nr	1	2	3	4	5	6
Immunogen	Kirsch extrakt	Kirsch extrakt	Kirsch extrakt	r Prua1	r Prua1	r Prua1
Immunisierung: 4x 200µg Protein(Extrakt) bzw. 10µg rAllergen alle 14 Tage						
ELISA rPru av 1	-	-	-	-+	++	+
ELISA rBet v 1	-	-	-	-	+-	+
letzte Boosterung				rBet v 1 25-30µg	r Pru av 1 25-30µg ohne AlOH ₃	r Pru av 1 25-30µg ohne AlOH ₃

Zellfusion und Selektion von Klonen

Nach erfolgreicher Immunisierung wurden zur Erzeugung Antikörper sezernierender Zelllinien Milzzellen der immunisierten Mäuse mit HGPRT negativen Myelomzellen (Ag8) fusioniert. Erfolgreich fusionierte Hybridomzellen wurden in HAZ-Medium und anschließend HT/RPMI Medium selektiert.

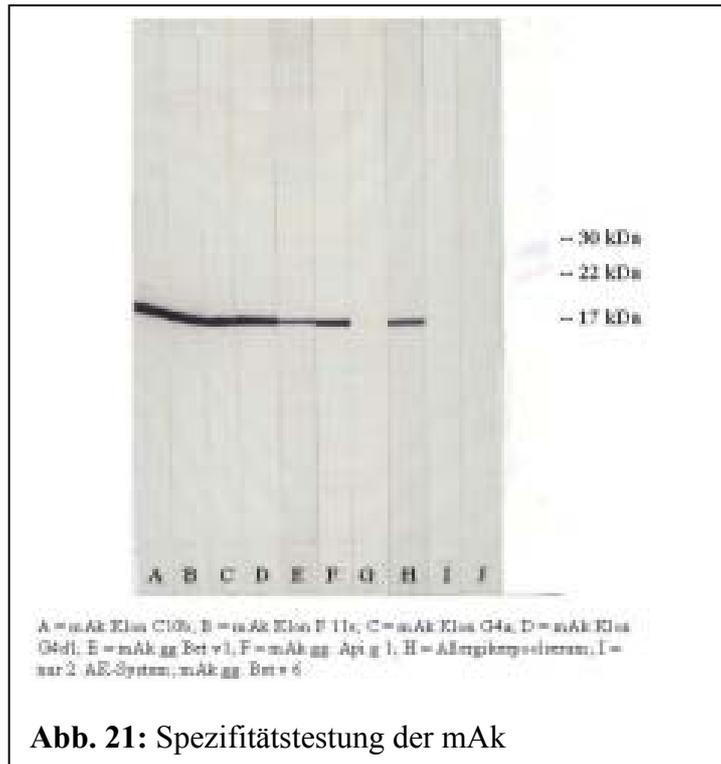
Zur Kultivierung und Selektion von Klonen wurde ein ELISA etabliert. Die Hybridomzellen werden hierbei in 96-Well Mikrotiterplatten in verschiedenen Verdünnungen ausgesät und die Zellüberstände mit dem ELISA auf Pru av 1-spezifische Antikörper getestet. Nach Adsorption von rPru av 1 in den Kavitäten der Mikrotiterplatte wurde mit Zellkulturüberstand inkubiert und spezifisch gebundenes Maus-IgG mit einem Peroxidase gekoppelten Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper detektiert. Die so ermittelten positiven Zellen wurden erneut nach dem oben erläuterten Schema in mehreren Verdünnungen ausgesät und auf spezifische Antikörper getestet. Nach mehreren Wiederholungen des Aussäens limitierender Verdünnungen konnten dann einzelne Klone selektiert werden, die Antikörper gegen Pru av 1 sezernieren. Es konnten 4 Klone isoliert werden, deren Antikörper an Pru av 1 binden und entsprechend der Reaktivität von Allergikereisen Kreuzreaktion zu Bet v 1 zeigen. Aus früheren Arbeiten lagen außerdem mAk gegen das Birkenpollenallergen Bet v 1 vor, von denen 3 eine Kreuzreaktion zu Pru av 1 zeigen. Diese mAk wurden ebenfalls in die Testungen zur Identifizierung geeigneter Kandidaten-Antikörper einbezogen. Die Arbeiten zu Punkt D1 sind abgeschlossen.

D2 Reinigung der mAk, Isotypisierung, Spezifitätsanalyse (PEI)

Spezifitätsanalyse

Nach dem ELISA-Screening von verschiedenen Hybridomzellkulturüberständen auf Antikörper gegen Pru av 1 wurden einige Klone ausgewählt und mit der Western Blot-Analyse auf ihre Reaktivität überprüft. Für diesen Zweck wurde rekombinantes Pru av 1 elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen geblottet. Wie in Abbildung 21 (Spur A bis D) dargestellt, banden die Antikörper C10b, F11e, G4a, G4d1 rPru av 1. Der Antikörper gegen Bet v 1 reagiert ebenfalls auf rPru av 1 (Spur E). Diese Kreuzreaktion beruht auf der weitgehenden Übereinstimmung der Tertiärstruktur von Bet v 1 und Pru av 1. Antikörper gegen das Hauptallergen aus Sellerie (Spur F) und gegen rBet v 6 (Spur J), einem Minorallergen aus Birke, reagierten nicht mit rPru av 1.

Zur Überprüfung, ob die Struktur von Pru av 1 trotz der reduzierenden Bedingungen der Elektrophorese erhalten bleibt, wurde ebenfalls mit einem Patientenpoolserum (Spur H) inkubiert. Der Test fiel positiv aus.



Der monoklonale Antikörper mP16 bindet nach unseren Ergebnissen an eine IgE-Epitopregion. Im ELISA wurde getestet, mit welchen Pru av 1 Homologen der mAk reagiert und wie stark. Die Daten wurden miteinander verglichen und zwei Aminosäuren in der Sequenz für eine Mutagenese ausgesucht. Es handelt sich um Mutationen der Aminosäuren N28 zu K und P108 zu A. Vorläufige Ergebnisse zeigen, dass der mAk mP16 mit der rekombinant hergestellten Pru av 1 Mutante N28K im ELISA sehr schwach reagiert im Vergleich zum nicht mutierten rekombinanten Protein. Die Bindung beträgt nur etwa 1/10 der Affinität an das natürliche Protein. Die Mutante N28K wurde auch mit Hilfe eines CD-Spektrums auf ihre korrekte Sekundärstruktur überprüft. Erste Ergebnisse zeigen, dass die Sekundärstruktur der Mutante erhalten geblieben ist. In die Spezifitätsanalyse wurde ein weiterer mAk (2B2) mit einbezogen, der ebenfalls die IgE-Bindung an ein Bet v 1 homologes Nahrungsmittelprotein inhibiert und ein anderes Spezifitätsmuster als der mAk mP16 besitzt. Alle obengenannten Antikörper wurden darauf untersucht, ob sie weitere Lebensmittelallergene der Bet v 1-Proteinfamilie spezifisch erkennen. Immunoblots und ELISA zeigten, dass die Antikörper neben Pru av 1 auch mit Mal d 1 aus Apfel und Pyr c 1 aus Birne reagieren. Weiterhin wurden die Antikörper darauf geprüft, ob sie an ein IgE-Epitop binden oder nicht. Siehe hierzu Punkt D3/8.

Isotypisierung

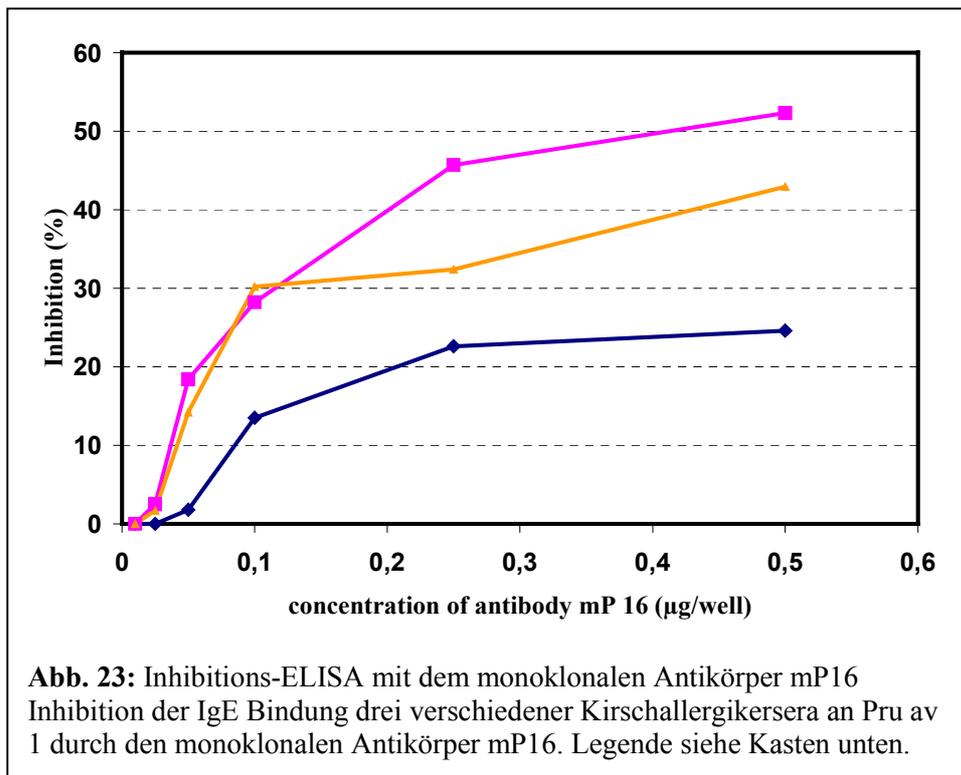
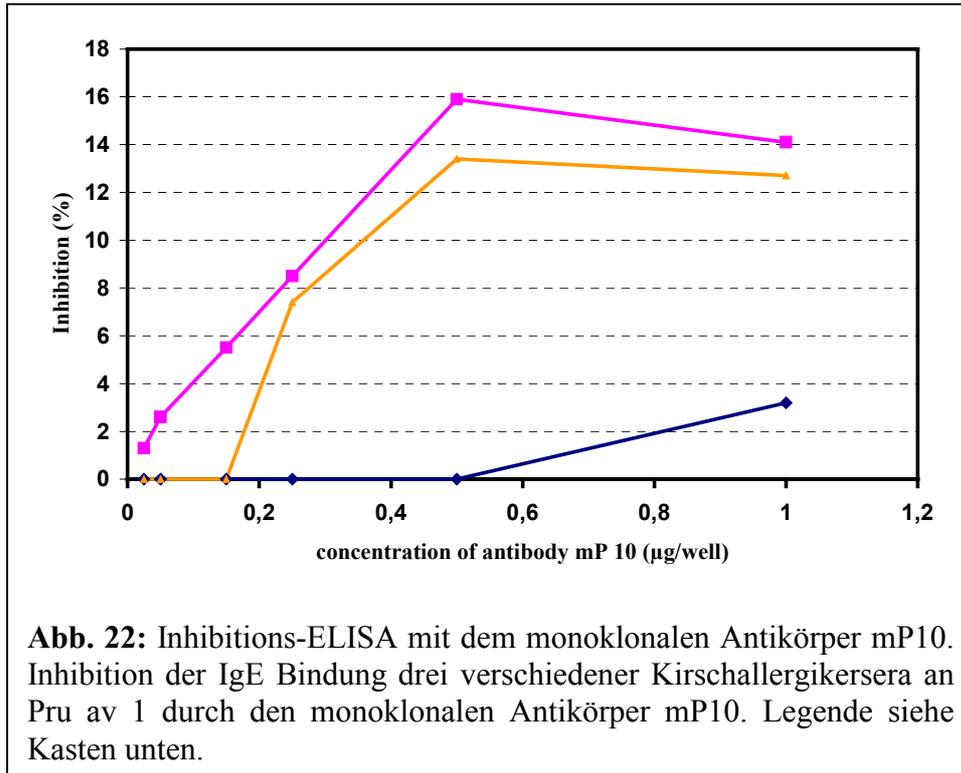
Die vier monoklonalen Antikörper (C10b, F11e, G4a, G4d1) gegen Pru av 1 besitzen alle den Isotyp IgG1. Die Antikörper mP10 und mP16, die gegen das Birkenpollenallergen Bet v 1 gerichtet sind, aber ebenfalls mit Pru av 1 reagieren, besitzen ebenfalls den Isotyp IgG1. Die Arbeiten zu diesem Punkt waren damit abgeschlossen.

Reinigung der monoklonalen Antikörper

Die Antikörper produzierenden Hybridomazellen wurden alle in Medium mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS) inkubiert. Kälberserum enthält auch Immunglobuline, die durch eine Reinigung der monoklonalen Antikörper über eine Protein-G-Säule nicht abgetrennt werden können. Deshalb wurden die Hybridomazellen an ein spezielles für Antikörper konzipiertes Medium ohne FKS angepasst. Um die Antikörper möglichst konzentriert für die Reinigung zu erhalten, wurden die Hybridomazellen in einer besonderen Zellkulturflasche gehalten, in der sich die Zellen in einem Dialyseschlauch befinden und die sezernierten Antikörper den Schlauch nicht passieren können. Die so erhaltenen Zellkulturüberstände wurden über eine Protein-G-Säule (ÄKTA-FPLC) gereinigt. Die Arbeiten zu diesem Punkt sind abgeschlossen.

D3/8 Allergenitätstests mit mAk- und Fab-Pru av 1- Komplexen (PEI)

Um nicht alle mAks für die Epitopanalyse einsetzen zu müssen, wurde eine Vorauswahl getroffen. Ein Immunoblot wurde mit der Pru av 1 Mutante S112P durchgeführt, deren Tertiärstruktur verändert ist. Sowohl der mAk mP16 als auch ein Patientenpoolserum reagierten nicht mit dieser Mutante. Der mAk mP10 reagierte eher schwach. Weil dieses Ergebnis auf eine ähnliche Epitopspezifität von den mAks und humanem IgE hindeutete, wurden die beiden monoklonalen Antikörper mP10 und mP16 für Inhibitionstests eingesetzt. Inhibitions-ELISA und Inhibitionsimmunoblots wurden durchgeführt. Mit beiden Methoden konnte gezeigt werden, dass der monoklonale Antikörper mP16 die Bindung von Patientenserum an Pru av 1 am stärksten inhibiert. Die Ergebnisse für die Inhibitions-ELISA sind in nachfolgenden Abbildungen dargestellt. Die eingesetzten Seren von Patienten mit einer Allergie gegen Kirsche enthielten alle IgE gegen Pru av 1, zeigten aber unterschiedliche EAST-Klassen.



Legende zu Abb. 22 und Abb. 23:

- Patient serum No. 1 with EAST class 4 to Pru av 1
- ▲— Patient serum No. 2 with EAST class 3 to Pru av 1
- ◆— Patient serum No. 6 with EAST class 2 to Pru av 1

Beide mAks inhibieren die Bindung von humanem IgE an Pru av 1, d.h. sie erkennen wahrscheinlich ein IgE-Epitop. Der mAk mP10 inhibierte die Bindung von humanem IgE bis zu 16 %, der mAk mP16 bis zu 55%. Aufgrund der hohen Inhibition wurde der Antikörper mP16 für die Konstruktion eines scFv eingesetzt. Die Arbeiten zu diesem Punkt sind abgeschlossen.

D5 Alternativ: Herstellung einer scFv-Bibliothek (PEI)

Auf die Herstellung einer scFv-Bibliothek konnte verzichtet werden, da ein monoklonaler Antikörper, mP16, an ein mögliches IgE-Epitop auf Pru av 1 bindet. Die cDNA der variablen Regionen der schweren und leichten Kette dieses mAks wurden sequenziert und für die Herstellung eines scFv verwendet.

D6/7 Alternativ: Selektion eines scFv, Expression, Spezifitätsanalyse (PEI)

Aufgrund der Ergebnisse im Inhibitions-ELISA wurde für die Herstellung eines scFv der monoklonale Antikörper mP16 gewählt. Die Sequenzierung der cDNA der variablen Regionen der schweren (V_H) und leichten Kette (V_L) erstreckte sich über einen längeren Zeitraum, da bei der variablen Region der leichten Kette immer nur Sequenzen ohne einen offenen Proteinleserahmen erhalten wurden. Nach einer N-terminalen Sequenzierung und aufgrund der bereits vorliegenden cDNA-Sequenz der leichten Kette wurde ein spezifischer Primer für den N-Terminus konzipiert. Mit diesem Primer konnte unter Verwendung einer *proof reading* Polymerase die cDNA-Sequenz ermittelt werden.

Aminosäuresequenz V_H :

**MAEVQLQESGAEVVRPGASVKLSCTASGFNIQDDYIHWNQRPEQGLEWIGRID
PANG
NSQYAPKFQDKATHIADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCIRSQLGRGSYWGQGT
LTVSA**

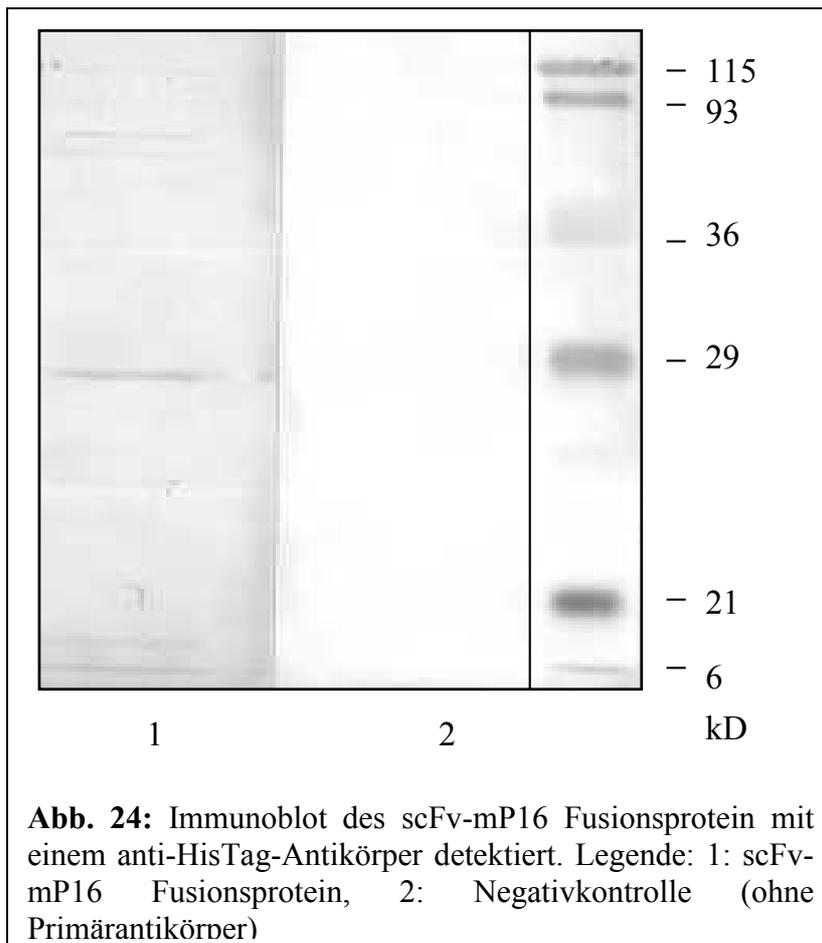
Aminosäuresequenz V_L :

**DIEMTQSHTFMSTSVGDRVSITCKASQDVYTAVAWYQQKPGQSPKGLIYWASTR
HTGV
PDRFTGSGSGTDYTLTISSVQAADLALYYCQQHYTTPWTFGGGTKLEIKR**

N-terminale Sequenzanalyse V_L :

DILMTQSHTFMS

Für die Konstruktion eines scFv wurde die cDNA von V_H mit der cDNA von V_L über den klassischen Linkerprimer $(Gly_4Ser)_3$ miteinander verbunden. Das Fragment wurde in einen pET-20b(+) Vektor ligiert. Dieser Vektor trägt eine N-terminale pelB Signalsequenz für eine periplasmatische Sekretion und eine C-terminale His-Tag-Sequenz. Der *E. coli* Stamm NovaBlue wurde für die Vermehrung des Plasmids und der *E. coli* Stamm BL21(DE3) zur Expression des scFv eingesetzt. Nach der Expression wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert und durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen aufgeschlossen. Der Überstand wurde für einen Immunoblot eingesetzt (Abbildung 24). Das berechnete Molekulargewicht beträgt 25.9 kDa.



Nach Anwendung unterschiedlicher Expressionsmethoden für das scFv wurden mit einem scFv, das einen N-terminalen DsbC-Fusionstag besitzt, nach Biotinylierung Bindungsstudien auf ELISA und Immunoblot-ebene durchgeführt. Diese zeigen eine schwache Bindung an Pru av 1, die sich durch Patientenserum und Kirschextrakt inhibieren lässt, aber nicht durch r Pru av 1. Eine mögliche Erklärung ist, dass der N-terminale Tag die Bindung an Pru av 1 stört. Das mit einem C-terminalen Tag exprimierte scFv ließ sich nicht reinigen und konnte deswegen nicht für Bindungsstudien eingesetzt werden. Die Arbeiten zu diesem Punkt wurden nicht weitergeführt da auf die Klonierung und Expression eines IgE Epitop blockierenden Antikörpers in der Pflanze zugunsten der Anwendung eines RNA Interferenz Konstruktes verzichtet wurde.

E1/1 Etablierung von Regenerationsprotokollen der Süßkirsche (DLR)

Für die Herstellung transgener Kirschlinien war die Entwicklung von effizienten Regenerations- und Transformationsprotokollen erforderlich. Parallel zur Induktion von Adventivknospen wurde mit Untersuchungen zur Etablierung eines Regenerationsprotokolls aus Blattgewebe (Organogenese) begonnen. Bei dieser Art der Regeneration verläuft die Entwicklung zu Pflanzen über die Bildung von Adventivsprossen und -wurzeln und nicht wie bei der somatischen Embryogenese über die Bildung von Embryoiden. Adventivsprosse und -wurzeln bilden sich normalerweise aus Wundrändern der Explantate und aus Kallus, welcher sich an den Wundrändern bildet. Maßgebend dafür, ob ein Kallus ohne Organbildung heranwächst oder ob sich aus ihm Sprosse bzw. Wurzeln regenerieren, sind Art und Mengenverhältnisse der Basalmedien sowie der Phytohormone, die im Kulturmedium vorhanden sind.

Um die Bildung von Adventivsprossen aus Blattgewebe fünf verschiedener Kirschsorten 'Starking Hardy Giant', 'Schneiders', 'Kordia', 'Sweetheart', 'Regina' zu induzieren, wurden die sechs unterschiedliche Basalmedien QL (Quoirin Lepoivre), MS (Murashige Skoog), Chee and Pool, DKW/Juglans Medium, $\frac{1}{2}$ DKW/Juglans Medium und $\frac{1}{2}$ WPM (McCown Woody Plant Medium), $\frac{1}{2}$ QL und $\frac{1}{2}$ WPM getestet. Zudem wurden sieben verschiedene Phytohormone BAP (6-Benzylaminopurin), TDZ (Thidiazuron), IBA (3-Indolylbuttersäure), Kinetin, 2,4 D (2,4-Dichlorphenoxyssäure), IAA (3-Indolylessigsäure) und NAA (1-Naphtalenessigsäure) in 18 unterschiedlichen Kombinationen und Konzentrationen dem jeweiligen Medium zugefügt. Um das in den Kulturen vorhandene und störende Ethylen zu binden, wurde bei weiteren Versuchsansätzen Silbernitrat und Natriumthiosulfat in das Medium gegeben. Silbernitrat und Natriumthiosulfat reagieren miteinander und es entsteht die Ethylen inhibierende Verbindung Silberthiosulfat. In einer anderen Variante wurde die Wirkung einer zusätzlichen Eisenquelle sowie die unterschiedlichen Kohlenstoffquellen Saccharose und Sorbitol im Medium untersucht. Vier Wochen alte *in vitro* Blätter der Sprosskulturen wurden geerntet, mit einem Skalpell drei mal quer zur Mittelrippe eingeritzt und mit der Unterseite auf das jeweilige Medium (Induktionsmedium) in Petrischalen aufgelegt. Ein Teil der Petrischalen wurden zwei Wochen im Dunkeln, die anderen im Hell-Dunkel-Rhythmus (16 h / 8h) bei $24 \pm 2^\circ\text{C}$ kultiviert. Anschließend wurde bei einem Teil der Versuche die Blätter wiederum auf das jeweilige Induktionsmedium überführt, bei den anderen Ansätzen erfolgte ein Transfer der Blätter auf G4-Medium (QL Medium mit 1 mg/L BAP). Die weiteren Subkulturen auf das G4-Medium wurden entweder 2 oder 4 wöchentlich durchgeführt. Die Endbonitur (= Prozentsatz regenerierter Pflanzen) erfolgte 16 Wochen nach Versuchsbeginn.

Bei allen Experimenten konnten bei 11 von insgesamt 30 untersuchten Medien eine Regeneration zu Pflanzen beobachtet werden (Abbildung 25). Die Regenerationseffizienz schwankte zwischen 2.7 % bei 'Starking Hardy Giant' und 8 % bei 'Schneiders' und 'Regina' (Tabelle 13.1 und 13.2).

Tabelle 13.1: Induktion von Adventivsprosse aus *in vitro* Blättern fünf verschiedener Süßkirschsorten auf unterschiedlichen Induktionsmedien

Basalmedium	Medium	Wachstums- bedingungen	Regenerationseffizienz (RE/Anzahl Blätter) und Anzahl Adventivsprosse pro Blatt (AS/Blatt)									
			Sweetheart		Schneiders		Kordia		Regina		SHG	
			RE	AS	RE	AS	RE	NS	RE	NS	RE	AS
½ DKW / ½ WPM	RM 2		8.3/36	1±0	11.1/18	1±0	11.1/18	1±0	0	0	8.3/36	1±0
QL	RM 7		10/30	2.5±1.4	0	0	0	0	0	0	0	0
½ DKW / ½ WPM	RM 9		0	0	0	0	0	0	11.1/18	1±0	0	0
½ DKW / ½ WPM	RM 11		0	0	16.7/18	1±0	0	0	0	0	0	0
½ DKW / ½ WPM	RM 11	dark	0	0	0	0	0	0	16.7/18	1.5±0.7	0	0
½ DKW / ½ WPM	RM 12		0	0	12.5/24	1.7±0.6	0	0	0	0	0	0
QL	RM 13		10/30	3.9±3.0	0	0	0	0	0	0	0	0
QL	RM 24	dark	0	0	11.1/18	2±0	0	0	0	0	0	0
QL	RM 25		0	0	11.1/18	1±0	0	0	0	0	0	0
QL	RM 26		0	0	11.1/18	1±0	0	0	0	0	0	0
QL	RM 27		0	0	11.1/18	2±0	0	0	11.1/18	1±0	0	0

Tabelle 13.2: Zusammenfassung der Regenerationseffizienz unterschiedlicher Kirschsornten mit Blättern als Ausgangsexplantate.

Kirschsorte	Sweetheart	Schneiders	Regina	Starking Hardy Giant	Kordia
Regenerations-effizienz [%]	6.3	8	8	2.7	2.8

Deutlich waren sortenspezifische Ansprüche zu beobachten. ‘Sweetheart‘ bildete auf dem QL-Medium mit 5 mg/L BAP und 0.5 mg/L IBA am häufigsten Regenerate, wohingegen auf diesem Medium bei der Sorte ‘Starking Hardy Giant‘ keine Pflanzen erzielt werden konnten. Generell war eine Kultivierung der Blätter auf QL-Medium mit den unterschiedlichen Phytohormonkombinationen -und -konzentrationen für zwei Wochen im Hell-Dunkel-Rhythmus (16 h / 8h) bei $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ gefolgt von einer Subkultur auf G4-Medium mit anschließenden 2 wöchentlichen Subkulturen auf G4-Medium am besten. Der Einsatz von Silberthiosulfat sowie Sorbitol statt Saccharose im Medium erzielte keine Erhöhung der Regenerationsrate.

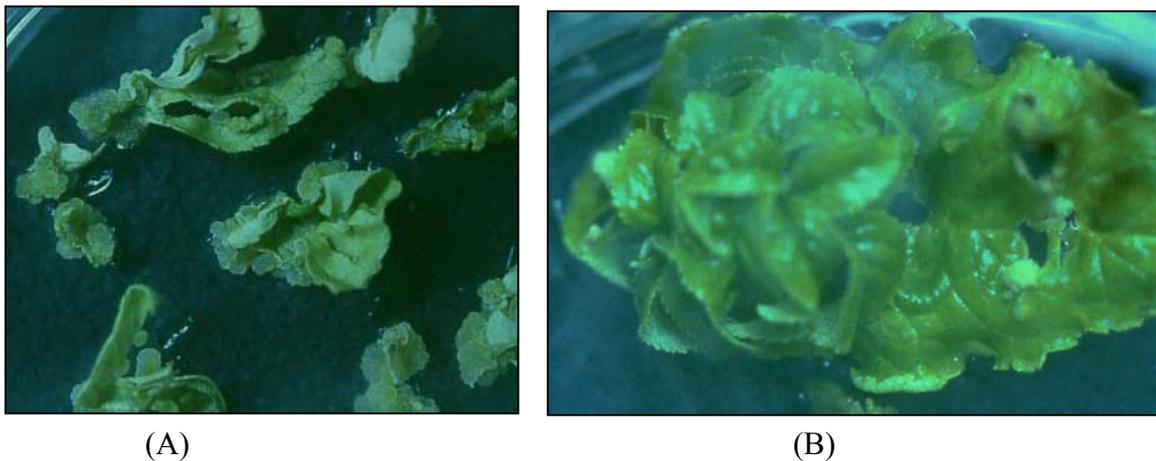


Abb. 25: Regeneration von Pflanzen der Sorte ‘Schneiders‘ aus Blättern.
 (A) *In vitro* Blätter drei Wochen nach Kulturbeginn.
 (B) Adventivsprosse sechs Wochen nach Kulturbeginn.

Aufgrund der sehr geringen Regenerationseffizienz aller untersuchten Kirschsornten wurden in weiteren Experimenten vier Wochen alte Internodiensegmente als Ausgangsexplantate zur Etablierung des Regenerationsprotokolls eingesetzt. Der oben beschriebene Versuchsaufbau wurde nicht verändert.

Die Verwendung von QL als Basalmedium wies in diesen Experimenten ebenfalls die höchsten Regenerationsraten auf, wobei wiederum eine sortenspezifische Zugabe unterschiedlicher Phytohormonkombinationen und -konzentrationen zur Induktion der

Tabelle 14.1: Regenerationseffizienz unterschiedlicher Kirschsornten mit Internodien als Ausgangsexplantate auf unterschiedlichen Induktionsmedien

Basal-Medium	Wachstumsbedingungen		Medium	Regenerationseffizienz (RE) und Anzahl Sprosse je regenerierender Internodie (NS/In)									
	AgS ₂ O ₃	Dunkel		Sweetheart		Schneiders		Kordia		Regina		SHG	
				RE	NS/In	RE	NS/In	RE	NS/In	RE	NS/In	RE	NS/In
½ DKW and ½ WPM			RM 2	19.7±12.5	2±1	10.3±8.4	1±0	0	0	33.3±16.6	5.5±0.7	11.1±9.6	1±0
½ DKW and ½ WPM	X		RM 2	0	0	11.1±9.6	1±0	0	0	0	0	0	0
QL		X	RM 7	11.1±9.6	2.7±2.1	0	0	0	0	0	0	0	0
QL			RM 7	17.4±15.3	1.0±0	16.7±11.8	1±0	25±11.8	2.5±2.1	33.3±16.6	3±0.7	0	0
½ DKW and ½ WPM			RM 8	0	0	25.0±11.8	20±13.2	22.2±9.6	3±1.4	16.7±11.8	1±0	0	0
½ DKW and ½ WPM	X		RM 8	16.7±13.6	2±0	22.2±9.6	1±0	12.5±8.3	1±0	16.7±11.8	10±0	0	0
½ DKW and ½ WPM			RM 11	25.0±16.7	2±1	22.6±9.6	2±0	0	0	0	0	0	0
½ DKW and ½ WPM	X		RM 11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QL			RM 13	21.4±16.6	4.3±3.8	50.0±16.0	3.1±2.8	11.1±9.6	1±0	0	0	0	0
QL	X		RM 13	31.2±16.6	8.3±2.1	11.1±9.6	1±0	0	0	0	0	0	0
QL			RM 14	13.3±7.5	2±0	16.7±11.8	2±0	0	0	0	0	0	0
QL		X	RM 15	16.7±0	1.5±0.7	0	0	0	0	0	0	0	0
QL			RM 15	18.4±14.6	2±1	24.2±18.8	2±1.4	0	0	33.3±16.6	5.5±4.3	22.2±9.6	1±0
QL	X		RM 15	20.8±8.3	1.5±0.7	16.7±11.8	1±0	0	0	0	0	0	0
QL			RM 16	0	0	16.7±11.8	1±0	0	0	0	0	0	0
QL			RM 18	22.2±14.8	2±1	0	0	0	0	16.7±11.8	3±0.7	0	0
QL	X		RM 18	16.7±11.8	4±0	0	0	0	0	0	0	0	0
QL			RM 19	19.8±13.8	3±1	27.8±13.6	2±1	11.1±9.6	1±0	0	0	27.8±19.2	1.4±0.6
QL	X		RM 19	0	0	33.3±0	3±2.8	0	0	0	0	0	0
QL			RM 20	41.7±11.8	2±0	22.2±9.6	1±0	0	0	0	0	0	0
QL			RM 21	10.4±8.6	1±0	25.0±11.8	2±0	0	0	0	0	0	0
QL			RM 22	10.0±9.1	2±1	0	0	0	0	0	0	0	0
QL			RM 23	11.7±8.1	12.5±5	14.3±11.5	3±2.8	0	0	0	0	0	0
QL	X		RM 23	20.8±8.3	3±2.8	0	0	0	0	0	0	0	0
QL			RM 24	0	0	11.1±9.6	2±1	0	0	0	0	0	0

Adventivsprosse nötig waren. Die Regenerationseffizienz, die bei allen eingesetzten Kirschsornten deutlich höher waren als beim Einsatz von Blättern waren, variierte zwischen 66 % bei 'Sweetheart' und 12.5 % bei 'Starking Hardy Giant' (Tabelle 14.1 und 14.2).

Tabelle 14.2: Zusammenfassung der Regenerationseffizienz unterschiedlicher Kirschsornten mit Internodien als Ausgangsexplantate.

Kirschsorte	Sweetheart	Schneiders	Regina	Starking Hardy Giant	Kordia
Regenerations-effizienz [%]	66	50	33.3	12.5	16.7

Der Zusatz von Silberthiosulfat oder eine zusätzliche Eisenquelle im Medium erzielte keine weitere Steigerung der Regenerationsrate. Wurde jedoch Sorbitol statt Saccharose als Kohlenstoffquelle im Induktionsmedium eingesetzt, konnten bei der Sorte 'Schneiders' deutlich mehr Adventivsprosse beobachtet werden. Beim Vergleich der anschließenden unterschiedlichen Kultivierung der Internodien, erwies sich wiederum eine 2 wöchige Kultivierung im Hell-Dunkel-Rhythmus (16 h / 8 h) bei $24\pm 2^\circ\text{C}$ gefolgt von einer Subkultur auf G4-Medium mit weiterem 2-wöchigem Umsetzen der Internodien auf G4-Medium am besten. In Abb. 26 ist die Regeneration von Pflanzen der Kirschsorte 'Sweetheart' aus Internodien dargestellt.

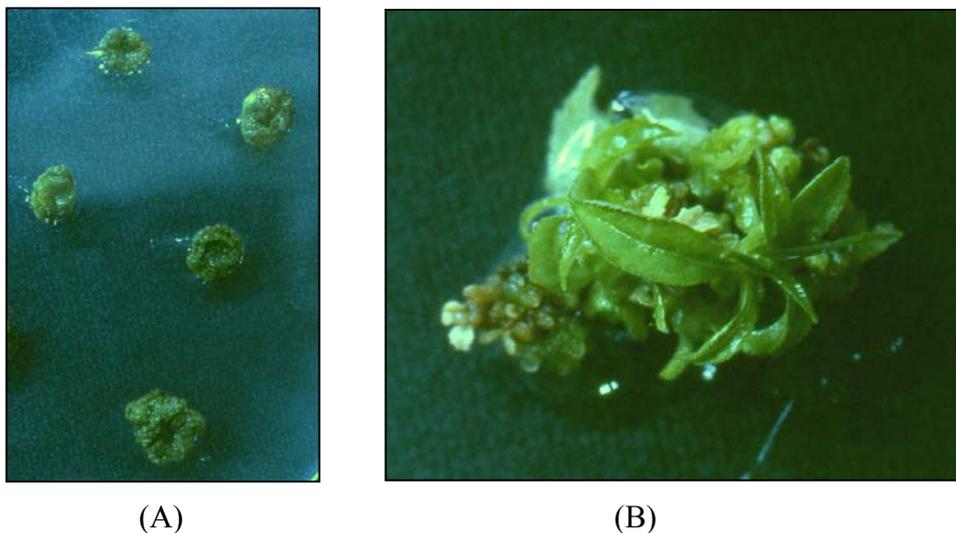


Abb. 26: Regeneration von Pflanzen der Sorte 'Sweetheart' aus Internodien.

(A) Internodien zwei Wochen nach Kulturbeginn.

(B) Adventivsprosse vier Wochen nach Kulturbeginn.

Insgesamt konnte für alle untersuchten Kirschsornten ein Regenerationsprotokoll etabliert werden. Allerdings waren die Regenerationseffizienzen beim Einsatz von vier Wochen alten

Kirschinternodien deutlich besser als bei Blättern und somit werden in den folgenden Transformationsexperimenten Internodien als Ausgangsexplantate eingesetzt. Da aufgrund des hohen Arbeitsaufwandes nicht alle Kischsorten transformiert werden konnten, wurden auf Grund ihrer großen Marktrelevanz und ihrer hohen Regenerationsraten die beiden Sorten 'Sweetheart' und 'Schneiders' für die Transformationsexperimente ausgewählt. Als Basis für diese Experimente diente oben erarbeitetes Regenerationsprotokoll.

E1/2 Klonierung eines Transfervektors zur Bildung von antisense-RNA-Konstrukten (DLR)

Klonierung eines Kontrollkonstrukts (DLR)

Als binärer Vektor für die Transformation der Kirschkpflanzen diente der pLH7000. Dieser Vektor enthält das *aadA*-Gen, welches eine Resistenz gegenüber Streptomycin und Spectinomycin besitzt. Diese Eigenschaft wurde für die Klonierungsschritte in *E. coli* genutzt. Da die Resistenz außerhalb der T-DNA liegt, wird es bei der Transformation nicht auf die Pflanzen mitübertragen. Des weiteren ist in diesem Vektor das Markergen *pat* vorhanden und verleiht den transformierten Pflanzen eine Resistenz gegenüber dem Herbizid BASTA. Dieses *pat*-Gen sowie eine multiple Klonierungsstelle sind von den *left border* und *right border* Sequenzen flankiert. Zur Etablierung eines Transformationsprotokolls der Kirsche wurde zunächst ein Kontrollkonstrukt hergestellt. Dieses besitzt lediglich das *uidA*-Gen, welches für das Enzym β -D-Glucuronidase (GUS) codiert. Bei einem histochemischen Nachweis spaltet dieses Enzym das synthetische Substrat 5-Bromo-4-chloro-3-indyl- β -D-Glucuronsäure in

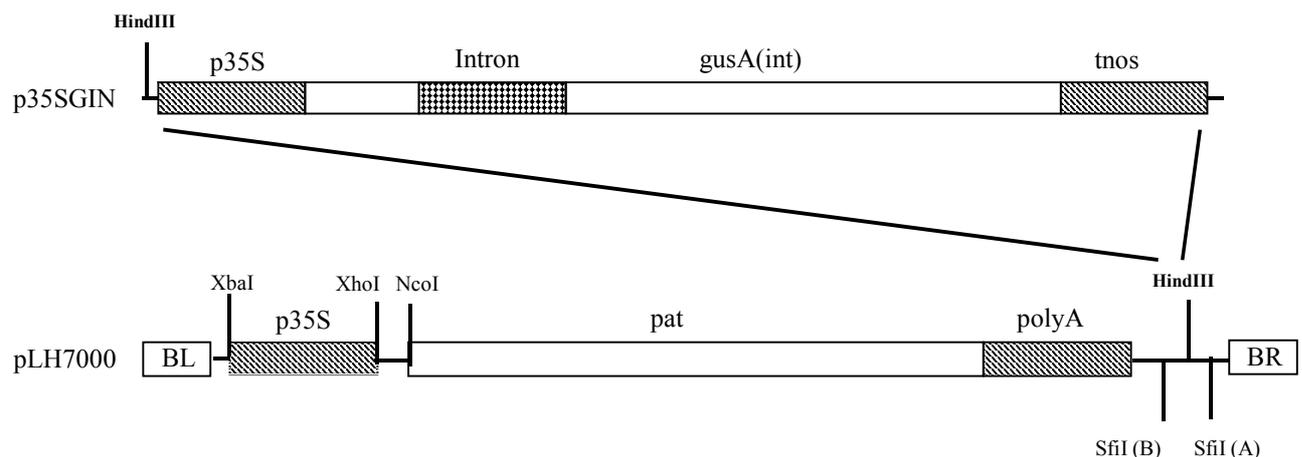


Abb. 27. Klonierungsstrategie für die Herstellung des binären Pflanzentransformationsvektors pLH7000GIN (Kontrollkonstrukt).

einen wasserunlöslichen blauen Farbstoff. Je nach Stärke des gebildeten Farbstoffes lässt sich die Transformationseffizienz bestimmen. Zur Klonierung wurde eine GUS-Kassette, die schon mit einem 35S-Promotor und einem nos-Terminator aus dem Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) ausgestattet war, eingesetzt (p35SGIN). Um zu verhindern, dass das Enzym GUS in *Agrobacterium tumefaciens* exprimiert wird, befindet sich im *uidA*-Gen ein Intron. Über die multiple Klonierungsstelle des pLH7000 (*Hind*III; blunt end) wurde das *uidA*-Gens in den binären Vektor eingebracht.

Klonierung eines antisense-RNA-Konstrukts (DLR)

Ausgangsmaterial für die Klonierung des antisense-RNA-Konstrukts war die cDNA des Hauptallergens der Kirsche Pru av 1. Diese cDNA wurde im pET16b Vektor, der eine Ampicillinresistenz besitzt, vom Paul-Ehrlich-Institut zur Verfügung gestellt. Das Gen für eine Ampicillinresistenz, welches auch der Vektor pRT102 besitzt, wurde für die Klonierungsschritte in *E. coli* genutzt. Als binärer Vektor diente wiederum der Vektor pLH7000 mit den oben erwähnten Eigenschaften. Zur Herstellung des Konstrukts wurde das Pru av 1 Gen mit dem Restriktionsenzym *Xho*I aus dem Vektor pET16b geschnitten und in den Vektor pRT102 ligiert. pRT102 besitzt zwischen einem 35S-Promotor und einem polyA-Signal aus CaMV eine multiple Klonierungsstelle, unter anderen für *Xho*I. Anschließend erfolgte eine Überprüfung, ob das Pru av 1 Allergen in antisense Richtung eingebaut wurde. Da dies der Fall war, wurde das antisense Pru av 1 mit dem 35S-Promotor und nos-Terminator mit dem Restriktionsenzym *Hind*III ausgeschnitten und in den binären Vektor pLH7000 ligiert.

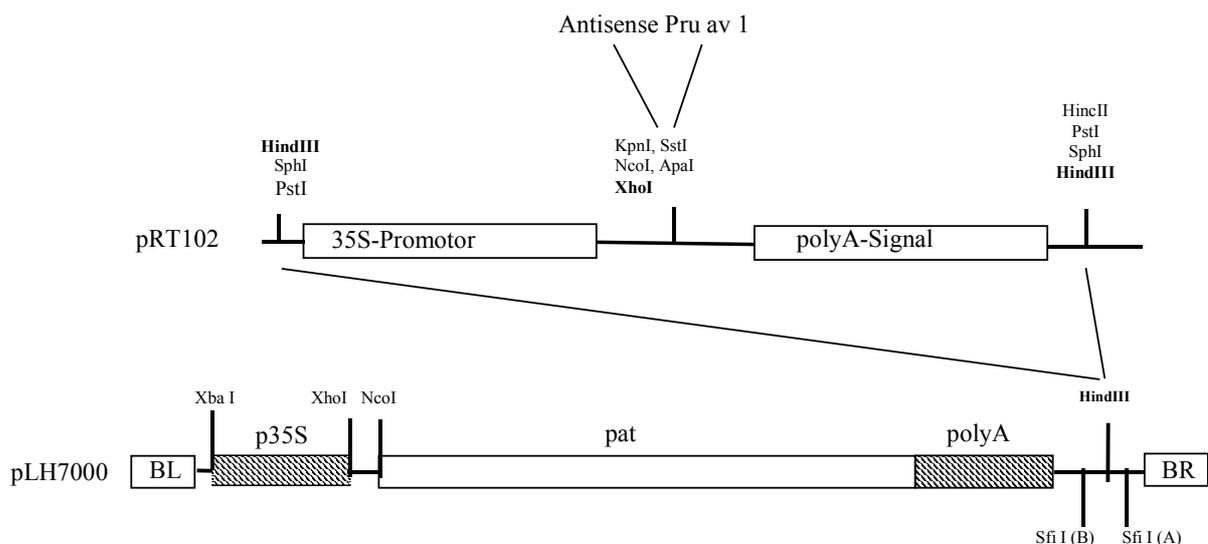
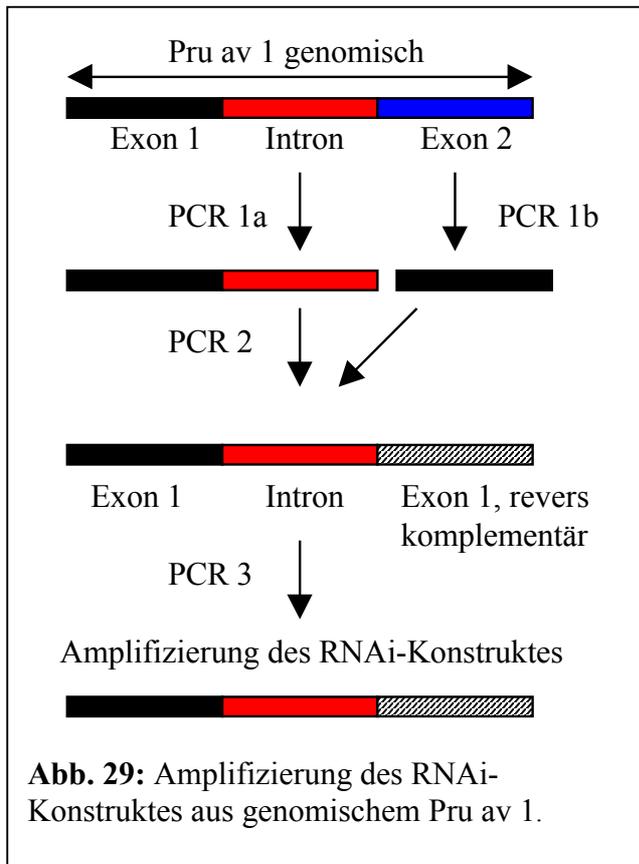


Abb. 28: Klonierungsstrategie für die Herstellung des binären Pflanzentransformationsvektors pLH7000 antisense Pru av 1

Klonierung eines RNAi (Interferenz)-Konstrukts (PEI; DLR)



Die für die Klonierung notwendige RNAi-DNA wurde mit einer PCR-Strategie hergestellt. Zunächst wurde aus genomischer DNA aus *in vivo* Blättern von Süßkirschen mit terminalen, genspezifischen Primern die vollständige Sequenz von Pru av 1 inklusive Intron amplifiziert. Anhand der daraus resultierenden Sequenz wurden verschiedene Primer abgeleitet, um die RNAi-DNA in mehreren Schritten amplifizieren zu können. Dieses sollte aus dem Exon 1 gefolgt von dem Intron dem sich wiederum Exon 1 in revers komplementärer Orientierung anschließt (RNAi-Pru av 1), bestehen. Nach Aufreinigung des Konstruktes wurde dieses dann zur weiteren Bearbeitung über *ApaI* Schnittstellen in pGEMT ligiert, kloniert und als Plasmid präpariert. Abschließend wurde das

Konstrukt zur Kontrolle sequenziert. Die Sequenzierung konnte allerdings nicht aus dem vollständigen Plasmid vorgenommen werden. Die selbstkomplementären Teile des Konstruktes verursachten immer einen Abbruch der Sequenzierreaktion innerhalb der ersten drei bis 4 Positionen des Konstruktes. Um die Basenabfolge dennoch überprüfen zu können, wurde das Plasmid mit *EcoRI* und *BstXI* in zwei verschieden große Fragmente geschnitten und nach elektrophoretischer Auftrennung unabhängig voneinander gereinigt. Die Position der *EcoRI*-Schnittstelle lag im Intron, so dass die selbstkomplementären Bereiche für die Sequenzierung getrennt voneinander vorlagen. Die anschließende Sequenzierung der beiden Teile des Konstruktes war dann erfolgreich. Die Basenabfolge stimmte mit der theoretisch erwarteten überein.

Zur Herstellung des RNAi-Konstruktes wurde die RNAi-Pru av 1-Sequenz mit dem Restriktionsenzym *ApaI* aus dem pGEMT-Vektor geschnitten und in pRT102 ligiert, welcher zwischen einem 35-S-Promotor und einem polyA-Signal aus CaMV (Califlower mosaic virus) eine multiple Klonierungsstelle, u. a. mit einer *ApaI*-Schnittstelle, besitzt. Eine auf diesem Vektor vorhandene Ampicillinresistenz wurde bei der Klonierung in *E. coli* eingesetzt. Die Überprüfung, ob die RNAi-Pru av 1-Sequenz in richtiger Orientierung vorhanden war, erwies sich aufgrund ihrer selbstkomplementären Struktur als äußerst schwierig. Letztendlich gelang es mit einem Restriktionsverdau mit den Endonukleasen *ScaI* und *AhuI* die richtige Orientierung der RNAi-Pru av 1-Sequenz nachzuweisen. Anschließend wurde mit dem

Restriktionsenzym *Hind*III die RNAi-Pru av 1-Sequenz einschließlich dem 35S-Promotor und nos-Terminator ausgeschnitten und in den binären Vektor pLH7000 ligiert.

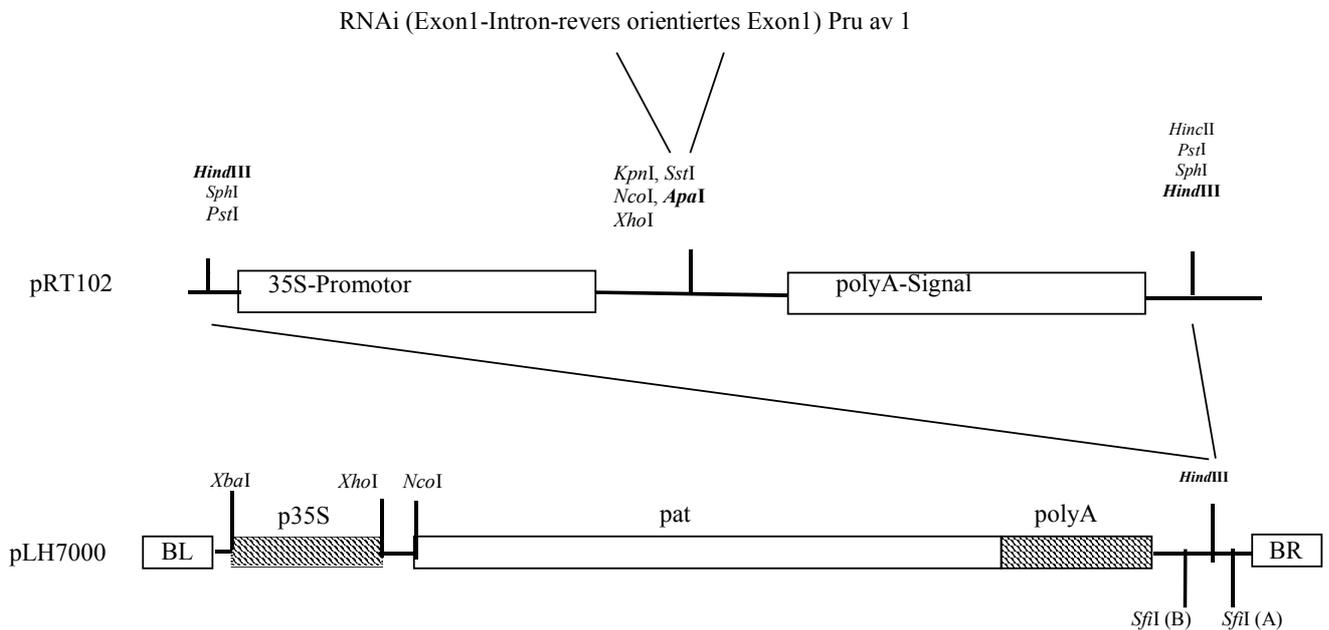


Abb. 30: Klonierungsstrategie für die Herstellung des binären Pflanzentransformationsvektors pLH7000-RNAi-Pru av 1

E1/2 Klonierung eines Transfervektors zur Expression eines pflanzlichen Antikörpers mit Pru av 1 Spezifität (DLR)

Als weitere Alternative zur Herstellung des asRNA-Konstruktes war ursprünglich auch die Herstellung eines Transfervektors zur Expression eines pflanzlichen Antikörpers mit Pru av 1 Spezifität angedacht. Da wegen der unerwartet langwierigen pflanzlichen Zellkultur zum Teil erhebliche zeitliche Verzögerungen im Projekt auftraten, hätte dies zu einer weiteren Verzögerung bei der Etablierung eines Transformationsprotokolls mittels antisense-RNA-Technologie und dem damit gewünschten Ergebnis, d.h. Kirschpflanzen mit einer geringeren Allergenität an Pru av 1, geführt. Stattdessen wurde der Pflanzentransformationsvektor pLH7000-RNAi-Pru av 1 kloniert und zur Transformation der beiden Kirschsorten 'Sweetheart' und 'Schneiders' eingesetzt.

E1/3 Etablierung von Transformationsprotokollen der Süßkirsche (DLR)

Entwicklung eines Phosphinothricin-Selektionssystems

Der Nachweis einer erfolgreichen Transformation einer Pflanze, lässt sich am einfachsten führen, wenn das Fremdgen selektierbar ist. Die Selektion sollte zudem in einem sehr frühen Stadium erfolgen können, um nicht alle unverändert gebliebenen Pflanzen bei der Anzucht mitvermehren zu müssen. Da jedoch fast alle Fremdgene selbst nicht selektierbar sind und erst in einem späteren Entwicklungsstadium zur Expression kommen, werden normalerweise selektierbare Markergene in den Transformationsvektor eingebracht. Diese Markergene bedingen häufig eine Resistenz bzw. eine höhere Toleranz gegenüber bestimmten Substanzen, die das Wachstum hemmen. Wird das Fremdgen zusammen mit dem Markergen übertragen und kommt es zur Expression, wachsen die betroffenen Pflanzenzellen auf dem Medium mit dem jeweiligen Hemmstoff und lassen sich so selektieren. Die nicht transgenen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen sterben.

Aufgrund des umstrittenen Einsatzes verschiedener Antibiotika wurde in diesem Projekt das Herbizid Phosphinothricin (= PPT = wirksamer Bestandteil des Herbizids BASTA) als Markergen ausgewählt. Phosphinothricin ist ein unspezifisches Kontaktherbizid, von dem das L-Enantiomer (L-PPT) als kompetitiver Inhibitor der Glutaminsynthetase (GS) wirkt. Die Glutaminsynthetase ist dabei das zentrale Enzym des Stickstoff-Stoffwechsels der Pflanzen. Eine Zugabe von PPT zum Medium bewirkt eine Hemmung der GS und führt so zur Akkumulation von schädlichem Ammonium in der Pflanzenzelle was zu deren Tod führt. In *Streptomyces hygroscopicus* codiert ein bar-Gen für eine spezielle Phosphinothricin-Acetyltransferase (PAT), welches das PPT durch Acetylierung inaktiviert. Wird dieses Markergen zusammen mit dem Wunschgen in die Pflanzenzelle eingebracht, so wird das schädliche PPT acetyliert und die Pflanzenzelle bzw. Pflanze überlebt.

Bevor das Markergen Phosphinothricin zur Selektion von potentiellen transgenen Kirschlorbäumen eingesetzt werden konnte, musste diejenige Konzentration an PPT ermittelt werden, bei der die nicht transgenen Pflänzchen gerade noch überleben. Dazu wurden in verschiedenen Experimenten unterschiedliche PPT-Konzentrationen (0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 20; 30; 50; 75; 100; 125 mg/L) zum Vermehrungsmedium zugegeben. Untersucht wurde das Verhalten von vier Wochen alten Pflanzen der Kirschsorsten 'Sweetheart' und 'Schneiders' jeweils über einen Zeitraum von wiederum vier Wochen.

Bei den beiden höchsten PPT-Konzentrationen starben die Pflänzchen unmittelbar nachdem sie das PPT aufgenommen hatten. Dies war nach ca. zwei Tagen der Fall. Erste Vergiftungssymptome wie schwarze Punkte bzw. größere Bereiche sowie Ausbleichungen wiesen die Pflanzen auf Medium mit 50 mg/L und 75 mg/L PPT sieben Tage nach Kulturbeginn auf. Ab diesem Zeitpunkt begannen auch die Pflanzen, die auf 5 mg/l bis 30 mg/L PPT kultiviert wurden, erste Symptome auszubilden. Wurden die Kirschlorbäume auf 0.5 mg/L und 1 mg/l PPT kultiviert, waren nach ca. neun Tagen erste schwarze Läsionen und Ausbleichungen zu erkennen. Vierzehn Tage nach Kulturbeginn waren die Pflanzen auf 0.5

mg/L bis 75 mg/L PPT tot. Alle Pflanzen, die auf 0.01 mg/L und 0.05 mg/L PPT überführt wurden, wiesen keinerlei Beeinträchtigungen ihres Wachstums auf. Erfolgte eine Kultivierung der Pflanzen auf 0.1 mg/L PPT wuchsen die Pflänzchen deutlich langsamer als bei der Kontrolle, wobei keinerlei sonstigen Symptome zu erkennen waren. Beim Vergleich der beiden eingesetzten Kirschsornten war lediglich ein sehr geringer Unterschied zu beobachten. Die Sorte 'Schneiders' schien etwas weniger empfindlich zu sein als 'Sweetheart', was sich aber auf weitergehende Experimente nicht auswirkte. Nach der Transformation wurde daher in der folgenden Selektion nach potentiell transgenen Pflanzen 0.1 mg/L PPT eingesetzt.

Etablierung eines *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten Transformationsprotokolls

Agrobacterium tumefaciens ist in der Lage hauptsächlich dikotyle Pflanzen zu infizieren, wobei bei der Infektion an verwundeten pflanzlichen Gewebeteilen ein tumor-induzierendes (Ti) Plasmid eingebracht wird. Dabei wird nur ein Teil dieses Plasmids, die sogenannte T-Region, in die pflanzliche Kern-DNA integriert und exprimiert. Um das gewünschte Fremdgen in die Pflanzenzelle zu übertragen, wird es meist als Chimäre (Fremdgen mit vorgeschaltetem Promotor unterschiedlicher Herkunftsorganismen) in einem Klonierungsvektor zwischen die beiden Bordersequenzen der T-Region eingebaut. Über die Infektion von z. B. Blattscheiben oder Internodien mit Agrobakterien erfolgt der Einbau des Fremdgens in die pflanzliche DNA, wobei bis heute noch nicht bekannt ist, wann die Genübertragung tatsächlich erfolgt. Der Erfolg der Transformation wird anschließend durch Untersuchung nach dem Vorhandensein eines Markergens überprüft und bei positivem Befund werden die transgenen Pflanzenzellen zu ganzen Pflanzen regeneriert. Um diese Transformationseffizienz zu überprüfen, wurde in diesem Projekt das *uidA*-Gen aus *E. coli* eingesetzt, welches für das Enzym β -D-Glucuronidase (GUS) codiert. Dieses Enzym spaltet bei einem histochemischen Nachweis das synthetische Substrat 5-Bromo-4-chloro-3-indyl- β -D-Glucuronsäure (X-GlcA) und ein wasserunlöslicher blauer Farbstoff entsteht.

Die Etablierung eines Transformationsprotokolls erfolgte auf der Grundlage des Regenerationssystems der beiden Kirschsornten 'Sweetheart' und 'Schneiders'. Als Pflanzengewebe für die Kokultivierung mit *A. tumefaciens* dienten, aufgrund ihrer höheren Regenerationseffizienz, die obersten Internodiensegmente. Diese wurden in verschiedenen Experimenten 10, 30, 60, 120 min bzw. 1, 3, 6, 7 Tage in den Bakterienkulturen ($OD_{600}=0.6-0.8$), die entweder unverdünnt oder mit dem jeweiligen Induktionsmedium verdünnt waren, geschwenkt. Zur Erhöhung der Transformationsrate wurde zu den jeweiligen Bakteriensuspensionen unterschiedliche Konzentrationen von Acetosyringon (25 μ M, 100 μ M, 200 μ M) zupipettiert. Acetosyringon wird zum Beispiel bei Tabak von frisch verletzten Pflanzenzellen ausgeschieden und veranlasst somit *A. tumefaciens* den Infektionsprozess in Gang zu setzen.

Bei einem anderen Versuchsansatz wurde überprüft, ob eine Infektion stattfinden kann, wenn unterschiedlich konzentrierte Bakteriensuspensionen auf die Internodien aufgeträufelt werden. Die Kokultur erfolgte entweder 3, 6 oder 7 Tage, wobei die Konzentration von Acetosyringon

mit jeweils 100 μM nicht variiert wurde. Da bei all diesen Experimenten die Internodien kurz vor der Kokultur nochmals eingeritzt werden müssen und somit diese Versuche sehr aufwendig sind, wurde in einem weiteren Ansatz überprüft, ob eine Vakuuminfiltration der Bakteriensuspensionen in die Explantate ebenfalls zum gewünschten Erfolg führt. Dabei wurden unterschiedlich verdünnte Bakteriensuspension eingesetzt. Die Konzentration von 100 μM Acetosyringon in der jeweiligen Bakteriensuspension wurde beibehalten.

Weitere Untersuchungen bezüglich des Zeitpunkts der Integration des Fremdgens wurden ebenfalls durchgeführt, da für die Übertragung dieses Gens durch *A. tumefaciens* offensichtlich die S-Phase (DNA-Verdopplung) besonders günstig ist (Chaudhury, A.M.; Dennis, E.S.; Brettell, R.I.S., 1994, Austr. J. Plant Physiol. Vol 21, pp.125-131). Um die Kirschkzellen zur Teilung anzuregen, wurden die geschnittenen Internodien auf den verschiedenen Induktionsmedien ($24\pm 2^\circ\text{C}$) zwischen 1-14 Tage kultiviert. Damit eine fast vollständige Synchronisation der in der S-Phase sich befindenden Zellen erzielt werden konnte, wurden in einer weiteren Versuchsvariante die Kirschkpflanzen vor der Präparation der Internodien unterschiedlich lange bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Bei der Kombination beider Methoden wurden die Kirschkpflanzen zunächst bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt, die Internodien präpariert und diese bei $24\pm 2^\circ\text{C}$ kultiviert. Anschließend erfolgte eine Vakuuminfiltration mit einer 1:2 Verdünnung der Agrobakteriensuspensionen mit je 100 μM Acetosyringon.

Nach den oben beschriebenen unterschiedlichen Kokulturen wurden die Internodien auf das jeweilige Induktionsmedium aufgelegt, wobei die Wundstellen in direktem Kontakt mit dem Medium standen. Die weitere Regeneration erfolgte nach dem in Kapitel E1/2 beschriebenen Protokoll. Zur Beseitigung noch vorhandener Agrobakterien wurde dem Induktionsmedium und anschließend dem G4-Medium zusätzlich unterschiedliche Kombinationen und Konzentrationen an Antibiotika (Cefotaxim, Ticarcillin und Vancomycin) zugesetzt. Damit lediglich die potentiellen transgenen Regenerate auf diesem Medium wachsen können, wurde Phosphinothricin eingesetzt (Kapitel E1/3; Entwicklung eines Phosphinothricin-Selektionssystems).

Der Vergleich aller unterschiedlichen Versuche ergab, dass eine Kokultur von 30 Minuten mit einer Bakterienkultur (1:5 und 1:10) mit je 100 μM Acetosyringon sowie eine Kokultur von einem Tag mit einer 1:3 und 1:7 verdünnten Agrobakteriensuspension mit je 25 μM Acetosyringon gute Ergebnisse erzielten. Eine längere Kokultur mit unterschiedlichen Verdünnungen der Bakteriensuspensionen und unterschiedlichen Konzentrationen von Acetosyringon führten einerseits zu einer relativ hohen Transformationsrate andererseits verbräunten fast alle Explantate nach ca. zwei Wochen und starben. Wurden die Bakteriensuspensionen auf die Internodien geträufelt, so wiesen diese nach einer Woche kaum Transformationsereignisse auf. Somit eignet sich diese Behandlung nicht für weitere Untersuchungen. Die besten Ergebnisse hingegen zeigte eine Vakuuminfiltration bei einem Einsatz einer 1:2 verdünnten Agrobakteriensuspensionen mit 100 μM Acetosyringon (Abb. 31). Diese Methode wurde in allen folgenden Transformationsexperimenten eingesetzt.

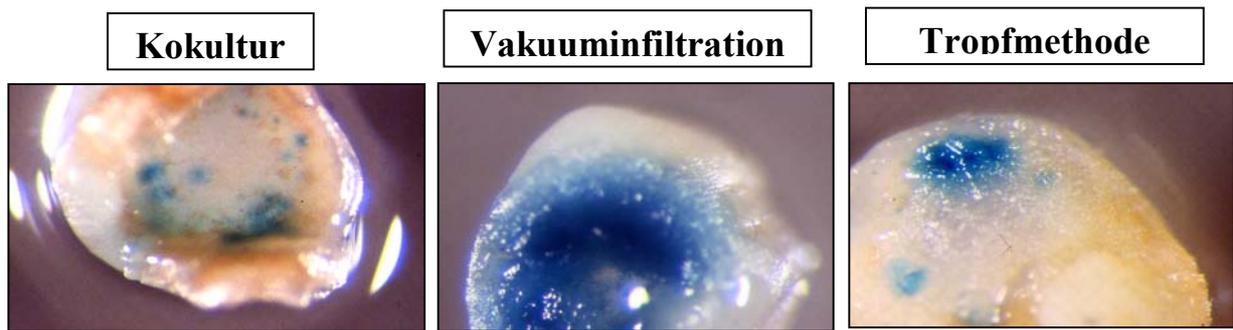


Abb. 31: Vergleich dreier unterschiedlicher Methoden zum Agrobakterien-vermittelten Gentransfer mittels GUS-Färbung von Internodien der Kirschsorte ‘Sweetheart’. Die Expression des transgenen *uidA*-Gens ist durch die Blaufärbung deutlich erkennbar.

F Herstellung transgener Linien und deren *in vitro*-Testung auf Allergenität (PEI/DLR)

F1 Transformation der *in vitro*-Kulturen (DLR)

In den zweijährigen Transformationsexperimenten wurden ca. 4577 Internodien der Sorte ‘Sweetheart’ und ca. 5000 Internodien von ‘Schneiders’ mit dem GUS-Kontroll-Konstrukt (Abb. 32), dem asRNA-Konstrukt und dem RNAi-Konstrukt transformiert. Da bei der Vakuuminfiltration der unterschiedlichen Agrobakteriensuspensionen die besten GUS-Ergebnisse erzielt wurden, wurde diese Methode bei den Transformationsexperimenten eingesetzt. Ansonsten diente das Regenerationsprotokoll als Basis der Transformationen (Kapitel E1/1; Etablierung von Regenerationsprotokollen der Süßkirsche).

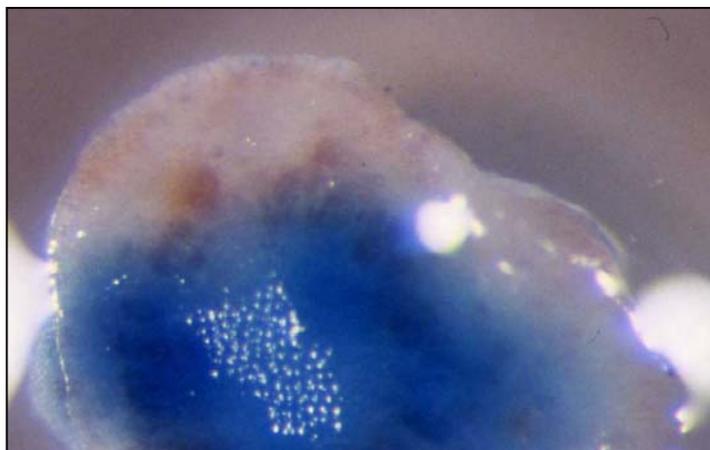


Abb. 32: GUS-Assay der Kirschsorte ‘Sweetheart’. Deutlich zu sehen ist die Expression des transgenen *uidA*-Gens (blaue Färbung).

Problematisch zeigte sich das Eliminieren der Agrobakterien nach dem Transformationsereignis. Sehr oft wiesen die Agrobakterien gegenüber den eingesetzten Antibiotika eine neu erworbene Resistenz auf und überwucherten die Internodien. Diese starben ab und mussten verworfen werden. Dieses Phänomen trat vor allem bei der Sorte 'Schneiders' auf. Dadurch sank die Anzahl transformierter Internodien im Vergleich zu 'Sweetheart' auf ca. 1900, obwohl ebenfalls ca. 5000 Internodien zu den unterschiedlichen Transformationsexperimenten eingesetzt wurden. Auch der Einsatz weiterer Antibiotika in unterschiedlichen Kombinationen und Konzentrationen konnten dieses Phänomen nicht vollständig verhindern.

Insgesamt konnten bei allen Transformationsexperimenten der Sorte 'Sweetheart' ca. 260 potenziell transgene Regenerate mit dem asRNA-Konstrukt sowie ca. 63 potenziell transgene Regenerate mit dem RNAi-Konstrukt erzielt werden. Bei der Sorte 'Schneiders' waren dies ca. 53 potenziell transgene Regenerate mit dem asRNA-Konstrukt bzw. ca. 64 potenziell transgene Regenerate mit dem RNAi-Konstrukt. Alle potenziell transgene Regenerate sowie die dazugehörigen Kontrollen (Kontrollpflanzen mit dem GUS-Konstrukt und die nicht transformierte echten Kontrollpflanzen) wurden auf G4-Medium mit 1 mg/l BAP und 0.1 mg/l Phosphinothricin weitervermehrt, bis diese groß genug waren, um eine molekularbiologische Charakterisierung durchführen zu können (Kapitel G; Analyse der Regenerate auf die Anwesenheit der übertragenen DNA-Sequenzen). In der folgenden Abb. 33 ist die Regeneration zu potenziell transgenen Kirschkpflanzen der Sorte 'Sweetheart' aus Internodien dargestellt.

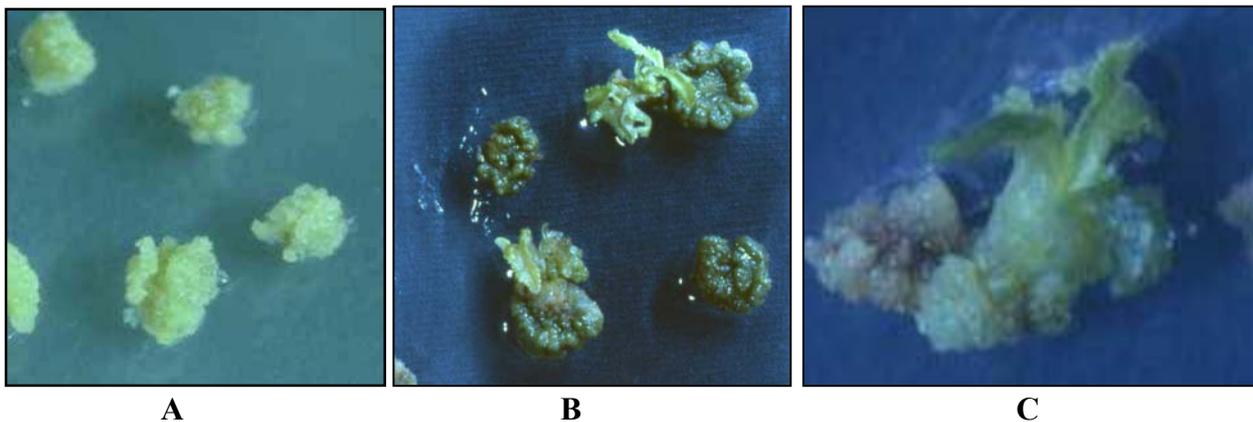


Abb. 33: Regeneration zu potenziell transgenen Kirschkpflanzen der Sorte „Sweetheart“ nach einer Agrobakterien vermittelter Transformation
A: Internodien 2 Wochen nach Transformation
B: Internodien 8 Wochen nach Transformation
C: Potenziell transgene Pflanze (asRNA-Konstrukt) 12 Wochen nach der Transformation

F2 Testung transgener Zelllinien auf Allergenität (PEI)

Die Testung transgener *in vitro*-Sprosskulturen auf ihre Allergenität konnte bisher noch nicht abgeschlossen werden, da die Regeneration zu Pflanzen erheblich länger dauerte als vorgesehen. So dauerte es oftmals ein Jahr, bis genügend intakte Pflanzen vorhanden waren, die mittels molekularer Analysen auf das Vorhandensein des Fremdgens untersucht werden konnten. Zudem wurde eine enorm große Anzahl an Regeneraten (ca. 440 Regenerate) erzielt, obwohl eine Selektion der potentiell transgenen Regenerate auf einem Phosphinothricin-haltigem Medium durchgeführt wurde. Da jedoch eine Bestimmung aller potentieller transgener Regenerate auf ihre Allergenität arbeitstechnisch nicht durchführbar ist und bei diesen ca. 440 Regeneraten höchstwahrscheinlich viele nicht-transgene Pflanzen (= Escapers) vorhanden sind, war es nötig, zuerst das Vorhandensein des Fremdgens (antisense RNA bzw. RNAi) nachzuweisen. Momentan wird eine transgene Pflanze der Sorte 'Sweetheart', die das asRNA-Konstrukt besitzt, vermehrt, so dass in den kommenden Wochen genügend Pflanzenmaterial für deren Untersuchung zur Allergenität vorhanden ist. Wegen der sehr langen Regenerationszeit konnte die Testung der potentiell transgenen Linien bis zum Ende der Laufzeit des Projektes nicht abgeschlossen werden.

G Analyse der Regenerate auf die Anwesenheit der übertragenen DNA-Sequenzen (DLR)

Damit die zu übertragenen DNA-Sequenzen in den Regeneraten nachgewiesen werden konnten, musste zuerst von jeder der ca. 440 erzielten Regeneraten DNA isoliert werden. Anschließend wurde eine spezifische PCR etabliert, um die Anwesenheit der übertragenen DNA-Sequenzen (asRNA und RNAi) zu überprüfen. Dabei muss beachtet werden, dass in den potenziell transgenen Regeneraten latent Agrobakterien vorkommen können und dies ein Vorhandensein unseres „Wunschgens“ vortäuschen kann. Um dies auszuschließen wurde zusätzlich eine PCR etabliert, die speziell latent in den Pflanzen vorhandene Agrobakterien nachweist. Andererseits können die latent in den Regeneraten vorhandenen Agrobakterien eine vorhandene Transgenität dieser Pflanzen maskieren. Um solche noch in den Pflanzen vorhandene Agrobakterien zu eliminieren, wurden die Pflanzen so lange auf einem antibiotikahaltigem Medium vermehrt, bis nach erneuter wiederholter DNA-Isolierung mit der spezifischen PCR keine Agrobakterien mehr nachgewiesen werden konnten.

Von allen mittels PCR untersuchten ca. 340 potenziell transgenen Regeneraten konnte bisher eine Pflanze der Sorte 'Sweetheart' nachgewiesen werden, die das asRNA-Konstrukt besitzt (Abb. 34). Die anschließende Klonierung und Sequenzierung dieses amplifizierten PCR-Produkts wies eindeutig die Sequenz des in die Pflanze eingebrachten asKonstrukts auf.



Abb. 34 : Transgene *in vitro*-Kirschlorpflanze der Sorte 'Sweetheart', die das asRNA-Konstrukt besitzt.

Zwei Regenerate der Sorte 'Sweetheart' wiesen die RNAi-Sequenz auf, wobei diese Pflanzen allerdings noch latent vorhandene Agrobakterien besitzen. Diese beiden Regenerate wurden nochmals auf antibiotikahaltiges Medium überführt und eine erneute Überprüfung auf das Vorhandensein von Agrobakterien sowie des RNAi-Konstrukts steht noch aus.

Derzeit wird von ca. 100 potentiell transgenen Regeneraten noch DNA isoliert und das Vorhandensein des Fremdgens molekularbiologisch charakterisiert. Nach Abschluß dieser Untersuchungen in ungefähr drei Wochen werden die transgenen Regenerate weitervermehrt bis genügend Pflanzenmaterial vorhanden ist. Anschließend erfolgt die Bestimmung der in diesen Regeneraten vorhandene Allergenität am Paul-Ehrlich-Institut in Langen.

2. Erfindungen / Schutzrechtsanmeldungen und erteilte Schutzrechte

nicht vorhanden

3./4. Wirtschaftliche, wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten nach Auftragsende / Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit

Im Rahmen des Forschungsprojektes sind mehrere bedeutende wissenschaftliche und technische Erfolge erzielt worden.

1. Marktrelevante Kirschlinien wurden erstmalig immunologisch hinsichtlich ihres Pru av 1 Gehalts untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass alle 11 untersuchten Sorten einen ähnlichen Pru av 1 Gehalt aufwiesen und eine ähnliche Anzahl an Pru av 1 Genkopien enthalten.
2. Isoformen des Pru av 1 wurden erstmalig identifiziert, kloniert und sequenziert. Die Isoformen wurden durch eine Kombination aus molekularbiologischen und proteinchemischen Methoden identifiziert. Die mit Hilfe einer cDNA-Expressionsbibliothek und Massenspektrometrie identifizierten Isoformen wurden mit 2-D Blot Inhibition bezüglich ihrer IgE-Bindungseigenschaften untersucht. Die hierbei identifizierten Isoformen von Pru av 1 zeigen abweichende IgE Bindungseigenschaften und könnten daher für die Diagnose und Therapie der Kirschallergie von Bedeutung sein
3. Durch *in vitro*-Mutagenese und NMR-Spektrometrie von Pru av 1 gelang es, unter anderem die Aminosäure E45 als zu einem IgE-Epitop gehörig zu identifizieren, Solche Epitope sind an der Auslösung von Symptomen in allergischen Patienten beteiligt. Diese Erkenntnisse sind ebenfalls für die Verbesserung von Diagnose und Therapie der Kirschallergie von Bedeutung.
4. Durch die Kombination von allergologischen Untersuchungen und von Gewebekulturtechniken wurde gezeigt, dass Pru av 1 auch in den Blättern von regenerierten Pflanzen vorkommt. Damit ist die Möglichkeit gegeben, die gentechnische Reduktion von Pru av 1 schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Regenraten von Kirschkpflanzen zu messen.
5. Es wurden neue Regenerationsprotokolle und neue auf Internodien basierende Transformationsprotokolle für verschiedene marktrelevante Kirschsornten entwickelt. Diese Methoden stellen die Basis für die Herstellung einer Kirsche mit reduzierter Allergenität und andere gentechnischer Veränderungen der Kirsche dar. Die erarbeiteten Regenerationsprotokolle, bei dem aus einzelnen Pflanzenzellen aus Internodien bzw. Blättern wieder neue Pflanzen regeneriert werden können, als auch das neu etablierte Transformationsprotokoll für marktrelevante Kirschsornten können für andere Fragestellungen eingesetzt werden. Dabei kann die Widerstandsfähigkeit gegenüber

Pathogenen, wie Pilz-, Bakterien- und Virenbefall, gentechnologisch erhöht werden. Weitere wichtige Ansatzpunkte sind die Verbesserung der Produkt- und Qualitätseigenschaften. Über den Erfolg der wissenschaftlichen Fragestellung des Projektes hinaus wurden damit für die Kirschenzüchter wertvolle methodische Vorarbeiten und Grundlagen erarbeitet

6. Aus über 10000 Transformanten wurde mindestens eine transgene Kirschlinie isoliert, die nachweislich das asRNA-Konstrukt enthält. Untersuchungen, inwiefern diese transgene Linie einen reduzierten Gehalt von Pru av 1 besitzt konnten noch nicht abgeschlossen werden. Die gewonnenen Erkenntnisse und etablierten Techniken können zur Reduzierung der Expression von Allergenen in anderen marktrelevanten Lebensmitteln wie Steinfrüchte (Apfel, Pflaumen, Kiwi) und Gemüse (Sellerie) eingesetzt werden. Da das Transformationsprotokoll für die Süßkirsche, die in der Gewebekultur als äußerst schwieriges Untersuchungsobjekt bekannt ist, entwickelt wurde, sollte eine Übertragung dieser antisense-RNA- und RNAi-Strategie auf andere holzige Nutzpflanzen möglich sein.

5. Arbeiten ohne Lösungen

Sämtliche wesentlichen Projektteile, die auf die Charakterisierung und die Reduktion des Hauptallergens der Kirschen, Pru av 1, abzielten, wurden erfolgreich abgeschlossen. Lediglich der Teilaspekt B3, Testung auf die Induzierbarkeit der Transkription und Expression von Pru av 1 durch Inkubation der Zellsuspensionskulturen mit Pathogenen bzw. Stressfaktoren, konnte aufgrund der verzögerten Inkulturnahme der unterschiedlichen Kirscharten nicht durchgeführt werden. Diese Arbeiten hätten parallel zu den Transformationsexperimenten und der molekularbiologischen Charakterisierung der Transformanten durchgeführt werden müssen. Im Hinblick auf den erfolgreichen Abschluss des Gesamtprojekts wurde auf diesen Teilaspekt verzichtet.

6. Präsentationsmöglichkeiten

Die engverzahnte Zusammenarbeit zwischen dem PEI und der DLR hat es ermöglicht, neue molekulare Erkenntnisse über Funktion und das Vorkommen von Pru av 1 und seiner Isoformen zu gewinnen und die Grundlage für die Herstellung transgener, hypoallergener Kirschen zu legen. Mit der erfolgreichen Klonierung von Transformationsvektoren, die für ein asRNA und ein RNAi Konstrukt kodieren, der erfolgreichen Entwicklung von Regenerations- und Transformationsprotokollen und der Herstellung von mindestens einer transgenen Kirschlinie wurde in Deutschland im Bereich der grünen Gentechnik von holzigen Pflanzen Neuland betreten. Die Projektergebnisse eignen sich hervorragend dazu, das wissenschaftlich/technische und das wirtschaftliche Potential der Kombination grüner und roter Gentechnologie exemplarisch darzustellen. Darüber hinaus könnten die über die Isoformen und IgE-Epitope von Pru av 1 gewonnenen Erkenntnisse zur Verbesserung der Diagnose und Therapie von allergischen Reaktionen auf Süßkirsche beitragen.

7. Einhaltung der Kosten- und Zeitplanung

Der Kosten- und Zeitplan wurde im Allgemeinen eingehalten. Die unerwartet lange Dauer der Regeneration der in-vitro-Pflanzen führte zwar in einigen Teilbereichen des Projektes zu Verzögerungen. Dies konnte durch eine kostenneutrale Verlängerung bis zum 30.09.2003 und einer weiteren Bearbeitung des Projektes aus anderen Mitteln bis zum 31.03.2004 ausgeglichen werden. Für den Projektträger sind hierdurch keine zusätzlichen Kosten entstanden.