

Charakterisierung und Isolierung
von Allergenen der Tomate
(*Lycopersicon lycopersicum* (L.) Karst. ex Farw.)

Dissertation

Zum Erlangen des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg

aus dem
Institut für Biochemie- & Lebensmittelchemie
- Abteilung Lebensmittelchemie –
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Silke Schubert
aus Hamburg

Hamburg 2003

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2000 bis Oktober 2002 unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. H. Steinhart am Institut für Biochemie- und Lebensmittelchemie, Abteilung Lebensmittelchemie, der Universität Hamburg angefertigt.

Wollte man warten, bis man etwas so gut könnte,
daß niemand etwas daran auszusetzen fände,
brächte man nie etwas zuwege.

(Mike Sinik)

Gutachter: Prof. Dr. Dr. H. Steinhart
Prof. Dr. B. Bisping

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Juni 2003

Danksagungen

Für das Überlassen des Themas sowie der freundlichen Betreuung dieser Arbeit bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. H. Steinhart und Frau Dr. A. Paschke.

Herrn Prof. Dr. B. Bisping gilt mein Dank für die bereitwillige Übernahme des Koreferats.

Für die finanzielle Förderung, welche diese Arbeit erst ermöglichte, möchte ich dem Forschungsbereich der Ernährungsindustrie (FEI) danken.

Ein besonderer Dank geht an Britta Gillner, Stephanie Nietzke, Andrea Steinbeck und Julia Schlögl, die mit ihrem Engagement und ihrer tatkräftigen Unterstützung zur Umsetzung dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Dr. Weißbecher sowie allen Mitarbeitern der Hautklinik des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf gilt mein spezieller Dank für die Kooperation und die Unterstützung bei der Rekrutierung der Patienten und der Blutabnahme.

Ein großer Dank geht an alle Patienten, welche sich liebenswürdiger Weise immer wieder stechen ließen und ohne die diese Untersuchungen nicht durchführbar gewesen wären.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe der Allergie möchte ich mich für den regen Erfahrungsaustausch, der phantastischen Zusammenarbeit, den wunderbaren Kaffeerunden sowie den vielen schönen Stunden, welche die Promotionszeit zu einem Erlebnis werden ließen, bedanken.

Marco Sell danke ich sehr für die grandiose Teamarbeit während der gesamten Studien- und Promotionszeit und der daraus entstandenen Freundschaft.

Ein ganz herzlicher Dank geht an Katy Zunker für die vielfältigen Anregungen, die konstruktive Kritik, die moralische Unterstützung sowie die Durchsicht des Skriptes.

Ein besonderer Dank geht an Solveig Jacobs sowie Torsten Schubert, die sich durch das Skript kämpften, obwohl die Thematik für sie eher böhmischen Dörfern glich.

Abschließend möchte ich mich bei all Denen, die stets an mich geglaubt haben und deren liebevoller Unterstützung ich mir jederzeit sicher sein konnte, bedanken.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Problemstellung und Arbeitsplan	2
1.2	Pathogenese allergischer Reaktionen	3
1.3	Klinik und Diagnostik von Lebensmittelallergien	7
1.4	Kreuzreaktivitäten	8
1.5	Verdauung	10
1.6	Lebensmittelallergien gegen Tomate	10
2	Material	13
2.1	Patientenseren	13
2.2	Tomate (<i>Lycopersicon lycopersicum</i> (L.) Karst. ex Farw.)	13
2.3	Lectine	14
2.4	Enzyme	15
3	Methoden	16
3.1	Methodenübersicht	16
3.2	Proteinextraktion	17
3.3	Bestimmung des Proteingehaltes	17
3.4	Enzymallergosorbent-Test (EAST)	18
3.5	EAST-Inhibition	18
3.6	Elektrophorese	19
3.6.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	19
3.6.2	Isoelektrische Fokussierung (IEF)	20
3.6.3	2D-Elektrophorese	20
3.7	Semidry-blotting	20
3.7.1	Immunoblot (IB)	21
3.7.2	Immunoblot-Inhibition	22
3.7.3	Profilin-Blot	22
3.8	Nachweis von Kohlenhydraten	22
3.8.1	Nachweis mittels Periodatspaltung	23
3.8.2	Nachweis mittels Lectinen	23
3.9	Unspezifische Färbungen	24
3.10	Verfahren zur Allergenisolierung	24
3.10.1	Ionenaustauschchromatographie (IEC)	25
3.10.2	Größenausschlußchromatographie (SEC)	25

3.10.3	Umkehrphasen Chromatographie (RPC)	25
3.11	Entsalzung über Dialyse	26
3.12	N-terminale Sequenzanalyse	26
4	Ergebnisse	27
4.1	Charakterisierung der Tomatenallergene	27
4.1.1	SDS-PAGE / Immunoblot	27
4.1.2	IEF / Immunoblot	29
4.1.3	2D-Elektrophorese / Immunoblot	29
4.1.4	Sortenvergleich	30
4.1.5	Reifung	33
4.1.6	Tomatenbestandteile	35
4.1.7	Profilinnachweis	38
4.1.8	Nachweis von Kohlenhydraten	39
4.1.8.1	Nachweis mittels Periodatspaltung	39
4.1.8.2	Nachweis mittels Lectinen	41
4.1.9	in-vitro Verdau	44
4.1.10	Kreuzreaktivitäten	48
4.2	Isolierung von Tomatenallergenen	54
4.2.1	Isolierung des 44 kDa Allergens	54
4.2.1.1	IEC	54
4.2.1.2	RPC	58
4.2.1.2	N-terminale Sequenzierung	60
4.2.2	Isolierung des 26 kDa Allergens	60
4.2.1.1	IEC	60
4.2.1.2	SEC	63
4.2.1.3	RPC	66
4.2.1.4	N-terminale Sequenzierung	67
5	Diskussion	68
5.1	Charakterisierung der Tomatenallergene	68
5.2	Isolierung der Tomatenallergene	78
5.3	Ausblick	80
6	Zusammenfassung / Summary	81
7	Anhang	86
8	Literatur	135

Abkürzungsverzeichnis

2D	2-dimensional	
AAA	Aleuria aurentia Agglutinin	Lectin
AC	Affinitätschromatographie	
AP	Alkalische Phosphatase	
Api g 1 bzw. 2	Apium graveolen	Hauptallergene des Selleries
APZ	Antigenpräsentierende Zelle	
Ara h 1	Arachis hypogaea	Hauptallergen der Erdnuß
AS	Aminosäure	
BBF	Brilliant Black Färbung	
Bet v 1 bzw. 2	Betula verucosa	Hauptallergene der Birke
β-FF	β-Fructofuranosidase	
Bis-Tris-HCl	Bis[2-hydroxyethyl]imino-tris[hydroxymethyl]methan-HCl	
BSA	Rinderserumalbumin	Bovine serum albumin
CAPS	(3-Cyclohexyl-amino)-1-propansulfonsäure	
CBB	Coomassie Brilliant Blue	
CCD	Kohlenhydratdeterminanten	
Con A	Concanavalin A	
DBPCFC	Doppeltblinder placebokontrollierter Provokationstest	
DEAE	o-2-Diethylaminoethyl	
DONS	Dioclylnatriumsulfosuccinat	
DTT	α-Dithiothreitol	
EACA	6-Aminohexansäure	
EAST	Enzymallergosorbent-Test	
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	
Fab	Antigenbindendes Fragment	fragment antigen binding
Fc	kristallines Fragment	fragment crystalline
Hev b 7	Hevea brasiliensis	Hauptallergen des Latex
HRP	Meerrettich Peroxidase	horseradish peroxidase
IB	Immunoblot	
IEC	Ionenaustauschchromatographie	Ion exchange chromatography
IEF	Isoelektrische Fokussierung	
Ig	Immunglobulin	Klassen A / D / M / G / E
LTP	Lipid transfer protein	
Lyc e 1	Lycopersicon esculentum	Profilin der Tomate
Mal d 1	Malus domesticus	Hauptallergen des Apfels
MES	2-(N-morpholino)ethansulfonsäure	
MG	Molekulargewicht	
MGM	Molekulargewichtsmarker	

MOPS	3-(N-morpholino)propansulfonsäure	
NC	Nitrocellulose	
NSD	Nicht spezifische Bindung	
OAS	Orales Allergie Syndrom	
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	
PAS	Periodsäure Schiff'sche (Färbung)	
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung	phosphate buffered saline
PG 2A	Polygalacturonase 2A	
PHT	Phenylthiohydantoin	
pI	Isoelektrischer Punkt	point isoelectric
pIM	pI-Marker	
PNA	Peanut Agglutinin	Lectin
PNPP	p-Nitro-phenylphosphat	
PR	Phatogenensis related	
PVDF	Polyvinylidendifluorid	
Pyr c 4	Pyrus communis	Birnenprofilin
RAST	Radioallergosorbent-Test	
RCA	Ricinus communis Agglutinin	Lectin
RPC	Umkehrphasenchromatographie	Reversed phase chromatography
RP	Umkehrphase	Reversed phase
SDS	Natriumlaurylsulfat	sodiumdodecylsulfate
SEC	Größenausschlußchromatographie	size exclusion chromatography
Sin a 1	Sinapis alba	Hauptallergen des Senfs
ST	Standard	
Sol t 1-4	Solanum tuberosum	Hauptallergene der Kartoffel
TFA	Trifluoressigsäure	
TMB	Tetramethylbenzidin	
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)methan	
TTE	Tieftemperaturextraktion	
USP	United specification of proteins	
UV	Ultraviolett	
WHO	World health organisation	
WGA	Lektin Wheat Germ Agglutinin	

1 Einleitung

Schon zu Zeiten des HIPPOKRATES (460-377 v. Chr.) wurden Überempfindlichkeitsreaktionen gegenüber Lebensmitteln beschrieben, welche nach heutigem Wissensstand den Lebensmittelallergien zugeordnet werden können. Obwohl diese somit nicht ein Phänomen der heutigen Gesellschaft darstellen, konnte in den letzten Jahren durch zahlreiche epidemiologische Studien ein Anstieg der Prävalenz von allergischen Erkrankungen nachgewiesen werden [ANDRÉ et al. 1994, ASHER et al. 1995, MONERET-VAUTRIN & KANNY 1995, WÜTHRICH 1996, STRACHAN et al. 1997, CHINN et al. 1999, PEARCE et al. 2000, SUNYER et al. 2000]. Die Lebensmittelallergie stellt eine individuelle Erkrankung des Organismus dar, welche sich in einer Vielzahl von klinischen Symptomen manifestieren kann. Die vier am häufigsten betroffenen Organe bzw. Organsysteme sind die Haut, der Respirationstrakt, der Gastrointestinaltrakt sowie weniger weit betroffen das Herz-Kreislauf-System [SAMPSON 1992a, WÜTHRICH 1993]. Die Diagnostik einer Lebensmittelallergie ist relativ kompliziert, da die Symptome mit einer zeitlichen Verzögerung auftreten können und somit der Zusammenhang zwischen erfolgter Nahrungsaufnahme und klinischer Manifestation schwer erkennbar ist [SAMPSON 1992b, CHANDRA et al. 1993, RING et al. 2001]. Daneben weisen die Patienten nur wenige der vielfältigen Symptome wie z.B. Rhinitis, Asthma, Urtikaria, Dermatitis oder Diarrhoe gleichzeitig auf [HEFLE 1996]. Aus dieser Problematik heraus resultieren die voneinander variierenden Angaben über die Prävalenz von Lebensmittelallergien. So wird der von Lebensmittelallergien betroffene Anteil an der Gesamtbevölkerung bei Säuglingen und Kindern mit 0.3-7.5 % angegeben, wohingegen der Anteil der Erwachsenen mit 1-2 % deutlich niedriger liegt [SAMPSON & METCALFE 1991, KARDINAAL 1991, CASTILLO et al. 1996, CHANDRA 1997, BINDSLEV-JENSEN 1998, SAMPSON 1999, STANLEY & BANNON 1999]. Die höhere Prävalenz der Lebensmittelallergien bei Kleinkindern kann durch die noch nicht vollständige Ausreifung der gastrointestinalen Epithelmembran und des Immunsystems erklärt werden, wodurch es zu einer erleichterten Aufnahme von intakten Makromolekülen kommen kann [ROBERTSON et al. 1982, HELBING 1998]. Entsprechend den Ernährungsgewohnheiten zählen Kuhmilch und Hühnerei zu den häufigsten Auslösern einer Lebensmittelallergie in diesem Alter, wobei diese über die Ausbildung einer immunologischen Toleranz mit zunehmendem Alter zumeist verlorengelht [COLLIN-WILLIAMS & LEVY 1984, LICHTENSTEIN 1993, HELBING 1998, WAHN 2000]. Bei Jugendlichen und Erwachsenen erfolgt die Sensibilisierung häufig über das Einatmen aero gener Allergene wie z.B. Pollen oder z.T. Latex. Hierbei reagieren die durch das Inhalationsallergen induzierten Antikörper mit den in ihrer Struktur ähnlichen Lebensmittelproteinen [CALKHOVEN et al. 1987, HELBING 1998]. Unter den Lebensmittelallergien ist die pollenassoziierte Lebensmittelallergie, welche auf dem Mechanismus der Kreuzreaktivität zwischen Inhalations- und Lebensmittelallergen beruht, die häufigste Form. Ihre mannigfaltigen Symptome beschränken sich zumeist auf den Oropharynx [BUSCHMANN 1996, HELBING 1998].

1.1 Problemstellung und Arbeitsplan

Trotz intensiver Forschung ist es noch nicht möglich, die Fehlsteuerung des Immunsystems zu korrigieren. Zur Zeit sind die Therapiemöglichkeiten für Allergiker häufig symptomorientiert ausgelegt, wobei die Karenz des Allergens neben einer Desensibilisierung oder einer medikamentösen Vorsorge die häufigste Behandlungsform darstellt. Für eine verbesserte Diagnostik und Therapie der Allergien ist die Identifikation und molekulare Charakterisierung der relevanten Lebensmittelallergene Grundvoraussetzung [BHALLA et al. 2001, KONAN & VIQUEZ 2002]. Um herauszufinden, wie die Allergene die IgE Antikörperproduktion zu induzieren vermögen, sind die Identifizierung und Reinigung derselben für strukturelle und immunologische Studien notwendig. Obwohl inzwischen die Primärstruktur von ca. 200 Allergenen bekannt ist, wurden bisher nur relativ wenig pflanzliche Allergene charakterisiert [STANLEY & BANNON 1999]. Die als Allergene identifizierten Proteine sind in der Allergen-Datenbank der World Health Organisation (WHO) mit ihren biochemischen und immunologischen Eigenschaften aufgeführt (WHO)/IUIS allergen list: <http://www.allergen.org>.

Die Tomate (*Lycopersicon lycopersicum*) zählt unter den *Solanaceae* zu den häufigsten Auslösern einer Immunglobulin E (IgE)-vermittelten Überempfindlichkeitsreaktion und ist in den mediterranen Gebieten mit einer Relevanz von 20 % unter den Lebensmittelallergenen die häufigste Ursache [ORTOLANI et al. 1988, 1989]. Aufgrund der Popularität der mediterranen Küche sind Tomaten auch in unseren Regionen zu einem wesentlichen Bestandteil der Ernährung geworden und treten hinsichtlich ihres allergenen Potentials immer weiter in den Vordergrund. Diese Arbeit umfaßt nun sowohl die eingehende Untersuchung als auch die Isolierung und Identifizierung der Allergene der Tomate.

Bereits BLEUMINK et al. [1966] beschrieb eine Steigerung der Allergenität von Tomaten in Abhängigkeit vom Reifegrad. Im Rahmen dieser Arbeit werden die Ergebnisse von BLEUMINK et al. [1966] anhand drei verschiedener Sorten verifiziert und gegebenenfalls die zur Allergenitätssteigerung beitragenden Allergene eingehender charakterisiert. Zusätzlich wird der u.a. beim Apfel [VIETHS et al. 1994a, HSIEH et al. 1995, SON et al. 1995] sowie der Paprika [JENSEN-JAROLIM et al. 1998] bereits bestätigte Einfluß der Sorte auf das allergene Potential untersucht. Neben dem Nachweis von Haupt- und Nebenallergenen in der Gesamtf Frucht erfolgt zusätzlich eine Erörterung über deren Verteilung innerhalb der Frucht. Zudem wird geprüft, inwieweit Kohlenhydrate am Aufbau des Allergens bzw. seiner Epitopstruktur beteiligt sind. Da die Tomatenallergie selten isoliert anzutreffen ist und zumeist mit einer Sensibilisierung gegenüber Inhalationsallergenen und Latex einhergeht [DE MARTINO et al. 1988, VIETHS et al. 1996c, HANNUKSELA & LATHI 1977, HELBING 1997], werden Untersuchungen zur Kreuzreaktivität mit anderen birkenpollenassoziierten Lebensmitteln verschiedener Pflanzengruppen durchgeführt. Das Ziel ist die Identifizierung der für die Assoziation verantwortlichen Allergene. Um abschließend zu klären, inwieweit eine Sensibilisierung gegen Tomate infolge der Adsorption immunologisch aktiver Moleküle im Gastrointestinaltrakt denkbar ist, oder ob sie ausschließlich über die Inhalation kreuzreagierender Allergene erfolgt, wird die Stabilität der Allergene im Rahmen einer einfachen in-vitro Simulation des Verdauungsprozesses untersucht.

Um eine molekulare Charakterisierung einzelner Allergene vornehmen zu können, müssen diese in reiner Form vorliegen. Unter Verwendung chromatographischer und

elektrophoretischer Verfahren werden im Rahmen dieser Arbeit ausgewählte Tomatenallergene im mikropräparativen Maßstab isoliert und anschließend einer N-terminalen Sequenzierung unterworfen.

Für die gesamten Untersuchungen werden etablierte elektrophoretische Methoden wie die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), Isoelektrische Fokussierung (IEF) und 2-dimensionale (2D)-Elektrophorese sowie immunologische Verfahren wie der Enzymallergosorbenttest (EAST), die EAST-Inhibition und der Immuno bzw. Profilinblot eingesetzt. Um eine relative Quantifizierung des allergenen Potentials vorzunehmen und mögliche Kreuzreaktionen zu ermitteln, findet die EAST-Inhibition Anwendung.

1.2 Pathogenese allergischer Reaktionen

Der Kinderarzt CLEMENS VON PIRQUET prägte 1906 veranlaßt durch "... Befunde von Überempfindlichkeit am immunisierten Organismus" als Erster den Begriff der Allergie. Er verstand darunter ganz allgemein eine spezifisch veränderte Reaktionsfähigkeit eines immunisierten Organismus. 1988 differenzierte RING den Begriff der Allergie als "... eine spezifische Änderung der Immunitätslage im Sinne einer krankmachenden Überempfindlichkeit". Eine echte Lebensmittelallergie ist demnach eine nicht toxische Überempfindlichkeitsreaktion, welche durch immunologische Mechanismen vom Soforttyp (Typ I-Reaktion) gekennzeichnet ist. Die strikte Abgrenzung zu anderen, nicht immunologisch vermittelten Lebensmittelintoleranzen erfolgt somit über pathogenetische Gesichtspunkte [BRUIJNZEL-KOOMEN et al. 1995]. Abb. 1-1 gibt einen Überblick über die Einteilung von Unverträglichkeitsreaktionen auf Lebensmittel.

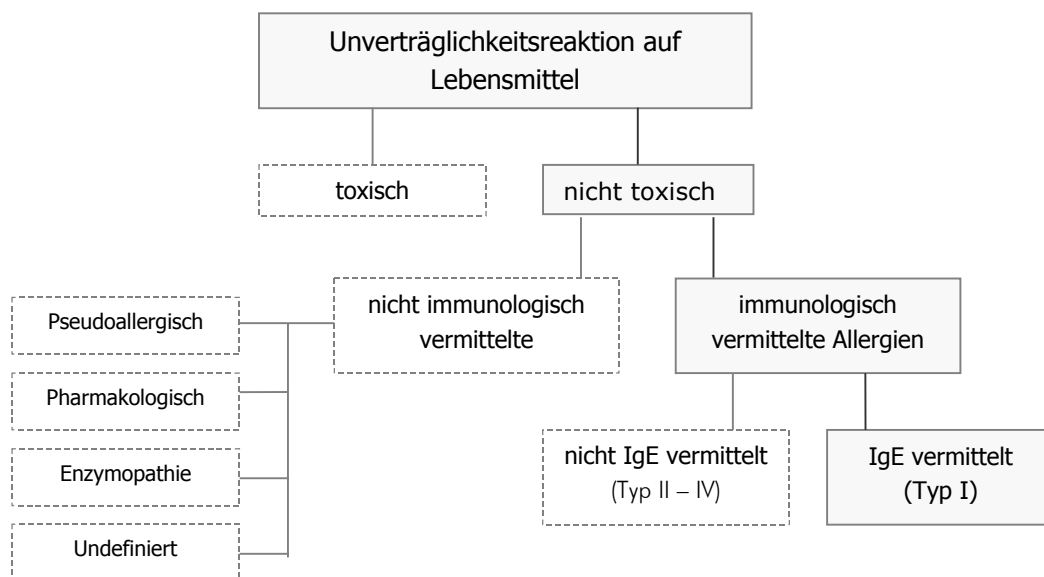


Abb. 1-1: Einteilung der Lebensmittelunverträglichkeitsreaktionen

Die Lebensmittelallergie stellt eine inadäquate Reaktion des körpereigenen Immunsystems gegenüber nicht toxisch wirkenden und ansonsten harmlosen Lebensmittelbestandteilen dar, wobei die Grundlage eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion bildet. Die bei der

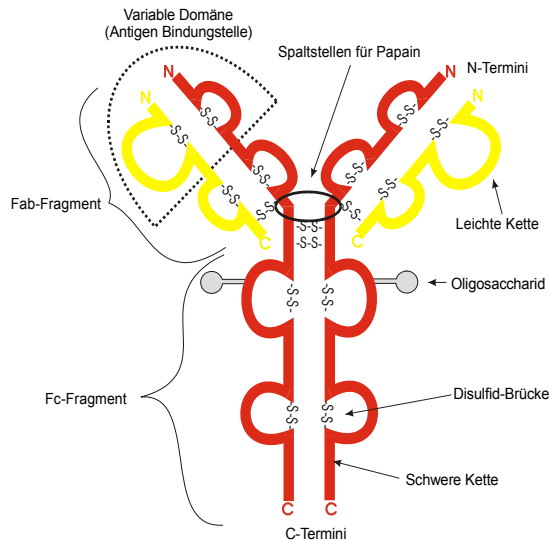


Abb.1-2: schematische Darstellung von Antikörpern

Molekulargewicht, Ladung, Aminosäuresequenz, Kohlenhydratanteil sowie ihrer Aufgabe voneinander unterscheiden. Wobei die IgE-Antikörper ursprünglich der immunologischen Abwehr des Wirtes gegen Wurmparasiten dienten [JANEWAY & TRAVERS 1995, KREFT et al. 1995, ROITT et al. 1995]. Allen Immunoglobulinen ist das in Abb. 1-2 dargestellte y-förmige Grundgerüst bestehend aus zwei identischen leichten sowie zwei ebenfalls identischen schweren Polypeptidketten, gemein. Eine Stabilisierung dieser Struktur wird über die Ausbildung von intramolekularen Disulfidbrücken erreicht [ROITT et al. 1995]. Die kurzen "Fab"-Fragmente (fragment antigen binding) tragen je zwei variable und konstante Domänen, wobei die Spezifität der Antikörper zu Antigenen in der differierenden Aminosäuresequenz der variablen Domäne - dem Paratop - begründet liegt [SUTTON & GOULD 1993, MEKORI 1996]. Durch eine für jeden Ig-Isotyp unveränderliche Sequenz der "Fc"-Fragmente (fragment crystallin) wird die Funktionalität der Antikörper bestimmt. Im Gegensatz zu allen anderen Antikörpern weisen IgE fünf statt vier konstante Domänen auf dem "Fc"-Fragment auf [ROITT et al. 1995].

Antigene, die über die Aktivierung von B-Lymphozyten eine Produktion von spezifischen IgE-Antikörpern induzieren und somit zur Auslösung einer allergischen Reaktion befähigt sind, werden als Allergene bezeichnet. Zumeist handelt es sich bei Lebensmittelallergenen um Proteine oder Glykoproteine mit einem Molekulargewicht (MG) zwischen 10 und 70 kDa [SAMPSON 1991, LEHRER et al. 1996] bis 100 kDa [AULEPP & VIETHS 1992, AALBERSE 2000]. Die erst nach Anlagerung an ein Trägermolekül ebenfalls zur IgE-Bindung befähigten niedermolekularen Proteine mit einem Molekulargewicht kleiner 4 kDa werden als Haptene bezeichnet [ROITT 1993]. Zur allergenen Potenz eines Proteins trägt somit zum einen die Immunogenität eines Moleküls und zum anderen die Permeabilität gegenüber der Schleimhautmembran bei [TAYLOR 1992]. Die zur Auslösung einer allergischen Reaktion erforderliche Kreuzvernetzung von gebundenen IgE-Molekülen erfolgt mittels einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Hierfür muß das Allergen einen bivalenten bzw. multivalenten Charakter zeigen, also mindestens zwei spezifische, frei zugängliche Bindungsstellen aufweisen, die als Epitope bezeichnet werden. Diese allergenen Determinanten können strukturell bedingt in zwei Gruppen unterteilt werden. Der spezifische Bereich der Sequenzepitope erklärt sich ausschließlich über die kontinuierliche Reihenfolge von bis zu 20 Aminosäuren, wohingegen

Soforttyp-Reaktion zentrale Bedeutung des Antikörper IgE wurde erst 1967 von ISHIZAKA & ISHIZAKA zeitgleich mit JOHANSSON & BENNICHT erkannt. In einem sensibilisierten Organismus werden IgE von differenzierten Plasmazellen sezerniert und dienen der Erkennung sowie der Inhibierung und Eliminierung von Antigenen. Erhöhte Gehalte der ansonsten nur in geringen Konzentrationen vorkommenden IgE im Serum werden als Hinweis auf eine atopische Erkrankung in Betracht gezogen [KAY 1997]. IgE ist eines von insgesamt fünf Immunoglobulinisotypen (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM) des Organismus, welche sich in Bezug auf

die Konformationsepitope über ihre räumliche Gestaltung, der Sekundär- bzw. Tertiärstruktur, definiert werden [GLICK & PASTERNAK 1995].

Ein Lebensmittel beinhaltet in der Regel eine Vielzahl verschiedener Allergene, welche hinsichtlich ihrer Relevanz für die Patienten aus allergologischer Sicht unterteilt werden. Bindet ein Allergen in mehr als 50 % der getesteten Seren von Atopikern spezifisches IgE, so wird dieses als Majorallergen beschrieben. Wird bei weniger als 10 % der Patienten eine Sensibilisierung nachgewiesen liegt ein Minorallergen zugrunde. Intermediärallergene sind in der Lage, eine Sensibilisierung zwischen 10 und 50 % hervorzurufen. Um eine solche Klassifizierung der Allergene gesichert durchführen zu können, muß ein Patientenkollektiv vorliegen, welches aus mehr als 50 Individuen besteht [GEHA 1995, VIETHS et al. 1996d].

In pflanzlichen Lebensmitteln als auch in Pollen sind teilweise allergene Moleküle mit gleichen funktionellen Eigenschaften und einer Sequenzhomologie von mindestens 67 % anzutreffen. Diese als Isoallergene bezeichneten Moleküle weisen voneinander divergierende isoelektrische Punkte (pI) auf, die z.B. aus geringen Variationen in der Primärsequenz des Allergens resultieren können [KING & THOMAS 1994]. Auffällig ist, daß vor allem die Majorallergene über einen hohen Grad an Polymorphismus verfügen. Es wird daher vermutet, daß diese Art der Variation eine Voraussetzung für die Wirkung eines Antigens als Majorallergen ist, da hierdurch die Anzahl ähnlicher Epitope, die mit dem IgE reagieren können, erhöht wird [THOMAS et al. 1998].

Bislang konnte die Mehrzahl der Allergene pflanzlicher Herkunft als Speicherproteine (Soja, Erdnuß) oder als in großer Menge vorhandene Protease Inhibitoren (Weizen, Reis, Soja) identifiziert werden (LEHRER et al. 1996). Zudem werden ebenfalls die in frischen Früchten und Gemüsen vorhandenen Pathogenensis-related (PR) Proteine als Allergene in der Literatur beschrieben [BREITENEDER & EBNER 2000]. Der aus der englischen Terminologie stammende Begriff „PR-Protein“ beschreibt Proteine, die in Reaktion auf einen Befall von Krankheitserregern gebildet werden und deren biologische Funktion noch nicht vollständig geklärt ist [BOWLES 1990, STINIZ et al. 1993]. In den letzten Jahren werden außerdem zunehmend die sogenannten Lipid-Transfer-Proteine (LTP) als potentielle Allergene diskutiert. Diese stabilen, phylogenetisch nah verwandten Proteine besitzen ein Molekulargewicht zwischen 9-10 kDa und sind als Allergene hauptsächlich in Südeuropa von Bedeutung. Ihre Funktion liegt in der Membran-Biogenese [KADER 1996] und der Abwehr von Pathogenen [GARCIA-OLMEDO et al. 1995] begründet. Besonders in den mediterranen Regionen sind die LTPs als Hauptallergene für Prunoideae-Allergiker bekannt [SANCHEZ-MONGE et al. 1999].

Die immunologische Überempfindlichkeit läßt sich nach COOMBS & GELL [1963] neben der IgE-vermittelten Soforttyp-Reaktion (Typ I) aufgrund der zugrundeliegenden Mechanismen in drei weitere Typen einteilen. An den Typen II (cytotoxische Reaktionen) sowie III (Immunkomplexreaktionen) sind ebenfalls Antikörper (IgG bzw. IgM) beteiligt, wobei der Typ IV in erster Linie durch T-Zellen und Makrophagen vermittelt wird. Obwohl in der Praxis diese Allergietypen nicht vollständig isoliert voneinander auftreten [MEKORI 1996, KAY 1997] wird vermutet, daß die Lebensmittelallergien bis zu 90 % nach der Soforttyp-Reaktion ablaufen [SPREITZER 1996].

Bevor es zum klinischen Ausbruch einer Soforttyp-Reaktion kommt, geht dieser eine initiale Sensibilisierungsphase gegen das betreffende Allergen voraus. Bei diesem ersten Kontakt zwischen Allergen und Immunsystem wird kein offensichtlicher Effekt auf die Zellen des Organismus ausgeübt. Somit erscheint diese Phase, welche über Jahre andauern kann, ohne klinische Symptomatik [ROTH et al. 1988]. Die in Abb. 1-3 illustrierte Sensibilisierungsphase beginnt mit der Aufnahme und der enzymatischen Spaltung der Moleküle [1] in kleinere Fragmente durch Makrophagen, die als antigenpräsentierende Zellen (APZ) [2] fungieren. Als T-Zellepitope werden die erhaltenen Fragmente den T-Lymphozyten [3] präsentiert, welche diese durch spezifische Rezeptoren ihrer Oberfläche erkennen und ihrerseits Lymphokine [4], wie z.B. Interleukin 4 oder γ -Interferon ausschütten. Diese freigesetzten Vermittlersubstanzen induzieren eine Differenzierung von B-Lymphozyten zu Antikörper sezernierenden Plasmazellen. Das auf diesem Weg produzierte IgE bindet über hochaffine F_c -Rezeptoren an die Oberfläche von Granulocyten (Mastzellen [9] und Basophile [10]).

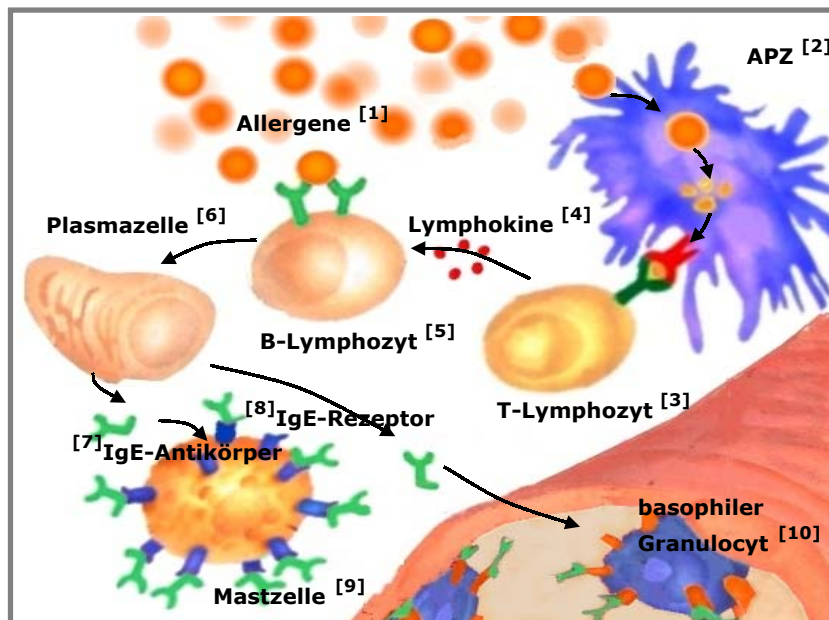


Abb. 1-3: Phase der Sensibilisierung

Die Sensibilisierung wird durch die Aufnahme und Spaltung der Allergene [1] durch Makrophagen eingeleitet. Die dabei entstandenen Fragmente werden an der Oberfläche der Makrophagen, welche als antigenpräsentierende Zellen [2] fungieren, den T-Lymphozyten [3] offeriert. Nach Erkennung der Fragmente kommt es zur Freisetzung von Lymphokinen [4], wodurch eine Ausreifung der B-Lymphozyten [5] zu Plasmazellen [6] erfolgt. Es kommt zu einer Ausscheidung von IgE-Antikörpern [7], die sich über einen langen Zeitraum an IgE-Rezeptoren [8] von Mastzellen [9] und an basophile Granulocyten [10] binden.

Erst eine erneute Exposition des Organismus mit dem Allergen hat in Sekundenschnelle eine allergische Reaktion zur Folge. Diese, als akute Phase bezeichnete Reaktionskaskade, ist vereinfacht in Abb. 1-4 dargestellt. Sie beginnt mit der Bindung des Epitops des Allergens [1] an die Paratope von IgE-Molekülen, welche an der Oberfläche von Granulocyten [2] gebunden vorliegen. Durch eine Überbrückung (bridging) [3] zweier zellgebundener IgE-Moleküle kommt es zur Oberflächendeformation der Mastzelle, wodurch eine Aktivierung von Enzymen der Zellmembran hervorgerufen wird. Als Konsequenz erfolgt daraufhin die Freisetzung von in den cytoplasmatischen Granula der Mastzelle gespeicherten Effektormolekülen durch eine degranulierende Exocytose [4]. Vor allem vasoaktive Amine wie Histamin und Serotonin sowie inflammatorische Lipide wie Prostaglandine und Leukotriene sind hierbei zu nennen. Neben der Fähigkeit, allergische Reaktionen zu initiieren, penetrieren sie zusätzlich in die Blutgefäße und lösen dort die Bildung von Adhäsionsmolekülen [5] aus, welche auf den Mediatoren selbst als auch den Endothelzellen [6] zu haften vermögen. Die zirkulierenden Immunzellen [7] des Blutes wie z.B. basophile Granulocyten bleiben dadurch

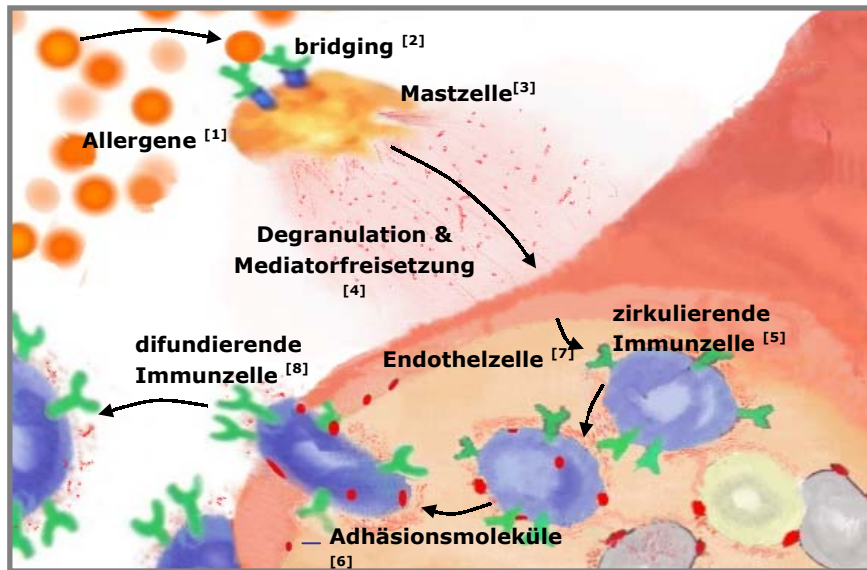


Abb.: 1-4 Phase der Manifestation

Der erneute Kontakt eines bereits sensibilisierten Organismus mit dem Allergen [1] führt zur Überbrückung (bridging) [2] von zwei auf einer Mastzelle [3] lokalisierten IgE-Antikörpern nach Bindung des Allergens an diesen. Als Folge der daraus resultierenden Deformation der Mastzellenoberfläche werden Mediatoren freigesetzt [4], welche nach Übergang in die Blutgefäße die Bildung von Adhäsionsmolekülen [6] induzieren. Diese haften an Mediatoren sowie Endothelzellen [7] und bewirken eine Diffusion [8] von zirkulierenden Immunzellen [5] in das umliegende Gewebe.

zunächst an den Endothelzellen haften und treten mit Hilfe der Adhäsionsmoleküle als diffundierende Immunzellen [8] in die umgebende Gewebeschicht ein, wodurch weitere Mediatoren freigesetzt werden. Die IgE-vermittelte Aktivierung der Mastzellen löst über diesen Mechanismus eine entscheidende Kaskade von Entzündungsreaktionen aus.

1.3 Klinik und Diagnostik von Lebensmittelallergien

Die auf die IgE-vermittelte Mastzellenaktivierung folgende Entzündungsreaktion erfolgt in zwei Phasen. Die Sofortreaktion beginnt innerhalb von Sekunden, wohingegen die Spätreaktion erst nach 8-12 Stunden entwickelt wird. Die Sofortreaktion kommt durch die Aktivität von Histamin, Prostaglandinen und anderen bereits vorhandenen Molekülen zustande. Sie verursachen eine schnelle Erhöhung der Gefäßdurchlässigkeit, eine Kontraktion der glatten Muskulatur als auch eine Verengung der Bronchien sowie juckreizlokale Entzündungen. Die Spätreaktion wird durch eine in den aktivierten Mastzellen induzierte Synthese von Mediatoren wie Leukotrienen, Chemokinen und Cytokinen bewirkt. Sie führen zu anhaltenden Ödemen, Gewebeschwellungen, gesteigerter Schleimproduktion in den Bronchien, erhöhter Reaktivität der Bronchialmuskulatur oder sogar zu anaphylaktischen Reaktionen [BUISSERET 1988, NACLERIO & BAROODY 1998]. Der bei der Diagnostik einer echten Lebensmittelallergie zu leistende Aufwand ist enorm, wobei nicht allein die Vielzahl der möglichen betroffenen Organe und die dadurch bedingte Verschiedenheit der Symptome eine Rolle spielen. Weitere Ursachen liegen ebenso in der großen Anzahl von potentiellen Allergenen [AULEPP & VIETHS 1992] sowie in den regional differierenden Ernährungsgewohnheiten [KREFT et al. 1995, HILL et al. 1999]. So treten z.B. in Norwegen vermehrt Allergien gegen Fisch auf, wohingegen in Japan Reis- und Sojaallergien überwiegen und die Erdnuß in den USA den Hauptauslöser einer Lebensmittelallergie darstellt [LEHRER et al. 2002]. Aufgrund dieser Problematiken wird der Anteil von Individuen, welche von einer allergischen Erkrankung betroffen sind, oftmals viel zu hoch eingestuft. So gaben in einer Studie 20.4 % der beteiligten Probanden an, unter einer Lebensmittelallergie zu leiden. Die genaue Diagnostik zeigte jedoch, daß lediglich 1.4 % dieser Probanden tatsächlich eine echte Lebensmittelallergie aufwiesen [YOUNG et al. 1994].

Die Diagnostik stützt sich heutzutage auf die vier Standbeine Anamnese, Kutantestungen, in-vitro-Diagnostik und Provokationstests. Um erste Anhaltspunkte zwischen der klinischen Ausbildung von Symptomen und dem Lebensmittel zu bekommen, wird eine umfangreiche Anamnese durchgeführt. Eine weitere Absicherung der dabei erlangten Hinweise erfolgt anschließend durch Kutantestungen, wobei Lebensmittelextrakte unter die Hautoberfläche injiziert werden. Hierbei werden entweder kommerziell erhältliche Lebensmittelextrakte (prick-test) [EIGENMANN & SAMPSON 1998] oder frische Lebensmittel (prick to prick-test) [DREBORG & FOUCARD 1983] verwendet. Diese Kutantestungen dienen lediglich als erweiterte Screeningmethode, da sie häufig zu falsch positiven Ergebnissen führen können. Hierfür sind die in den Lebensmitteln natürlich vorkommenden Substanzen wie z.B. Salicylate, Benzoate oder Sulfite verantwortlich [RING et al. 2001]. Die Bestätigung positiver Hauttestungen wird mit Hilfe von in-vitro-Tests durchgeführt, wobei verschiedene Systeme Anwendung finden können. Zum einen basieren diese Testungen auf der Messung des spezifischen IgE-Gehaltes (Radio-, Enzym- bzw. Fluoroenzym-allergosorbenttests) oder der Konzentration an Mediatorsubstanzen (Histaminfreisetzung oder Leukotrientest) im Blut [KLEINE-TEBBE & RYTTER 1997, HELBING 1998, RING et al. 2001]. Da eine Sensibilisierung gegenüber dem Lebensmittel aus einer Kreuzreaktivität resultieren kann, ist ein positiver IgE-Nachweis nicht zwingend mit einer klinischen Manifestation verbunden. Eine Verifizierung einer Lebensmittelallergie bietet der Provokationstest, bei welchem dem Probanden das vermeintliche Allergen oral dargeboten wird. Als akzeptierter und gesicherter Nachweis einer echten Lebensmittelallergie gilt heutzutage einzig der doppelblinde, placebo-kontrollierte Provokationstest (DBPCFC), bei welchem dem Patienten während der Testdurchführung ohne sein Wissen das vermeintliche Allergen bzw. Placebos verabreicht werden [BRUIJNZEL-KOOMEN et al. 1995].

1.4 Kreuzreaktivitäten

Bei Jugendlichen und Erwachsenen zählen Früchte und Gemüse zu den wichtigsten Auslösern einer Lebensmittelallergie [ORTOLANI et al. 1993, WÜTHRICH 1993, BIRCHER et al. 1994, ETESAMIFAR & WÜTHRICH 1998, CABALLERO & MARTIN-ESTEBAN 1998]. Mit einer Größenordnung von 80 bis 90% sind allergische Reaktionen gegen diese Lebensmittel an Allergien gegen verschiedene Pollen gebunden [ERIKSSON et al. 1982, THIEL 1988, AULEPP & VIETHS 1992, BIRCHER et al. 1994, CABALLERO & MARTIN-ESTEBAN 1998]. Dieses von THIEL [1988] als „pollenassoziierte Lebensmittelallergie“ bezeichnete Phänomen beruht auf immunologischen Kreuzreaktionen zwischen den Lebensmitteln und Pollenallergenen. Die allergische Sofortreaktion gegen Lebensmittel entwickelt sich zumeist erst nach einer primären, inhalativ ausgelösten Sensibilisierung gegen Pollenallergene und einer IgE-Kreuzreaktion zwischen homologen Allergenen in Lebensmitteln und Pollen [BIRCHER et al. 1994, CABALLERO & MARTIN-ESTEBAN 1998]. Damit ein Allergen als kreuzreaktiv angesehen werden kann, muß eine strukturelle Komplementarität gegeben sein. Alle bisher in der Literatur beschriebenen Kreuzallergenitäten besitzen Homologien in der Primär- und Tertiärstruktur und zeigen zudem den gleichen Faltungstyp [AALBERSE 2000]. Bei einer Homologie der Aminosäuresequenz von 60 % gilt eine Kreuzreaktivität als gesichert [DREBORG 1988, HELBING 1997]. Diese Homologie ist bei weitem nicht auf eine botanische Verwandtschaft beschränkt, durch phylogenetisch konservierte Strukturen werden auch taxonomische Grenzen überbrückt [VALENTA et al. 1992a, 1992b, ORTOLANI et al. 1993].

Eines der bedeutendsten, mit Lebensmittelallergien assoziierten Pollenallergene ist der Birkenpollen. So leiden zwischen 50 - 93 % der Birkenpollenallergiker ebenfalls an einer mehr oder weniger stark ausgeprägten Lebensmittelallergie, welche sich meist in Form einer milden oropharyngealen Symptomatik äußert [DREBORG 1988]. Das enorme Spektrum der kreuzreagierenden Früchte reicht von den *Rosaceae* wie beispielsweise Äpfel und Kirschen über Haselnüsse, exotische Früchte wie Kiwis oder Mangos bis hin zum Sellerie. Die Beifußallergiker weisen mit nur 10 % wesentlich seltener eine assoziierte Lebensmittelallergie auf, wobei die gekoppelten Lebensmittel überwiegend der Gruppe der *Apiaceae* und *Solanaceae* entstammen [WÜTHRICH et al. 1990, PICHLER & STICH 1993]. Während im Mittelmeerraum ferner die Kreuzreaktivität von Graspollen zu Lebensmitteln von Bedeutung ist, nimmt sie in unseren Breitengraden eine eher untergeordnete Rolle ein [ORTOLANI et al. 1993, BOCCAFOGLI et al. 1994, GARCIA ORTIZ et al. 1995].

Für die Pollenassoziation der Lebensmittelallergien scheinen nach heutiger Erkenntnis im wesentlichen drei Strukturen verantwortlich zu sein. Die herausragendste Bedeutung unter diesen nimmt das Birkenpollenallergen Bet v 1 ein. Die Prävalenz dieses Hauptallergens mit einem MG von 17 kDa beträgt in den assoziierten Lebensmitteln zwischen 59 und 96 % [LÜTTKOPF et al. 2000, BALLMER-WEBER et al. 2001] und zeigt zu homologen Pflanzenallergenen eine Sequenzidentität von bis zu 67 % auf. Daneben konnte auch eine hohe Homologie zwischen Bet v 1 verwandten Lebensmittelallergenen und der PR 10 Gruppe der PR-Proteine nachgewiesen werden [HOFFMANN-SOMMERGRUBER 2000].

Als weitere kreuzreagierende Struktur werden die in eukaryotischen Zellen ubiquitär vorliegenden Profiline mit einem Molekulargewicht zwischen 12 und 15 kDa angegeben [VALENTA et al. 1992b, STAIGER et al. 1993]. Sie sind Bestandteil des Zytoskeletts, beteiligen sich an der Regulation von Actin und scheinen eine entscheidende Rolle beim Pflanzenwachstum sowie der Pollenkeimung zu spielen [VIETHS et al. 1996a & 1996b]. Das als Bet v 2 bezeichnete Profilin der Birkenpollen weist eine hohe Homologie von durchschnittlich mehr als 75 % zu anderen pflanzlichen Profilinen auf, wohingegen erhebliche Differenzen zu tierischen Profilinen zu finden sind. MARTINEZ et al. [1995] beziffert die Sensibilisierung gegen das als Panallergen bezeichnete Profilin bei Pollenallergikern auf ca. 20 %. Allerdings ist zu bemerken, daß in Abhängigkeit des untersuchten Lebensmittels 11 % bis 70 % der Patienten IgE-Antikörper gegen dieses Panallergen besitzen [SCHEURER et al. 2000, 2001a, 2001b; FÖTISCH et al. 2001; REINDL et al. 2002].

Weitere kreuzreaktive Strukturen sind ubiquitär vorhandene N-verknüpfte Zucker, die N-Glycane. Es wird vermutet, daß die hohe Immunogenität dieser Kohlenhydratdeterminanten (CCD) aus der Art der Verknüpfung der Monosaccharide mit dem Grundgerüst resultiert, die bei Säugern unbekannt ist [TRETTER et al. 1993, KRISTENSEN et al. 1997, AALBERSE & VAN REE 1997, FÖTISCH et al. 1999]. Die beiden Strukturen $\alpha(1,3)$ -Fucose und $\beta(1,2)$ -Xylose stehen im Verdacht, für die IgE-Bindung verantwortlich zu sein [GARCIA-CASADO et al. 1996, WILSON & ALTMANN 1998].

Neben den pollenassoziierten Lebensmittelallergien ist das sogenannte "Latex-Frucht-Syndrom" zu erwähnen, welches die Assoziation von Latex- und Lebensmittelallergien beschreibt [BLANCO et al. 1994]. Als kreuzreaktive Strukturen werden hierbei das Speicherprotein Patatin mit einem MG von 46 kDa [HELBING 1997] sowie CCDs diskutiert [FUCHS et al. 1997, LEVY et al. 2000].

1.5 Verdaauung

Ziel der Verdaauung ist die Überföhrung der hochmolekularen Substanzen der Nahrung in für den Organismus absorbierbare Einheiten. Die hierfür notwendige Spaltung erfolgt durch die in den verschiedenen Verdaauungssekreten des Gastrointestinaltraktes enthaltenen Enzyme, deren Wirkung durch Milieubedingungen wie z.B. die Salzsäurekonzentration des Magens begünstigt wird.

Der Beginn der Verdaauung findet im Mund statt und wird in der Magenpassage durch die Protease Pepsin sowie das salzsaure Milieu fortgeführt. Das nur im Sauren aktive Pepsin spaltet bevorzugt die Peptidbindungen der Proteine bzw. Glycoproteine an deren Aufbau aromatische Aminosäuren beteiligt sind. Nach einer Aufenthaltsdauer von ca. 60 - 90 min im Magen gelangt der saure Nahrungsbrei, auch Chymus genannt, in den Dünndarm. Unter nahezu neutralen Bedingungen erfolgt ein weiterer Proteinabbau unter Einwirkung verschiedener proteolytischer Enzyme des Pancreassaftes. Die durch die Hydrolyse entstandenen Einheiten werden von der Dünndarmmucosa absorbiert und gelangen auf diesem Weg in die Blutbahn bzw. Lymphbahn, von wo aus sich eine Verteilung im gesamten Körper anschließt. Im Dickdarm, dem letzten Abschnitt des Verdaauungstraktes, wird dem nicht aufgenommenen Speisebrei Wasser entzogen. Die in diesem Abschnitt durch Proteasen geprägte enzymatische Aktivität ist durch die mikrobielle Darmflora zu erklären.

Die Resistenz der Allergene gegenüber der Verdaauung ist von besonderer Bedeutung, da für die Sensibilisierung eines Organismus intakte Allergene bzw. deren Epitope nach erfolgter Verdaauung notwendig sind [ASTWOOD et al. 1996]. Aufgrund von Kreuzreaktionen stellt die Persistenz gegenüber Proteasen allerdings keine Voraussetzung zur Fähigkeit eines Allergens zur Auslösung der allergischen Reaktion dar. Viele birkenpollenassoziierte Allergene zeigen eine relativ schwache Stabilität gegenüber der Verdaauung bzw. dem sauren Milieu des gastrointestinalen Traktes [YAGAMI et al. 2000]. Trotzdem sind sie befähigt allergische Reaktionen, wie z.B. das orale Allergiesyndrom (OAS), auszulösen. Ein Beispiel hierfür bietet die Haselnuß, bei welcher eine deutliche Reduktion der allergenen Aktivität durch eine simulierte in-vitro Verdaauung erzielt wurde [VIETHS et al. 1999]. Andere pflanzliche Allergene, wie z.B. die der Soja und Erdnuß behalten ihre immunologisch aktiven Epitope selbst im intestinalen Bereich bei [KIMBER et al. 1999]. Auch die Lipid Transfer Proteine gelten gegenüber proteolytischen Einflüssen als überaus resistent, was am LTP der Karotte gezeigt werden konnte [ASERO et al. 2001].

1.6 Lebensmittelallergien gegen Tomate

Unter den IgE-vermittelten Überempfindlichkeitsreaktionen gegen die Pflanzengruppe der *Solanaceae* stellt die IgE-Sensibilisierung gegen Tomate (*Lycopersicon lycopersicum*) die häufigste klinische Form dar. Die Symptome der allergischen Reaktion reichen vom OAS, welches durch das Jucken der Zunge, des Mundes sowie des Rachens gekennzeichnet ist, über Irritationen der Haut bis hin zu mit Krämpfen verbundenen Leibschmerzen und Übelkeit. In Mitteleuropa zählt die Tomate zwar mit einem Anteil von 1.5 % unter den Lebensmittelallergien zu den selteneren Ursachen [WÜTHRICH 1993], ist jedoch bei der mediterranen Bevölkerung mit einer Prävalenz von bis zu 20.6 % der wichtigste Auslöser des OAS [ORTOLANI et al. 1988, 1989]. Von allergischen Reaktionen oder Sensibilisierungen

gegen Tomate wird oftmals lediglich im Zusammenhang mit einer Inhalationsallergie berichtet [HANNUKSELA & LATHI 1977, DE MARTINO et al. 1988, WÜTHRICH & SCHMID-GRENDELMEIER 1995, PETERSEN et al. 1996, BREHLER et al. 1997, CZAJA-BULSA & BACHORSKA 1998]. Die hohe Relevanz der Kreuzreaktionen der Tomate mit Pollen zeigt sich unter anderen in der Studie von FÖTISCH et al. [2001], in welcher bei 9 % eines aus 357 Pollinosepatienten bestehenden Kollektivs IgE-Antikörper gegen Tomaten nachgewiesen werden konnten. Die häufig mit einer Tomatenallergie in Zusammenhang gebrachten inhalativen Allergene sind Gräser-, Birken- und Beifußpollen [VIETHS et al. 1996c, DE MARTINO et al. 1988, HANNUKSELA & LATHI 1977, FÖTISCH et al. 2001]. Daneben scheinen die Tomatenallergene ebenfalls eine wichtige Rolle beim „Latex-Frucht-Syndrom“ zu spielen [HELBING 1997, RECHE et al. 2001]. Abb 1-5 gibt einen Überblick über bisher bekannte Kreuzreaktivitäten der Tomate mit inhalativen Allergenen und anderen Lebensmitteln.

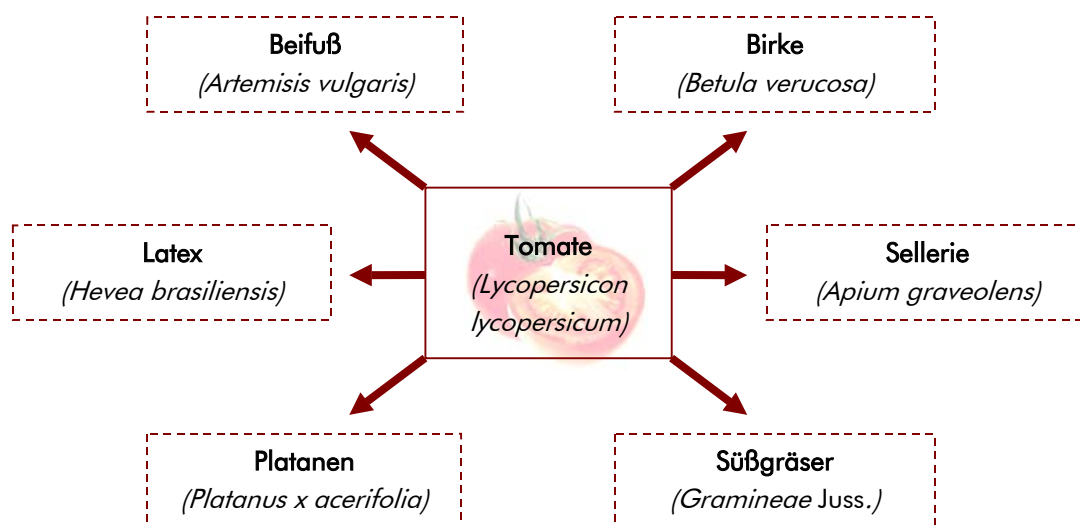


Abb. 1-5: ZUr Tomate bekannte Kreuzreaktivitäten

Bereits 1966 wurden von BLEUMINK et al. erste Fraktionierungsversuche der Allergene aus reifen Tomaten durchgeführt. Mittels einer DEAE (o-2-Diethylaminoethyl)-Sephadex-Säule konnte eine Fraktion isoliert werden, in welcher der Großteil der Allergenaktivität - ermittelt durch Hauttestungen - enthalten zu sein schien. Die Analyse dieser Fraktion ergab, daß sie aus Glycoproteinen mit MG zwischen 20 und 30 kDa bestand; eine weitere Reinigung erfolgte allerdings nicht. In einer anschließenden Studie stellte die gleiche Arbeitsgruppe fest, dass während der Reifung eine Allergenitätszunahme zu verzeichnen ist. Dies wurde mit der Bildung des allergenen Glykoproteins durch eine nichtenzymatische Bräunung (Maillard-Reaktion) zwischen Protein und reduzierenden Zuckern begründet [BLEUMINK et al. 1967]. Diese reifungsabhängige Zunahme des allergenen Potentials konnte in späteren Studien von YUNGINGER [1991] sowie KONDO et al. [2001] bestätigt werden. Über die Charakterisierung sowie Identifizierung der einzelnen IgE-bundenen Tomatenallergene finden sich in der Literatur wenige Studien. PETERSEN et al. [1996] gelang die Identifizierung eines Allergens mit einem MG von 16 kDa als Profilin, welches von FUCHS et al. [2002] als Lyc e 1 beschrieben wurde. In der Studie von FÖTISCH et al. [2001] wiesen 44 % der gegen Tomaten sensibilisierten Individuen IgE-Antikörper gegenüber diesen Allergenen auf. Unter Verwendung der zweidimensionalen Elektrophorese beschrieben PETERSEN et al. weitere Allergene mit MG

zwischen 25 und 50 kDa und dazugehörigen isoelektrischen Punkten (pI) von 5.2 bis 9.6. Ein besonders intensiv anfärbbares Protein mit einem MG von 52 kDa und einem pI von 5.3 wurde mittels N-terminaler Sequenzierung als β -Fructofuranosidase (β -FF) identifiziert. In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, daß es sich bei diesem Allergen um ein Glykoprotein handelt, wobei seine IgE-Reaktivität auf CCDs zurückzuführen ist [FÖTISCH et al. 2001]. Im Widerspruch zu PETERSEN et al. [1996] charakterisierten FÖTISCH et al. [2001] die β -FF mit einem MG von 50 kDa und einem pI-Bereich von 4.0 - 4.5, wohingegen KONDO et al. [2001] ein MG von 25 kDa angibt. In den beiden letztgenannten Studien wurden zudem jeweils eine Polygalacturonase 2A (PG 2A) mittels N-terminaler Sequenzierung identifiziert [KONDO et al. 2001, FÖTISCH et al. 2001]. Auch hier treten Diskrepanzen hinsichtlich der Charakterisierung der identifizierten Allergene auf. So gaben FÖTISCH et al. [2001] für die PG 2A sowie für die Pektinesterase ein MG von 36 kDa an, wohingegen KONDO et al. [2001] das MG der PG 2A mit 46 kDa und das der Pektinesterase mit 14 kDa angeben. Des weiteren wurde von KONDO et al. [2001] noch ein zusätzliches Allergen mit einem MG von 18 kDa als Superoxidismutase identifiziert. Die Identifizierung der genannten Allergene erfolgte ausschließlich über die N-terminale Sequenzierung ohne eine vorangehende Isolierung.

Als weiteres potentiell Tomatenallergen, welches vor allem bei der Bevölkerung der Mittelmeerregion von Bedeutung ist, werden die LTP angesehen. Darüber hinaus bestehen Erkenntnisse, die das Vorkommen eines zum Latexallergen Hev b 7 homologen Patatins [RECHE et al. 2001] sowie einer Hev b 11 homologen Chitinase [DIAZ-PERALES et al. 1999] vermuten. Die Relevanz dieser vermeintlich homologen Tomatenallergene bezüglich der Sensibilisierung sowie der klinischen Symptomatik sind bisher noch nicht verifiziert worden.

Obwohl das Profilin von FUCHS et al. [2002] bereits als Lyc e 1 bezeichnet worden ist, ist in der offiziellen Allergen-Datenbank der WHO bislang noch keine Benennung von Tomatenallergenen vorgenommen worden.

2 Material

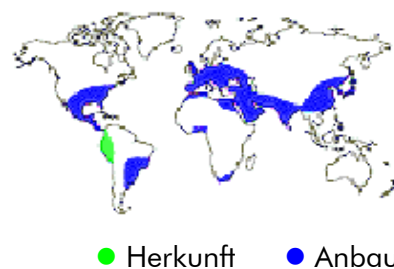
2.1 Patientenseren

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Blutseren resultieren aus einer Kooperation mit der Hautklinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf und stammen von Patienten mit einer Typ-I-Reaktion bzw. Sensibilisierung gegen Tomate. Ein Teil der rekrutierten Probanden leiden zudem unter einer nachgewiesenen Birkenpollenallergie mit ausgeprägter Pollinose bzw. einer Latexallergie. Nach erfolgter Dokumentation der Anamnesedaten schloß sich die Bestimmung der Gehalte an freiem, allergenspezifischen IgE in den Humanseren mittels EAST (siehe Anhang 7.4.2) an. Alle für die allergologischen Untersuchungen verwendeten Seren von Allergikern weisen eine EAST-Klasse ≥ 2 (Klasseneinteilung siehe Anhang Tab. 7-3) auf; zur Kontrolle wurde das Serum zweier nicht atopischer Individuen (EAST-Klasse = 0) eingesetzt. Eine detaillierte Auflistung der eingesetzten Humanseren findet sich in Kapitel 7.19.

Um ein möglichst breites Allergenspektrum in den allergologischen Untersuchungen abdecken zu können, wurde aus aliquoten Teilen geeigneter Patientenseren ein Pool erstellt, dessen Zusammensetzung im Anhang in Tabelle 7-9 aufgeführt ist.

2.2 Tomate (*Lycopersicon lycopersicum* (L.) Karst. ex Farw.)

Die in dem Andengebiet Perus beheimatete Tomatenpflanze gehört zur botanischen Familie der *Solanaceae* (Nachtschattengewächse). Nach der Entdeckung Amerikas gelangte sie vorerst als Zierpflanze nach Europa und rückte erst nach 1920 zur Weltwirtschaftspflanze auf. Der weltweite jährliche Verzehr dieser Frucht beläuft sich auf 460 000 t. Die Hauptanbauggebiete befinden sich in den USA, China, Türkei, Russland, Italien und Indien. Siehe dazu Abb. 2-1.



● Herkunft ● Anbau

Abb. 2-1: Herkunft & Anbauggebiete der Tomate

Die einjährige strauchartige Pflanze erzeugt einen bis zu 1.5 m hohen, sympodial verzweigten Sproß, der mit großen, unterbrochenen gefiederten Blättern besetzt ist. Die oberständigen Fruchtknoten der gelben Blüten gehen aus 2 - züchtungsbedingt z.T. auch 3-4 - miteinander verwachsenen Fruchtblättern hervor. Dabei entstehen zentral an den bis zur Mitte eingeschlagenen Fruchtblättern die markreichen Plazenten, an denen zahlreiche Samen ansitzen (siehe Abb. 2-2). Ihre Samenschalen weisen zunächst ein stark verschleimendes Zylinderepithel auf, das zusammen mit der ebenso verschleimenden Plazenta die saftige Gallerte (Pulpa) um die Samen herum erzeugt. Das festere Fruchtfleisch (Perikarp) verfärbt sich während der Reifung durch Carotinoide, unter denen das Lycopin überwiegt, von grün nach rot, rosa, orange oder gelb. Die Tomate ist aus dem einheimischen Anbau in der Zeit von etwa Mai bis Oktober erhältlich; als Importware ganzjährig.

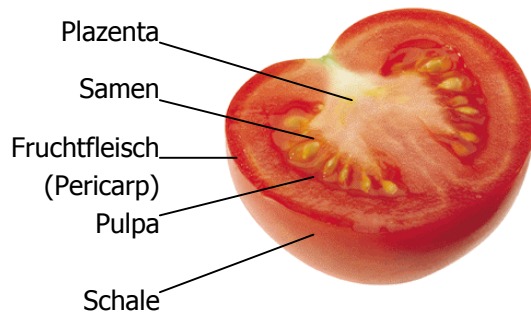


Abb. 2-2: Aufbau einer Tomate

Die Sortenvielfalt der Tomate lässt sich auf ca. 1000 verschiedene Varietäten beziffern, welche bezüglich ihres Phänotyps voneinander divergieren und diesem entsprechend in Gruppen eingeteilt werden können. Entsprechend der Fruchtgröße, welche in erster Linie durch die Anzahl der Fruchtkammern bestimmt wird, erfolgt eine Einteilung in Fleischtomaten mit 5-10 Kammern sowie Flaschentomaten, runde Tomaten, Eiertomaten und den kleinen Kirsch- bzw. Cherrytomaten mit 2-3

Kammern. Die Übergangs- oder Zwischentypen dieser Sorten weisen 3-5 Kammern auf. Neben Größe und Form erfolgt noch eine die Reifung betreffende Einteilung, wonach gleichzeitig reifende Tomaten mit Kelch und Stielen geerntet und dementsprechend als Strauchtomaten bezeichnet werden. Das Gewicht einer Tomate schwankt, je nach Sorte, von wenigen Gramm (Cherrytomaten) bis hin zu einem Kilogramm (Fleischtomaten).

Für die Untersuchungen, insbesondere zur Verifizierung potentiell vorhandener Sortenunterschiede, wurden 10 verschiedene Sorten herangezogen, welche Differenzen bezüglich der Größe, Farbe, Form und Geschmack zeigen. Eine Beschreibung der einzelnen Sorten sowie die an ihnen durchgeführten Untersuchungen sind im Anhang 7.20 in der Tabelle 7-11 aufgeführt.

Der eßbare Anteil der Tomate besteht zu 94,2 % aus Wasser und enthält daneben ca. 1,0 % Protein, 3,0 % Kohlenhydrate und 0,2 % Fett. Der ernährungsphysiologische Wert der Tomate beruht vor allem auf dem Gehalt an Vitamin C (17 mg/100g) und Mineralstoffen (60 mg/100g). Der Geschmack der Tomaten wird im wesentlichen durch ätherische Öle und organische Säuren bestimmt.

2.3 Lectine

Zum Nachweis auf Kohlenhydratstrukturen der Allergene wurden in dieser Studie verschiedene Lectine eingesetzt. Diese Proteine oder Glykoproteine binden spezifisch an definierte Kohlenhydratreste und besitzen keine Enzymaktivität, womit sie von Antikörpern und Enzymen abzugrenzen sind [LINDHORST 2000]. Die zum Nachweis von Zuckern verwendeten Lectine werden im Folgenden kurz beschrieben.

Das bekannteste Lectin Concanavalin A (Con A) mit vielseitigen Bindungseigenschaften stammt aus der Schwertbohne. Für seine Bindungsaktivität benötigt das zu den Metalloproteinen gehörige Con A Calcium und Magnesiumionen. Seine größte Bindungsaffinität weist Con A gegenüber α -D-Mannose auf, während es aber auch α -D-Glucose zu binden vermag.

Eines von zwei Lectinen aus dem wässrigen Extrakt der Ricinusbohne ist das *Ricinus communis* Agglutinin (RCA). Das toxische RCA bindet generell Glykane mit terminalen Galactosen, zeigt daneben aber auch eine geringe Bindungsaffinität zur Lactose.

Aus dem Samen des Weizens wird das kohlenhydratfreie und chitinbindende Lectin Wheat Germ Agglutinin (WGA) gewonnen. Seine beiden Bindungsstellen weisen eine spezifische Affinität zu β -N-Acetylglucosaminen auf.

Das aus der Erdnuss gewonnene Peanut Agglutinin (PNA) erkennt das Disaccharid Galactose $\beta(1-3)$ N-Acetyl-Galactosamin und eignet sich somit zur Identifizierung von O-glycosidisch gebundenen Kohlenhydratketten.

2.4 Enzyme

Für die Untersuchung der Stabilität der Tomatenallergene gegenüber der Verdauung wurde eine Simulation des Gastrointestinaltraktes unter Verwendung der im folgenden beschriebenen Enzyme durchgeführt.

Zur Studie der Verdauungsvorgänge im Magen wurde Pepsin [EC 3.4.23.1] aus der Schweinemagenschleimhaut mit einer Aktivität von 452 Units/mg (gemessen am Substrat Hämoglobin) eingesetzt. Pepsin gehört zu der Gruppe der Endopeptidasen und wird im sauren Milieu aus der inaktiven Vorstufe Pepsinogen gebildet. Basierend auf dem Substrat zeigt das aktive Pepsin (MG: 34.5 kDa) ein pH-Optimum im Bereich von pH 1.5 - 2 und bleibt bis pH 6 stabil. Die Spaltung durch Pepsin erfolgt relativ unspezifisch, wobei die Peptidbindungen des Carboxylendes von Phenylalanin, Leucin, Methionin oder Tryptophan bevorzugt werden.

Die Simulation der Proteinverdauung im Intestinaltrakt erfolgte unter Verwendung von Trypsin und Proteinase K sowie dem Enzymgemisch Pankreatin, bestehend aus Trypsin, Chymotrypsin, Elastase, Amylasen und Lipasen. Diese Untersuchungen schlossen sich direkt an die simulierte Magenverdauung an.

Das aus dem Rinderpankreatin gewonnene Trypsin [EC 3.4.21.4] weist eine Aktivität von 10900 Units/mg sowie ein pH-Optimum von pH 7.6 auf. Das Trypsin mit einem MG von 23.3 kDa wird im Darm in Gegenwart von Calcium aus der inaktiven Vorstufe, dem Trypsinogen, gebildet. Die Spaltung von Peptidbindungen durch Trypsin erfolgt relativ spezifisch am Carboxylende der basischen Aminosäuren Lysin und Arginin.

Um mögliche Einflüsse der Dickdarmflora berücksichtigen zu können, wurde zudem die Proteinase K [EC 3.4.21.64] aus dem Pilz *Tritirachium album* mit einer Aktivität von 37 Units/mg verwendet (gemessen am Substrat Casein). Die verwendete Endopeptidase hydrolysiert bevorzugt Peptidbindungen am Carboxylende von hydrophoben, N-substituierten Aminosäuren bei einem pH-Optimum zwischen pH 7.0 - 8.0.

Das Enzymgemisch Pankreatin entstammt dem Schweinpankreas und besitzt eine dem vierfachen der USP-Spezifikation entsprechende Aktivität. Eine USP-Spezifikation ist definiert als die Verdauung des 25-fachen des Enzymeigengewichtes innerhalb von 60 min bei einem pH von 7.5, gemessen am Substrat Casein.

3 Methoden

3.1 Methodenübersicht

Für die Realisierung der gesetzten Ziele dieser Arbeit wurden verschiedene immunologische und chemische Methoden eingesetzt. In Abb. 3-1 sind alle genutzten Methoden zusammengefaßt und in Rubriken eingeteilt dargestellt, wobei nicht der Anspruch erhoben wird, die Zusammenhänge der Methoden untereinander zu repräsentieren. Die folgenden Kapitel liefern eine kurze Erläuterung der Prinzipien der einzelnen Methoden und der vorgenommenen Modifikationen.

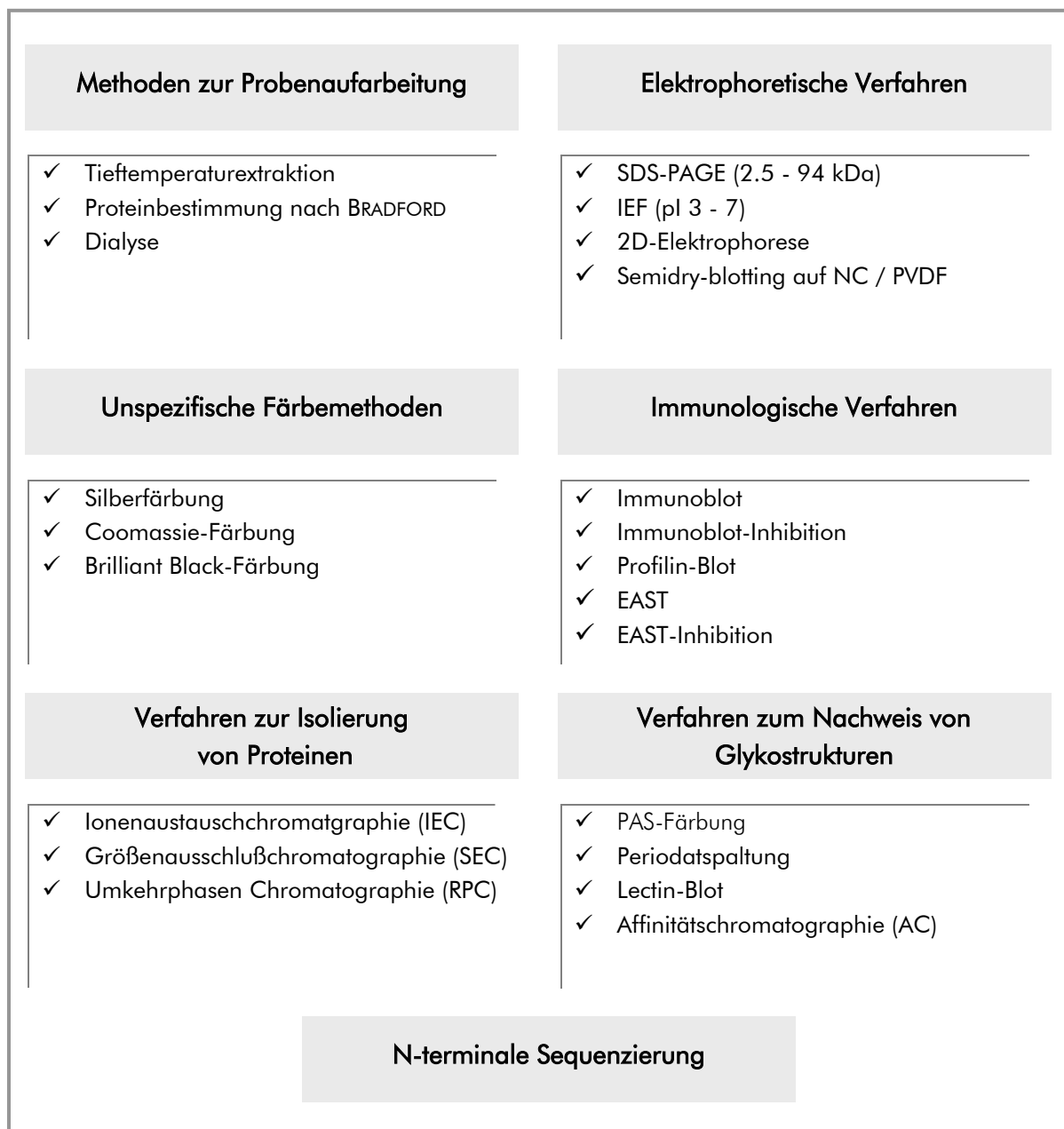


Abb. 3-1: Übersicht über die angewandten Methoden

3.2 Proteinextraktion

Die Basis für Untersuchungen von Lebensmittelallergenen wird von der Reproduzierbarkeit und der qualitativen Zusammensetzung der verwendeten Allergenextrakte gebildet [AAS et al. 1978]. Gerade die Extraktion der allergenen Substanzen aus pflanzlichen Lebensmitteln gestaltet sich aufgrund des niedrigen Gehaltes an Proteinen und des zudem relativ hohen Gehaltes an phenolischen Verbindungen problematisch [LOOMIS 1974]. Die kommerziell erhältlichen Extrakte erleiden aufgrund der industriell angewandten Extraktion von zerkleinertem Gewebe mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) bei 4 °C oftmals einen Allergenitätsverlust. Dieser kann durch die Freisetzung von Pflanzenphenolen erklärt werden, die durch Phenoxidasen unter Sauerstoffeinwirkung zu Chinonen oxidieren und unter Ausbildung kovalenter Bindungen mit den Proteinen reagieren [MCEVILY et al. 1992, VIETHS et al. 1992a, VIELUF et al. 1997].

Durch die von CLEMENTS [1965] entwickelte und von VIETHS et al. 1992b] modifizierte Tieftemperaturextraktion wird diese Problematik berücksichtigt. Die Frucht wird bei einer Temperatur von -40°C mit Aceton homogenisiert, filtriert und der gewaschene Rückstand wird lyophilisiert. Dadurch werden die in Aceton löslichen störenden phenolischen Begleitstoffe abgetrennt und die Enzymaktivität der Polyphenoxidasen stark herabgesetzt. Gemäß der im Anhang 7.2 geschilderten Durchführung werden die Proteine aus dem Lyophilisat (Acetonpulver) mit PBS extrahiert.

Im Rahmen der in-vitro-Untersuchungen erfolgte eine verkürzte Form der Proteinextraktion. Die mit den jeweiligen Enzymen behandelten Tomatenfrüchte wurden lediglich einer Zentrifugation unterzogen, anschließend filtriert und lyophilisiert. Für die elektrophoretischen Untersuchungen erfolgte eine Rekonstitution der Extrakte mit dest. Wasser.

3.3 Bestimmung des Proteingehaltes

Die Quantifizierung des Proteingehaltes der Extrakte erfolgt unter Verwendung des Farbstoffes Commassie Brilliant Blue G 250 nach der Methode von BRADFORD [1976]. Die Reaktion beruht auf der Bildung eines blauen Protein-Farbstoffkomplexes, welcher durch die Anlagerung negativ geladener Farbstoffmoleküle an die Aminogruppen der Proteine induziert wird und bei 540 nm photometrisch vermessen wird. Bereits 2 Minuten nach Reagenzienzugabe ist der entstandene Farbstoff stabil [READ & NORTHCOTE 1981]. Da diese Methode nicht durch matrixbedingte Begleitstoffe gestört wird, sind keine gesonderten Aufarbeitungsschritte nötig. Die Quantifizierung erfolgt über eine Kalibriergerade mit Rinderserumalbumin (BSA) als Referenzprotein. Angesichts der unterschiedlichen Responsefaktoren verschiedener Proteine gewährleistet diese Methode keine absolute Quantifizierung, so daß die Proteingehalte nur relativ zueinander bestimmt werden können (Durchführung siehe Anhang 7.3).

3.4 Enzymallergosorbent-Test (EAST)

Der EAST gehört zu den wichtigsten in-vitro-Untersuchungsmethoden bei der Diagnostik von Lebensmittelallergenen. Diese enzymimmunologische Variante des Radioallergosorbent-Tests (RAST) dient der Messung des freien, allergenspezifischen IgE im Blutserum. Das Prinzip des EAST, dargestellt in Abb. 3-2, beruht auf zwei hochspezifischen Reaktionsschritten.

Der erste Schritt besteht aus der Kopplung der entsprechenden Allergene an eine als Festphase dienende bromcyanaktivierte Cellulosescheibe nach CESKA & LUNDKVIST [1972]. Im Laufe der daran anschließenden Inkubation mit dem Patientenserum binden die IgE-Antikörper des Serums an die festphasengekoppelten Allergene. Spezifische mit alkalischer Phosphatase (AP) gelabelte Anti-IgE-Antikörper markieren die an die Scheiben gebundenen Antikörper. Die AP ermöglicht nun die Umsetzung des farblosen Substrates p-Nitrophenylphosphat zu gelbem p-Nitrophenolat, welches bei 405 nm photometrisch detektiert wird. Die Durchführung ist in Anhang 7.4 beschrieben.

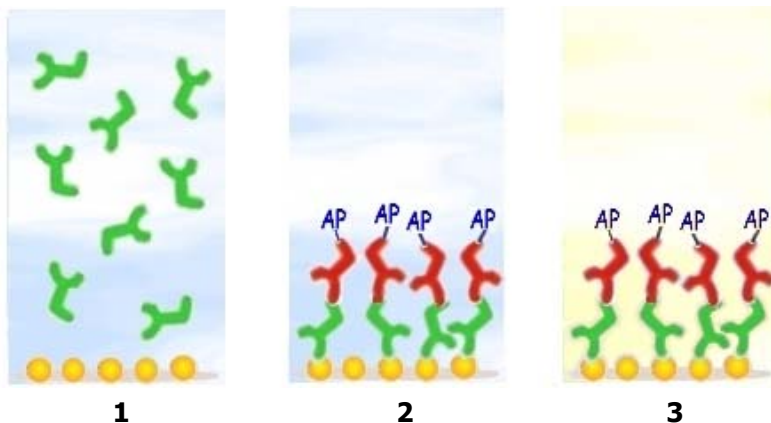


Abb. 3-2: Prinzip des EAST

An eine Cellulosescheibe gekoppelte Allergene werden mit Patientenserum inkubiert (1), wobei die Allergene eine spezifische Bindung mit den IgE-Antikörpern des Serums eingehen. Daran schließt sich eine Markierung der Antikörper durch mit alkalischer Phosphatase (AP) gelabelten Anti-IgE an (2). Über eine enzymatische Reaktion der AP mit p-Nitrophenylphosphat erfolgt die Bildung des gelbgefärbten Nitrophenolat, welches photometrisch detektiert wird (3).

Über Referenzseren mit bekanntem IgE-Gehalt gegen Lieschgras und entsprechende Allergenscheiben erfolgt die Einteilung der Patientenserum entsprechend ihres IgE-Gehaltes in eine der fünf EAST-Klassen. Die Klassengrenze wird dabei jeweils von einem der vier Referenzseren mit den IgE-Gehalten 0.35 U/mL (Klasse 1), 0.7 U/mL (Klasse 2), 3.5 U/mL (Klasse 3) und 17.5 U/mL (Klasse 4) gebildet, dabei entspricht 1 U ca. 2.4 ng IgE.

3.5 EAST-Inhibition

Die zu den kompetitiven Hemmtests gehörige EAST-Inhibition gestattet den Nachweis eventueller Kreuzreaktivitäten und bietet zudem die Möglichkeit der relativen Quantifizierung des allergenen Potentials der eingesetzten Extrakte. Das Prinzip dieser Variation des EAST beruht auf der der eigentlichen Messung vorangestellten Inkubation des Patientenserums mit dem zu untersuchenden Extrakt, der Inhibitorlösung [VIETHS et al. 1993a, MÖLLER et al. 1997a]. Um ein möglichst weites Spektrum von Allergenen abdecken zu können wurde als Serum ein Pool aus verschiedenen Einzelseren verwendet. Als Inhibitor dienten innerhalb dieser Arbeit neben den verschiedenen Fruchtexttrakten zur Untersuchung der Kreuzreaktivitäten auch die Extrakte der unterschiedlichen Varietäten, der Fruchtfragmente sowie die der in-vitro Verdauung.

Die Methode beruht auf der Konkurrenzreaktion zwischen den festphasengebundenen Allergenen der nativen Frucht und den in Lösung befindlichen potentiellen Allergenen um das spezifische IgE des Patientenserums. Je größer die IgE-Bindungskapazität des Inhibitors ist, desto stärker erfährt das Meßsignal eine Verminderung. Zur Bestimmung der maximal erreichbaren Inhibition und der 50 %igen Verminderung des Signals (C_{50} -Wert) wird eine Verdünnungsreihe des Inhibitors eingesetzt. Der C_{50} -Wert ermöglicht dabei den direkten Vergleich des allergenen Potentials verschiedener Extrakte untereinander. Als Bezugsgröße für den Vergleich der C_{50} -Werte sowie zur Überprüfung der korrekten Testdurchführung wird die homologe Inhibition durchgeführt, bei welcher der Inhibitor den nativen festphasengebundenen Extrakten gleicht und zu einer maximalen Reduktion des Meßsignals führt. Die Auswertung der EAST-Inhibition erfolgt anhand der graphisch dargestellten Inhibitionskurven, welche aus der Abhängigkeit der prozentualen Inhibition von der logarithmisch aufgetragenen Proteinkonzentration der Inhibitorextrakte resultieren (Zur Durchführung siehe Anhang 7.5).

3.6 Elektrophorese

Die Elektrophorese stellt eine etablierte Methode zur Auftrennung von Proteinen dar und basiert auf der Wanderung geladener Moleküle in einem Gleichstromfeld. Die Trennung der Moleküle erfolgt aufgrund unterschiedlicher Ladungen und/oder Massen, wobei die Trennschärfe durch die Wanderungsgeschwindigkeit, der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und dem Trägermaterial beeinflusst wird.

3.6.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung bei der SDS-PAGE erfolgt nach dem MG der Moleküle. Durch eine Beladung mit dem anionischen Detergenz SDS entstehen, mit Ausnahme der Glykoproteine, SDS-Protein-Micellen mit identischem Masse-/Ladungsverhältnis [GUTTMAN 1996]. Eine anschließende Spaltung der Disulfidbrücken unter Verwendung von 2-Mercaptoethanol bewirkt eine Destruktion der Sekundär- und Tertiärstruktur und führt nach Auffaltung zu einer einheitlichen Micellenstruktur. Die Trennung erfolgt in restriktiven Gelen, wodurch basierend auf der geringen Porengröße die Wanderung größerer Micellen stärker als die der kleineren Micellen behindert wird. Daraus resultiert eine zum MG proportionale Wanderungsgeschwindigkeit der Proteinmicellen. Über den Vergleich mit einem Standardgemisch aus Proteinen mit definiertem MG, dem sogenannten Marker, erfolgt eine Abschätzung des MG. Das Trennmedium besteht aus Polyacrylamid-Gelen, welche durch die Copolymerisation von Acrylamid-Monomeren mit dem als Vernetzer fungierenden N,N'-Methylenbisacrylamid hergestellt werden. Sie zeichnen sich durch eine hohe mechanische und chemische Stabilität aus. Die für die Trennleistung eines Gels verantwortliche Porengröße kann bei diesem Polymer über die Totalamidkonzentration und den Vernetzungsgrad reproduzierbar eingestellt werden.

Für die vorliegende Arbeit fanden drei unterschiedliche Systeme zur Auftrennung der Proteine Anwendung. Alle Systeme beruhen ausschließlich auf den kommerziell erhältlichen Fertiggelelen vom Typ Novex® NuPage der Firma Invitrogen™ (Groningen, Niederlande).

Um eine Trennung im MG-Bereich zwischen 14 und 94 kDa zu gewährleisten, wurde ein Bis-Tris-HCl gepuffertes Polyacrylamid-Gel mit einer Totalamidkonzentration von 10 % mit einem

2-(N-morpholino)ethansulfonsäure (MES)-SDS-Elektrodenpuffer verwendet. Diese Systemzusammenstellung ermöglicht eine kontinuierliche Auftrennung über den gesamten MG-Bereich. Um eine sehr gute Trennleistung der Proteine im MG-Bereich zwischen 20 und 60 kDa zu erzielen, wird anstatt des MES-SDS-Puffers ein 3-(N-morpholino)propansulfonsäure (MOPS)-SDS-Puffer verwendet. Das dritte System beruht auf einem Novex® NuPage Gel mit einer Totalamidkonzentration von 12 % unter Verwendung des MES-SDS-Puffers, wodurch eine reproduzierbare Trennung im niedermolekularen Bereich bis 2.5 kDa ermöglicht wird. Die Durchführung aller Varianten der SDS-PAGE mit der Zusammensetzung der jeweils verwendeten Marker ist im Anhang 7.6 aufgeführt.

3.6.2 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Bei der IEF wandern native Moleküle bis zum Erreichen ihres pI in einem pH-Gradientensystem entsprechend ihrer Ladung Richtung Kathode bzw. Anode. Da an dem dem pI entsprechenden pH-Wert die Nettoladung und dementsprechend auch die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im elektrischen Feld gleich Null beträgt, können sie mit dieser Endpunktmethode fokussiert werden. Das IEF-Trennsystem dieser Arbeit bestand aus Novex® Pre-Cast Gelen der Firma Invitrogen™ vom Typ IEF-Gel, pH 3-7 in Verbindung mit einem Kathoden- bzw. Anodenpuffer. Die verwendeten restriktiven Gele erlauben eine Trennung von Proteinen mit pI zwischen 3 und 7, wobei eine Zuordnung der entsprechenden pI über die Verwendung eines definierten pI -Markers erfolgt. Die Durchführung und die Zusammensetzung des pI -Markers ist dem Anhang 7.7 zu entnehmen.

3.6.3 2D-Elektrophorese

Die 2D-Elektrophorese stellt eine Kombination der IEF und der SDS-PAGE dar und basiert auf der Aufeinanderfolge beider Trenntechniken. Im Anschluß an die erste Dimension (IEF), bei welcher die Trennung nach dem pI erfolgt, schließt sich senkrecht dazu die auf der Trennung nach dem MG basierende SDS-PAGE als zweite Dimension an. Entsprechend den Einzeltechniken werden die pI bzw. MG der Proteine anhand von Markerproteinen abgeschätzt. Diese Verbindung der Einzelsysteme ermöglicht eine hohe Auflösung komplexer Proteingemische und gewährleistet dadurch eine Trennung von Isoproteinen (Durchführung siehe Anhang 7.8).

3.7 Semidry-blotting

Unter dem Semidry-blotting nach TOBWIN & GORDON [1984] wird der Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Makromolekülen aus dem Trärgel auf eine immobilisierende Membran verstanden. Zwischen zwei als Elektroden dienenden Graphitplatten werden mit Puffergetränkte Elektrodetücher, das Gel sowie eine Blotmembran platziert. Ein effektiver und gleichmäßiger Transfer der Proteine auf eine NC-Membran wird durch die Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems gewährleistet [KYSE-ANDERSEN 1984, STOTT 1989]. Nach dem Transfer liegen die Proteine bzw. ihre Bindungsstellen für spezifische Reaktionen mit Makromolekülen wie z.B. IgE-Antikörpern frei zugänglich vor. Eine Bindung an die Membran erfolgt wahrscheinlich über hydrophobe Wechselwirkungen, wobei eine Renaturierung der Proteine nach dem Verlust des SDS der Elektrophorese angenommen wird [AALBERSE 2000]. Die Bin-

dungskapazität einer Membran hängt entscheidend von ihrer Porengröße ab, wobei eine Porengröße von $0.2\ \mu\text{m}$ eine Immobilisierung von kleineren Proteinen ermöglicht [HANDMAN & JARVIS 1985] (Durchführung siehe Anhang 7.9.1).

Soll dem Semidry-blotting eine N-terminale Sequenzierung folgen, so wird anstelle einer NC-Membran eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran verwendet, da diese im Gegensatz zur NC-Membran gegenüber den Reagenzien des Edman-Aminosäureabbaus resistent ist. Für den Transfer auf die PVDF-Membran wurde das kontinuierliche Puffersystem nach WARD et al. [1990] verwendet (Durchführung siehe Anhang 7.9.2).

3.7.1 Immunoblot (IB)

Der Immunoblot wird nach STOTT [1989] als Kombination eines Proteintransfers auf eine immobilisierende Membran mit anschließender immunochemischer Detektion zur Differenzierung von allergenen und nicht allergenen Strukturen beschrieben.

Um unspezifische Farbreaktionen durch remanente freie Bindungsstellen der NC-Membran nach erfolgtem Semidry-blotting zu vermeiden, wurden diese zunächst durch Milchproteine abgesättigt [JOHNSON et al. 1984, AHLROTH et al. 1995]. Um die Empfindlichkeit dieses Nachweises zu erhöhen, wurde ein von VIETHS et al. [1992b] entwickeltes Verstärkersystem, welches in Abb. 3-3 veranschaulicht ist, eingesetzt. Das System besteht aus Anti-Human-IgE vom Kaninchen, mehrfach biotinylierten Anti-Kaninchen IgG aus der Ziege und einem Streptavidin-Meerrettichperoxidase (HRP)-Konjugat. Die verstärkende Wirkung resultiert aus der mehrfachen Biotinylierung des IgG, wodurch mehrere Moleküle des Streptavidin-HRP-Konjugates gebunden werden können.

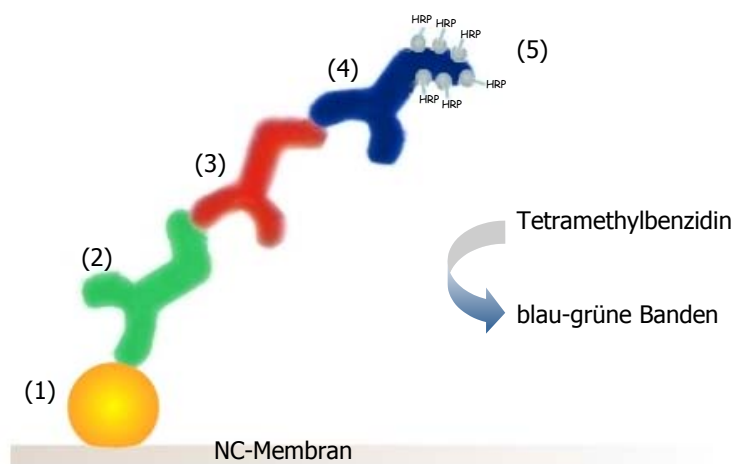


Abb. 3-3: Prinzip des Immunoblot
Die IgE-Antikörper (2) binden an die auf der NC-Membran immobilisierten Allergene (1). Anschließend erfolgt nacheinander eine Inkubation mit Kaninchen Anti-Human-IgE (3) und mehrfach biotinyliertem Anti-Kaninchen-IgG aus der Ziege (4). An das IgG lagern sich mehrere Streptavidin-HRP-Moleküle (5) an, wodurch nach einer enzymatischen Färbereaktion eine blau-grüne Färbung hervorgerufen wird.

Die Visualisierung der immunologisch detektierten Allergene erfolgt über eine enzymatische Farbreaktion in der die farblose Verbindung 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) als Substrat fungiert. In Gegenwart von Dioctylnatriumsulphosuccinat (DONS) und Wasserstoffperoxid entsteht infolge der katalytischen Wirkung der HRP zunächst das blaugefärbte Radikalkation, welches in Gegenwart von Licht zu einem gelbgefärbten Salz weiter oxidiert wird. Selbst unter Lichtausschluß bleibt diese Färbung nur wenige Tage stabil [GALLATI & PRACHT 1985]. Die Durchführung des IB ist im Anhang unter 7.10 aufgeführt.

3.7.2 Immunoblot-Inhibition

Entsprechend der unter 3.5 beschriebenen EAST-Inhibition ermöglicht auch die IB-Inhibition eine Identifizierung kreuzreagierender Allergene [VIETHS et al. 1992b] durch eine der immunochemischen Detektion vorangestellten Inkubation mit den zu prüfenden Proteinextrakten (Inhibitoren). Über die IB-Inhibition können im Gegensatz zur EAST-Inhibition detaillierte Aussagen über die Inhibition einzelner Allergene gemacht werden.

Der potentielle Inhibitorextrakt wird im ersten Schritt mit dem Patientenserum vorinkubiert und anschließend auf den zuvor elektrophoretisch getrennten und auf eine NC-Membran transferierten nativen Extrakt gegeben. Im Verlauf der Vorinkubation binden aktive Allergene des Inhibitorextraktes an das spezifische IgE des Serums, so daß dieses bei der späteren Inkubation der festphasen-gebundenen Allergene nicht mehr zur Verfügung steht, woraus eine Schwächung bzw. Eliminierung der Banden resultiert. Die Methode wird durch den Einsatz einer homologen Inhibition überprüft. Zur Verifizierung unspezifischer Inhibitionen bzw. Bindungen erfolgt zudem eine Kontrolle mit einer Ovalbuminlösung bzw. Patientenserum eines Nicht-Allergikers (Durchführung siehe Anhang 7.11).

3.7.3 Profilin-Blot

Der Nachweis von Profilinen erfolgte nach VIETHS et al. [1994b] unter Verwendung polyklonaler Antikörper aus Kaninchen, welche zuvor gegen Profileine aus Pollen oder Lebensmitteln immunisiert worden sind. Eine solche Nachweisführung ist aufgrund der engen Verwandtschaft und der damit verbundenen starken Homologie in der Struktur von Profilinen unterschiedlicher Herkunft möglich.

Die immunochemische Detektion der Tomatenprofiline erfolgte unter Verwendung eines vom Paul-Ehrlich-Institut (Langen, Deutschland) zur Verfügung gestellten Antikörpers gegen rekombinantes Birnenprofilin Pyr c 4. Für den Nachweis wurden die Allergenextrakte wie beschrieben mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine NC-Membran transferiert. Nach der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen schloß sich die Inkubation mit dem verdünnten Antikörper an. Die weitere Detektion mit biotinyliertem Anti-Kaninchen-IgG und Streptavidin-HRP-Konjugat entspricht der im Kapitel 3.7.1 beschriebenen Methode (Durchführung siehe Anhang 7.12).

3.8 Nachweis von Kohlenhydratanteilen

Der Kohlenhydratanteil der im Pflanzenreich weitverbreiteten Glykoproteine kann bis zu 90 % betragen und ist für die physiologische Funktion der Proteine von enormer Bedeutung [LEISTNER & BRECKLE 1988]. Zu den wichtigsten Kohlenhydraten der Glykoproteine pflanzlicher Herkunft zählen unter anderem D-Galactose, D-Mannose, L-Arabinose, L-Rhamnose sowie L-Fucose [WAFFENSCHMIDT & JAENIKE 1991]. Neben der physiologischen Funktion wird den Kohlenhydraten eine Rolle bei der Auslösung der allergischen Reaktion zugesprochen, da viele Hauptallergene von Pollen und pflanzlichen Lebensmitteln als Glykoproteine identifiziert werden konnten [BREITENEDER et al. 1989, NILSEN et al. 1991]; inwieweit sie jedoch an der Bildung der Epitopstruktur beteiligt sind, ist noch nicht vollständig geklärt. Bislang stehen insbesondere

die $\alpha(1,3)$ -Fucose und $\beta(1,2)$ -Xylose im Verdacht, für die IgE Bindung verantwortlich zu sein [GARCIA-CASADO et al. 1996, WILSON & ALTMANN 1998].

Zum Nachweis von Kohlenhydraten wurden vier, auf zwei unterschiedliche Prinzipien basierende Verfahren, die dem Nachweis von Glykostrukturen dienen, angewendet. Sie werden in den folgenden Abschnitten kurz erläutert.

3.8.1 Nachweis mittels Periodatspaltung

Unter Einwirkung von Periodat werden die vicinalen Hydroxylgruppen der Kohlenhydrate oxidativ unter Bildung von Formaldehyd und Ameisensäure gespalten.

Zur einfachen Visualisierung der Glykoproteine wird eine Farbreaktion zwischen den nach einer Spaltung mittels Periodat entstehenden Aldehyden und dem Schiff'schen Reagenz (Fuchsin, Schwefelsäure) angewendet. Die Glykoproteine werden bei der sogenannten Periodsäure-Schiff'sche (PAS)-Färbung nach erfolgter elektrophoretischer Trennung im Gel angefärbt und erscheinen als violettrote Banden (Durchführung siehe Anhang 7.15.1).

Um den Einfluß der Kohlenhydrate auf die IgE-Bindungsfähigkeit zu untersuchen, wurde der elektrophoretisch getrennte und auf NC-Membran geblottete Extrakt mit einer Periodatlösung inkubiert. Durch Zugabe einer Sorbitlösung wurde das überschüssige Periodat entfernt und die Membran mit dem Patientenserum inkubiert. Daran schloß sich die immunochemische Detektion nach 3.7.1 an, bei der - sollte die Kohlenhydratstruktur am Epitopaufbau beteiligt sein - eine Schwächung bzw. Eliminierung der allergenen Bande eintritt. Eine Kontrolle der Methode erfolgte durch eine parallel verlaufende Inkubation mit deaktivierter Periodatlösung [VIETHS et al. 1995a]. Allerdings ist dieser Nachweis lediglich als Hinweis auf eine Epitopbeteiligung von Kohlenhydraten zu werten, da neben den Hydroxylgruppen auch empfindliche Aminosäuren bzw. Aminosäureester von einer Oxidation betroffen sein können. Sollten diese an dem Aufbau des Epitops beteiligt sein, so ist auch hier eine Schwächung oder Eliminierung der Banden zu erwarten (Durchführung siehe Anhang 7.15.2).

3.8.2 Nachweis mittels Lectinen

Auch beim Nachweis der Glykoproteine mittels Lectinen wurden zwei unterschiedliche Methoden angewandt. Die erste Methode, der sogenannte Lectinblot, beruht auf der Charakterisierung des Gesamtextraktes nach elektrophoretischer Trennung und anschließendem Transfer auf eine NC-Membran, wohingegen die zweite Methode auf einer vorangestellten Isolierung der durch die entsprechenden Lektine gebundenen Glykoproteine mittels AC basiert. Diese Methoden dienen lediglich der Identifizierung von Glykoproteinen und lassen keine Rückschlüsse auf eine Beteiligung der Kohlenhydrate an der Epitopstruktur zu.

Im Lectinblot erfolgte die spezifische Detektion über den Einsatz von biotinylierten Lectinen, welche anschließend - analog dem Immunoblot - unter Verwendung des Streptavidin-HRP-Konjugates visualisiert wurden. Es wurden die Lektine Con A, PNA und RCA zur spezifischen Detektion von Kohlenhydratstrukturen verwendet (Durchführung siehe Anhang 7.15.3).

In Zusammenarbeit mit dem GKSS-Forschungszentrum Geesthacht wurde zum Nachweis von Glykoproteinen eine dort entwickelte Lectin-Affinitätschromatographie durchgeführt. Das Prinzip der AC beruht auf der spezifischen, reversiblen Adsorption eines Moleküls an einen affinen, auf dem Säulenmaterial immobilisierten Bindungspartner. Die Desorption der zu isolierenden Substanz erfolgt entweder spezifisch durch einen Überschuß an konkurrierenden Liganden oder unspezifisch durch deformierende Bedingungen wie z.B. pH-Wert oder Ionenstärke. Zur spezifischen Isolierung der Glykoproteine aus dem Tomatenextrakt fungierten die Lectine Con A, RCA und WGA als immobilisierte Bindungspartner. Die Desorption der Glykoproteine wurde über einen individuellen Elutionspuffer spezifisch herbeigeführt. Die genauen Chromatographiebedingungen sind im Anhang 7.15.4 beschrieben.

3.9 Unspezifische Färbungen

Zur Visualisierung des Gesamtproteinmusters der elektrophoretisch getrennten Proteine im Acrylamidgel sowie auf Membranen wurden die nachstehenden Methoden angewandt.

Die **Silberfärbung** nach HEUCKESHOVEN & DERNICK [1986] basiert auf der Reduktion von Silberionen zu elementarem Silber und zählt mit einer Nachweisgrenze von 0.05 bis 0.1 ng/mm² zu den empfindlichsten unspezifischen Färbemethoden. Aufgrund des höheren Normalpotentials der proteingebundenen Silberionen im Vergleich zu den gelixierten läuft eine bevorzugte Reduktion der proteinassoziierten Ionen ab. Die Visualisierung der Proteine ist mit dem Farm'schen Abschwächer zwar aufzuheben; die Proteine können anschließend jedoch nur erneut unspezifisch detektiert werden und sie sind für weitere Untersuchungen nicht verfügbar. Im Gegensatz dazu steht die **Commassie-Brilliant-Blue (CBB) Färbung**, welche mit einer Nachweisgrenze von 30 ng/mm² zwar wesentlich unempfindlicher ist, dafür jedoch eine reversible Detektionsmethode darstellt. Eine Entfärbung der durch Anlagerung des Farbstoffes Commassie-Brilliant-Blue G 250 visualisierten Proteine ist ohne Schädigung derselben möglich. Neben der Detektion von Proteinen in der Gelmatrix kann diese Methode ebenso zur Visualisierung auf Membranen genutzt werden. Neben der CBB wird zur Proteindetektion auf NC-Membranen die nach HANCOCK & TSANG [1983] modifizierte **Brilliant Black-Färbung** verwendet. Sie basiert ebenso wie die CBB Färbung auf der Anlagerung eines Farbstoffes, bietet aber im Vergleich zur CBB eine sehr schwache Hintergrundfärbung und damit eine erhöhte Sensitivität. Die Durchführungen der jeweiligen Färbemethoden sind im Anhang 7.13 & 7.14 aufgeführt.

3.10 Verfahren zur Allergenisolierung

Für die Isolierung von Proteinen steht in der Literatur eine Auswahl an bereits etablierten chromatographischen bzw. elektrophoretischen Methoden zur Verfügung. Zu den wichtigsten chromatographischen Verfahren zählen die Ionenaustausch-, Größenausschluß-, Affinitäts- und Umkehrphasenchromatographie, die je nach Trennproblem zum Einsatz kommen. Die bedeutendste elektrophoretische Methode zur Isolierung von Proteinen stellt die Elektroelution dar. Die bisherigen Erfahrungen auf dem Gebiet der Allergenisolierung aus pflanzlichen Lebensmitteln zeigen jedoch, daß oftmals nur durch eine sinnvolle Kombination der verschiedenen Trennmethoden ein Erfolg erzielt werden kann.

3.10.1 Ionenaustauschchromatographie (IEC)

Die IEC gehört aufgrund ihrer milden Trennbedingungen, welche eine Aufrechterhaltung der biologischen Aktivität gewährleisten, zu den bedeutendsten Techniken zur Fraktionierung von Proteinen und Peptiden [MALMQUIST & LUNDELL 1992]. Ihr Prinzip beruht auf der reversiblen Adsorption geladener Moleküle an immobilisierten Gruppen mit entgegengesetzter Ladung.

Zur Trennung der Proteine wurde für die Anionenaustauschersäule das Material SourceTM 15 Q der Firma Amersham pharmacia biotech (Uppsala, Schweden) verwandt. Dieses Ionenaustauscherharz aus Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymeren und quarternären Ammoniumgruppen als Festionen ist durch eine hohe Kapazität gekennzeichnet und somit für eine Probenaufreinigung in größerem, präparativem Maßstab gut geeignet [PHILLIPS et al. 1992]. Bei der IEC ist allerdings auf einen geringen Salzgehalt der aufzugebenden Proben zu achten, da ansonsten die Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Ionenaustauscherharz vermindert werden können.

Die für die Isolierung verwendeten Tomatenextrakte wurden, um eine unnötige Salzbelastung zu vermeiden, mit dem Elutionspuffer I (0.02 M Tris-HCL-Puffer) aus dem Acetonpulver extrahiert. Die Durchführung der Elution der Proteine von der Säule erfolgte in Anlehnung BALESTRIERI et al. [1990] und SEPPÄLÄ et al. [1999] mit einem 0.02 M Tris-HCL-Puffer bei konstantem pH-Wert unter Verwendung eines NaCl-Gradienten mit einer UV-photometrischen Detektion bei 214 nm. Die detaillierten Trennbedingungen sind Anhang 7.16.1 zu entnehmen.

3.10.2 Größenausschlußchromatographie (SEC)

Das Trennprinzip der SEC basiert auf der Molekülgröße der zu trennenden Substanzen. Die stationäre Phase besteht aus Perlen mit gequollenem Netzwerk, dessen Permeabilität über mehrere Größenordnungen variiert. Basierend auf dem sterischen Ausschlußprinzip werden die gelösten Substanzen nach abnehmender Molekularmasse eluiert.

Das verwendete Säulenmaterial Sephacryl S 100 der Firma Amersham pharmacia biotech (Uppsala, Schweden), ein Mischpolymer aus N,N-Methylenbisacrylamid und Allyldextran, ist für eine Trennung von Peptiden und Proteinen mit MG von ca. 1 bis 100 kDa geeignet. In Anlehnung an MÖLLER et al. [1997b] wurde zur Elution ein 0.01 M Phosphatpuffer mit 0.03 M NaCl eingesetzt und bei 214 nm UV-photometrisch detektiert. Ein gewisser Salzgehalt im Elutionspuffer ist zur erwünschten Unterdrückung der Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Säulenmaterial nötig. Die genauen Trennbedingungen sind in Anhang 7.16.2 dokumentiert.

3.10.3 Umkehrphasenchromatographie (RPC)

Die RPC beruht auf der Bindung der in der mobilen Phase gelösten Probe an immobilisiertes n-Alkylkohlenwasserstoffen oder aromatischen Liganden über hydrophobe Interaktionen. Die RPC ist für Moleküle mit einem hydrophoben Charakter, wie Proteine und Peptide von einer sehr guten Trennleistung und Wiederfindung geprägt und ermöglicht daher eine sehr gute Trennung für Moleküle mit nur leichten Strukturunterschieden. Allerdings eignet sich die RPC

nicht als erster Schritt einer Trennung, da viele Begleitstoffe der Matrix aufgrund ihres hydrophoben Charakters die Trennleistung der Säule herabsetzen.

Als Säulenmaterial für die RPC wurde Source™ 15RPC der Firma Amersham pharmacia biotech (Uppsala, Schweden), welches aus einer Polystyren/Divinylbenzen-Basis besteht, verwandt. Die Elution der Proteine wurde mit einem linearen Gradienten mit steigender Acetonitrilkonzentration in 0.1 % Trifluoressigsäure (TFA) erreicht. Die Chromatographiebedingungen sind dem Anhang 7.16.3 zu entnehmen.

3.11 Entsalzung über Dialyse

Die Entsalzung der Retentate der chromatographischen Trennungen wurde mittels Slide-A-Lyzer® Dialyse-Kammern mit einer Ausschlußmembran von 10 kDa gemäß den Angaben des Herstellers (Pierce, Rockford, USA) durchgeführt. Im Gegensatz zu den höhermolekularen Proteinen sind die zu entfernenden Salze zum Durchgang der Membran befähigt, während die Proteine in der Kammer verbleiben (Durchführung siehe Anhang 7.17).

3.12 N-terminale Sequenzanalyse

Das als „Edman-Abbau“ etablierte Verfahren zur Bestimmung der Aminosäuresequenz beruht auf der stufenweisen Abspaltung von Aminosäuren (AS) vom N-terminalen Ende einer Peptidkette. An eine endständige Aminosäure wird Phenylisothiocyanat gekoppelt, woran sich eine Abspaltung dieser AS als Phenylisothiocarbamonylpeptid sowie eine Stabilisierung zur Phenylthiohydantoin-(PHT)-Aminosäure anschließt. Die Identifizierung dieser PHT-Derivate kann mittels RP-HPLC/UV durchgeführt werden. Dieses Verfahren ist auf eine zyklische Bestimmung von bis zu 20 Aminosäuren limitiert, da bei einer Erhöhung der Zyklenanzahl eine Auswertung stetig schwieriger wird.

Für die Ansequenzierung wurden die Proteine nach elektrophoretischer Trennung auf eine PVDF-Membran geblottet und unspezifisch mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Die für eine Sequenzierung nötige Menge von mindestens 50 pmol ist zumeist mit der Visualisierbarkeit mit CBB gewährleistet. Die N-terminale Sequenzierung der zuvor ausgeschnittenen Banden wurde in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Biochemie der Universität Hamburg durchgeführt (siehe Anhang 7.18).

4 Ergebnisse

Im ersten Abschnitt dieses Kapitels werden die Ergebnisse zur umfassenden Charakterisierung der Tomatenallergene vorgestellt, während sich der zweite Abschnitt mit der Isolierung zweier Tomatenallergene und deren N-terminaler Sequenzierung befaßt.

4.1 Charakterisierung der Tomatenallergene

Sowohl die mittels BRADFORD [1976] bestimmten Proteingehalte aller für die nachfolgenden Untersuchungen eingesetzten Fruchtextakte als auch die Ergebnisse der durchgeführten EAST-Inhibitionen sind in Anhang 7.21 & 7.22 dokumentiert.

Eine Zuordnung der visualisierten allergenen Banden im Immunoblot bezüglich ihres MG bzw. pI erfolgte anhand der mittels Brilliant Black-Färbung (BBF) angefärbten Molekulargewichtsmarker (MGM) bzw. pI-Marker (pIM).

4.1.1 SDS-PAGE / Immunoblot

Durch die Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Eppendorf stand für die Untersuchungen bzw. Charakterisierung der Allergene ein Pool von insgesamt 33 Patienten mit spezifischen IgE gegen Tomate zur Verfügung. Sämtliche eingesetzten Seren wiesen eine EAST-Klasse ≥ 2 (vergleiche dazu Anhang 7-19) auf. Zur Charakterisierung wurde der Extrakt der Sorte «Balkonstar» elektrophoretisch mittels SDS-PAGE getrennt und nach anschließendem Transfer auf eine NC-Membran unter Verwendung der Einzelseren immungefärbt. Um unspezifische Bindungen ausschließen zu können, erfolgte zudem eine Inkubation mit dem Serum eines Nicht-Atopikers (EAST-Klasse = 0) als Negativkontrolle (K). In den Abbildungen 4-1 und 4-2 sind die mit den jeweiligen Einzelseren immungefärbten NC-Streifen dargestellt.

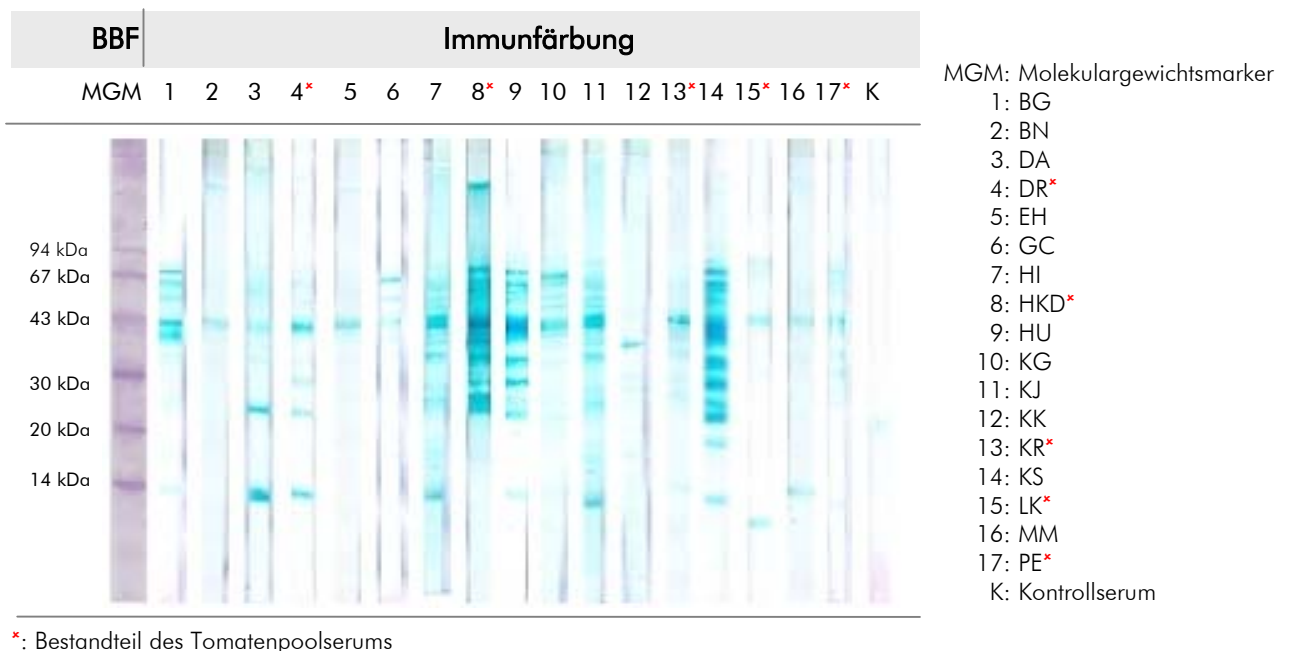
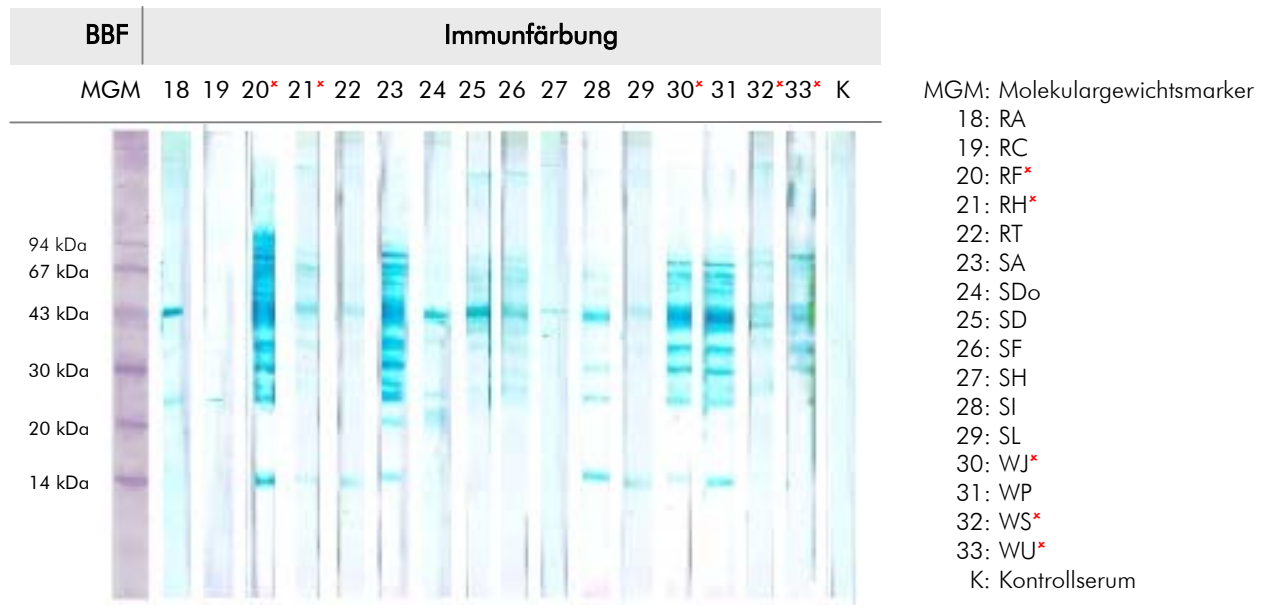


Abb. 4-1: Immunoblot der Tomate «Balkonstar» unter Verwendung der Einzelseren 1-17



*: Bestandteil des Tomatenpoolserums

Abb. 4-2: Immunoblot der Tomate «Balkonstar» unter Verwendung der Einzelseren 18-33

Bis auf die Einzelseren 12 und 19 wiesen alle Seren spezifische IgE-Antikörper gegenüber einem Allergen mit einem MG von 44 kDa auf, welches mit 93.9 % der eingesetzten Seren am häufigsten detektiert werden konnte, und somit eine große Bedeutung bezüglich der Allergie gegen Tomate zu haben scheint. Trotz des hohen Anteils an positiv reagierenden Seren auf dieses Allergen kann lediglich eine Tendenz bezüglich der tatsächlich vorherrschenden Relevanz angegeben werden, da für diese Studie nur eine relativ geringe Patientenanzahl von 33 Patienten zur Verfügung stand. Im höhermolekularen Bereich zeigen 51.5 % der Seren, d.h. 17 von insgesamt 33, Antikörper gegen ein 70 kDa Protein. Im unteren MG-Bereich bei 14 kDa wurde ein weiteres Protein mit einer relativ hohen Häufigkeit von 48.5 % der Seren detektiert. Hierbei könnte es sich aufgrund des MG um die im Pflanzenreich ubiquitär vertretenen Profilinen handeln, welche schon bei einer Vielzahl von Pflanzen als Allergene identifiziert wurden. Als sogenanntes Intermediärallergen kann wahrscheinlich das 26 kDa Protein angesehen werden, welches durch 14 Seren (42.4%) visualisiert werden konnte. Daneben können auch die Proteine von 30, 36, 50 und 65 kDa zu dieser Gruppe gezählt werden; zwischen 27.3 und 36.4 % der Seren detektierten diese Allergene. Eine Übersicht über die nachgewiesenen allergenen Proteine im Tomatenextrakt

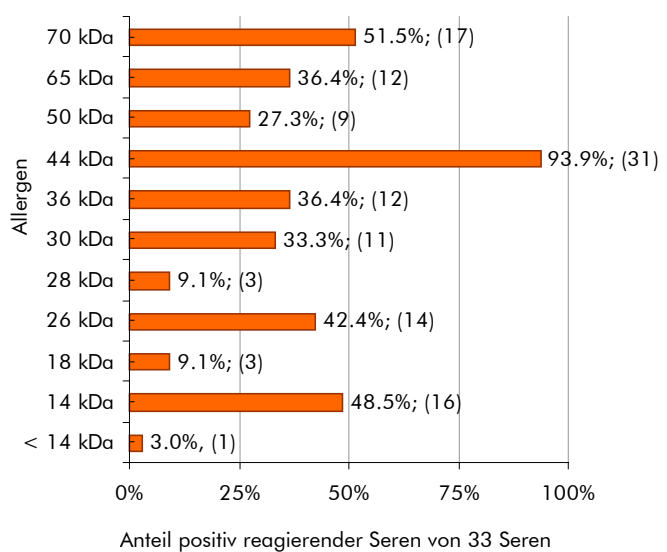


Abb. 4-3: Darstellung über die Detektionshäufigkeit der apparenten Tomatenallergene

sowie deren Detektionshäufigkeit liefert Abb. 4-3. Die Antikörper von nur drei Seren detektierten Allergene im Bereich von 18 kDa (14, 23, 24) bzw. 28 kDa (8, 14, 23) und scheinen somit in Zusammenhang mit einer Tomatenallergie zu den Minorallergenen zu zählen. Ebenfalls ein Minorallergen stellt ein Protein im niedermolekularen Bereich <14 kDa dar, gegen welches lediglich ein Patient (15) spezifische IgE-Antikörper aufwies. Unspezifische Bindungen konnten durch die Inkubation mit dem Nichtallergikerserum (K), wobei keine Banden visualisiert wurden, ausgeschlossen werden.

4.1.2 IEF / Immunoblot

Eine Charakterisierung der Tomatenproteine hinsichtlich ihrer pI erfolgte mittels IEF in einem pH-Bereich von 3-7 anhand der Proteinextrakte aus der Gesamtf Frucht der Sorte «Balkonstar». Das Gesamtproteinmuster wurde nach der elektrophoretischen Auftrennung mittels der

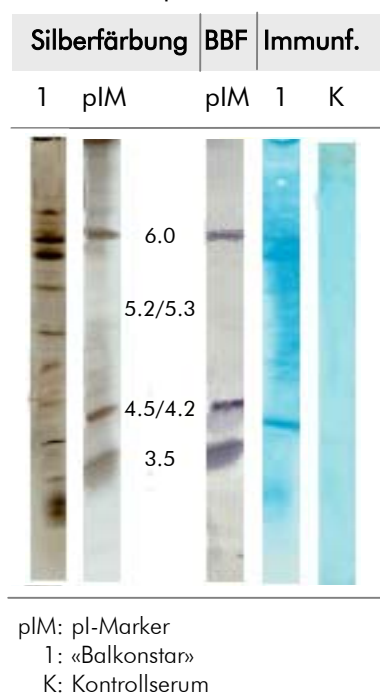


Abb. 4-4: Silberfärbung & IB nach IEF

unspezifischen Silberfärbung im Gel visualisiert. Zur Detektion der Allergene wurde nach einem Semidry-Blot eine Immunfärbung unter Verwendung des Tomatenpoolserums durchgeführt. Wie aus Abb. 4-4, welche beide Färbungen dokumentiert, ersichtlich wird, wies das Gesamtproteinmuster zwei sehr ausgeprägte Banden bei einem pI von 5.8 und 5.9 auf. Neben diesen beiden Banden wurden durch die Silberfärbung differenzierte Banden bei einem pI von 6.5, 5.5, 5.0, 4.8, 3.8 sowie weitere Banden unterhalb des pIs von 3.5 visualisiert. Die unspezifisch sehr gut detektierbaren Proteine mit einem pI von 5.8, 5.9 sowie 3.8 zeigten im Immunoblot ein IgE-bindendes Potential. Daneben traten etwas schwächer visualisierte Banden bei pI 5.0 und 5.5 sowie eine Anzahl sehr diffus erscheinender Banden im pH-Bereich von 5.0 - 6.0 auf, welche mittels Silberfärbung nicht visualisiert werden konnten. Die pI der Allergene der Tomate beschränken sich somit hauptsächlich auf den neutralen bis sauren pH-Bereich. Unspezifische Bindungen konnten durch die Inkubation mit dem Kontrollserum ausgeschlossen werden.

4.1.3 2D-Elektrophorese / Immunoblot

Eine Zuordnung der ermittelten pI zu den MG der Allergene erfolgte unter Durchführung einer 2D-Elektrophorese. Hierbei schloß sich nach erfolgter IEF in der ersten Dimension eine Auftrennung der Proteine nach ihrem MG in zweiter Dimension an. In Abb. 4-5 ist die unspezifische Silberfärbung sowie der unter Verwendung des Poolserums durchgeführte Immunoblot dokumentiert.

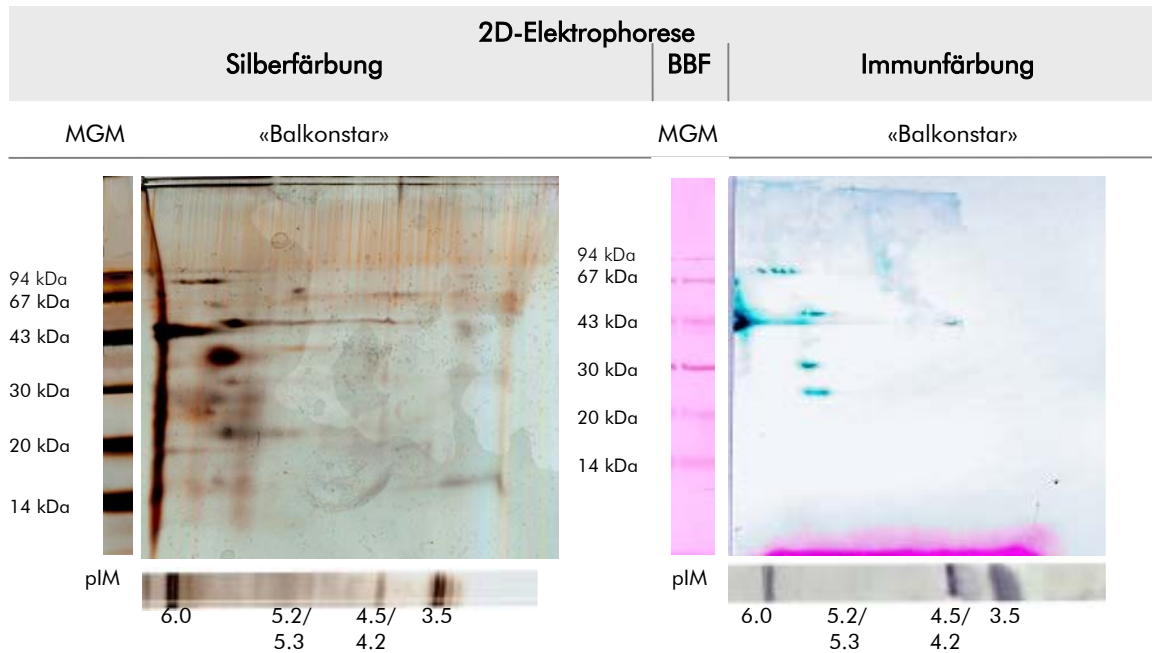


Abb. 4-5: Silberfärbung & IB nach 2D-Elektrophorese

In der unspezifischen Silberfärbung (Abb. 4-5 linke Seite) der zweidimensionalen Auftrennung ist zu erkennen, daß die beiden Banden bei pH 5.8 und 5.9 der IEF aus einer Vielzahl von Proteinen mit unterschiedlichen MG resultierten. Besonders deutlich traten hierbei allerdings Proteine mit einem M von ca. 70, 45, 44, 36 und 26 kDa in Erscheinung. Diese Proteine konnten im Immunoblot (Abb. 4-5 rechte Seite) zudem als Allergene charakterisiert werden und verteilten sich z.T. über einen weiten pH-Bereich. So erstreckten sich z.B. die allergenen Proteine mit einem MG von 44 kDa über einen Bereich von pl 5.7 - 6.1. Des weiteren konnte der Bande bei pl 3.8 aus der IEF ebenfalls ein MG von 44 kDa zugeordnet werden. Im Bereich von pH 5.9 - 6.0 wurden außerdem, in der unspezifischen Silberfärbung und im Immunoblot, vier Spots mit einem MG von 70 kDa visualisiert. Bei einem pl von 5.8 waren zwei allergene Spots bei 45 kDa, ein Spot bei 36 kDa sowie zwei Spots bei 26 kDa apparent. Die bei der Charakterisierung der Patientenserum (siehe dazu 4.1.1) nachgewiesenen Allergene bei 14, 18, 28, 30, 50 und 65 kDa konnten im Immunoblot nach 2D-Auftrennung allerdings nicht nachgewiesen werden. Dies könnte darin begründet liegen, daß diese Allergene einen pl oberhalb von 7 besitzen, so daß sie nicht detektiert werden konnten, da für die erste Dimension lediglich ein IEF-Gel mit einem pH-Bereich von 3-7 zur Verfügung stand.

4.1.4 Sortenvergleich

Der potentielle Einfluß der Sorte auf das allergene Potential bzw. auf das Allergenspektrum wurde anhand von zehn verschiedenen Sorten, welche dem gleichen Anbaugelände entstammten, verifiziert. In der in Abb. 4-6 (linke Seite) dargestellten Silberfärbung wiesen alle Sorten Proteine im MG-Bereich von <14 bis 94 kDa auf. Darin ließen sich bezüglich des Proteinmusters zwischen den einzelnen Sorten leichte Differenzen feststellen. Während alle

Extrakte eine intensiv hervortretende Bande bei 44 kDa aufweisen, ist sie in den Extrakten der Sorten «Togo Trefle» (2) und «Flamme» (3) nicht deutlich erkennbar. Daneben wird deutlich, daß eine Reihe von Proteinen, insbesondere im Bereich von ca. 18 bis 40 kDa, zwar in jedem Extrakt auftraten, jedoch unterschiedlich intensiv detektiert worden sind. So zeigen z.B. die Extrakte der Sorten «Flamme» (3) und «El Salvador» (10) eine stark ausgeprägte Bande bei ca. 28 kDa, welche bei allen anderen Sorten weitaus weniger stark hervortraten. Ebenso war die Intensität der Bande bei ca. 36 kDa bei den Extrakten der Sorten «Balkonstar» (1), «Togo Trefle» (2) und «Tasty Tom» (7) intensiver als bei den anderen, wobei die Sorte «Balkonstar» hier sogar eine Doppelbande aufwies. Die im Proteinmuster auftretenden Unterschiede sind jedoch unabhängig von der Einteilung in Cherry-, Strauch-, Busch- und Fleischtomaten zu sehen (Einteilung siehe Tab. 7-11 im Anhang).

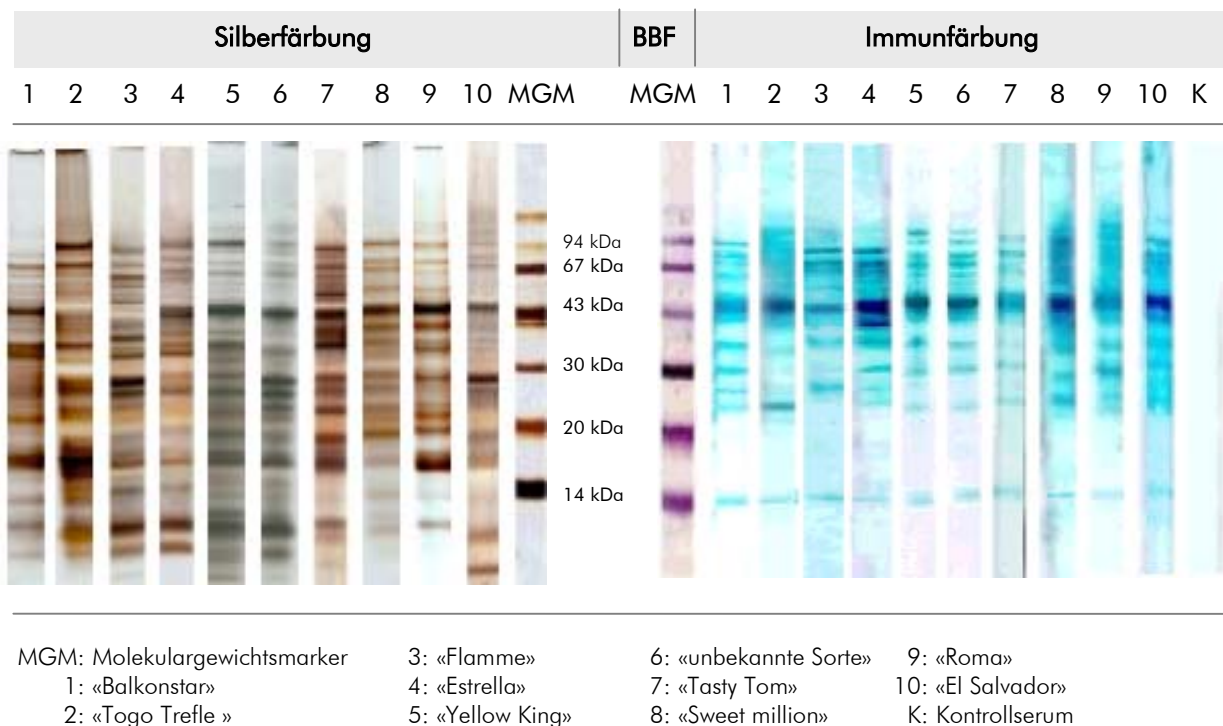


Abb. 4-6: Silberfärbung & IB zehn verschiedener Tomatensorten

Bei der immunologischen Detektion (siehe Abb. 4-6 rechte Seite) der Tomatensorten zeigte sich ein ähnliches Allergenspektrum aller Sorten. Obwohl in der Silberfärbung nicht bei allen Sorten eine deutliche Visualisierung von Proteinen mit einem MG von 44 kDa erfolgte, war in allen Extrakten bei diesem MG eine intensiv gefärbte allergene Bande apparent. Daneben waren Allergene mit einem MG von 14, 36, 50, 65, 70 kDa in den Extrakten sämtlicher untersuchter Sorten vorhanden. Weiterhin ist mit Ausnahme der Sorten «Togo Trefle» (2) und «Flamme» (3) ein IgE-bindendes Protein mit einem MG von 30 kDa zugegen, wobei bei «Togo Trefle» zusätzlich noch das Allergen bei 26 kDa nicht nachweisbar war. Lediglich in den Sorten «Balkonstar» (1), «Flamme» (3) und «Estrella» (4) waren bei einem MG von 28 kDa allergene Banden detektierbar. Der Extrakt «Estrella» wies zudem als einzige Sorte eine intensive Bande bei 40 kDa auf. Außerdem wurden in den Extrakten der Sorten «Togo Trefle» (2), «Yellow King» (5) und der unbekannten Sorte (6) im oberen MG-Bereich >94 kDa allergene Proteine durch Inkubation mit dem Poolserum visualisiert. Anhand der IEF konnten hinsichtlich des

Allergenspektrums keine Unterschiede festgestellt werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Unspezifische Bindungen konnten durch die Inkubation mit dem Kontrollserum ausgeschlossen werden.

Um die Relevanz der leicht differierenden Allergenbandenmuster der SDS-PAGE zu verifizieren und die allergene Potenz relativ quantifizieren zu können, wurde eine IB- sowie eine EAST-Inhibition durchgeführt, wobei der Extrakt jeder Sorte festphasengebunden mit allen anderen Tomatensorten inhibiert wurde. Die durchgeführten IB-Inhibitionen zeigten, daß entsprechend der homologen Inhibition die Extrakte jeder Sorte die Detektion sämtlicher Allergenbanden gleichermaßen zu hemmen vermochten (nicht abgebildet). Die Inhibitionsgraphen der EAST-Inhibition sind exemplarisch in Abb. 4-7 mit der Sorte «Balkonstar» als festphasengebundene Komponente aufgezeigt. Während die Inhibitionskurven sämtlicher Sorten annähernd identisch verlaufen, wies die homologe Inhibition der Sorte «Balkonstar» einen signifikant steileren Verlauf auf. Dies spiegelt sich auch in der zur 50 %igen Inhibition führenden Proteinkonzentration der Extrakte wider. Während die einzelnen Sorten kaum schwankende C_{50} -Werte zwischen 8.4 $\mu\text{g/mL}$ («Roma») und 26.0 $\mu\text{g/mL}$ («Flamme») aufweisen und sich somit nicht signifikant unterschieden, lag der C_{50} -Wert der Sorte «Balkonstar» (homologe Inhibition) mit 0.7 $\mu\text{g/mL}$ deutlich niedriger. Die hier exemplarisch dargestellten Ergebnisse der Versuchsvariante, bei welcher der Extrakt «Balkonstar» festphasengekoppelt vorlag, wurden anhand der anderen Versuchsvariationen bestätigt.

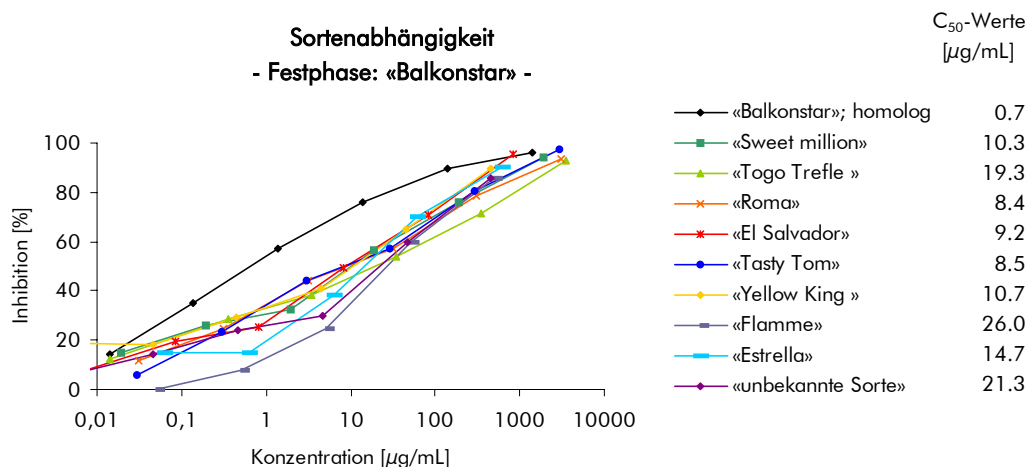


Abb. 4-7: Inhibitionsgraphen verschiedener Tomatensorten
Festphase: «Balkonstar»

Abschließend läßt sich festhalten, daß zwischen den verschiedenen Sorten leichte Differenzen im Gesamtproteinmuster festgestellt werden können, diese jedoch nicht mit den geringfügigen Unterschieden im Allergenbandenmuster korrespondierten. Zudem kann aufgrund der IB-Inhibition darauf geschlossen werden, daß die allergenen Banden, welche nicht bei allen Sorten detektiert werden konnten, identische oder stark homologe Epitope wie die anderen vorhandenen Allergene tragen. Die Ergebnisse der EAST-Inhibition zeigten eine etwas stärkere allergene Aktivität der Sorte «Balkonstar». Die übrigen Sorten wiesen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich ihrer allergenen Potenz auf.

4.1.5 Reifung

Um eine potentielle Veränderung der Allergenität während des Reifungsprozesses zu bestimmen, wurden vier verschiedene Reifestufen der drei Tomatensorten «Balkonstar», «Sweet million» und «Togo Trefle» untersucht. Die Früchte wurden im grünen, orangen, roten und dunkelroten Zustand geerntet und für die Untersuchungen aufgearbeitet. Abb. 4-8 gibt die unspezifische Silberfärbung und die immunologische Detektion der Proteinextrakte der verschiedenen Reifegrade der Sorte «Balkonstar» wieder.

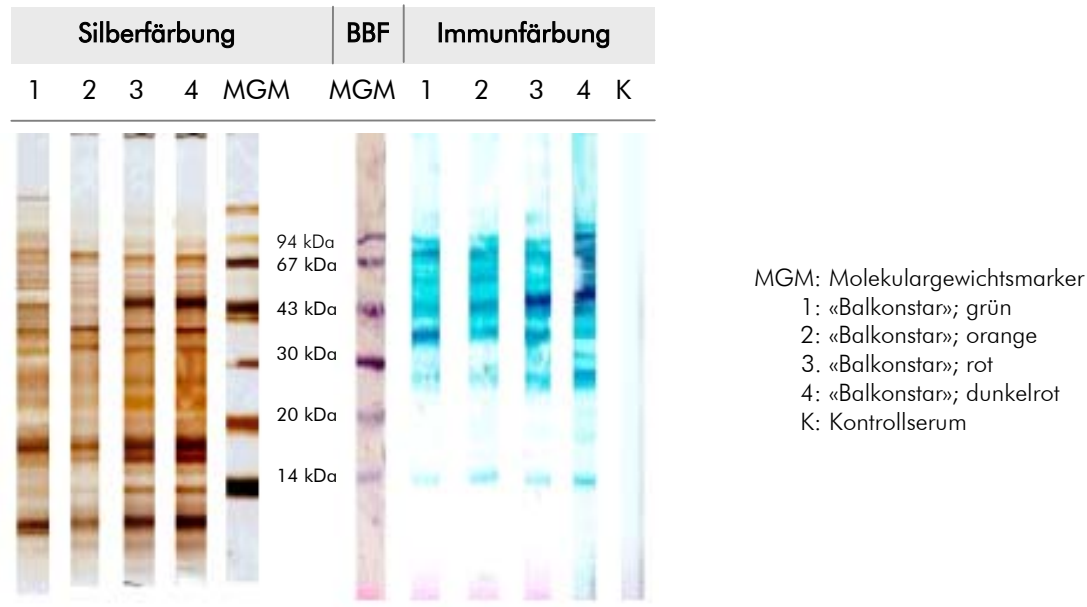


Abb. 4-8: Silberfärbung & IB verschiedener Reifegrade der Sorte «Balkonstar»

Im Gesamtproteinmuster war insbesondere die Entstehung eines Proteins mit einem MG von 44 kDa zu erkennen. Erst in der ausgereiften roten bzw. dunkelroten Frucht wurde dieses Protein äußerst intensiv detektiert. Daneben wurden in Abhängigkeit des Reifegrades noch weitere Proteine mit MG von 16, 26 sowie 30 kDa stärker ausgebildet. Die durch die Silberfärbung erzielten Erkenntnisse wurden anhand der spezifischen Detektion der Allergene im Immunoblot bestätigt. Die in der grünen Frucht noch schwach angefärbte Bande bei 44 kDa wurde, einhergehend mit der Reifestufe, ebenfalls stetig intensiver visualisiert. Ebenso verhielt es sich mit den IgE-bindenden Proteinen bei 26 und 30 kDa. Im Gegensatz zur Silberfärbung zeigte die allergene Bande bei 36 kDa keine Intensitätszunahme. Im Bereich von 30 kDa wurde wiederum mit zunehmendem Reifegrad (roter und dunkelroter Zustand) ein IgE-bindendes Protein detektiert, welches anhand der unspezifischen Färbung nicht differenziert visualisiert worden war.

Zur Absicherung der visuell erlangten Ergebnisse erfolgte eine densitometrische Auswertung der Immunoblots mittels der Auswertesoftware „ScanPack“ (Densitogramme siehe Anhang 7.23). Die bereits beschriebenen Veränderungen wurden ebenfalls über die densitometrische Auswertung bestätigt, die in Abb. 4-9 graphisch dargestellt ist. Es zeigte sich eine Abhängigkeit der Detektionsintensität der allergenen Banden bei den MG 26, 30 und 44 kDa zu dem Reifegrad der Früchte. Bei allen drei erwähnten Banden war eine deutliche Intensitätszunahme erkennbar, wobei die Peakfläche der 26 kDa Bande am stärksten zunahm.

Während sich die Zunahme zwischen der grünen und orange-farbenen Reifestufe noch nicht so deutlich abzeichnete, war der Intensitätsunterschied zur ausgereiften, roten Frucht sehr ausgeprägt. So stieg die Peakfläche der Bande mit einem MG von 44 kDa beispielsweise um ca. 45 % an. Im weiteren Reifungsverlauf zur dunkelroten Frucht war wiederum nur eine geringe Zunahme erkennbar. Die Bande mit einem MG von 30 kDa hatte mit einem Zuwachs von 10 % die geringste Intensitätszunahme der drei beschriebenen Banden. Die anderen allergenen Banden wurden von dem Reifeprozess nicht beeinflusst, wobei bei keinem Allergen eine signifikante Abnahme der Detektionsintensität nachgewiesen werden konnte.

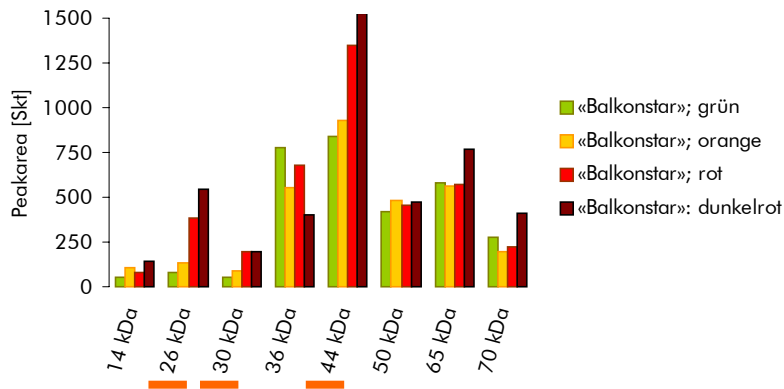


Abb. 4-9: Inhibitionsgraphen verschiedener Reifegrade der Sorte «Balkonstar»
Festphase: «Balkonstar»; rot

Die beiden ebenfalls untersuchten Tomatensorten «Sweet million» und «Togo Trefle» zeigten analoge Veränderungen der Protein- bzw. Allergenzusammensetzung im Laufe des Reifungsprozesses, so daß auf eine Darstellung dieser Ergebnisse verzichtet worden ist.

Die zur relativen Quantifizierung des allergenen Potentials durchgeführte EAST-Inhibition mit der roten Reifungsstufe als Festphase resultierte in einer stetigen Allergenitätszunahme im

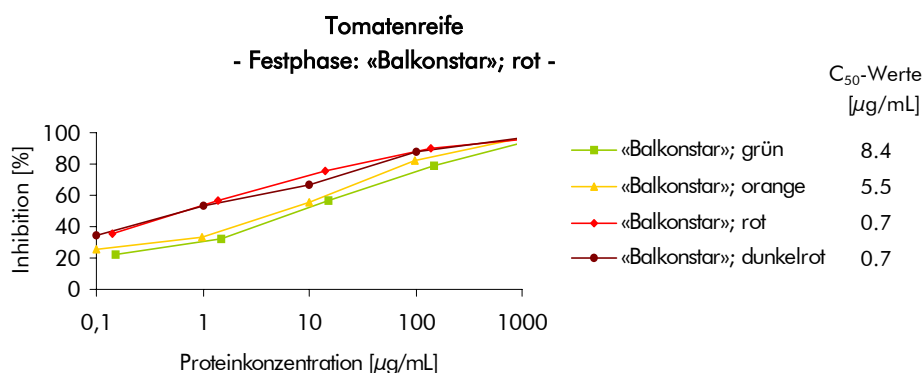


Abb. 4-10: Inhibitionsgraphen verschiedener Reifegrade der Sorte «Balkonstar»
Festphase: «Balkonstar»; rot

Verlauf der Reifung und war somit mit den Ergebnissen des Immunoblots vergleichbar. Während bei der unreifen, grünen Frucht eine Proteinkonzentration von $8.4 \mu\text{g/mL}$ eine 50 %ige Inhibition induzierte, lagen die Konzentrationen der reifen Früchte mit $0.7 \mu\text{g/mL}$ deutlich niedriger (siehe Abb. 4-10). Obwohl zwischen den letzten beiden Reifestufen im Immunoblot Unterschiede vorhanden waren, zeigten sie einen homologen Inhibitionskurvenverlauf und identische C_{50} -Werte.

4.1.6 Tomatenbestandteile

Der Aufbau der Tomate läßt sich leicht in verschiedene Fragmente gliedern, welche sich in ihrem Erscheinungsbild sowie ihrer Konsistenz deutlich voneinander abgrenzen (siehe hierzu Kapitel 2-2). Um die Allergenverteilung innerhalb der Tomate zu verifizieren, wurde die Frucht der Sorten «Estrella», «Flamme» und «Roma» in die Fragmente Schale, Perikarp, Pulpa, Plazenta und Samen zerlegt, die einzeln einer allergologischen Untersuchung unterzogen wurden. Parallel hierzu wurde bei allen Untersuchungen ein Extrakt der Gesamtf Frucht mitgeführt. Der Abb. 4-11 ist die Silberfärbung wie auch die Immunfärbung der Fragmente der Sorte «Estrella» zu entnehmen. Im Proteinmuster der verschiedenen Extrakte (2-5) zeigten sich keine auffälligen Unterschiede im Vergleich zur Gesamtf Frucht (1). Ausschließlich im Extrakt des Samens (6) waren über den gesamten MG-Bereich einige zusätzliche Proteinbanden zu erkennen, so daß dieses Proteinspektrum deutlich von dem der anderen Fragmente bzw. der Gesamtf Frucht abwich. Die anderen Fragmente zeigten lediglich eine etwas schwächere Intensität einiger Banden.

Im IB der einzelnen Fragmente waren z.T. deutliche Unterschiede im Vergleich zum Gesamtextrakt erkennbar. Während die Allergenmuster des Perikarps (3) und der Plazenta (5) nur hinsichtlich ihrer Detektionsintensität von dem der Gesamtf Frucht abwichen, war in der Schale (2) ausschließlich das 44 kDa apparent. Der Extrakt der Pulpa (4) wies im unteren MG-Bereich Differenzen auf, welche sich in dem Auftreten eines IgE-bindenden Proteins mit einem

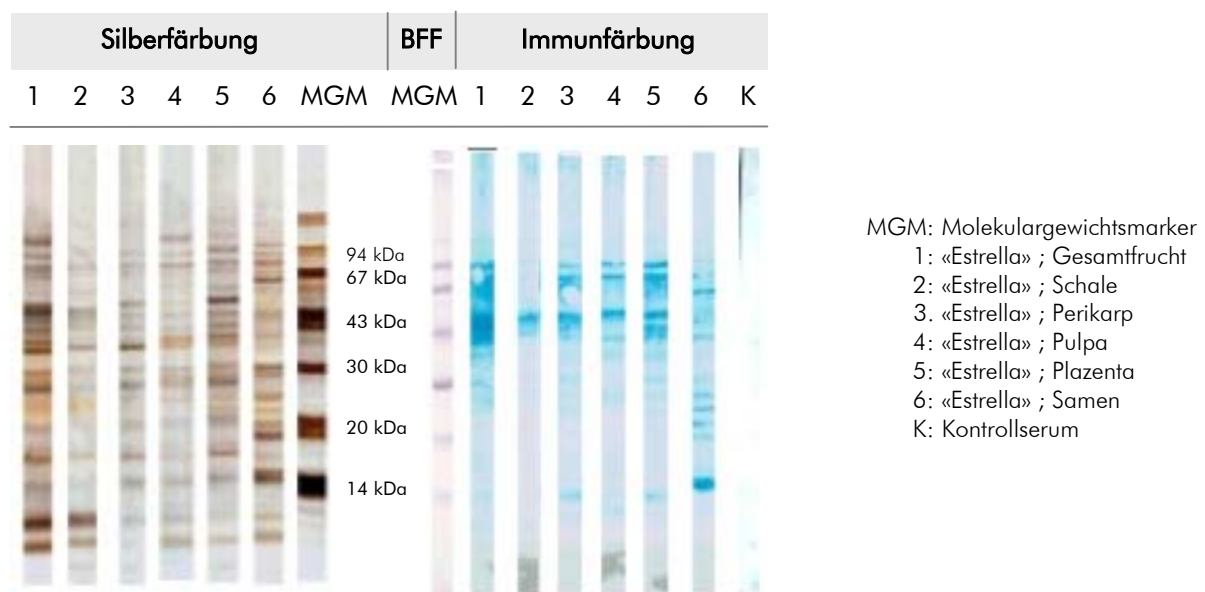


Abb. 4-11: Silberfärbung & IB verschiedener Fragmente der Sorte «Estrella»

MG <14 kDa sowie der Abwesenheit des 14 kDa Allergens manifestierten. Der Extrakt des Samens (6) zeigte im Bereich zwischen 16 und 30 kDa fünf zusätzliche, im Gesamtextrakt nicht detektierbare, allergene Proteine. Zudem wurde im oberen MG-Bereich ein weiteres Allergen bei ca. 60 kDa visualisiert.

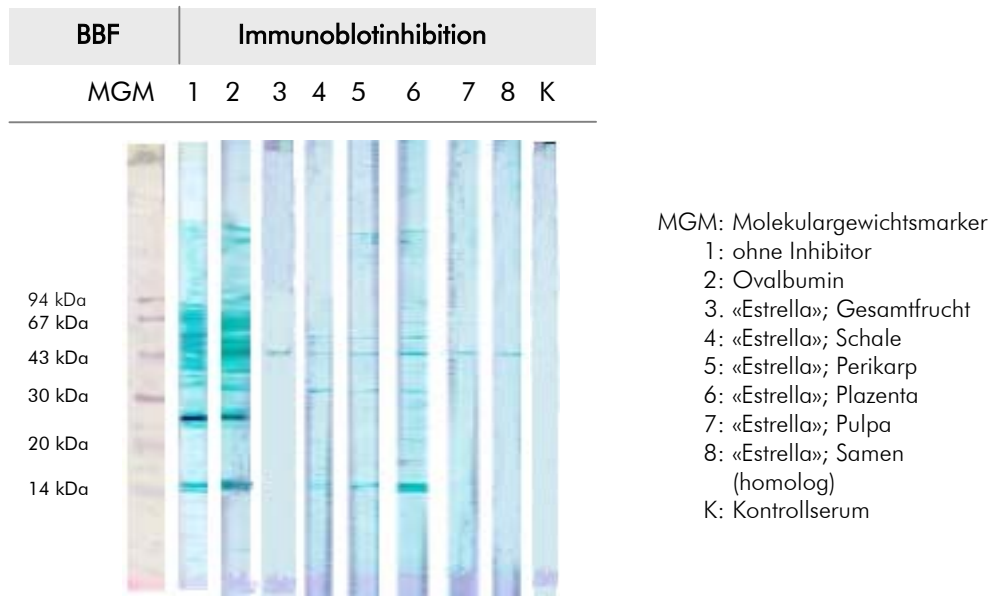


Abb. 4-12: IB-Inhibition der verschiedenen Fragmente der Sorte «Estrella»
 elektrophoretisch getrennter Extrakt: «Estrella»; Samen

Um festzustellen, inwieweit die zusätzlich detektierten IgE-bindenden Proteine des Samens die gleichen Epitope tragen bzw. in welchen weiteren Fragmenten sie in einer nicht detektierbaren Konzentration auftreten, wurde eine IB-Inhibition durchgeführt. Dabei wurden die Proteine des Samenextraktes elektrophoretisch getrennt und mit den Extrakten der einzelnen Fragmente als auch mit dem der Gesamtfrucht inhibiert. Zur Prüfung auf eine unspezifische Inhibition diente eine Ovalbuminlösung als Inhibitor. Das Ergebnis ist Abb. 4-12 zu entnehmen. Da das Bandenmuster sowie die Intensität der detektierten Banden der mit Ovalbumin (2) und der ohne Inhibitor (1) durchgeführten Inhibition identisch waren, konnte eine unspezifische Inhibition ausgeschlossen werden. Die Vorinkubation mit den Extrakten der Gesamtfrucht (3) sowie der Pulpa (7) führten entsprechend der homologen Inhibition (8) zu einer Eliminierung des kompletten Bandenmusters mit Ausnahme der 44 kDa Bande. Die Extrakte der Schale (4), des Perikarps (5) und der Plazenta (6) führten hingegen zu keiner vollständigen Hemmung der Bandenvisualisierung, wobei der Extrakt der Plazenta das schwächste Inhibitionsvermögen aufwies. Alle drei Extrakte bewirkten keine Inhibition der IgE-bindenden Proteine mit einem MG von 16, 33 und 60 kDa. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß die eben genannten Allergene nur in der Pulpa und im Samen der Tomatenfrucht vorkommen und zudem andere Epitope tragen. Eine ebenso durchgeführte Inhibition des elektrophoretisch getrennten Gesamtextraktes mit den Extrakten der einzelnen Fragmente der Tomatenfrucht (nicht abgebildet) führte zu keiner Hemmung der Bandendetektion durch den Samenextrakt. Ebenso konnte lediglich die Bande bei 44 kDa durch die Vorinkubation mit dem Extrakt der

Schale entsprechend der homologen Inhibition geschwächt werden. Alle anderen Allergene waren weiterhin vorhanden. Die Extrakte des Perikarps, der Plazenta und der Pulpa stimmen mit der homologen Inhibition überein.

Durch die Charakterisierung der Proteine bzw. Allergene der einzelnen Fragmente anhand ihres pI mittels IEF mit anschließender Silberfärbung bzw. im IB - siehe dazu Abb. 4-13 - wurden die mittels SDS-PAGE erzielten Ergebnisse bestätigt. Ebenso wie in der SDS-PAGE zeigte der Extrakt des Samens (6) nach erfolgter IEF im Vergleich zur Gesamtf Frucht ein differentes Protein- bzw. Allergenmuster. Während in allen Extrakten zwei intensive Banden bei einem pH von 5.8 und 5.9 in der Silberfärbung als auch im Immunoblot detektiert wurden, wies der Samen in diesem Bereich nur leicht diffuse Banden auf. Allerdings zeigte sich im Extrakt des Samens im Proteinmuster eine Doppelbande bei einem pI von 6.0, deren allergene Potenz im IB nachgewiesen werden konnte. Zudem traten weitere, in den anderen Extrakten nicht detektierbare Allergene im Bereich zwischen pH 4.8 und 5.7 sowie oberhalb pH 6.0 auf. Zusätzlich zum Samen zeigte auch der Extrakt der Schale (2) ein von den Extrakten der anderen Fragmente abweichendes Protein- bzw. Allergenmuster. Dieser zeigte zusätzliche

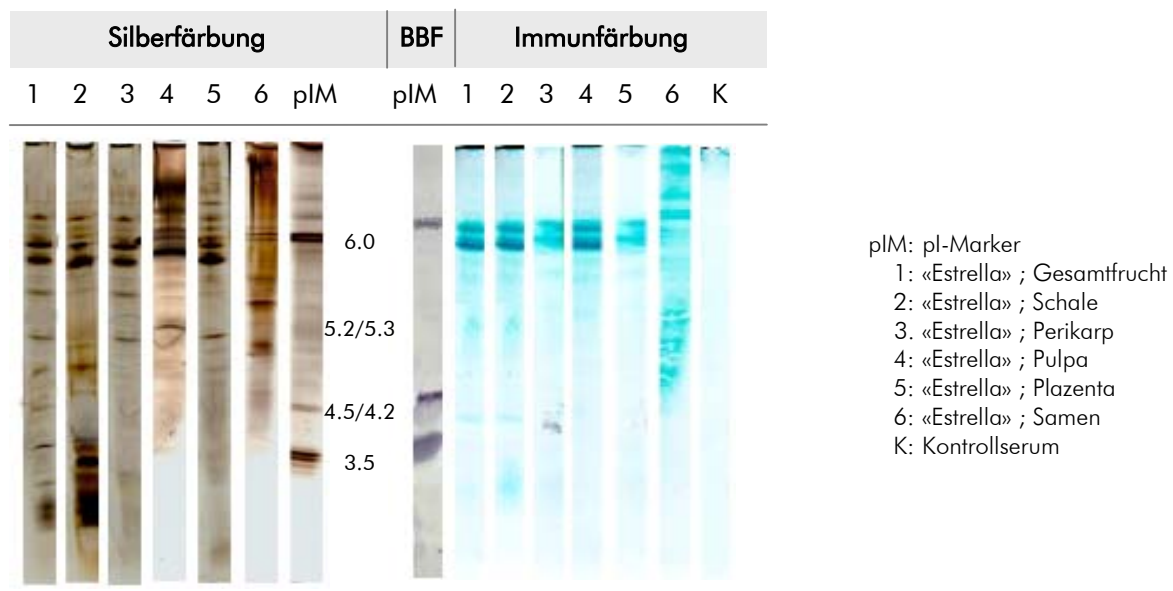


Abb. 4-13: Silberfärbung & IB verschiedener Fragmente der Sorte «Estrella» nach IEF

Proteine im sauren pH-Bereich, welche im Gesamtextrakt zwar vorhanden, jedoch weniger stark ausgeprägt waren. Im IB zeigte sich, daß lediglich im Extrakt der Schale sowie im Gesamtextrakt eine scharfe Bande mit einem pI von 3.8 und weitere diffuse Banden unterhalb pH 3.5 apparent waren. Alle anderen Tomatenbestandteile zeigten in diesem Bereich keine IgE-bindenden Proteine.

Zum Vergleich der allergenen Potenz der verschiedenen Bereiche der Tomate wurde eine EAST-Inhibition durchgeführt. Die Inhibitionsgraphen sowie die dazugehörigen C_{50} -Werte sind der Abb. 4-14 zu entnehmen. Die relative Quantifizierung der Extrakte deutet auf eine weitaus niedrigere Potenz des Tomatensamens hin. Abweichend von den Inhibitionskurven der übrigen Tomatenfragmente, welche sich annähernd deckungsgleich darstellten, zeigte die des Samens einen deutlich flacheren Verlauf. Die geringere allergene Aktivität des Samens spiegelt sich

zudem in dem mit einer maximalen Inhibition von 48 % nicht erreichten C_{50} -Wert wider. Im Vergleich dazu liegen die zur 50 %igen Inhibition benötigten Proteinkonzentrationen der anderen Fragmente im Bereich zwischen 3.0 und 5.2 $\mu\text{g/mL}$ und wichen somit von dem der Gesamtf Frucht (3.7 $\mu\text{g/mL}$) nur geringfügig ab.

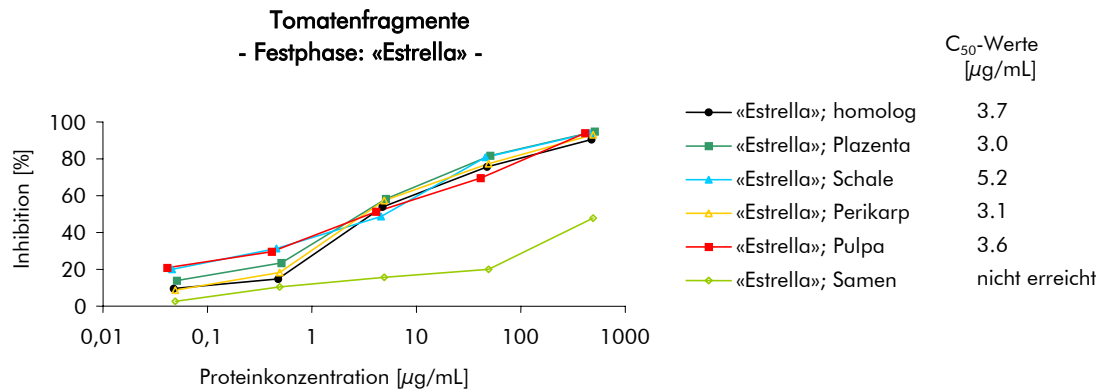


Abb. 4-14: Inhibitionsgraphen verschiedener Fragmente der Sorte «Estrella»
Festphase: «Estrella»; Gesamtf Frucht

Die am Beispiel der Sorte «Estrella» exemplarisch dargestellten Ergebnisse sind mit denen der anderen Sorten kongruent, so daß die jeweiligen Einzelergebnisse nicht dargestellt worden sind.

Ausgehend von diesen Untersuchungen läßt sich feststellen, daß die Allergenverteilung bzw. das Allergenmuster innerhalb der Frucht variiert. Dabei sind mit Ausnahme des Samens die allergenen Potenzen der Bestandteile als identisch anzusehen.

4.1.7 Profilinnachweis

Wie in Kapitel 4.1.1 bereits beschrieben, könnte es sich bei dem im niedermolekularen Bereich von 14 kDa detektierten Allergen um ein Profilin handeln, welches ubiquitär in verschiedenen Pflanzen vorkommt. Zur Identifizierung der Allergene mit einem MG von 14 kDa als Profiline fand eine Inkubation der elektrophoretisch aufgetrennten und geblotteten Extrakte der Tomate mit einem Anti-Birnenprofilin-Antikörper statt. In diesem sogenannten Profilinblot konnte in jedem Extrakt der verschiedenen Sorten ausschließlich eine diskrete Bande bei 14 kDa visualisiert werden (nicht abgebildet). Die pI der als Profiline identifizierten Allergene konnten im Blot der im pH-Bereich 3-7 aufgetrennten Tomatenextrakte nicht bestimmt werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Dies ist mit den Ergebnissen der 2D-Elektrophorese (siehe Abb. 4.1.3) übereinstimmend, in welcher kein Spot bei einem MG von 14 kDa zu erkennen war. Vermutlich liegt der pI der Profiline außerhalb des bei der IEF bzw. 2D-Elektrophorese verwendeten pH-Bereiches.

Am Beispiel der Sorte «Estrella» wurde zudem die Anwesenheit von Profilinen in den einzelnen Fruchtbestandteilen mittels des Profilinblots überprüft. Aus Abb. 4-15 ist ersichtlich, daß in der Schale, dem Fruchtfleisch sowie der Plazenta Profiline mit einem MG von 14 kDa visualisiert worden sind, wohingegen die Blotstreifen der Extrakte aus der Pulpa und des Samens keinerlei Banden aufwiesen. Dieses stimmt mit den jeweiligen, in Abb. 4-11 dargestellten kompletten

Allergenmustern überein. Auch dort konnten in den Extrakten der Pulpa und des Samens keine IgE-bindenden Proteine mit einem MG von 14 kDa nachgewiesen werden. Anhand des Profilinblots wurde zudem gezeigt, daß es sich bei der im Gesamtallergenmuster vorhandenen Bande des Samens bei 16 kDa (siehe Abb. 4-11 bzw. 4-15) um kein Profilin handelt, da diese im Profilinblot nicht visualisiert worden ist. Unspezifische Banden konnten durch die Inkubation mit einem Kontrollserum ausgeschlossen werden. Abschließend kann festgestellt werden, daß es sich bei den in der Tomatenfrucht vorkommenden IgE-bindenden Proteine um Profileine handelt, welche jedoch in den Bereichen der Pulpa und des Samens nicht auftreten.

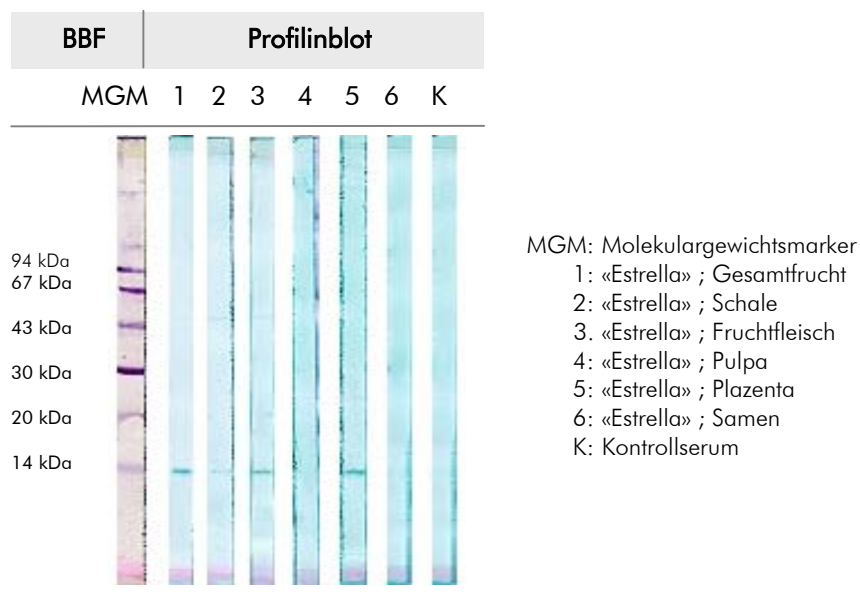


Abb. 4-15: Profilinblot verschiedener Fragmente der Sorte «Estrella»

4.1.8 Nachweis von Kohlenhydraten

Im Pflanzenreich liegen eine Vielzahl der Proteine als Glycoproteine vor, wobei eine Beteiligung der Kohlenhydrate am Aufbau des zur IgE-Bindung fähigen Epitops nach heutigem Kenntnisstand nicht auszuschließen ist. Inwieweit es sich bei den Allergenen der Tomaten um Glycoproteine handelt, wurde im Rahmen dieser Arbeit über vier Methoden, welche auf zwei verschiedenen Prinzipien beruhen, untersucht. Eine eingeschränkte Aussage über die Bedeutung der Kohlenhydrate bezüglich der IgE-Bindungsfähigkeit kann dabei lediglich mittels der Periodatspaltung mit anschließendem Immunoblot getroffen werden.

4.1.8.1 Nachweis mittels Periodatspaltung

Zum Nachweis von Glycoproteinen wurde die PAS-Färbung, welche im Gel stattfindet, verwendet. In Abb. 4-16 ist das Resultat dieser Färbung dokumentiert (Durchführung siehe Anhang 7.15.1). Im Gesamtextrakt der Tomate sind deutlich vier Banden mit MG 20, 26, 36 und 44 kDa visualisiert worden. Die anderen, in der Silberfärbung detektierten Proteine im

Extrakt der Tomate, konnten anhand der PAS-Färbung nicht als Glycoproteine identifiziert werden. Um eine eventuelle Beteiligung des Kohlenhydratanteils an der Epitopstruktur belegen zu können, wurden die mittels SDS-PAGE getrennten und auf NC-Membran geblotteten Proteine des Tomatenextraktes einer Inkubation mit Periodat unterzogen (vgl. Anhang 7.15.2). Nach erfolgter Oxidation mit 0.2 M Periodat ist im Immunoblot unter Verwendung des Poolserums, dargestellt in Abb. 4-16, eine Schwächung des 44 kDa Allergens erkennbar. Zudem hatte die Inkubation mit Periodat eine Eliminierung der Allergene mit einem MG 36 kDa zur Folge. Außerdem zeigte sich eine leichte Schwächung des 26 kDa-Allergens. Alle anderen Banden wurden im Vergleich zum Allergenspektrum, welches lediglich mit dem Poolserum inkubiert worden ist, in unveränderter Intensität detektiert. Das durch Mannit deaktivierte Periodat, welches als Negativkontrolle diente, besitzt hingegen keinen Einfluß auf die IgE-bindende Potenz der Allergene. Zudem wurden durch das Kontrollserum keine Banden detektiert, so daß unspezifische Bindungen ausgeschlossen werden konnten. Dieses Ergebnis liefert einen Hinweis auf eine mögliche IgE-bindende Aktivität des Kohlenhydratanteils des 36 kDa Proteins. Die vorliegende Schwächung der allergenen Banden bei 26 bzw. 44 kDa könnten ebenfalls auf eine mögliche Kohlenhydratbeteiligung am Epitopaufbau hinweisen. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, daß diese Nachweismethode relativ unspezifisch ist. Die Behandlung mit Periodat kann zur Oxidation von empfindlichen AS-Resten führen, woraus ebenfalls eine Schwächung bzw. Eliminierung der allergenen Banden resultieren kann.

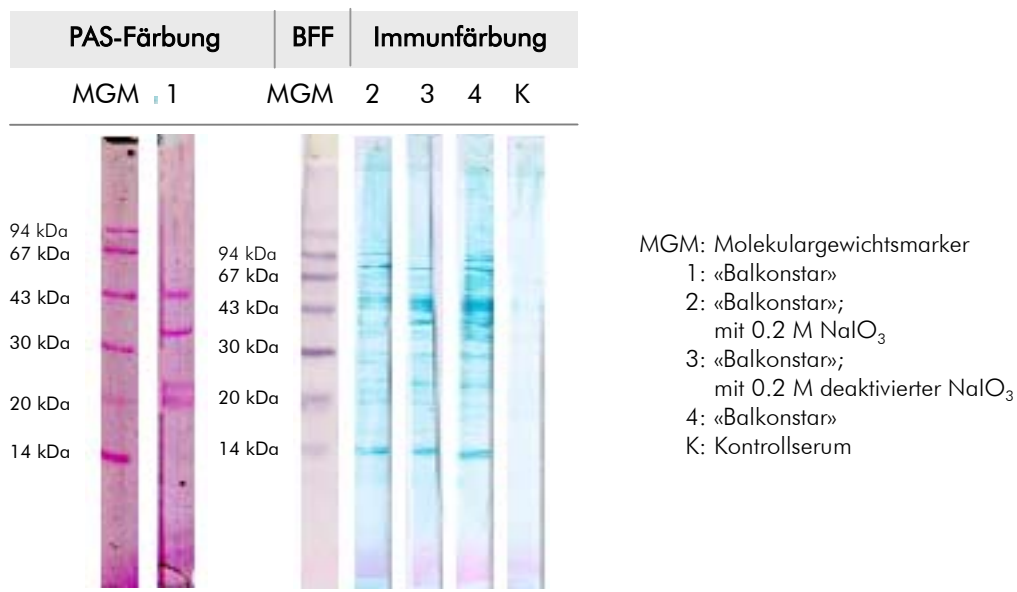


Abb. 4-16: Nachweis von Glycoproteinen im Extrakt der Sorte «Balkonstar» mittels PAS-Färbung sowie einer Inkubation mit Periodat folgendem Immunoblot

4.1.8.2 Nachweis mittels Lectinen

Eine im Vergleich zur PAS-Färbung weitaus empfindlichere Methode zum Nachweis von Glycoproteinen wird durch den Einsatz von Lectinen ermöglicht, welche spezifisch an Kohlenhydrate zu binden vermögen. Somit ist eine Spezifikation der Proteinbanden bezüglich ihres Kohlenhydratanteils möglich. Innerhalb dieser Arbeit erfolgte der Nachweis zum einem mit dem sogenannten Lectin-Blot zum anderen über eine Isolierung von Glycoproteinen mittels AC unter Verwendung von zwei unterschiedlichen Lectinliganden.

Lectin-Blot

Der Lectin-Blot basiert auf der Inkubation des elektrophoretisch getrennten und geblotteten Extraktes der Tomate mit Lectinen, welche HRP konjugiert sind und somit anschließend mittels TMB immunochemisch detektiert werden können (Durchführung siehe Anhang 7.15.3). Die unter Verwendung der Lectine Con A, PNA und RCA erzielten Ergebnisse werden in Abb. 4-17 wiedergegeben. Eine Inkubation mit dem Lectin Con A resultierte in der Detektion einer Vielzahl von Proteinen im Bereich von 18 bis 70 kDa. Der Vergleich mit dem ebenfalls in Abb. 4-17 dargestellten Allergenspektrum der Tomatenfrucht läßt vermuten, daß die Allergene N-glycosidisch an einem Glycanrest gebunden sind, welcher entweder α -Mannose, α -Glucose oder α -N-Acetylglucosamin enthält. Weitaus weniger Banden werden unter Verwendung des Lectins RCA detektiert. Dieses α - und β -Galactose spezifische Lectin, bindet lediglich an die

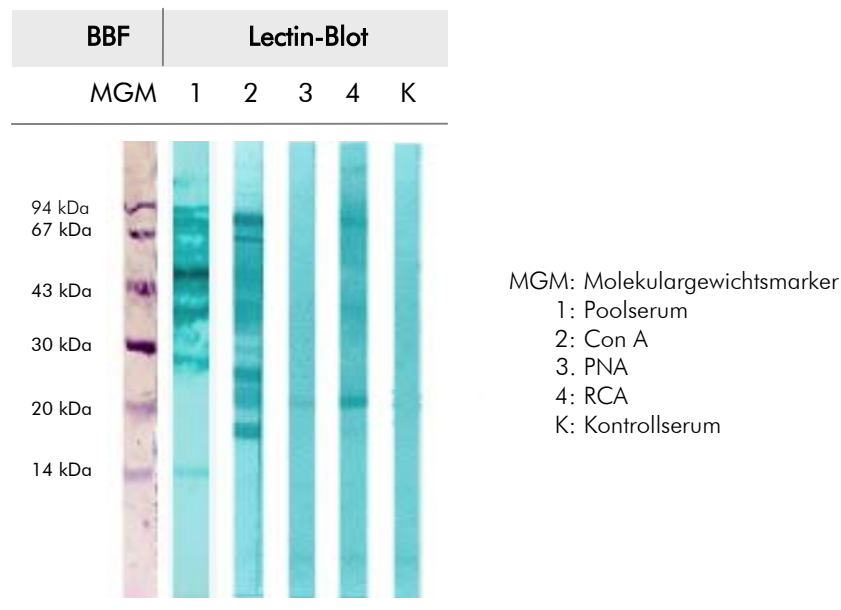


Abb. 4-17: Nachweis von Glycoproteinen im Extrakt der Sorte «Balkonstar» mittels Lectinen

Glycoproteine mit einem MG von 20 kDa und zeigte eine sehr schwache Bindung im oberen MG-Bereich zwischen 36 und 70 kDa. Eine spezifische Detektion an Glycoproteine der Tomate war dagegen mittels PNA nicht zu beobachten. Daraus kann geschlossen werden, daß die von PNA detektierbare Struktur N-Acetyl-galactosamin keine Rolle im Kohlenhydratanteil der Glycoproteine der Tomate spielt. Anhand des immungefärbten Extraktes der Tomate ohne

vorhergehende Inkubation mit Lectinen, bei welchem keine Banden visualisierbar waren, können unspezifische Bindungen ausgeschlossen werden.

Lectin-Affinitätschromatographie

Über die AC, bei welcher die Lectine RCA bzw. WGA auf der Trennsäule festphasengekoppelt vorlagen, erfolgte eine spezifische Bindung der Glycoproteine in Abhängigkeit der verwendeten Lectine. In einem Folgeschritt wurden die an die Lectine spezifisch gebundenen Komponenten von der Säule eluiert und elektrophoretisch sowie immunologisch untersucht (Durchführung siehe Anhang 7.15.4). Abb. 4-18a zeigt das Chromatogramm der Affinitätstrennung des Tomatenextraktes der Sorte «Estrella» unter Verwendung des Lectinliganden RCA. Es wird deutlich, daß ein Teil des Extraktes eine Affinität zum RCA aufwies und daran gebunden wurde. Durch Zugabe von Lactose - siehe gestrichelte Linie im Chromatogramm – erfolgte die spezifische Elution. Das Totvolumen sowie das Eluat wurden mittels SDS-PAGE hinsichtlich seiner Komponenten untersucht. Wie aus Abb. 4-18b ersichtlich wird, waren im Totvolumen nur wenige Proteine im unteren und oberen MG-Bereich erkennbar. Im Eluat waren indes eine Vielzahl von intensiv detektierten Banden im Bereich von 20 bis ca. 70 kDa vorhanden. Aufgrund ihrer hohen Detektionsintensität und ihres diffusen Erscheinungsbildes ließen sie sich nur noch schlecht einem exakten MG zuordnen bzw. voneinander differenzieren. Die unscharfe Trennung war dabei auf den Kohlenhydratanteil dieser Glycoproteine zurückzuführen. Im Vergleich zum Lectin-Blot unter Verwendung von RCA (vgl. Abb. 4-17), erfolgte eine Detektion der Proteine im gleichen MG-Bereich. Es zeigte sich jedoch ein Unterschied hinsichtlich der auftretenden Intensität. Durch die vorangestellte spezifische Abtrennung mittels der AC kam es zu einer Konzentrierung, welche in der Detektionsstärke der Glycoproteine zum Ausdruck kam. Anhand der spezifisch abgetrennten

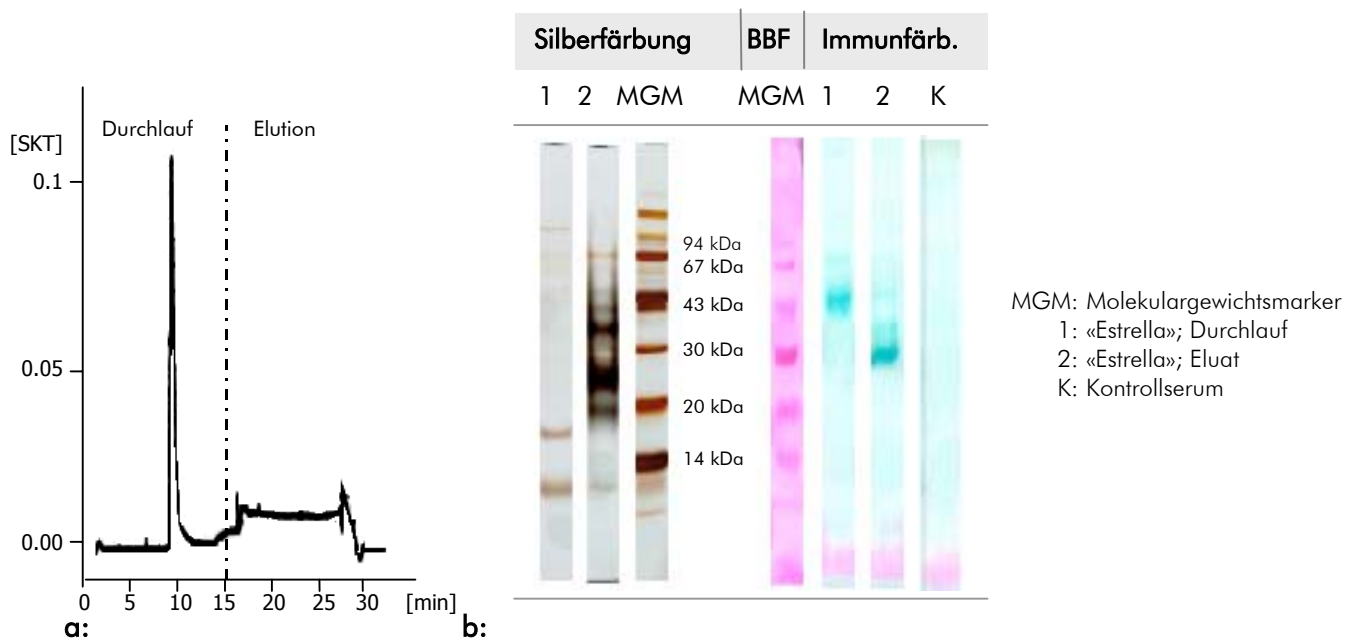


Abb. 4-18: **a:** Chromatogramm der Affinitätstrennung des Extraktes der Sorte «Estrella»
b: Silberfärbung und IB der Fraktionen dieser Trennung
 Lectinligand: RCA

Glycoproteine wurde zudem eine Immunfärbung unter Verwendung des Patientensерums durchgeführt, welche ebenfalls in Abb. 4-18b gezeigt ist. Während im Durchlauf eine unscharfe Bande bei 44 kDa zu erkennen war, wurde im Eluat ein IgE-bindendes Glycoprotein mit einem MG von 30 kDa visualisiert. Anhand dieses Ergebnisses kann geschlossen werden, daß es sich bei dem im Gesamtextrakt der Tomate apparenten 30 kDa-Allergen um ein Glycoprotein handelt, bei welchem α - bzw. β -Galactose am Aufbau des Kohlenhydratanteils beteiligt sind.

Das Chromatogramm der Affinitätstrennung des Tomatenextraktes unter Verwendung von WGA als Lectinliganden ist in Abb. 4-19a wiedergegeben. Auch hier ist anhand des Chromatogramms von einer deutlichen Bindung von Komponenten des Tomatenextraktes an den Säulenliganden auszugehen. Eine selektive Elution der gebundenen Komponenten erfolgte durch Zugabe von N-Acetylglucosamin (siehe gestrichelte Linie). In der Silberfärbung des konzentrierten Eluates waren über den gesamten Bereich von <14 kDa bis hin zu 94 kDa Glycoproteine visualisierbar, in deren Kohlenhydratanteil β -N-Acetylglucosamine vorhanden sind. Entsprechend des Eluates der AC unter Verwendung des Liganden RCA erschienen auch diese Banden ziemlich unscharf. Besonders auffällig sind die relativ diskreten Banden bei <14, 26, 37 und >67 kDa, welche jedoch im IB keine IgE-bindende Aktivität aufwiesen. Im Extrakt des Eluates sowie des Durchlaufes konnte unter Verwendung des Poolserums ein allergenes Glycoprotein mit einem MG von 44 kDa nachgewiesen werden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß es sich bei der im Gesamtallergenspektrum detektierten IgE-bindenden Bande bei 44 kDa um mehrere, unterschiedliche Proteine bzw. Glycoproteine handelt.

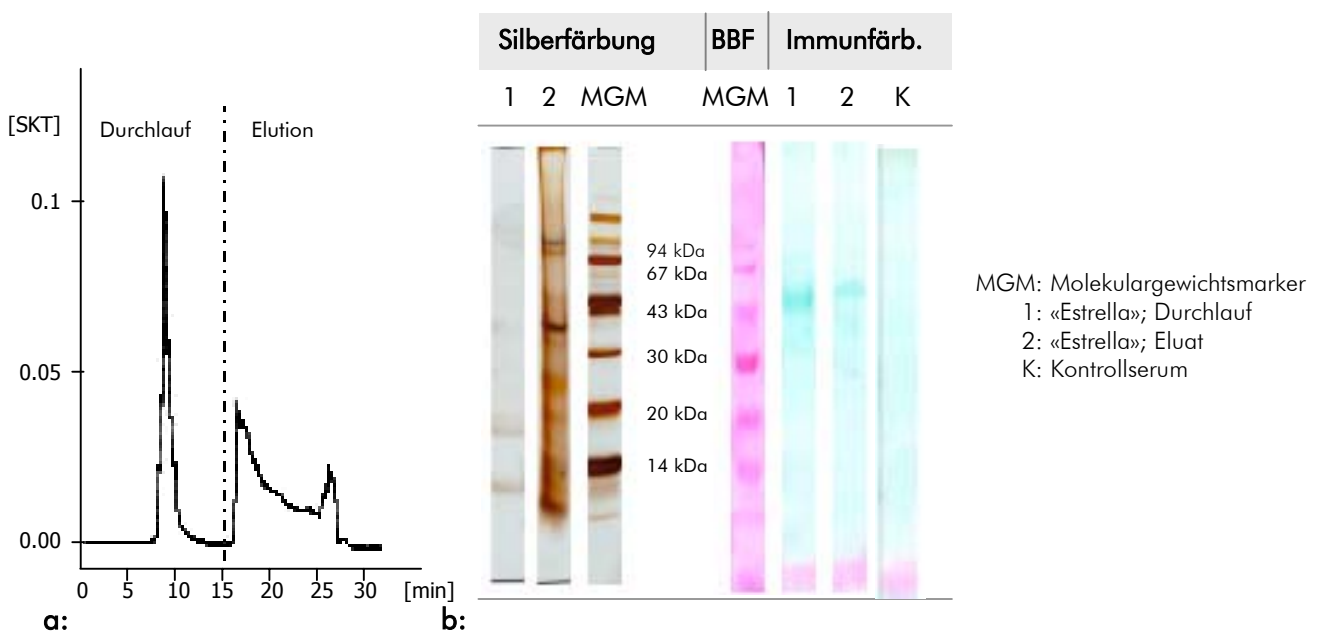


Abb. 4-19: a: Chromatogramm der Affinitätstrennung des Extraktes der Sorte «Estrella»
b: Silberfärbung und IB der Fraktionen dieser Trennung
Lectinligand: WGA

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß in der Tomatenfrucht eine Vielzahl von Glycoproteinen vorhanden sind. Durch die spezifische Abtrennung von Glycoproteinen unter Verwendung der beiden Lectine RCA und WGA konnte gezeigt werden, daß es sich zumindest bei einem Allergen mit einem MG von 44 kDa sowie bei einem 30 kDa Allergen um Glycoproteine handelt.

4.1.9 in-vitro Verdau

Anhand einer in-vitro Verdauung wurde die Stabilität der Tomatenallergene anhand der unbekannten Sorte gegenüber der proteolytischen Spaltung untersucht.

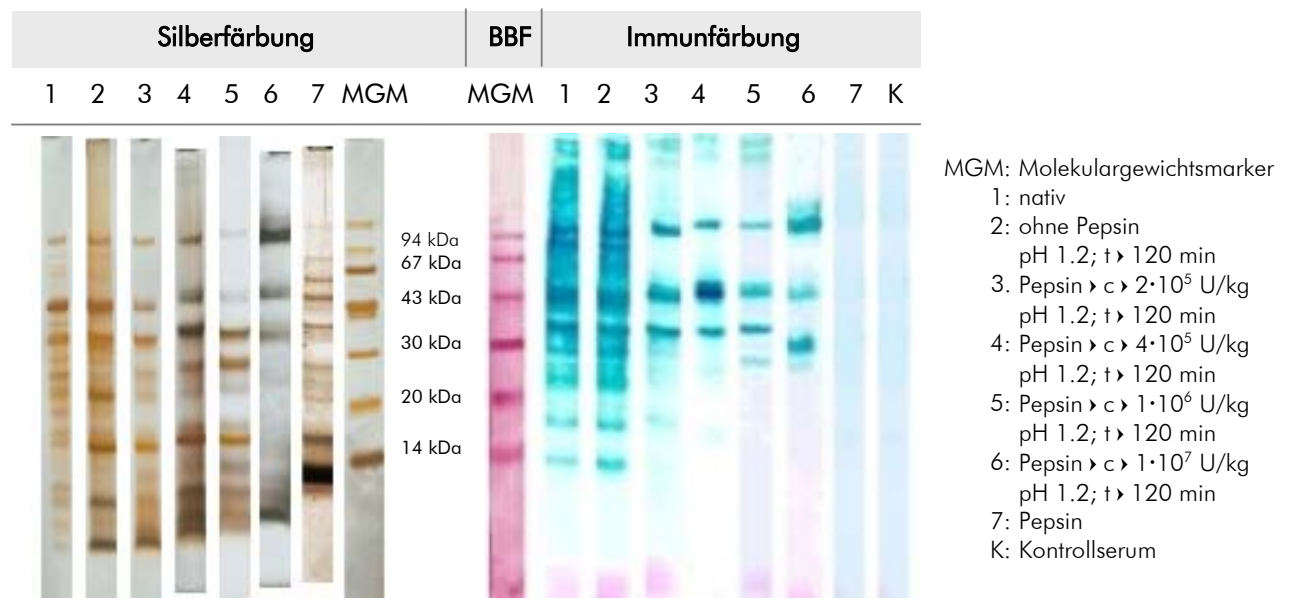


Abb. 4-20: Silberfärbung und IB der Extrakte der simulierten Magenverdauung

Simulierter Magenverdau

Im ersten Schritt wurden die Tomatenallergene zur Simulation der Magenverdauung einer Inkubation mit Pepsin bei einem pH von 1.2 unterworfen. Die Zeiten der Inkubation (30 - 120 min) wurden dabei ebenso wie die verwendeten Pepsinaktivitäten (2·10⁵ - 1·10⁷ U/kg) variiert. In Abb. 4.20 sind die unspezifisch angefärbten Gesamtproteinmuster sowie die spezifisch immungefärbten Blotstreifen unterschiedlich behandelter Tomaten dargestellt. Da die Inkubationsdauer der Pepsinlösungen keinen Einfluß auf die Veränderungen der Proteine bzw. Allergene besaß, wurde von den verwendeten Pepsinaktivitäten lediglich die Inkubationsdauer von 120 min repräsentativ für die anderen Versuchsvarianten dargestellt. Der Einfluß des niedrigen pH-Wertes auf die Proteine wurde anhand einer Inkubation der Tomaten mit einem sauren Medium (pH 1.2) ohne Pepsinzusatz überprüft. Dabei zeigten sich im Gesamtproteinmuster (2) im Vergleich zur nativen Frucht leichte Differenzen, welche sich hauptsächlich in der schwächeren Detektierbarkeit der Proteine im Bereich von 20 - 30 kDa und in der Ausbildung von neuen Proteinbanden im unteren MG-Bereich manifestierten.

Dagegen zeigte dieser Extrakt das für die Tomate spezifische Allergenmuster und ließ keine Unterschiede zu dem der nativen Tomate erkennen. Ein Einfluß des pH-Wertes auf die allergene Potenz konnte somit ausgeschlossen werden. Durch den Zusatz von $2 \cdot 10^5$ U/kg Pepsin wurden die Veränderungen im Gesamtproteinmuster (3) deutlicher. Im MG-Bereich >14 kDa konnten nur noch sechs diskrete Banden visualisiert werden und die Intensität und Anzahl der Banden <14 kDa nahmen zu. Mittels Immunfärbung waren nur noch die Allergene bei 18, 36, 44 und 70 kDa erkennbar. Dabei ist zu bemerken, daß die Intensität der Bande bei 18 kDa stark geschwächt war. Eine allergene Aktivität der neu entstandenen Proteine <14 kDa konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Eine Erhöhung der Pepsinaktivität auf $1 \cdot 10^6$ U/kg führte zu keinem weiteren Abbau der Proteine bzw. Allergene (4-5). Eine Erhöhung der Pepsinaktivität auf $1 \cdot 10^7$ U/kg führte hingegen zu einem weiterführenden Abbau der Proteine im mittleren MG-Bereich, welches anhand der Schwächung der Detektionsintensität erkennbar war (6). Zudem konnte das zuvor noch detektierbare Allergen mit einem MG von 36 kDa im Immunoblot (6) nicht mehr visualisiert werden. Allerdings wurde eine neue IgE-bindende Bande mit einem etwas geringeren MG von ca. 30 kDa visualisiert, welche weder im nativen noch in den mit Pepsin behandelten Extrakten nachweisbar war. Unspezifische Banden konnten anhand eines mit dem Serum eines Nichtallergikers inkubierten Blotstreifens ausgeschlossen werden. Zudem konnte dem Pepsin im Immunoblot (7) keine IgE-bindende Aktivität nachgewiesen werden.

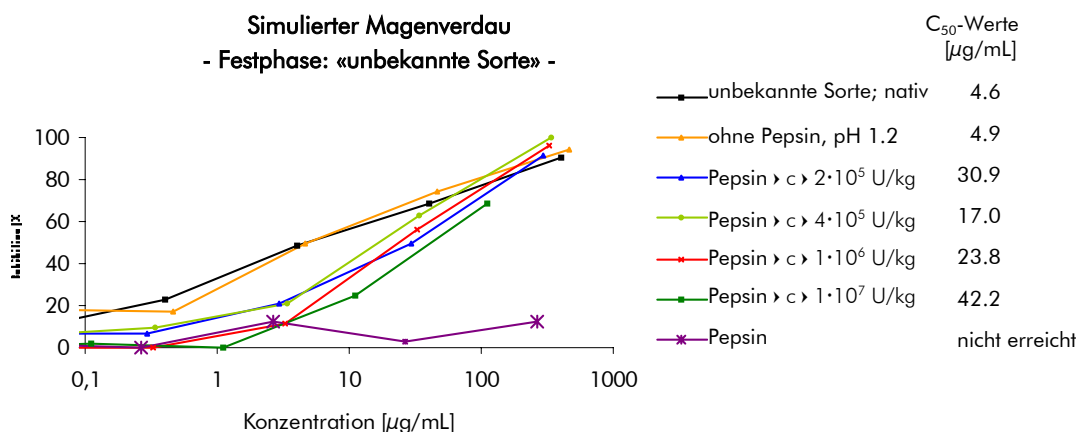


Abb. 4-21: Inhibitionsgraphen unterschiedlicher Extrakte der simulierten Magenverdauung
Festphase: «unbekannte Sorte»; nativ

Zur relativen Quantifizierung der allergenen Potenz wurde eine EAST-Inhibition, bei welcher die native Tomate festphasengekoppelt vorlag, durchgeführt. Deren graphische Auswertung ist in Abb. 4.21 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, daß die Inhibitionskurve des Pepsins bzw. der Pepsinlösung nicht ansteigt und von diesem somit keine allergene Aktivität ausgeht. Durch den Zusatz von Pepsin zur Tomate kam es jedoch zum Abbau der Tomatenproteine und damit verbunden zur Reduktion des allergenen Potentials, welches sich im flacheren Inhibitionskurvenverlauf der Pepsin behandelten Tomaten widerspiegelt. Allerdings kann von keinem signifikanten Unterschied zwischen den mit unterschiedlichen Pepsinaktivität behandelten Tomaten gesprochen werden. Die ermittelten C_{50} -Werte dieser Extrakte schwankten in einem Bereich zwischen 17.0 und 42.2 $\mu\text{g/mL}$, wobei kein Anstieg mit

steigender Pepsinkonzentration festzustellen war. Der pH-Wert von 1.2 hat entsprechend dem Ergebnis des Immunoblots keinen Einfluß auf das allergene Potential, da die Inhibitionskurven als auch die C_{50} -Werte der nativen und der pH-behandelten Tomate nahezu identisch waren. Insgesamt konnten die elektrophoretisch erzielten Ergebnisse, bei welcher zwar eine Reduktion aber keine Eliminierung der IgE-Bindungsfähigkeit festgestellt wurde, bestätigt werden.

Simulierter Darmverdau

Im zweiten Schritt sollte der Einfluß der proteolytischen Enzyme des Dünndarms auf die IgE-Bindungsfähigkeit der Tomatenallergene untersucht werden. Entsprechend der Verdauung schloß sich der in-vitro Darmverdau dem simulierten Magenverdau (pH 1.2; $c > 1 \cdot 10^6$ U/kg; $t > 120$ min) an. Dabei wurde der mit Pepsin behandelte Extrakt mit den Enzymen Trypsin, bzw. Pankreatin und zusätzlich Proteinase K über verschiedene Zeiträume inkubiert (60 - 120 min). Abb. 4-22 liefert eine Darstellung der durchgeführten Färbung der verwendeten Einzelenzyme sowie ausgewählter Extrakte der in-vitro Darmverdauung. Wie schon in den mit Pepsin inkubierten Extrakten zeigten sich in der unspezifischen Anfärbung der Extrakte der simulierten Darmverdauung eine Reihe von neuen Proteinbanden im unteren MG-Bereich. Anhand des Immunoblots konnte diesen Proteinen in keinem Extrakt eine allergene Aktivität nachgewiesen werden. Nach dem Verdau der Tomaten unter Verwendung des Trypsins (2) war im Immunoblot weiterhin die IgE-bindende Bande bei 44 kDa visualisierbar. Zudem war eine Bande bei 30 kDa apparent, welche durch die weitere Hydrolyse des 36 kDa Allergens

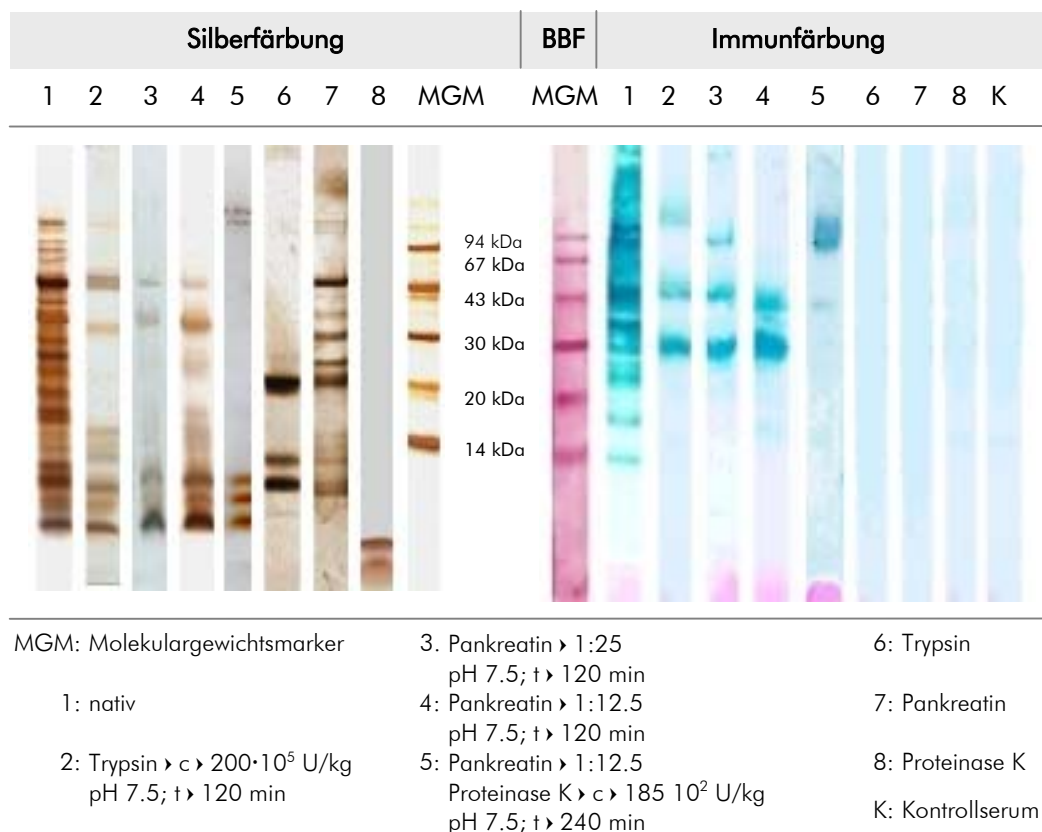


Abb. 4-22: Silberfärbung und IB der Extrakte der simulierten Darmverdauung

zustande gekommen sein könnte, da nach erfolgter Pepsininkubation (vgl. Abb. 4-20) diese noch vorhanden war. Weiterhin kam es zum Abbau der allergenen Bande mit einem MG von 70 kDa und zur Entstehung einer allergenen Bande oberhalb von 94 kDa. Der Verdau mit dem Enzymgemisch Pankreatin (3) lieferte ähnliche Ergebnisse wie der zuvor beschriebene Verdau unter Verwendung von Trypsin. Allerdings kam es durch Zusatz von Pankreatin zu keinem enzymatischen Abbau des 70 kDa-Allergens, welche sich im Immunoblot weiterhin zeigte. Erst eine Erhöhung der Enzymaktivität führte zur Hydrolyse dieses Allergens (4). Die Allergene mit einem MG von 30 und 44 kDa zeigten sich dagegen weiterhin überaus resistent. Die an eine Behandlung mit Pankreatin (pH 7.5, 1:12.5; t > 120 min) anschließende Inkubation mit Proteinase K (5) wies in der unspezifischen Silberfärbung keine charakteristischen Tomatenproteine mehr auf. Unterhalb <14 kDa zeigten sich 3 Banden, welche in den zuvor enzymatisch behandelten Extrakten ebenso erkennbar waren. Im oberen MG-Bereich >94 kDa waren jedoch zwei neue Proteinbanden detektierbar, welche in der anschließenden Immunfärbung eine IgE-bindende Aktivität zeigten. Während die allergene Bande bei 36 kDa nicht mehr nachweisbar war, wurde die 44 kDa mit deutlich verminderter Intensität visualisiert.

Daß es sich bei den Banden >94 kDa nicht um Proteine aus den Enzymen handelte, konnte anhand der Immunfärbungen der Einzelenzyme (6-8) unter Verwendung des Poolserums bestätigt werden. Auf diesen Blotstreifen waren keine Banden sichtbar. Durch Inkubation der einzelnen Extrakte mit dem Serum eines Nichtallergikers konnten zudem unspezifische Bindungen ausgeschlossen werden (nicht abgebildet).

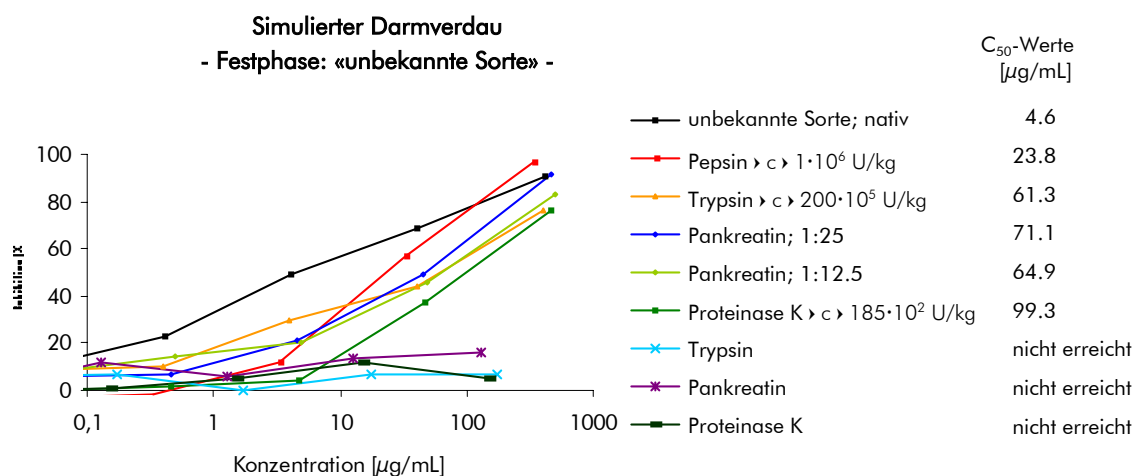


Abb. 4-23: Inhibitionsgraphen unterschiedlicher Extrakte der simulierten Darmverdauung
Festphase: «unbekannte Sorte»; nativ

Das potentiell verbliebene allergene Potential der Tomaten des simulierten Darmverdaus wurde mittels der EAST-Inhibition untersucht. Aus Abb. 4-23 ist zwar eine Reduzierung jedoch keine Eliminierung der allergenen Aktivität der Tomaten der in-vitro Darmverdauung erkennbar. Durch die Inkubation mit den darmspezifischen Enzymen kam es im Vergleich zu den mit Pepsin verdauten Extrakten zu einer weiteren Verminderung der allergenen Potenz, welches sich in den etwas flacher verlaufenden Inhibitionskurven und den zu höheren Proteinkonzentrationen verschobenen C_{50} -Werten (61.3 - 99.3 $\mu\text{g/mL}$) äußerte. Dabei zeigte

der mit Proteinase K inkubierte Extrakt mit einem C_{50} -Wert von $99.3 \mu\text{g/mL}$ die geringste Aktivität. Entsprechend dem Immunoblot zeigten die verwendeten Enzyme auch in der EAST-Inhibition keine allergene Potenz.

4.1.10 Kreuzreaktivitäten

Die Kreuzreaktivität zwischen Tomaten und Inhalationsallergenen wird in der Literatur oftmals beschrieben. Allerdings wurde bislang noch nicht untersucht, inwieweit sich diese Assoziation auf eine Kreuzreaktivität zu anderen Früchten auswirkt. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit die birkenpollenassoziierten Lebensmittel Apfel, Haselnuß und Sellerie sowie die exotischen Lebensmittel Banane und Litchi auf eine eventuell existente Kreuzreaktivität untersucht. Ergänzend dazu wurde auf eine potentielle Assoziation zu den botanisch verwandten Gemüsearten Kartoffel und Paprika getestet. Um die Resultate der Untersuchung überprüfen zu können, wurden die einzelnen Methoden parallel mit dem tierischen und somit nicht kreuzreaktiven Hühnerei als Negativkontrolle durchgeführt. Die für die immunologischen Untersuchungen verwendeten Einzelseren, welche mit Ausnahme des Hühnereies gegen die einzelnen Lebensmittel eine EAST-Klasse ≥ 2 aufwiesen, sind im Anhang 7.19 aufgeführt. Für die Detektion der Eiallergene stand ein Serum mit einem sehr hohen spezifischen IgE-Gehalt gegen Hühnerei zur Verfügung. In Abb. 4-24 sind die Silberfärbung und der unter Verwendung des zusammengestellten Poolserums durchgeführte IB dokumentiert. Sämtliche Extrakte zeigten in der Silberfärbung eine Vielzahl von Proteinen, welche über einen weiten

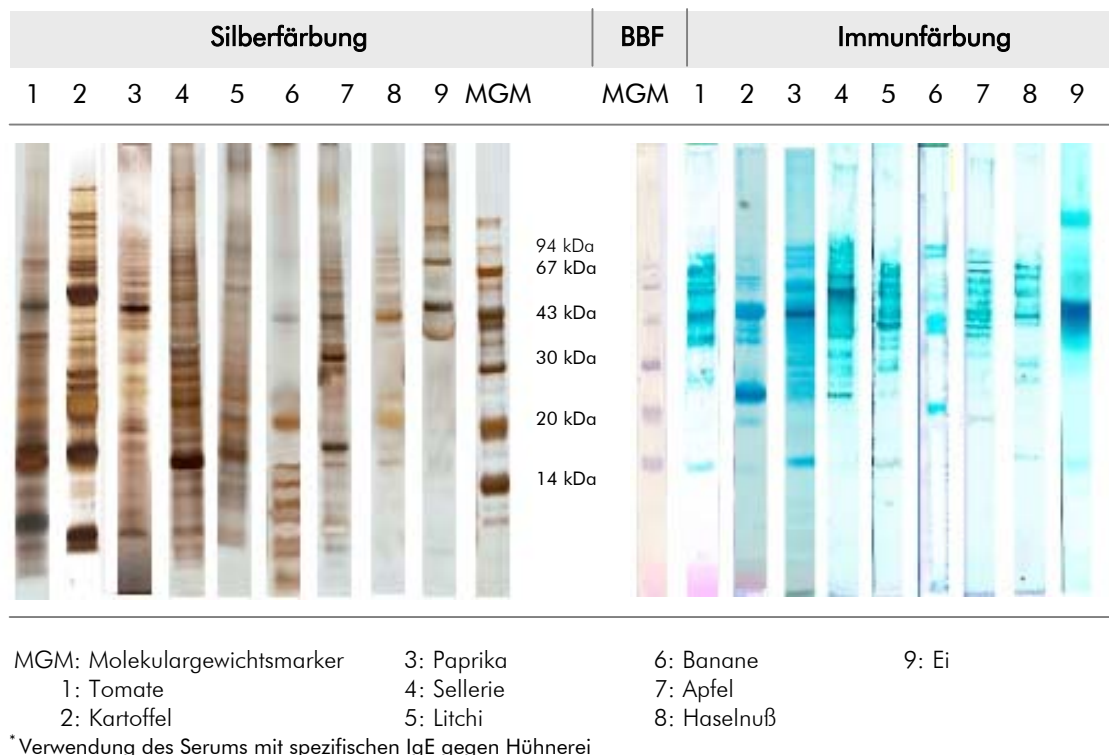


Abb. 4-24: Silberfärbung und Immunoblot verschiedener Frucht- & Gemüseextrakte

MG-Bereich verteilt sind. Der IB der Tomate (1) zeigte mit Ausnahme des Allergens mit einem MG von 18 kDa das in Kapitel 4.1.1 beschriebene Allergenspektrum. Im Kartoffelextrakt

konnte das von SEPPÄLÄ et al. [1999] beschriebene Hauptallergen Sol t 1 (Patatin) mit einem MG von 43 kDa sowie die Allergene Sol t 2 - 4 im MG-Bereich zwischen 16 und 23 kDa [SEPPÄLÄ et al. 2001] visualisiert werden. Zudem waren weitere Allergene bei 14 kDa und, entsprechend den Ergebnissen von WAHL et al. [1990] im Bereich von 36 bis 65 kDa vorhanden. Die bisher in der Literatur beschriebenen IgE-bindenden Proteine der Paprika im Bereich zwischen 23 und 50 kDa [LEITNER et al. 1998] konnten im untersuchten Paprikaextrakt bestätigt werden. Zusätzlich wurde eine allergene Bande bei 14 kDa und weitere oberhalb von 50 kDa detektiert. Die bei einem MG von ca. 44 kDa visualisierte Bande trat dabei besonders intensiv hervor. Im untersuchten Sellerieextrakt waren Allergene im Bereich von 23 - 70 kDa apparent, wobei die Banden bei 23 und 60 kDa besonders deutlich hervortraten. Die Hauptallergene Api g 1 und Api g 2 mit MG von 16 bzw. 17 kDa [BAUER et al. 1996; JANKIEWICZ et al. 1998] konnten dagegen nicht visualisiert werden. Der Litchiextrakt wies IgE-bindende Proteine bei 14 und 23 kDa sowie im Bereich von 30 bis 94 kDa auf, wobei das von FÄH et al. [1995] beschriebene pollenassoziierte Allergen bei 16 kDa nicht detektiert werden konnte. Im Extrakt der Banane wurden Allergene im Bereich von 40 - 43 kDa detektiert, wobei in der Literatur bislang nur Proteine mit einem MG von 30 - 37 kDa beschrieben worden sind [SANCHEZ-MONGE et al. 1999]. Das Hauptallergen des Apfels Mal d 1 mit einem MG von 18 kDa [EBNER et al. 1991, VANEK-KREBITZ et al. 1995] wurde neben weiteren, bereits in der Literatur erwähnten IgE-bindenden Proteinen bei 31, 35, 50, 60 und 67 kDa [HSIEH et al. 1995, VIETHS et al. 1992a, HEISS et al. 1996] deutlich detektiert. Im Extrakt der Haselnuß wurden die Minorallergene bei 14 kDa und im Bereich zwischen 40 und 69 kDa [CABALLERO et al. 1997] detektiert. Das von HIRSCHWEHR et al. [1992] beschriebene Hauptallergen der Haselnuß bei 18 kDa konnte dagegen nicht nachgewiesen werden. Unter Verwendung des Serums des Ei-Allergikers wurde im Immunoblot des Hühnereies das Hauptallergen Ovalbumin bei einem MG von 43 kDa sehr intensiv detektiert. Daneben zeigte sich eine weitere allergene Bande bei 28 kDa, welche dem von BESLER et al. [1997] identifizierten Ovomucoid zuzuordnen ist.

Die durchgeführte IB-Inhibition mit den verschiedenen Inhibitoren an der elektrophoretisch aufgetrennten und geblotteten Tomate ist in Abb. 4-25 wiedergegeben. Die ohne Inhibitor durchgeführte Immunfärbung (1) wies das bereits beschriebene charakteristische Allergenspektrum der Tomate auf. Eine mit Ovalbumin als Inhibitor durchgeführte Inkubation (2) zur Prüfung auf eine unspezifische Inhibition zeigte keine Veränderung und keine Schwächung der detektierten Banden. Die Inkubation mit dem Extrakt des Hühnereies führte ebenfalls zu keiner Veränderung des Allergenspektrums der Tomate. Dementsprechend konnte eine unspezifische Hemmung der Bandenvisualisierung ausgeschlossen werden. Durch die homologe Inhibition der Tomate (3) kam es zu einer vollständigen Auslöschung sämtlicher Banden. Entsprechend der Tomate führte auch die Inkubation mit den Extrakten der Kartoffel (4) und Paprika (5) zu einer Inhibition aller IgE-bindenden Proteine, so daß keine Banden mehr visualisierbar waren. Der Sellerieextrakt (6) bewirkte ebenfalls eine sehr starke Inhibition der Tomatenallergene. Lediglich das 44 kDa-Allergen war in stark geschwächter Intensität nachzuweisen. Während nach Inkubation mit dem Extrakt des Apfels (10) nur noch eine Bande bei 65 kDa nachzuweisen war, konnte zusätzlich zu dem 65 kDa-Allergen die allergene Bande bei 44 kDa durch den Extrakt der Banane (10) nicht inhibiert werden. Ein etwas schwächeres Inhibitionsvermögen zeigte der Extrakt der Litchi (9), bei welchem die IgE-bindenden Proteine bei 44, 36 und 26 kDa noch detektierbar waren. Die Inkubation mit dem Extrakt der Haselnuß

(11) führte lediglich zur Hemmung des 14 kDa-Allergens. Die anderen Banden waren in z.T. leicht geschwächter Intensität noch deutlich visualisierbar.

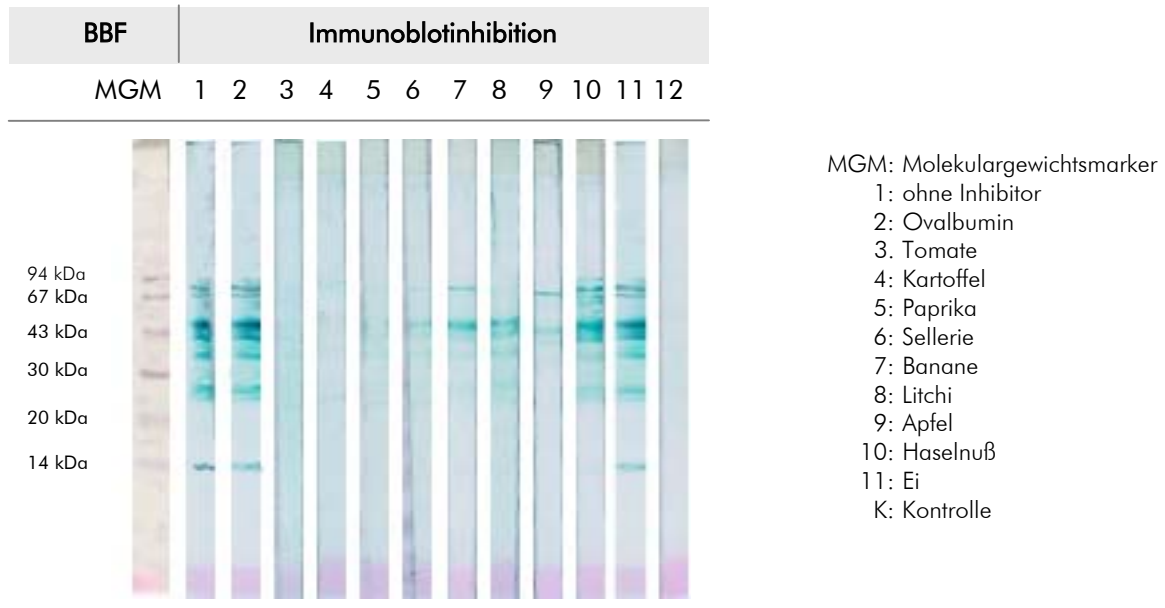


Abb. 4-25: IB-Inhibition verschiedener Extrakte
 elektrophoretisch getrennter Extrakt: Tomate

Zusätzlich zur IB-Inhibition wurde eine EAST-Inhibition, bei welcher die Tomate festphasengekoppelt vorlag, durchgeführt. In Abb. 4-26 & 4-27 sind die Inhibitionen der untersuchten Extrakte graphisch dargestellt. Die Inhibitionskurven der Gemüseextrakte aus Kartoffel, Paprika und Sellerie weisen einen fast identischen Verlauf auf, welcher sich ebenso in ihren C_{50} -Werten, die zwischen 12.7 - 22.6 $\mu\text{g/mL}$ kaum voneinander differierten, bestätigte. Im Vergleich zur homologen Inhibition der Tomate mit einem C_{50} -Wert von

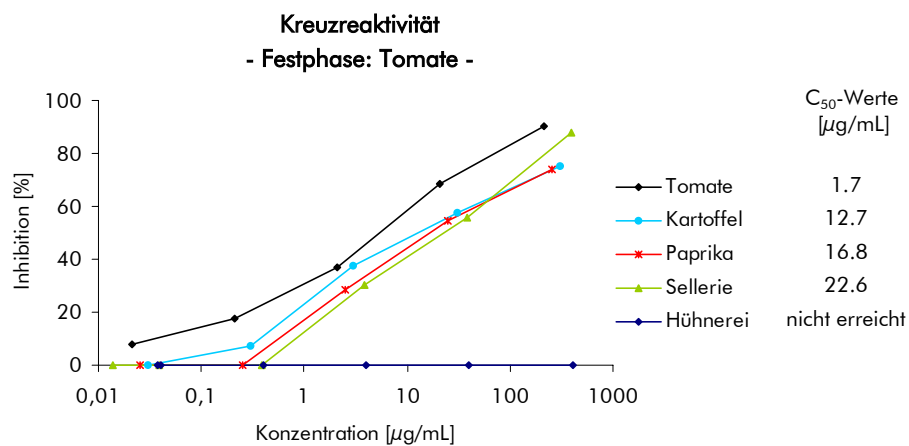


Abb. 4-26: Inhibitionsgraphen verschiedener Extrakte
 Festphase: «Balkonstar»

1.7 $\mu\text{g/mL}$ waren sie nur leicht zu höheren Proteinkonzentrationen verschoben. Einen etwas stärker erhöhten C_{50} -Wert wies der Extrakt des Apfels mit einer Konzentration von 41.8 $\mu\text{g/mL}$ auf, welcher sich ebenfalls im Verlauf der Inhibitionskurve widerspiegelte. Einen im Vergleich zur homologen Inhibition weitaus flacheren Kurvenverlauf besaßen die Extrakte der Banane, Litchi und Haselnuß. Dabei konnte die inhibierende Wirkung der Bananen- und Litchiextrakte aufgrund der C_{50} -Werte (86.5 & 88.8 $\mu\text{g/mL}$) und der erreichten maximalen Inhibitionen (75 & 71 %) als annähernd identisch angesehen werden. Die schwächste Inhibitionswirkung zeigte dagegen die Haselnuß mit einer maximalen Inhibition von 58 % und einem C_{50} -Wert von 172 $\mu\text{g/mL}$. Anhand des Kurvenverlaufes und der nicht erreichten 50 %igen Inhibition des Hühnereiextraktes konnten zudem unspezifische Inhibitionen ausgeschlossen werden.

Entsprechend der Inhibitionsversuche der verschiedenen Extrakte an der festphasen- gebundenen Tomate wurden die Extrakte der unterschiedlichen Gemüse bzw. Früchte an eine Festphase gekoppelt und mit der Tomate inhibiert. Die Ergebnisse dieser IB-Inhibitionen sind in den Abb. 4-28 und 4-29 dargelegt. Die Prüfung auf eine unspezifische Inhibition mittels einer Ovalbuminlösung führte mit Ausnahme des Hühnereies zu keiner Veränderung des

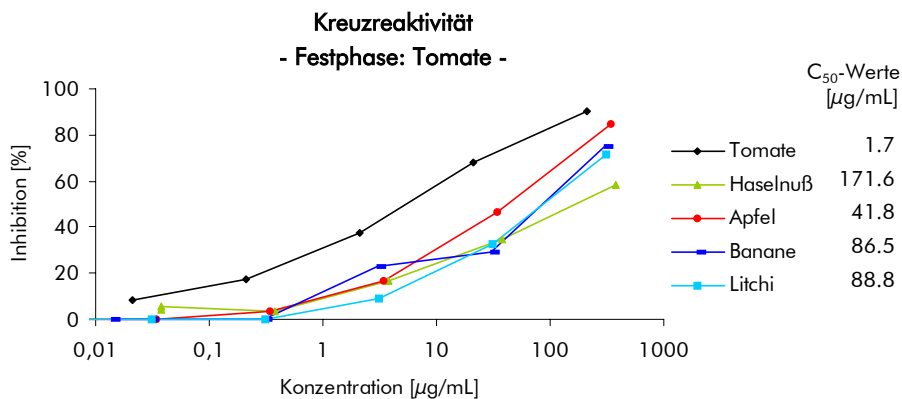


Abb. 4-27: Inhibitionsgraphen verschiedener Extrakte
Festphase: «Balkonstar»

mittels Poolserum detektierbaren Allergenspektrums. Beim Hühnerei kam es dagegen erwartungsgemäß zur fast vollständigen Eliminierung der Bande bei 60 kDa, dem Ovalbumin. Eine homologe Inhibition führte ebenfalls zur kompletten Hemmung der Bandenvisualisation.

Während nach der Inkubation des elektrophoretisch aufgetrennten Kartoffelextraktes mit dem Extrakt der Tomate noch schwache allergene Banden im Bereich von 20 kDa und 43 kDa vorhanden waren, führte eine homologe Inkubation zur vollständigen Eliminierung. Die Inkubation der festphasengebundenen Extrakte Paprika und Sellerie mit dem Extrakt der Tomate resultierten in einer der homologen Inhibitionen entsprechenden Hemmung der Bandenvisualisation. Die im Bananenextrakt sehr intensiv visualisierte Bande bei 43 kDa konnte durch den Tomatenextrakt nicht vollkommen inhibiert werden und war dementsprechend noch als schwache Bande detektierbar. Die Bindung des spezifischen IgE an das 50 kDa-Allergen der Litchi konnte durch eine Inkubation mit dem Extrakt der Tomate nicht verhindert werden, so daß diese Bande weiterhin visualisierbar war. Die Detektion der anderen Litchiallergene wurde entsprechend der homologen Inhibition gehemmt.

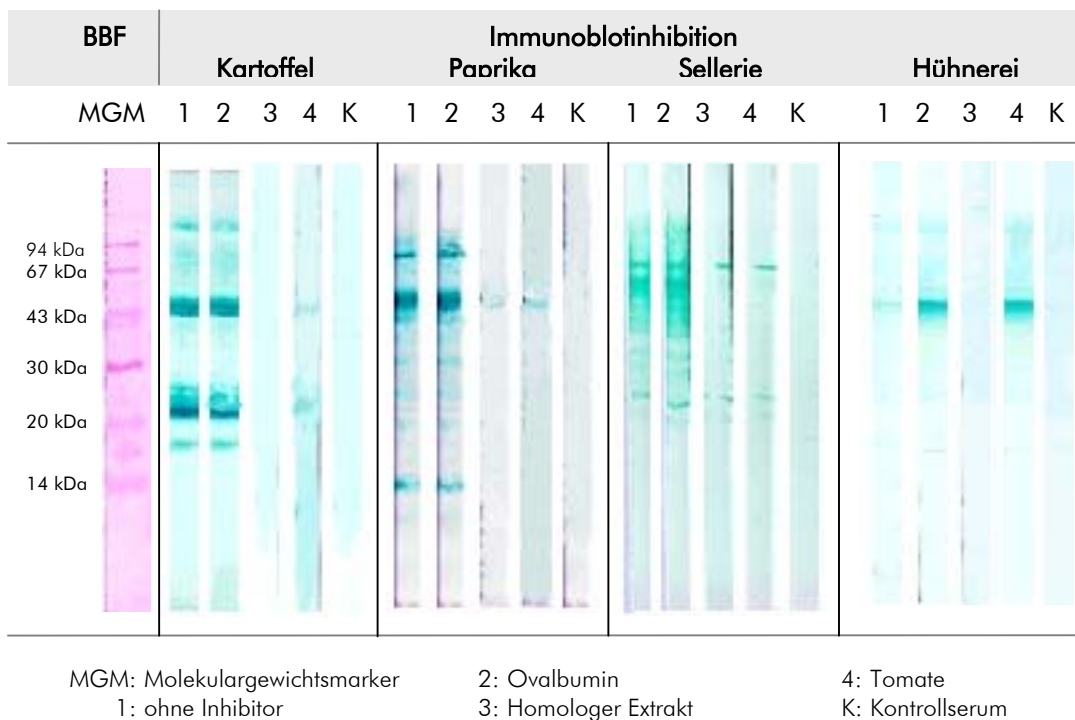


Abb. 4-28: IB-Inhibition der Tomate
 elektrophoretisch getrennter Extrakte: Kartoffel, Paprika, Sellerie bzw. Hühnerei

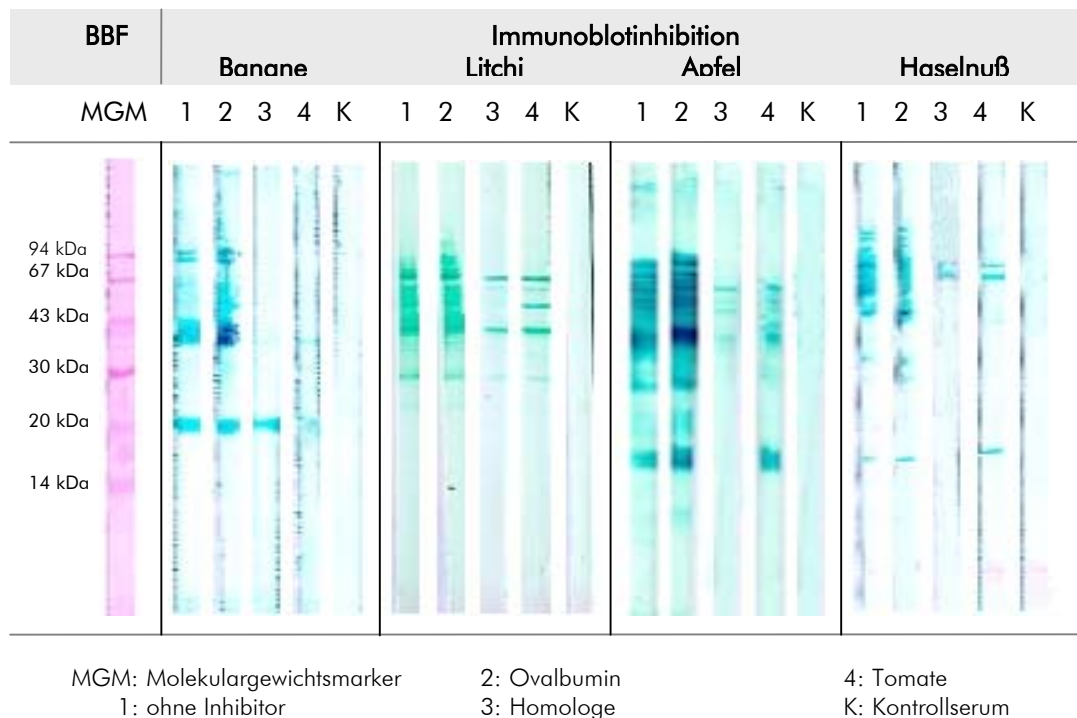


Abb. 4-29: IB-Inhibition der Tomate
 elektrophoretisch getrennter Extrakte: Banane, Litchi, Apfel bzw. Haselnuß

Das im Apfelextrakt intensiv detektierte Hauptallergen Mal d 1 konnte durch die homologe Inhibition vollständig inhibiert werden, wohingegen eine Inkubation mit dem Extrakt der Tomate zu keiner Verminderung der Detektionsintensität führte. Beim Haselnußextrakt kam es durch die Tomate ebenfalls zu einer Eliminierung großer Teile des Allergenspektrums, wobei eine Inhibition des Hauptallergens der Haselnuß mit einem MG von 18 kDa nicht erfolgte.

Die Ergebnisse der IB-Inhibition wurden anhand einer EAST-Inhibition verifiziert. Wiederum lagen die Extrakte der verschiedenen Gemüse und Früchte festphasengebunden vor und wurden mit dem Extrakt der Tomate inhibiert. In Abb. 4-30 sind die resultierenden C_{50} -Werte der einzelnen Inhibitionen dargestellt. Die EAST-Inhibitionen der festphasengebundenen Extrakte Kartoffel, Paprika und Sellerie zeigten nur leicht voneinander differierende Inhibitionskurven (nicht dargestellt) und C_{50} -Werte des Tomatenextraktes im Vergleich zur homologen Inhibition.

Während die maximale Inhibition des homologen Apfelextraktes 86 % erreichte, induzierte der

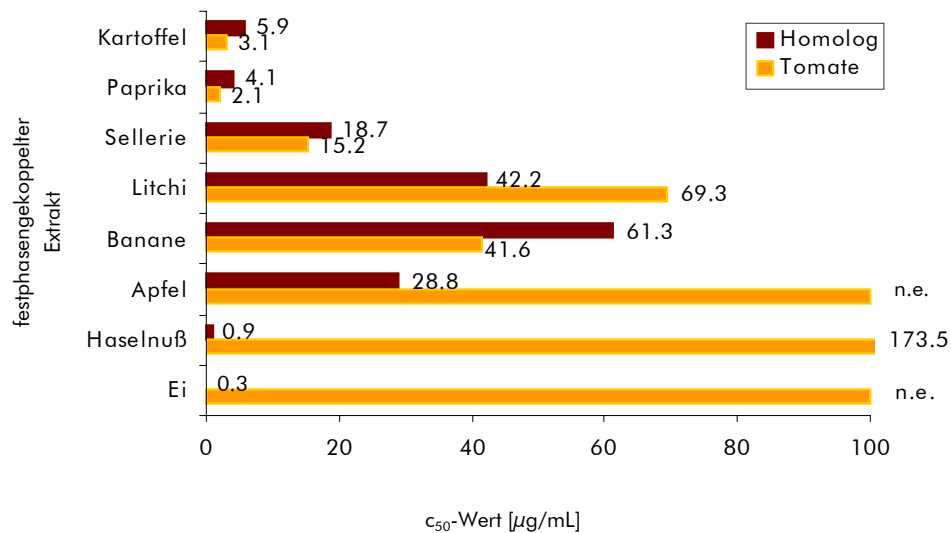


Abb. 4-30: Darstellung der C_{50} -Werte der EAST-Inhibition

n.e.: nicht erreicht

Tomatenextrakt lediglich eine maximale Inhibition von 26 % und erreichte somit auch kein C_{50} -Wert. Gegenüber des festphasengekoppelten Haselnußextraktes zeigte der Tomatenextrakt ebenfalls eine geringe inhibierende Wirkung. Während der C_{50} -Wert der homologen Inhibition bei 0.9 µg/mL lag, wurde zur Erreichung einer 50 %igen Inhibition eine Konzentration von 173 µg/mL des Tomatenextraktes benötigt.

Die zur Kontrolle auf unspezifische Inhibition mitgeführte EAST-Inhibition des Hühnereiextraktes lieferte das erwartete Ergebnis. Die Inhibition des Tomatenextraktes führte zu einer maximalen Hemmung von 5 % und dementsprechend zu keinem C_{50} -Wert.

4.2 Isolierung von Tomatenallergenen

In den folgenden Kapiteln werden die erarbeiteten Ansätze zur Isolierung von Tomatenallergenen detailliert dargestellt.

4.2.1 Isolierung des 44 kDa Allergens

Eines der interessantesten Allergene der Tomatenfrucht stellt ein IgE-bindendes Protein mit einem MG von 44 kDa dar. Aufgrund seiner herausragenden Bedeutung hinsichtlich seiner hohen Detektionshäufigkeit der Einzeleren sowie der Kreuzreaktivität sollte eine Methode zur Isolierung dieses Allergens entwickelt werden.

4.2.1.1 IEC

Anhand der IEF (vgl. 4.1.2) konnte gezeigt werden, daß die stärkste allergene Aktivität der Tomaten zwischen den isoelektrischen Punkten 5.8 und 5.9 vorliegt. Unter Verwendung der zweidimensionalen Elektrophorese (vgl. 4.1.3) wurde die Apparenz des 44 kDa Allergens in diesem pI-Bereich belegt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde im ersten Schritt der Isolierung dieses Allergens eine IEC mit einer Anionenaustauschersäule (Material Source™ 15 Q) angewendet. In Anlehnung an die von SEPPÄLÄ et al. [1999] modifizierte Methode nach BALESTRIERI et al. [1990] wurde ein 0.02 mol/L Tris-Puffer (pH 8.0) mit einem Salzgradienten von 0 bis 0.5 mol/L NaCl verwendet. Die genauen Trennbedingungen sind dem Anhang 7.16.1 zu entnehmen.

Zur Überprüfung der Trennleistung der Säule als auch zur Optimierung des Gradienten wurden Standardproteine mit einem bekannten pI eingesetzt. Für eine spätere Abschätzung der pI der jeweiligen Proteinfractionen wurde anhand der optimierten Bedingungen eine Kalibrierung durchgeführt. Die annähernd linear verlaufende Kalibriergerade ist in Abb. 4-31 dargestellt. Die verwendeten Standards als auch die dazugehörigen Konzentrationen und Retentionszeiten sind im Anhang in Tab. 7-6 aufgeführt.

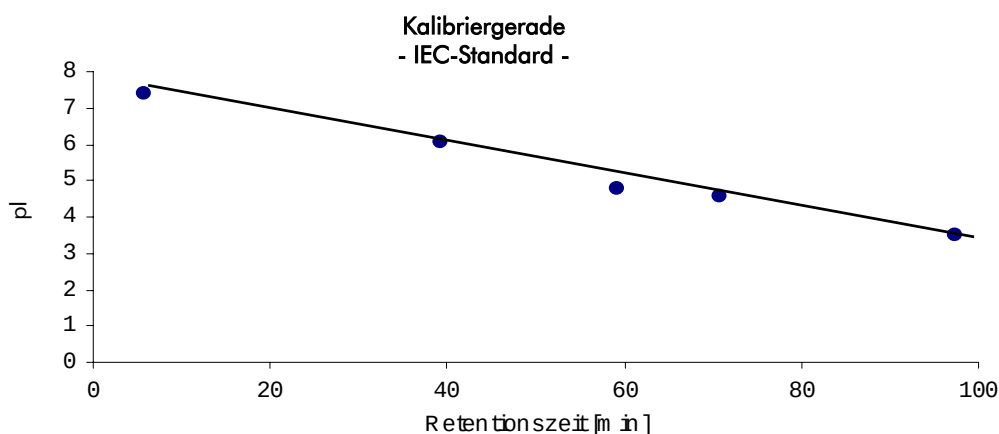


Abb. 4-31: Kalibriergerade der IEC
 $R^2 : 0.9881$

Da die IEC durch einen hohen Salzgehalt erheblich gestört und die Trennleistung deutlich herabgesetzt wird, wurden die Proteine aus dem Acetonpulver nicht wie üblich mittels PBS extrahiert, sondern unter Verwendung des in der Chromatographie eingesetzten Tris-Puffers. Anhand einer SDS-PAGE mit anschließendem Immunoblot sowie einer EAST-Inhibition (Ergebnisse nicht aufgeführt) konnte sichergestellt werden, daß dieser Extrakt die gleichen Proteine bzw. Allergene und allergene Potenz wie der PBS-Extrakt aufwies. In Abb. 4-32 ist ein Chromatogramm des mittels IEC aufgetrennten Tomatenextraktes der unbekannten Sorte dargestellt.

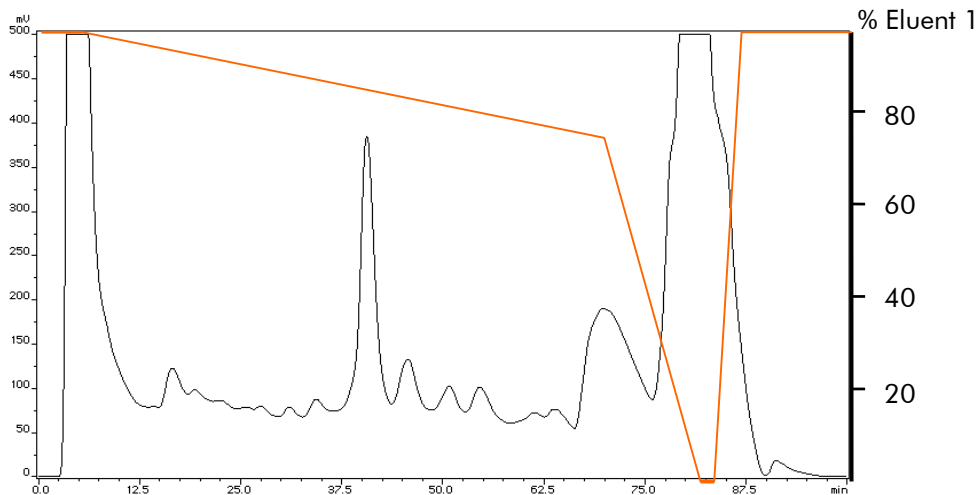


Abb. 4-32: Chromatogramm der IEC-Trennung des Tomatenextraktes der unbekannten Sorte

— : Gradient

Die bei 214 nm detektierbaren Substanzen verteilen sich über den gesamten auftrennbaren pI-Bereich, wobei viele Komponenten bereits im Totvolumen der Säule nach ca. 4 min eluieren. Hierbei handelt es sich zum einen um nichtionische und UV-aktive Substanzen der Probenmatrix, zum anderen werden sämtliche Proteine mit einem $pI \geq 8.0$ an der Anionenaustauschersäule nicht retardiert, da sie in diesem Elutionspuffer positiv geladen vorliegen. Bei einer Retentionszeit von ca. 40 min tritt im Chromatogramm ein Peak besonders deutlich hervor. Den zu dieser Zeit eluierenden Substanzen kann anhand der ermittelten Kalibriergeraden ein ungefähres pI von ca. 5.9 zugeordnet werden. Des weiteren werden die eluierenden Substanzen bei einer Retentionszeit zwischen 70 und 75 min sehr stark detektiert, woraus sich ein abgeschätzter pI von ungefähr 4.5 ergibt.

Zur Überprüfung der mittels IEC durchgeführten Trennung der Proteine des Tomatenextraktes wurde das Eluat entsprechend Abb. 4-33a fraktioniert. Die Eluate der jeweiligen Fraktionen wurden anschließend lyophilisiert, in einer minimalen Menge (50 - 100 μ L) Probenpuffer aufgenommen, reduziert und elektrophoretisch mittels SDS-PAGE getrennt.

Abb. 4-33b zeigt die unspezifisch angefärbten Proteine der einzelnen Fraktionen der IEC-Trennung. Besonders auffällig war, daß in allen Fraktionen, mit Ausnahme des Extraktes des Totvolumens (Fraktion 1), eine intensive Bande bei einem MG von 44 kDa apparent war.

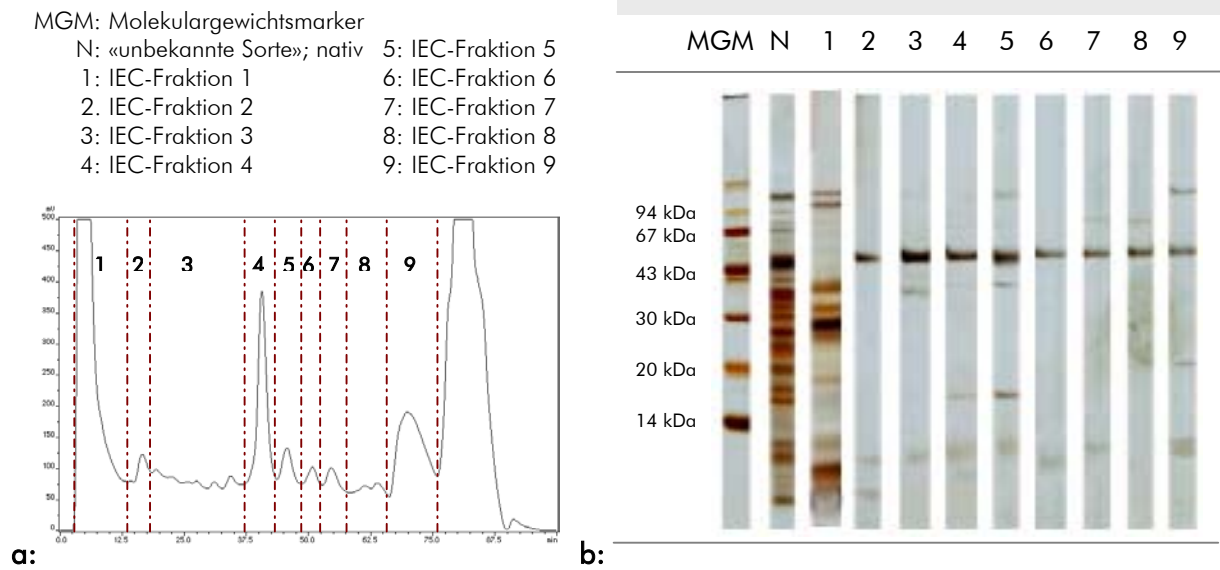


Abb. 4-33: **a:** Chromatogramm der fraktionierten IEC-Trennung des Tomatenextraktes
b: Silberfärbung der Fraktionen nach IEC-Trennung

Daneben sind nur wenige, deutlich schwächer detektierte Proteine mit einem höheren als auch niedrigeren MG detektierbar. Zudem ist gut erkennbar, daß ein Großteil der Tomatenproteine bereits mit dem Totvolumen von der Säule eluierte. Dabei handelte es sich hauptsächlich um Proteine mit mittleren MG zwischen 20 und 40 kDa.

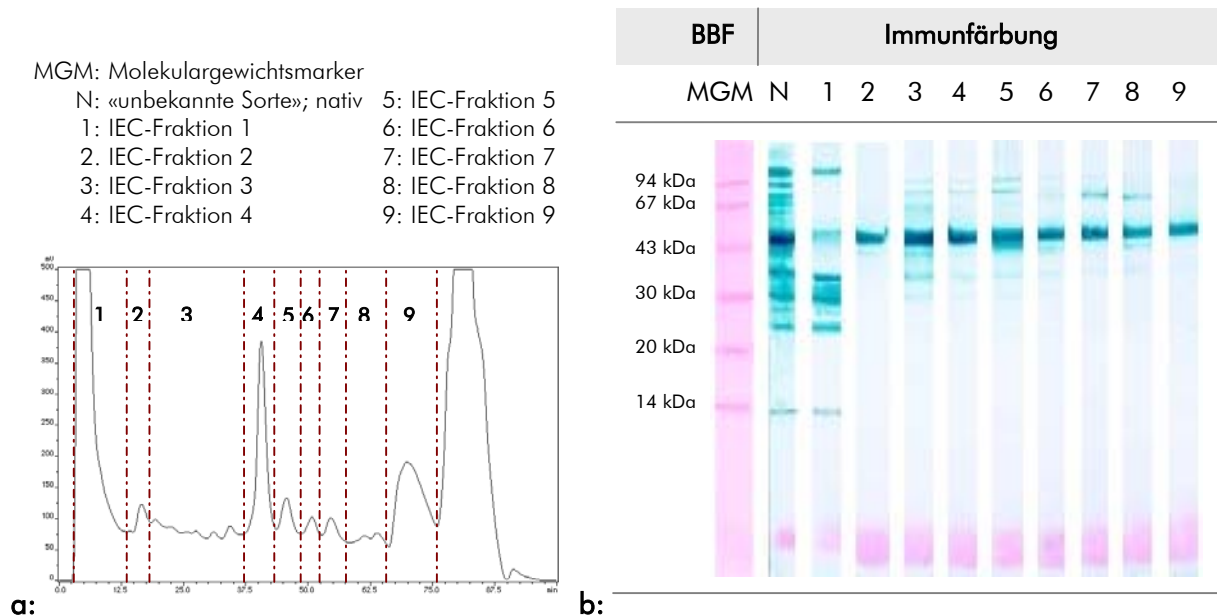


Abb. 4-34: **a:** Chromatogramm der fraktionierten IEC-Trennung des Tomatenextraktes
b: Immunoblot der Fraktionen nach IEC-Trennung

Unter Verwendung des Poolserums wurden anschließend die Fraktionen bezüglich der darin vorkommenden IgE-bindenden Proteine mittels IB untersucht. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abb. 4-34b dargestellt. Mit dem Totvolumen wurden mehrere Allergene von der Säule eluiert. Dabei handelte es sich unter anderem um IgE-bindende Proteine mit einem mittleren MG von 26, 28, 30 und 36 kDa. Daneben konnte aber auch das Profilin mit einem MG von 14 kDa sowie eine Bande bei 44 kDa visualisiert werden. Diese Allergene wurden unter den gegebenen Bedingungen nicht vom Säulenmaterial retardiert und scheinen somit einen $pI > 8.0$ zu besitzen. In allen anderen Fraktionen (2-9) trat jeweils eine allergene Bande bei einem MG von 44 kDa auf. Diese wurde in den Fraktionen 3-8 von weiteren IgE-bindenden Proteinen mit einem höheren MG begleitet, wohingegen in den Fraktionen 2 und 9 ausschließlich die 44 kDa-Bande visualisiert worden ist. Weitere Allergene mit MG von 30, 36 und 40 kDa konnten in den Fraktionen 3, 4, 5 und 6 nachgewiesen werden. Die in der Silberfärbung visualisierten Banden im unteren MG-Bereich wiesen im Immunoblot keine allergene Aktivität auf. In den Fraktionen 2 und 9 ist ein 44 kDa-Allergen das einzig nachweisbare.

Da in sämtlichen Fraktionen eine allergene Bande mit einem MG von 44 kDa detektierbar war, wurde die Trennleistung der IEC anhand der Eluate überprüft. Hierzu wurden drei ausgewählte Fraktionen der IEC (2, 4 und 9) mittels IEF elektrophoretisch getrennt und unspezifisch sowie immunologisch angefärbt. Anhand der in Abb. 4-33 dokumentierten Silberfärbung ist zu sehen, daß die detektierten Proteinbanden jeder Fraktion in unterschiedlichen pH-Bereichen vorlagen. Sie stehen zudem in relativ guter Korrelation zu den pI , welche über die Retentionszeiten abgeschätzt worden sind. Der geschätzte pI der Proteine aus Fraktion 2 lag bei 6.9. In der Silberfärbung lagen die Proteine dieser Fraktion im Bereich

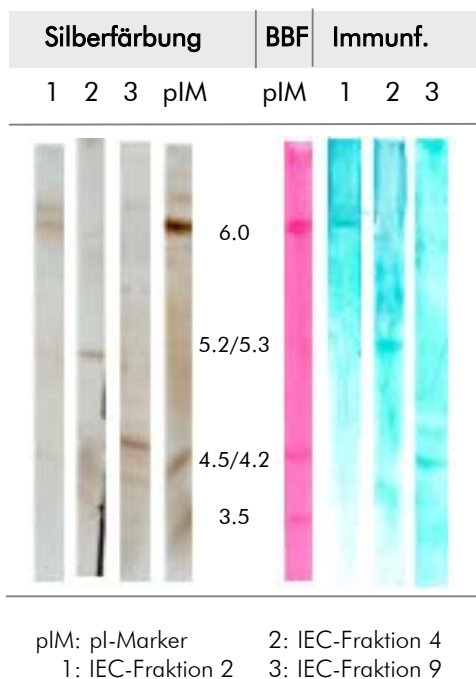


Abb. 4-35: Silberfärbung & IB der mittels IEF aufgetrennten IEC-Fraktionen 2, 4 und 9

zwischen pH 6.0 und 7.0. Dementsprechend waren auch die allergenen Banden diesem pI -Bereich zuzuordnen (siehe Abb. 4-35). Der über die Kalibriergerade der IEC ermittelte pI der Fraktion 9 lag bei pI 4.5, welche anhand der IEF mit pI 4.6 bestätigt werden konnte. Lediglich der für die Fraktion 4 abgeschätzte pI von 5.9 lag in der IEF mit einem pI von ca. 5.3 etwas niedriger. Da die Proteine bzw. Allergene verschiedene pH -Bereiche aufzeigen, konnte die Trennleistung der IEC-Säule durch die IEF bestätigt werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß es mittels der IEC gelungen ist, eine gute Vorreinigung der Proteine des Tomatenextraktes zu erreichen. Ein Großteil der Proteine bzw. der Allergene konnte mit dem Totvolumen abgetrennt werden. Obwohl in den einzelnen

Fractionen der IEC zwar nur noch wenige Allergene bzw. weitere Begleitproteine apparent waren, war die IEC für eine vollständige Isolierung nicht ausreichend, so daß eine weitere Reinigung entsprechender Fractionen erfolgen mußte.

4.2.1.2 RPC

An die IEC schloß sich eine Umkehrphasenchromatographie an, welche für hydrophobe Substanzen wie z.B. Proteine eine sehr gute Trennleistung aufweist. Die Trennung wird repräsentativ am Beispiel der Fraction 4 der IEC aufgezeigt, welche aus fünf IEC-Läufen gepoolt, lyophilisiert und unter Verwendung einer Dialyse-Kammer entsalzt wurde. Anschließend erfolgte die Trennung in Anlehnung an die Methode von FAHLBUSCH et al. [1995] mit einem Gradientensystem aus 0.1 mol/L TFA und Acetonitril sowie einer UV-photometrischen Detektion bei 214 nm. Die Trennbedingungen sind im Anhang unter 7.16.3 aufgeführt. Abb. 4-36 zeigt repräsentativ die Trennung der aus fünf Läufen gepoolten Fraction 4 der IEC unter Darstellung des verwendeten Gradienten. Die deutlich abfallende Basislinie wurde durch das verwendete Gradientensystem verursacht.

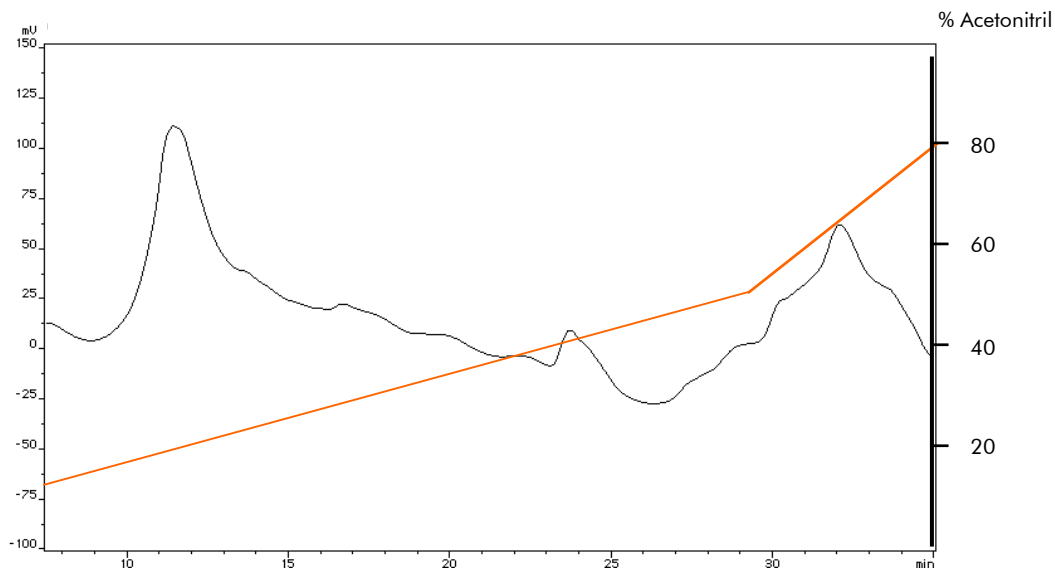


Abb. 4-36: Chromatogramm der RPC-Trennung der IEC-Fraktion 2

Zur Überprüfung der mittels RPC erzielten Trennung wurden im Abstand von 5 min Fractionen aufgefangen, welche anschließend lyophilisiert und in einer minimalen Menge Probenpuffer aufgenommen wurden. Die unspezifische Silberfärbung der mittels SDS-PAGE aufgetrennten Eluate ist in Abb. 4-37 dokumentiert. Neben der Silberfärbung der einzelnen Fractionen der RPC-Trennung ist zum Vergleich noch einmal das Gesamtproteinmuster der eingesetzten IEC-Fraction 4 (F_4) dargestellt. Obwohl im Chromatogramm der RPC im Fraktionsbereich 1 ein deutlicher Peak auftrat, waren in der Silberfärbung nur sehr schwache Proteinbanden detektierbar. Fraction 2 zeigte in der Silberfärbung keine visualisierbaren Proteine. Während in den Fractionen 4 und 5 der Großteil der zu trennenden Proteine nachgewiesen werden konnte, wurde in der RPC-Fraction 3 nur noch ein Protein mit einem MG von 44 kDa-Protein detektiert. Mittels der RPC ist es demnach gelungen das 44 kDa von anderen Begleitproteinen zu trennen. Zum Nachweis der Allergene wurde eine SDS-PAGE mit anschließendem IB unter

MGM: Molekulargewichtsmarker

F₄: IEC-Fraktion 4 3: RPC-Fraktion 3
 1: RPC-Fraktion 1 4: RPC-Fraktion 4
 2: RPC-Fraktion 2 5: RPC-Fraktion 5

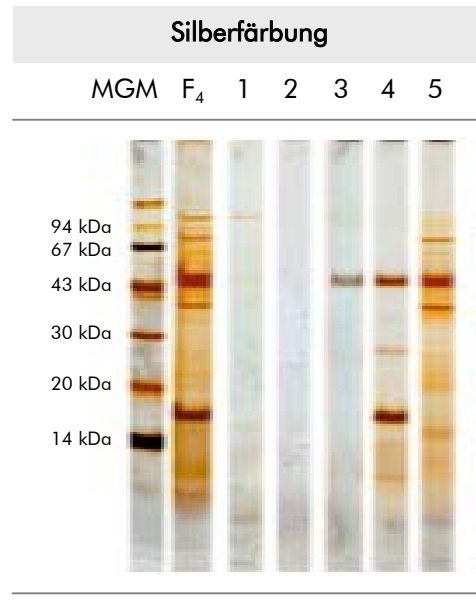
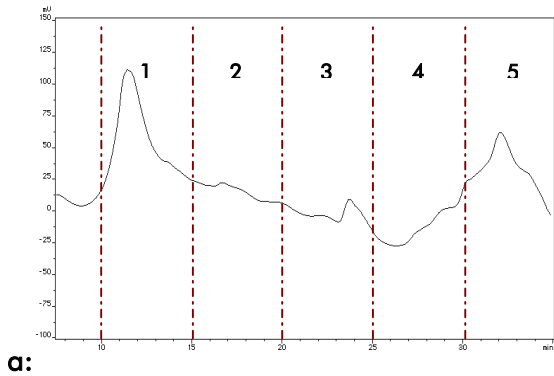


Abb. 4-37: a: Chromatogramm der fraktionierten RPC-Trennung einer IEC-Fraktion
b: Silberfärbung der Fraktionen nach RPC-Trennung

Verwendung des Poolserums durchgeführt. Aus dem in Abb. 4-38 wiedergegebenen IB ist klar ersichtlich, daß, entsprechend der Silberfärbung, in der Fraktion 3 ausschließlich das 44 kDa-Allergen vorlag. Obwohl in der Fraktion 4 noch weitere Proteine unspezifisch angefärbt worden sind, wurde im IB ebenfalls nur noch das 44-kDa-Allergen detektiert. Daneben wies Fraktion 5 noch weitere Allergene im oberen MG-Bereich auf. Gemäß der Silberfärbung waren in Fraktion 1 und 3 keine allergenen Strukturen nachweisbar.

MGM: Molekulargewichtsmarker

F₄: IEC-Fraktion 4 3: RPC -Fraktion 3
 1: RPC-Fraktion 1 4: RPC -Fraktion 4
 2: RPC-Fraktion 2 5: RPC -Fraktion 5

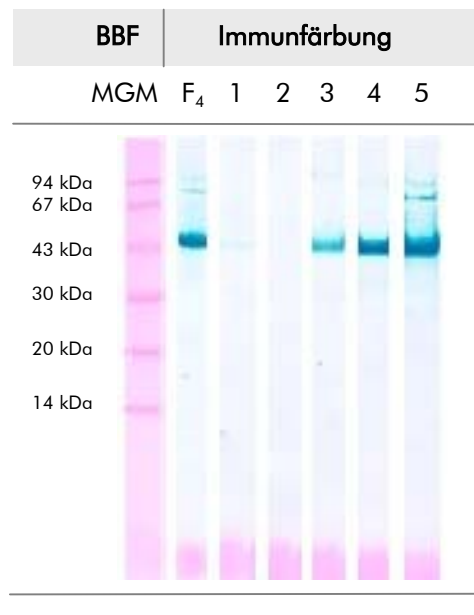
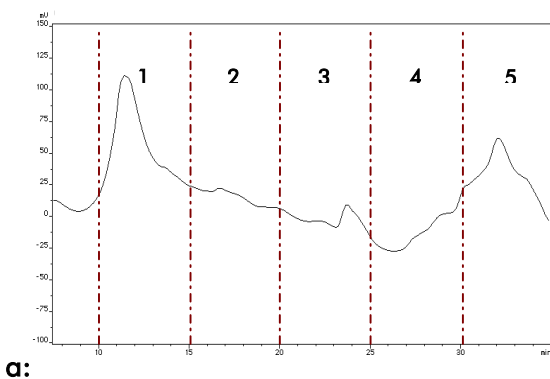


Abb. 4-38: a: Chromatogramm der fraktionierten RPC-Trennung einer IEC-Fraktion
b: Immunfärbung der Fraktionen nach RPC-Trennung

4.2.1.3 N-terminale Sequenzierung

Um über den Vergleich mit Proteindatenbanken eine eventuelle Identifizierung des isolierten Allergens vornehmen zu können, wurde eine N-terminale Sequenzanalyse nach Edman durchgeführt. Der aus fünf RPC-Läufen gepoolte Extrakt der Fraktion 3 wurde lyophilisiert und anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach einem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte eine unspezifische CBB-Färbung (Durchführung siehe Anhang 7.14.2). Wie schon in der Silberfärbung sowie dem IB (siehe Kapitel 4.2.1.2) wurde auch in der CBB-Färbung lediglich eine Bande bei 44 kDa detektiert (nicht dargestellt). Diese Bande wurde aus der Membran ausgeschnitten und direkt zur Bestimmung der AS-Sequenz eingesetzt. Die für die Sequenzanalyse vorliegende Proteinkonzentration von 2.94 pmol ließ einen Umfang von 15 Edman-Cyclen zu, deren Ergebnis in Tab. 4-1 wiedergegeben ist. Eine Recherche in der Proteindatenbank SWISSPROT ergab eine 100 %ige Übereinstimmung mit der AS-Sequenz der Polygalacturonase 2 A der Tomate. Somit konnte das Allergen mit einem MG von 44 kDa eindeutig als Polygalacturonase 2A identifiziert werden.

Tab. 4-1: N-terminale Aminosäuresequenz der analysierten Proteinbande und der Polygalacturonase 2A der Tomate (SWISSPROT P05117)

44-kDa-Bande	¹ G	I	K	V	⁵ I	N	V	L	S	¹⁰ F	G	A	K	G	¹⁵ D
Polygalacturonase 2A	⁷² G	I	K	V	⁷⁶ I	N	V	L	S	⁸¹ F	G	A	K	G	⁸⁶ D

Die 44 kDa-Bande aus den IEC-Fractionen 2 und 9 wurde ebenfalls isoliert und einer N-terminalen Sequenzanalyse unterzogen (nicht dargestellt). Die aus den Analysen resultierenden Aminosäuresequenzen sind mit der in Tab. 4-1 aufgeführten identisch, so daß es sich bei dem 44 kDa der IEC-Fractionen 2 und 9 mit den geschätzten pI von 6 bzw. 4.5 ebenfalls um die Polygalacturonase 2A handelt.

4.2.2 Isolierung des 26 kDa Allergens

Im Rahmen der Trennung mittels IEC wurde neben der unbekannten Sorte ebenfalls der Extrakt der Sorte «Balkonstar» eingesetzt. Im Laufe der elektrophoretischen Untersuchung der einzelnen Fraktionen dieser Trennung zeigten sich in der Proteinzusammensetzung im Vergleich zu der IEC-Trennung der unbekannten Sorte deutliche Differenzen, auf welche im folgenden Kapitel näher eingegangen wird. Unter anderem konnte in einer Fraktion ein IgE-bindendes Protein mit einem MG von 26 kDa nachgewiesen werden, welches daraufhin zur Identifizierung isoliert werden sollte.

4.2.2.1 IEC

Der aus dem Acetonpulver unter Verwendung des Tris-HCl-Puffers gewonnene Extrakt wurde entsprechend der in 4.2.1.1 aufgeführten Bedingungen mittels IEC getrennt. In Abb. 4-39 sind zum Vergleich die jeweiligen Chromatogramme der IEC-Trennung beider Tomatensorten übereinandergelegt dargestellt. Anhand der Chromatogramme waren nur geringfügige

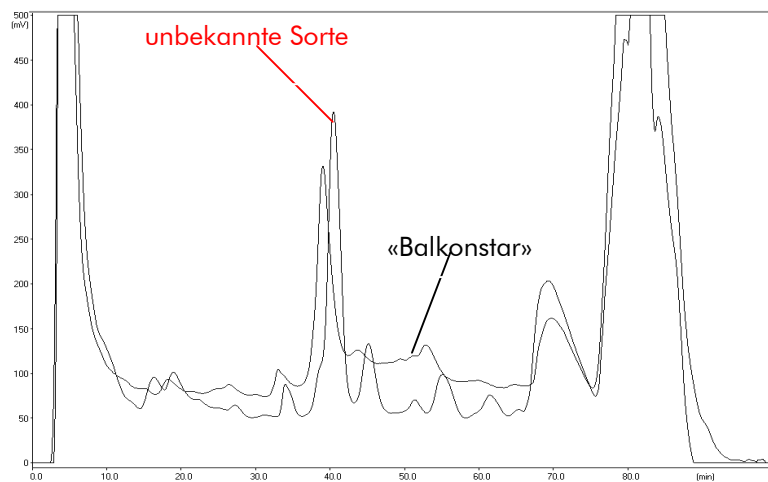


Abb. 4-39: Chromatogramme der IEC-Trennung des Tomatenextrakte der unbekannten Sorte (-) und «Balkonstar» (-)

Unterschiede festzustellen, welche sich im wesentlichen in einer leichten Verschiebung der Retentionszeiten der Peaks äußerten.

In Abb. 4-40 ist die Silberfärbung ausgewählter Fraktionen der IEC-Trennung eines

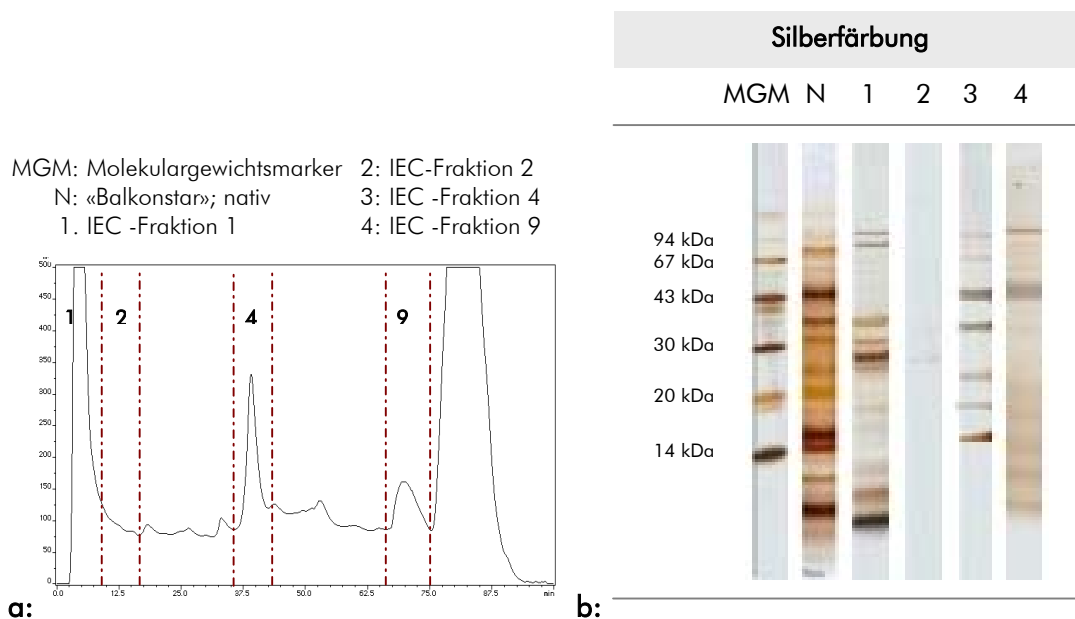


Abb. 4-40: a: Chromatogramm der fraktionierten IEC-Trennung der Sorte «Balkonstar»
b: Silberfärbung der Fraktionen nach IEC-Trennung

Proteinextraktes der Sorte «Balkonstar» dargestellt. Entsprechend der IEC-Trennung des Extraktes der unbekannten Sorte wurde auch bei der Sorte «Balkonstar» ein Großteil der Proteine nicht an der Säule retardiert und eluiert im Totvolumen (1). Einen großen Unterschied zwischen den beiden Tomatensorten läßt sich jedoch anhand der Fraktion 4 darlegen. Während in der korrespondierenden Fraktion des Proteinextraktes der unbekannten Sorte Banden bei MG von 15, 34, 44, 50 und 70 kDa (vgl. Abb. 4-31b (5)) detektiert wurden, waren in dieser Fraktion der Sorte «Balkonstar» (vgl. Abb. 4-40b (3)) zwei weitere diskrete Proteinbanden mit einem MG von ca. 18 und 26 kDa apparent. Des weiteren wurde im Extrakt der Fraktion 2 der Sorte «Balkonstar» im Gegensatz zur entsprechenden Fraktion der unbekannten Sorte (vgl. 4-31b (2)) das als Polygalacturonase 2A identifizierte Protein mit einem MG von 44 kDa nicht visualisiert. In dieser Fraktion war ausschließlich eine Proteinbande bei ca. 28 kDa erkennbar. Dagegen stimmte die Proteinzusammensetzung der Fraktion 9 der Sorte «Balkonstar» wieder mit der entsprechenden Fraktion der unbekannten Sorte überein. In den Fraktionen beider Sorten waren lediglich das 44 kDa Protein als diskrete, deutlich detektierte Bande zu erkennen. Im IB der Fraktionen der IEC-Trennung des Extraktes «Balkonstar», dargestellt in Abb. 4-41, wurden die bereits in der unspezifischen Silberfärbung manifestierten Unterschiede zur unbekannten Sorte bestätigt. Obwohl in Fraktion 2 die Polygalacturonase 2A nicht visualisiert werden konnte, wurde sie im IB schwach detektiert. Damit konnte gezeigt werden, daß die Polygalacturonase 2A in einer sehr geringen Konzentration auch in dieser Fraktion der Sorte «Balkonstar» vorhanden ist. Zudem war in

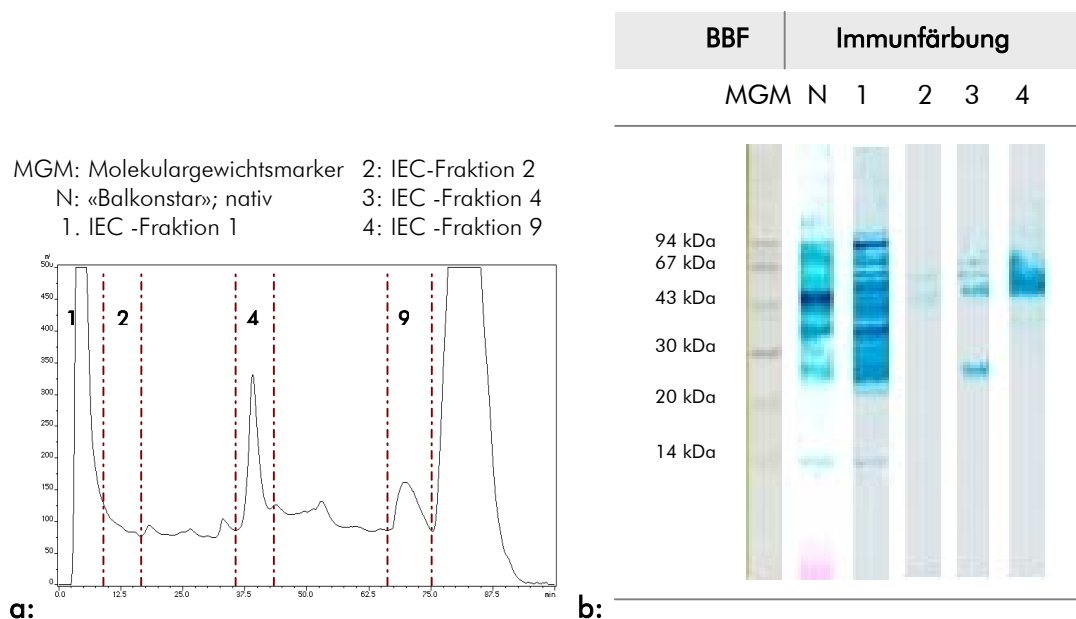


Abb. 4-41: **a:** Chromatogramm der fraktionierten RPC-Trennung einer IEC-Fraktion
b: Immunfärbung der Fraktionen nach RPC-Trennung

Fraktion 3 neben dem 44 kDa-Allergen ein weiteres Allergen im Bereich von 26 kDa vorhanden. Das in der Silberfärbung detektierbare Protein mit einem MG von ca. 15 kDa wies dagegen keine IgE-bindende Aktivität auf. In Fraktion 9 konnte unter Verwendung des Poolserums, entsprechend der Fraktion der unbekannten Sorte, die Polygalacturonase 2A detektiert werden.

Um diesen Unterschied dieser beiden Sorten bezüglich der Apparenz des 26 kDa-Allergens mit einem abgeschätzten pI von 5.3 zu verifizieren, wurden Extrakte der Tomatensorten «Estrella», «Togo Trefle», «Sweet million» und «Flamme» mittels IEC aufgetrennt und anschließend elektrophoretisch sowie allergologisch untersucht. Obwohl die Chromatogramme sämtlicher Sorten den charakteristischen Verlauf aufwiesen (nicht dargestellt), konnte in keiner weiteren Sorte ein 26-kDa-Allergen mit einem abgeschätzten pI von 5.3 nachgewiesen werden. Vielmehr war das Protein- bzw. Allergenspektrum der entsprechenden Fraktionen mit dem der unbekannten Sorte identisch. Im Vergleich zur unbekannten Sorte wiesen sie hinsichtlich der Verteilung des 44 kDa-Allergens leichte Konzentrationsunterschiede auf (nicht dargestellt).

Aufgrund der unterschiedlichen Protein- bzw. Allergenverteilung in den jeweiligen Fraktionen der beiden Sorten kann von einer Sortenspezifität ausgegangen werden (vgl. Kapitel 4.1.4). Zwar liegen in den Extrakten beider Sorten Proteine bzw. Allergene mit gleichem MG vor, jedoch zeigt sich zumindest für das Allergen mit einem MG von 26 kDa ein anderer isoelektrischer Punkt. Während das 26 kDa-Allergen der Sorte «Balkonstar» einen abgeschätzten pI von 5.3 besitzt, eluierte das Allergen mit einem MG von 26 kDa der unbekannten Sorte während des Totvolumens der Säule. Dies deutet darauf hin, daß dieses Allergen ein $pI \geq 8.0$ besitzt.

4.2.2.2 SEC

Um eine Isolierung des 26 kDa-Allergens zu erreichen, sollte eine weitere Auftrennung der IEC-Fraktion erfolgen. Aufgrund der unterschiedlichen MG der beiden Allergene von 44 bzw. 26 kDa wurde daher eine SEC durchgeführt. Die Trennung erfolgte an Sephacryl S 100 nach MÖLLER et al. [1997b] unter Verwendung eines Elutionspuffers (pH 7.0) mit 0.01 mol/L Phosphat und 0.03 mol/L NaCl und UV-photometrischer Detektion bei 214 nm. Die genauen Bedingungen sind dem Anhang 7.16.2 zu entnehmen.

Die Überprüfung der Trennleistung der Säule wurde anhand von Standardproteinen mit unterschiedlichen MG durchgeführt. Wie aus Abb. 4-42 ersichtlich, verläuft die Kalibriergerade, in der das MG gegen die Retentionszeit dargestellt ist, annähernd linear. Die einzelnen Standards sowie die dazugehörigen Retentionszeiten sind in Tab. 7-7 des Anhanges aufgeführt.

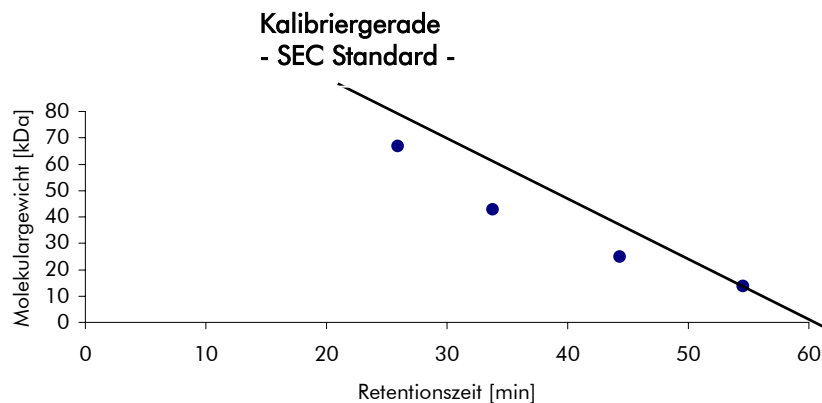


Abb. 4-42: Kalibriergerade der SEC an Sephacryl S 100
 $R^2 : 0.9552$

Vor einer weiteren Auftrennung mittels SEC wurde die IEC-Fraktion 3 des Extraktes der Sorte «Balkonstar» lyophilisiert und in 1 mL des SEC-Elutionspuffers aufgenommen. In Abb. 4-43 ist ein Chromatogramm des mittels SEC aufgetrennten IEC-Eluates wiedergegeben.

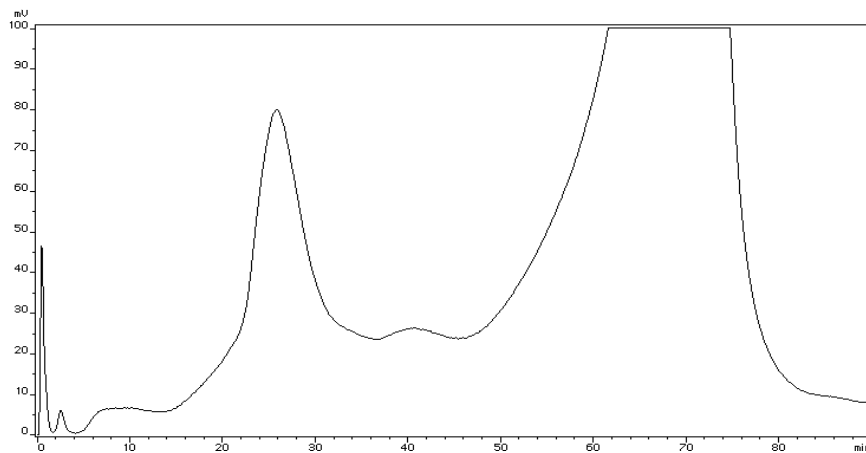


Abb. 4-43: Chromatogramm der SEC-Trennung der IEC-Fraktion 3

Zur Untersuchung des in der SEC aufgetrennten IEC-Eluates wurde im Bereich von 20 - 50 min fraktioniert, da nach einer Abschätzung anhand der Kalibriergeraden die beiden Allergene mit den MG von 44 bzw. 26 kDa in diesem Zeitraum eluieren sollten. Dies konnte anhand des Chromatogrammes insofern bestätigt werden, daß in diesem Bereich zwei Peaks zu erkennen waren. Die Eluate der SEC wurden lyophilisiert und wiederum in einer minimalen Menge an Probenpuffer aufgenommen. Im Gegensatz zu den vorhergehenden Untersuchungen wurde die SDS-PAGE unter Verwendung des MOPS-Elektrodenpuffers verwendet, welcher im mittleren MG-Bereich eine bessere Trennleistung ermöglicht. Die unspezifische

MGM: Molekulargewichtsmarker

F₄: IEC-Fraktion

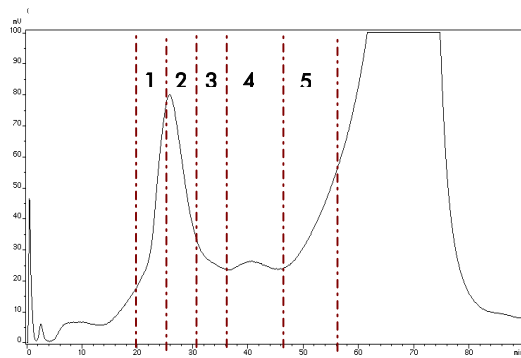
1: SEC-Fraktion 1

2: SEC-Fraktion 2

3: SEC-Fraktion 3

4: SEC-Fraktion 4

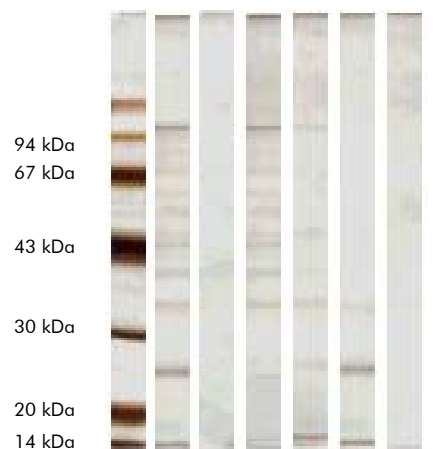
5: SEC-Fraktion 5



a:

Silberfärbung

MGM F₄ 1 2 3 4 5



b:

Abb. 4-44: **a:** Chromatogramm der fraktionierten SEC-Trennung einer IEC-Fraktion
b: Silberfärbung der Fraktionen der SEC-Trennung

Visualisierung der Proteine der SEC-Fraktion ist in Abb. 4-44 dargestellt. Während in Fraktion 1 der SEC keine Proteinbanden detektiert worden sind, befand sich in Fraktion 2 der Großteil der Proteine mit MG zwischen 34 und >94 kDa. Daneben war eine sehr schwach ausgebildete Bande im Bereich von 26 kDa zu erkennen. Die Proteinbanden im oberen MG-Bereich waren in Fraktion 3 zwar noch detektierbar, wiesen jedoch eine schwächere Intensität auf. Dafür waren diskrete Banden mit den MG 14 und 26 kDa erkennbar. Die Fraktion 4 weist nur noch zwei diskrete Banden mit einem MG von 14 und 26 kDa, sowie eine schwach detektierte Bande bei 34 kDa auf. In Fraktion 5 waren keine Proteine mehr visualisierbar. Der unter Verwendung des Poolserums durchgeführte IB ist in Abb. 4-45 dargestellt. Während in den Fraktionen 2 und 3 das gesamte Allergenspektrum der IEC-Fraktion präsent war, wurde in der Fraktion 4 ausschließlich das 26 kDa-Allergen detektiert. Entsprechend der Silberfärbung waren in den Fraktionen 1 und 5 keine IgE-bindenden Proteine vorhanden.

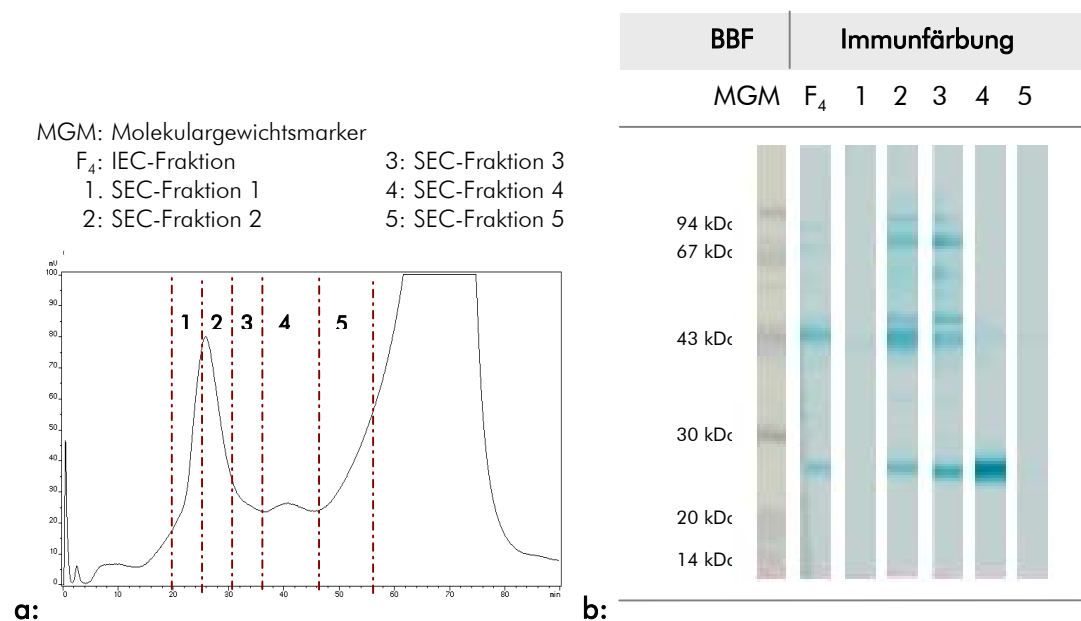


Abb. 4-45: **a:** Chromatogramm der fraktionierten SEC-Trennung einer IEC-Fraktion
b: Immunfärbung der Fraktionen nach SEC-Trennung

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß eine Isolierung des 26 kDa Allergens von dem 44 kDa Allergen mittels SEC erfolgreich war. Allerdings konnte eine vollständige Abtrennung von den Begleitproteinen mit einem MG von 14 bzw. 36 kDa nicht erreicht werden. Zudem war die Menge an isoliertem 26 kDa Allergen für eine N-terminale Sequenzierung nicht ausreichend. Um einen weiteren Isolierungsschritt mittels RPC anschließen zu können, war es erforderlich, aufgrund der niedrigen Proteinkonzentration, die Fraktionen mehrerer SEC Läufe zu poolen. Bei der elektrophoretischen Prüfung der einzelnen Läufe stellte sich jedoch heraus, daß diese Methode keine reproduzierbaren Ergebnisse lieferte und somit eine Trennung anhand der Retentionszeiten nicht durchführbar war. Anhand des Chromatogramms der SEC-Trennung und der Ergebnisse der elektrophoretischen Untersuchungen (vgl. Abb. 4-42 & 4-43) wurde vermutet, daß das 26 kDa-Allergen bei einer Retentionszeit von 40 min eluiert. Aufgrund der schwachen UV-Detektion dieses Proteins war eine reproduzierbare

Fraktionierung anhand des Chromatogramms ebenfalls nicht möglich, so daß von einer weiteren Trennung mittels SEC abgesehen wurde.

4.2.2.3 RPC

Ein weiterer Ansatz zur Isolierung des 26 kDa-Allergens der Sorte «Balkonstar» war die Trennung des IEC-Eluates mittels der RPC. Analog der in Kapitel 4.2.1.2 aufgeführten Bedingungen wurde eine Trennung an einer RPC-Phase der IEC-Fraktion 4 durchgeführt. In Abb. 4-46 sind ein Chromatogramm dieser Trennung sowie die Silberfärbungen und die Immunfärbung der relevanten Fraktionen dargestellt. Sowohl nach Silberfärbung als auch

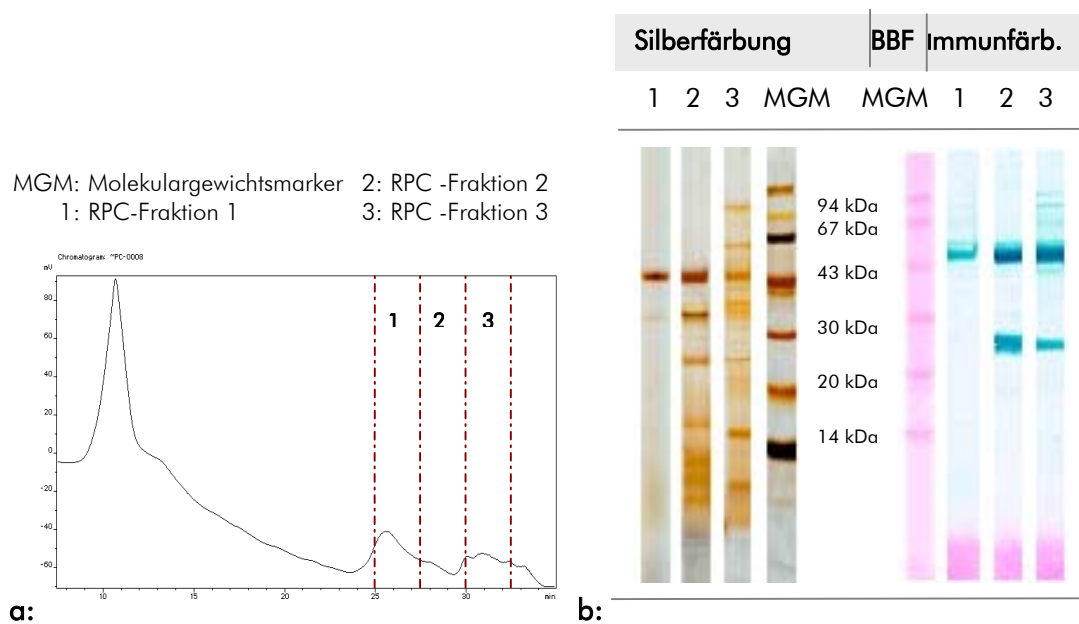


Abb. 4-46: **a:** Chromatogramm der fraktionierten RPC-Trennung der IEC-Fraktion
b: Silber- und IB der Fraktionen der RPC-Trennung

nach immunochemischer Detektion mittels Poolserum ist klar ersichtlich, daß lediglich das IgE-bindene Protein mit einem MG von 44 kDa von den anderen Proteinen abgetrennt werden konnte, welches mit Trennung des IEC-Eluates der unbekannten Sorte (siehe Kapitel 4.2.1.2) übereinstimmt. Innerhalb der RPC-Fraktionen 2 und 3 wurde das 26 kDa-Protein zwar von der Säule eluiert, lag aber in den Fraktionen mit einer Vielzahl anderer Proteinen vor. Mit der RPC konnte keine ausreichende Abtrennung des 26 kDa-Allergens von anderen Proteinen erzielt werden. Zudem war dieses Ergebnis auch hinsichtlich einer Vorreinigung für einen weiteren Isolierungsschritt nicht befriedigend, so daß auf eine weitere Anwendung der RPC zur Isolierung des 26 kDa-Allergens verzichtet wurde.

4.2.2.4 N-terminale Sequenzierung

Obwohl keine vollständige Isolierung des 26 kDa-Allergens erreicht werden konnte, wurde eine N-terminale Sequenzanalyse durchgeführt. Hierfür wurde die aus fünf Läufen gepoolte Fraktion 4 der IEC mittels SDS-PAGE unter Verwendung des MOPS-Puffers getrennt und nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran mittels CBB unspezifisch angefärbt. Wie aus Abbildung

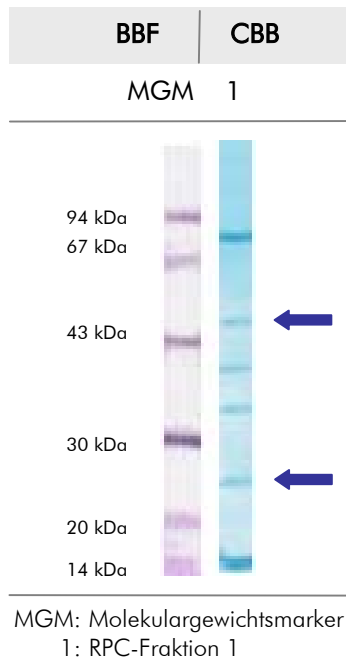


Abb. 4-47: CBB-Färbung des IEC-Eluates auf der PVDF-Membran

4-47 ersichtlich ist, konnte eine gute Auftrennung der Proteine erreicht werden. Die Proteine mit den MG 26 und 44 kDa konnten als diskrete Banden visualisiert werden. Beide Banden wurden ausgeschnitten und direkt zur Sequenzanalyse eingesetzt. Die ermittelte AS-Sequenz des 44 kDa Allergens zeigte wiederum eine 100 %ige Übereinstimmung mit der Aminosäuresequenz der Polygalacturonase 2A der Tomate (Sequenz siehe Tab. 4-1; Kapitel 4.2.1.3). Die relativ geringe Konzentration des 26 kDa-Allergens war für eine Durchführung von lediglich 8 Cyclen ausreichend. Die ermittelte N-terminale AS-Sequenz ist in Tab. 4-2 aufgeführt. Über eine Datenbankrecherche konnte eine Identifizierung des Allergens nicht erfolgen, jedoch ergab sich eine 75 %ige Homologie zu einem Cystein Protease Inhibitor der Kartoffel.

Tab. 4-2: N-terminale Aminosäuresequenz der analysierten Proteinbanden sowie des Cystein Protease Inhibitors der Kartoffel (SWISSPROT P24744)

26-kDa-Bande	¹ X	V	L	P	⁵ E	V	Y	A	*übereinstimmende Aminosäuren sind grau unterlegt
Cystein Protease Inhibitor	¹ L	V	L	P	⁵ E	V	Y	D	

5 Diskussion

Mit der vorliegenden Arbeit sollte zum einem eine umfassende Charakterisierung der IgE-bindenden Proteine der Tomate durchgeführt und ein Ansatz zur Isolierung dieser erarbeitet werden.

5.1 Charakterisierung der Tomatenallergene

Anhand einer SDS-PAGE mit anschließender immunochemischer Detektion unter Verwendung der 33 zur Verfügung stehenden Einzelseren wurden die IgE-bindenden Proteine der Tomate hinsichtlich ihres MG charakterisiert. Die anhand dieser IB erfolgten Aussagen über die Einteilung in Major, Intermediär- und Minorallergene entsprechend der Detektionsfrequenz der einzelnen Allergene innerhalb des Patientenkollektives ist lediglich als Tendenzangabe zu werten, da für eine gesicherte Aussage das relativ kleine Kollektiv von 33 sensibilisierten Patienten nicht ausreichend groß war. Nach GEHA et al. [1995] ist eine fundierte Klassifizierung erst ab einer Kollektivgröße von mindestens 50 Patienten möglich. Entsprechend der Einteilungsdefinition eines Majorallergens, wonach über 50 % der Individuen eine IgE-Bindung zu einem Allergen aufweisen müssen [DREBORG et al. 1994], könnte es sich bei dem 44 kDa Allergen der Tomate um ein solches handeln. In dem untersuchten Patientenkollektiv besaßen 31 von 33 Seren spezifisches IgE gegen dieses Allergen und wiesen im IB eine intensiv gefärbte Bande auf. Im Rahmen der später durchgeführten Isolierung konnte dieses 44 kDa Allergen als Polygalacturonase 2A identifiziert werden. Auch RECHE et al. [2001] beschrieben ein IgE-bindendes Protein mit einem MG von 44 kDa, welches im IB eine starke Färbung induzierte. Das von FÖTISCH et al. [2001] erwähnte Allergen mit einem MG von 43 kDa könnte ebenso mit Polygalacturonase 2A übereinstimmen. KONDO et al. [2001] wiesen ein Majorallergen mit einem MG von 46 kDa nach, welches von 72.2 % der Seren detektiert wurde und ebenfalls als Polygalacturonase 2A identifiziert worden war. Somit ist das von KONDO et al. [2001] beschreibende 46 kDa Allergen mit dem nachgewiesenen 44 kDa identisch. Ein weiteres potentiell Majorallergen stellt das 70 kDa Allergen mit einer Detektionshäufigkeit von 51.5 % dar. Daneben treten weitere Allergene mit MG von 14, 26, 30, 36, 50 und 65 kDa, welche wahrscheinlich als Intermediärallergene angesehen werden können. Von weniger als 10 % der Seren wurden IgE-bindende Proteine mit MG von 18 und 28 kDa detektiert. Lediglich ein Serum wies spezifisches IgE gegenüber einem Allergen mit einem MG von ungefähr 9 kDa auf, welches dem in der Studie von FÖTISCH et al. [2001] nachgewiesenen und als LTP identifizierten IgE-bindenden Protein mit dem gleichen MG entsprechen könnte. Generell stimmen die ermittelten MG weitgehend mit den in der Literatur angegebenen MG für die Tomatenallergene überein. PETERSEN et al. [1996] beschrieben diverse Allergene in einem MG-Bereich zwischen 18 und 70 kDa, wohingegen von KONDO et al. [2001] mehrere Allergene im Bereich von 14 und 46 kDa angegeben wurden. Dabei identifizierten KONDO et al. [2001] ein 22 sowie 25 kDa Allergen als β -Fructofuranosidase, bei 18 kDa die Superoxid Dismutase sowie die Allergene mit einem MG von 14 und 34 kDa als Pectinesterase. Daneben beschrieben sie ein IgE-bindendes 16 kDa Protein, welches auch in der Studie von PETERSEN et al. [1996] erwähnt wurde, sowie ein weiteres bei 7 kDa. Im Gegensatz zu KONDO et al. [2001] wurde von FÖTISCH et al. [2001] für die β -Fructofuranosidase ein MG von 50 kDa und für die Pectinesterase ein MG von 36 kDa angegeben. Anhand der Ergebnisse des IB der Einzelseren läßt sich eine erhebliche

Heterogenität der individuellen Sensibilisierungsspektren feststellen, wodurch auch die Differenzen der angegebenen MG der Tomatenallergene der verschiedenen Studien zu erklären sind.

Eine weitere Charakterisierung der Tomatenallergene erfolgte mittels IEF. Die dabei verwendeten Fertiggele ließen eine Auftrennung der Proteine in einem pH-Bereich von pH 3 - 7 zu. In der unspezifischen Silberfärbung waren gut ausgebildete Proteinbanden mit pI von 3.8, 4.8, 5.0, 5.5, 5.8 und 5.9 erkennbar, wobei lediglich die Proteinbanden bei einem pI von 3.8, 5.8 und 5.9 eine IgE-bindende Aktivität aufwiesen. Anhand einer 2D-Elektrophorese konnten die Ergebnisse der IEF bestätigt und den pI ein MG zugeordnet werden. So konnte gezeigt werden, daß sich der pI der 44 kDa-Bande über einen pI-Bereich von 5.7 - 6.1 erstreckte und ebenso bei einem pI von 3.8 vorhanden war. Die 70 kDa Bande teilte sich in der zweidimensionalen Elektrophorese in vier Spots mit pI zwischen 5.9 und 6.0. Bei den Allergenen mit gleichen MG und verschiedenen pI könnte es sich um Isoallergene handeln, wobei die 2D-Elektrophorese lediglich als Hinweis auf eine potentielle Apparenz von Isoallergenen zu sehen ist. Für eine fundierte Klärung wäre eine Identifizierung dieser Allergene nötig. Den IgE-bindenden Banden mit einem MG von 26 und 36 kDa konnte jeweils ein pI von 5.8 zugeordnet werden. Das potentielle Profilin mit einem MG von 14 kDa, konnte in der 2D- Elektrophorese jedoch weder in der Silberfärbung noch im IB visualisiert werden. Dies könnte darin begründet liegen, daß dieses Protein ein pI oberhalb 7 besitzt und somit durch das, in der ersten Dimension verwendete IEF-Gel, welches einen Trennbereich zwischen pH 3 und 7 besitzt, nicht aufgetrennt werden konnte. In der Literatur finden sich nur wenige Studien, welche die pI von Tomatenallergenen beschreiben. PETERSEN et al. [1996] beschrieb ein Allergen mit einem MG von 52 kDa und einem pI von 5.3, welches als β -Fructofuranosidase identifiziert wurde. Zudem wurden von ihnen weitere 20 Allergene im Bereich zwischen pI 5.2 und 7.5 nachgewiesen, welche jedoch nicht genauer bestimmt wurden. FÖTISCH et al. [2001] gaben für ein Allergen, welches sie ebenfalls als β -Fructofuranosidase identifizierten ein MG von 50 kDa an und ordneten diesem einen pI Bereich von 4 bis 4.5 zu. Des weiteren beschrieben sie insgesamt vier IgE-bindende Proteine mit einem MG von 36 kDa, wovon drei als Isoallergene der Polygalacturonase 2A bezeichnet wurden und im pI-Bereich zwischen 6.8 und 7.5 auftraten. Dem vierten, als Pectinesterase identifizierten 36 kDa Allergen, wurde ein pI von 9.3 zugeordnet. Wie schon im Allergenspektrum der SDS-PAGE können die verschiedenen pI und MG auch hier über die Verwendung von Seren unterschiedlich sensibilisierter Individuen erklärt werden. Hinzu kommt des weiteren die Verwendung verschiedener Trennsysteme in der IEF. So wurde die IEF in der Studie von PETERSEN et al.[1996] in einem pH-Gradienten von 3.6 - 9.3 durchgeführt, wohingegen die Trennung von FÖTISCH et al. [2001] in einem Bereich von pH 3 bis 10 erfolgte. Das in dieser Studie verwendete IEF-Gel ermöglichte die Trennung im pH-Bereich von 3-7.

Anhand zehn verschiedener Tomatensorten wurde eine potentielle Sortenabhängigkeit des Allergenspektrums und der allergenen Aktivität untersucht. Bei der Auswahl der Tomatensorte wurde darauf geachtet, daß ein relativ breites Spektrum verschiedener Phänotypen abgedeckt wurde. Als Vertreter der Cherrytomate wurden die Sorten «El Salvador» und «Sweet million» eingesetzt, wohingegen «Togo Trefle» ein Vertreter der Fleischtomate darstellt. «Flamme» und «Estrella» sind typische Stabtomaten, während die Sorten «Roma» und «Balkonstar» zu den

Buschtomaten gezählt werden. Obwohl die genaue Sortenbezeichnung der «unbekannte Sorte» nicht bekannt war, gehört sie ebenso wie die Sorte «Tasty Tom» zu den Strauchtomaten. Im Gegensatz zu sämtlichen anderen Sorten war die Sorte «Yellow King» im reifen Zustand von leuchtend gelber Farbe. Im Gesamtproteinmuster der SDS-PAGE zeigten sich geringfügige Unterschiede im Proteinmuster zwischen den einzelnen Sorten, die hauptsächlich auf einer unterschiedlichen Intensität der einzelnen Proteine basierten. Das Allergenspektrum war fast identisch; doch auch hier konnten leichte Differenzen festgestellt werden. So wurden die allergenen Banden mit MG von 26, 28 und 30 kDa nicht in jeder Tomatensorte nachgewiesen. Allerdings standen die Unterschiede in keiner Relation zu den Phänotypen der verschiedenen Sorten. In der IB-Inhibition, bei welcher jeder Extrakt festphasengekoppelt und als Inhibitor eingesetzt wurde, zeigten jedoch alle Sorten ein identisches Inhibitionsvermögen. Dies ließ darauf schließen, daß die in nicht jeder Sorte vorhandenen Allergene identische oder zumindest große Homologien zeigen. Die zu erkennenden Unterschiede im Proteinmuster bzw. im Allergenspektrum der verschiedenen Tomatensorten könnten durch die jahrelang erfolgten Züchtungsversuche erklärt werden, wodurch es zur Anreicherung bzw. Reduzierung verschiedener Proteine gekommen sein kann. In der EAST-Inhibition zeigte der Extrakt der Sorte «Balkonstar» im Vergleich zu allen anderen Sorten eine leicht erhöhte allergene Potenz. Die allergene Aktivität aller anderen Tomatensorten ist dagegen miteinander vergleichbar. Ähnliche Ergebnisse konnten von JENSEN-JAROLIM et al. [1998] in der botanisch verwandten Paprika festgestellt werden. Von acht untersuchten Paprikasorten konnte lediglich in fünf Sorten ein Protein bzw. Allergen mit einem MG von 23 kDa nachgewiesen werden. Eine Untersuchung hinsichtlich des allergenen Potentials wurde in dieser Studie jedoch nicht durchgeführt. Entsprechend diesen Ergebnissen konnten auch in der Kartoffel Differenzen im Protein- sowie Allergenspektrum unterschiedlicher Sorten festgestellt werden [SCHUBERT et al. submitted]. Anhand einer EAST-Inhibition zeigten sich dagegen keine Unterschiede bezüglich der allergenen Potenz. Im Gegensatz dazu konnten erhebliche Differenzen der allergenen Aktivität verschiedener Apfelsorten festgestellt werden [VIETHS et al. 1993b, 1994a & HSIEH et al. 1995]. Die jüngeren Zuchtsorten wie «Golden Delicious» und «Granny Smith» zeigen eine stärkere Allergenität als die Apfelsorten «Boskoop», «Gloster» und «Jamba». VIETHS et al. [1994a] und SON et al. [1999] konnten in diesem Zusammenhang die Korrelation zwischen der allergenen Potenz und der Konzentration des Hauptallergens Mal d 1 belegen. Im Gegensatz dazu konnten KINDER et al. [1999] anhand von vier Mangosorten keine Sortenabhängigkeit feststellen. Zu dem gleichen Ergebnis führten die Untersuchungen von ZUNKER [2001] an Mangos und Litchis. Ebenso zeigten WIGOTZKI et al. [2000], daß verschiedene Haselnuß- bzw. Karottensorten das gleiche Protein- bzw. Allergenspektrum und keine Unterschiede in ihrer Allergenität aufweisen.

Die Untersuchung des allergenen Potentials während des Reifungsprozesses wurde an den Sorten «Balkonstar», «Sweet million» und «Togo Trefle» durchgeführt, welche jeweils in vier verschiedenen Reifestadien geerntet wurden. Alle drei Sorten zeigten eine Zunahme der allergenen Potenz mit fortschreitendem Reifegrad. Anhand der unspezifischen Färbung wurde eine Konzentrationszunahme verschiedener Proteine beobachtet, welche sich ebenso im IB widerspiegelte. Die Färbung der allergenen Banden mit einem MG von 26, 30 und 44 kDa war in den reifen, roten Früchten deutlich intensiver als in den unreifen. Über den Konzentrationsanstieg dieser Allergene könnte eine Zunahme der allergenen Potenz erklärt werden. Diesen Ergebnissen entsprechend beschrieben auch KONDO et al. [2001] einen

Anstieg der Allergenkonzentration während des Reifungsprozesses. Sie dokumentierten in den reiferen Früchten ebenfalls einen höheren Gehalt der Polygalacturonase 2A (46 kDa) sowie eines als β -Fruktofuranosidase identifiziertes 25 kDa-Allergen, welche mit den 26 kDa-Allergen übereinstimmen könnte. Daneben beschrieben sie eine Steigerung des Gehaltes der Pectinesterase mit einem MG von 14 kDa. Diese Ergebnisse stimmen damit überein, daß die Polygalacturonase 2A zusammen mit der Pectinesterase am Reifungsprozeß der Tomate beteiligt ist [BIRD et al. 1988]. Im Gegensatz dazu begründeten BLEUMINK et al. [1967] die ebenfalls festgestellte Zunahme der Allergenaktivität von Tomaten durch die Entstehung neuer Allergene durch die Maillardreaktion. Dieser Zusammenhang konnte in dieser Studie jedoch nicht bestätigt werden. Anhand des Apfels konnten VIETHS et al. [1993b] und HSIEH et al. [1995] eine Zunahme der allergenen Potenz während der Reifung feststellen, wobei diese in Relation zur Konzentrationszunahme des Hauptallergens Mal d 1 stand. Dagegen wurden von PASCHKE et al. [2001] sowie ZUNKER [2001] keine Allergenitätsveränderungen in reifenden Mangos nachgewiesen.

Zudem wurde die Allergenverteilung innerhalb der Tomatenfrucht an den Sorten «Estrella», «Flamme» und «Roma» untersucht, wobei die Tomate in ihre Bestandteile Schale, Fruchtfleisch, Plazenta, Pulpa und Samen aufgeteilt worden ist. FERNANDEZ-RIVAS & CUEVAS [1999] konnten bei den der Familie der *Rosaceae* zugehörigen Früchten Apfel, Birne und Pfirsich eine erhöhte allergene Potenz der Schale gegenüber dem Fruchtfleisch feststellen. Auch FUNES et al. [1999] dokumentierten im Fruchtfleisch der Früchte der *Anacardiaceae* andere IgE-bindende Proteine als in der Schale. PASTORELLO et al. [1999] konnten nachweisen, daß sich die in einer Vielzahl von Pflanzen vorkommenden und allergenen LTP in den Schalen der Früchte anreichern. Im Gegensatz hierzu konnten in der Kartoffel, welche mit der Tomate phylogenetisch verwandt ist, keine Differenzen der IgE-Bindung zwischen Mark und Schale festgestellt werden [SEPPÄLÄ et al. 1999; CASTELS et al. 1986]. Ebenso wenig führt die ungleichmäßige Reifung der klimakterischen Mangofrucht zu einer heterogenen Verteilung der Allergene innerhalb der Frucht [ZUNKER 2001]. Die durchgeführten Untersuchungen wiesen allerdings auf eine heterogene Allergenverteilung innerhalb der Tomatenfrucht hin. Während in der Schale ausschließlich das 44 kDa-Allergen vorhanden war, konnte dieses im Samen nicht detektiert werden. Dafür wies der Samen zusätzliche, im Gesamtextrakt der Tomate nicht detektierbare Allergene auf. In der IB-Inhibition, bei welcher der Extrakt des Samens festphasengebunden vorlag, konnte zudem gezeigt werden, daß die Allergene mit einem MG von 16, 33 und 60 kDa nur in der Pulpa und im Samen vorkommen und zudem im Vergleich zu den anderen in der Tomatenfrucht apparenten Allergenen verschiedene Epitope tragen. Die Differenzen konnten anhand der IEF verifiziert werden. Die *pI* der Allergene des Samens lagen im Gegensatz zu allen anderen Fruchtbestandteilen bei einem *pI* von 6.0 und im Bereich von 4.8 - 5.7. Zudem konnte die in der Gesamtf Frucht bestimmte Bande bei pH 3.8 in keinem anderen Fragment als in der Schale nachgewiesen werden. Die Untersuchung der Tomatenbestandteile mittels EAST-Inhibition zeigte eine deutlich niedrigere Allergenität des Samens gegenüber allen anderen Fragmenten. Die im Samen vorliegenden abweichenden Proteine bzw. Allergene könnten über die Funktion des Samens erklärt werden. So enthält der Samen im Gegensatz zu den anderen Fruchtbestandteilen die zur Erstentwicklung einer neuen Pflanze benötigte Nährstoffreserve, die sich aus Kohlenhydraten, Proteinen und Fetten zusammensetzt [FRANKE 1997].

Anhand eines gegen rekombinantes Birnenprofilin gerichteten Antikörpers wurde die Präsenz von Profilinen in den unterschiedlichen Tomatenfragmenten untersucht. Diese ubiquitär vorkommenden Proteine werden als kreuzreagierende Allergene in pflanzlichen Ressourcen angesehen. Sie konnten in einer Vielzahl von Pflanzen bereits als Minorallergene nachgewiesen werden, wobei jeweils ein einheitliches MG von ca. 14 kDa angegeben werden konnte [VALENTA et al. 1992a, 1992b; VAN REE et al. 1992, 1995; VALLIER et al. 1992; MARTINEZ et al. 1995; EBNER et al. 1995; VIETHS et al. 1995b; BAUER et al. 1996; JANKIEWICZ et al. 1996, 1997, 1998; DANSCHER et al. 1998; LEITNER et al. 1998; DÍEZ-GÓMEZ et al. 1999]. Zudem sind die IgE-bindenden Epitope der Profiline durch eine hochkonservierte Sekundär- bzw. Tertiärstruktur determiniert [ORTOLANI et al. 1993]. Im Rahmen dieser Studie konnte in der Tomate das 14 kDa Allergen als Profilin identifiziert werden, wobei dieses in der Schale sowie in der Pulpa nicht zugegen war. DARNOWSKI et al. [1996] vermuteten als erste das Vorhandensein von Profilinen in der Tomate. PETERSEN et al. [1996] und FÖTISCH et al. [2001] identifizierten eine 16 kDa Allergen als Profilin, wohingegen FUCHS et al. [2002] für das Tomatenprofilin nach erfolgter Klonierung ein MG von 14.252 kDa angaben und dieses als Lyc e 1 bezeichneten. In der vorliegenden Arbeit wiesen 16 der 33 Patienten, d.h. 48.5 %, eine Sensibilisierung gegenüber dem Profilin auf, welches in guter Korrelation zu den Ergebnissen von FÖTISCH et al. [2001] steht, in welcher 44 % der Patienten auf das Profilin reagierten. Über die Verteilung von Profilin innerhalb der Frucht sind bislang noch keine Untersuchungen bekannt.

Als weitere kreuzreagierende Struktur zwischen phylogenetisch nicht verwandten Organismen werden die CCD diskutiert [AALBERSE 1981]. Um potentielle Glycoproteine zu identifizieren und deren Relevanz als Allergene zu verifizieren, kamen verschiedene Methoden zum Einsatz. Mittels der PAS-Färbung konnten in der Tomate vier Glycoproteine mit MG von 20, 26, 36 und 44 kDa visualisiert werden. Dieses Resultat wurde durch eine Periodatsspaltung, bei welcher eine Zerstörung der Kohlenhydrate erfolgte, verifiziert. Bei der anschließenden immunochemischen Detektion unter Verwendung des Poolserums war zum einen eine Schwächung der 26 kDa und 44 kDa-Bande erkennbar. Zum anderen hat die Periodatbehandlung zur Eliminierung der IgE-Bindungsfähigkeit des 36 kDa Allergens geführt. Die Detektion aller anderen Allergene erfolgte unverändert. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß die Allergene mit den MG von 26, 36 und 44 kDa CCD tragen könnten. Da die Allergenbanden bei 26 und 44 kDa nur geschwächt worden sind, wäre es möglich, daß diese Proteine neben potentiellen CCD weitere, nur durch Proteine gebildete Sequenz- bzw. Konformationsepitope tragen. Allerdings können diese Ergebnisse nur als Hinweise auf eine mögliche CCD gewertet werden, da die Periodatbehandlung ebenso eine Veränderung von oxidationsempfindlichen AS zur Folge haben könnte, woraus ebenfalls eine Zerstörung des Epitops resultieren würde. Die Apparenz von CCD auf den Allergenen der Tomate wird durch die Ergebnisse von ZELNY et al. [1999] bestätigt. Sie charakterisierten die Struktur der N-gebundenen Oligosaccharide der Tomate und konnten zeigen, daß bei der Mehrheit der N-Glycane an dem terminalen N-Acetylglucosamin ein α -1,3-Fucose-Rest vorliegt. Von GARCIA-CASADO et al. [1996], WILSON & ALTMANN [1998] und PETERSEN & MUND [2001] konnte die IgE-bindende Potenz der α -Fucose nachgewiesen werden. BLEUMINK et al. [1966,1967] beschrieben die Isolierung einer nicht näher charakterisierten Fraktion der Tomate mit einem hohen allergenen Potential, welche aus Glycoproteinen mit MG zwischen 20 und 30 kDa bestand. Eine Periodatbehandlung führte in der Studie von PETERSEN et al. [1996] zu einer

drastischen Reduzierung der IgE-bindenden Proteine, wobei lediglich das Profilin noch detektierbar war. Eine sensiblere Methode zum Nachweis von Glycoproteinen stellt die spezifische Detektion durch die Verwendung von Lectinen dar. Der Nachweis erfolgte mittels Lectin-Blot, bei welchem die HRP- konjugierten Lectine Con A, PNA und RCA zur Verfügung standen. Während das Lectin PNA keine Bindungsaktivität aufwies, zeigt RCA, welches spezifisch auf α - und β -Galactose reagiert, schwache Bindungen an Glycoproteine mit MG von 20 kDa sowie zwischen 36 und 70 kDa. Eine Inkubation mit dem Lectin Con A resultierte in einer Detektion von einer Vielzahl von Proteinen im Bereich von 18 - 70 kDa. Der Vergleich mit dem Allergenspektrum läßt vermuten, daß es sich bei den Allergenen um Glycoproteine handelt, bei welchen α -Mannose, α -Glucose bzw. N-Acetylglucosamin glycosidisch gebunden sind. Der Nachweis potentieller Glycoproteine wurde zudem unter Verwendung der AC, bei welcher die Lectine RCA bzw. WGA als Liganden fungierten, durchgeführt. Die von den Lectinliganden retardierten Glycoproteine wurden nach erfolgter Elution von der Säule elektrophoretisch getrennt und unspezifisch sowie immunologisch detektiert. Das unspezifisch visualisierte Eluat der RCA wies Proteine im Bereich zwischen 20 und 70 kDa auf. Im Gegensatz zum RCA-Lectinblot konnten die Proteine intensiver detektiert werden, welches jedoch in der Konzentrierung des Extraktes nach erfolgter AC begründet liegt. Von diesen Glycoproteinen konnte lediglich ein Protein bei 30 kDa als Allergen identifiziert werden. Eine Vielzahl von Proteinen im gesamten MG-Bereich von 14 bis 94 kDa zeigte eine Bindungsaffinität zum Lectin WGA, wobei auch hier lediglich das 44 kDa-Allergen als Glycoprotein nachgewiesen werden konnte. Daneben konnte das 44 kDa-Allergen jedoch auch im Durchlauf der WGA-AC nachgewiesen werden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß die im IB bei 44 kDa sichtbare Bande durch mehrere, unterschiedliche IgE-bindende Proteine hervorgerufen wird. Es wäre aber auch denkbar, daß es sich um das gleiche Protein handelt, welches unterschiedliche Kohlenhydratketten trägt. Dies stimmt mit dem Ergebnis der 2D-Elektrophorese überein, bei welcher sich die Spots mit einem MG von 44 kDa über einen pI-Bereich von 3.8 bis 6.1 verteilten. Diese Verteilung könnte zum einen über leichte Unterschiede in der AS-Sequenz oder über unterschiedliche Kohlenhydratketten erklärt werden. Der Nachweis von Kohlenhydraten des 44 kDa-Allergens, welche später als Polygalacturonase 2A identifiziert wurde, steht dabei im Einklang mit der molekularen Charakterisierung dieses Proteins durch GRIERSON et al. [1986] und SHEEHY et al. [1987]. Sie konnten zeigen, daß die Polygalacturonase 2A an vier Stellen eine N-glycosidische Bindung aufweist. FÖTISCH et al. [2001] dokumentierten Glycoproteine in der Tomate über den MG-Bereich 20 - 94 kDa. Sie beschrieben, daß die meisten Allergene der Tomatenfrucht, mit Ausnahme der Proteine mit MG 23, 40 und 43 kDa, in ihrem Epitopaufbau Glycostrukturen tragen. PETERSEN & MUND [2001] konnten unter Verwendung des Lectins *Aleuria aurantia* Agglutinin (AAA), welches α -Fucose spezifisch zu binden vermag, mehrere Glycoproteine detektieren. Dabei wurden auch Banden >65, 35 - 45, 31 und 25 kDa visualisiert, welche auch im IB vorhanden waren und somit eine IgE-bindende Aktivität aufwiesen. Da α -Fucose als IgE-bindende Struktur angesehen wird [GARCIA-CASADO et al. 1996; WILSON & ALTMANN 1998; PETERSEN & MUND 2001], wird vermutet, daß die IgE-Reaktivität der eben beschriebenen Allergene auf dem Vorkommen von Kohlenhydratdeterminanten basieren könnte. Dies steht in Übereinstimmung mit der durchgeführten Periodatspaltung, bei welcher die IgE-Bindungsfähigkeit des 26 und 44 kDa Allergens, welche dem 25 und 43 kDa-Allergen entsprechen könnten, geschwächt wurde. Zudem könnte das von PETERSEN & MUND [2001]

beschriebene 35 kDa-Allergen mit der allergenen Bande bei 36 kDa, welche nach der Periodatbehandlung nicht mehr apparent war, übereinstimmen.

Im Rahmen zur Stabilitätsuntersuchung gegenüber proteolytischen Enzymen der Tomatenallergene wurde eine einfache Simulation des menschlichen Verdauungstraktes durchgeführt. Dadurch sollte geklärt werden, ob durch die Tomatenallergene eine Sensibilisierung des Immunsystems über den gastrointestinalen Trakt erfolgen kann. Nach ASTWOOD et al. [1996] und TAYLOR [1992] ist eine Sensibilisierung des Organismus nur dann möglich, wenn die Allergene die Magenpassage des Verdauungstraktes mit intakten Epitopen überstehen. Daher wird die Proteininstabilität gegenüber der enzymatischen Verdauung auch im Rahmen einer Sicherheitsbeurteilung von genetisch veränderten Pflanzen untersucht [FUCHS et al. 1993; REED et al. 1996]. Eine Auslösung von schwachen klinischen Symptomen wie dem OAS ist jedoch nicht an eine Persistenz der Allergene gegenüber der proteolytischen Spaltung gebunden, sondern kann ebenso über potentiell vorhandene Kreuzreaktivitäten der Lebensmittel zu Pollenallergenen erfolgen. Ein Beispiel hierfür stellt die birkenpollenassoziierte Haselnußallergie dar. VIETHS et al. [1999] konnten einen weitgehenden Abbau der Allergenaktivität bzw. der Allergene der Haselnuß nach erfolgter Pepsinbehandlung feststellen. Die trotzdem auftretenden klinischen Symptome, welche sich fast ausschließlich auf das OAS beschränkten, erklärten sie über die Kreuzallergenität zu Birkenpollen. Gegenüber den in der Literatur beschriebenen Studien, in welchen lediglich eine Simulation der Magenverdauung mit Pepsin erfolgte [ISHIZAKA et al. 1960; MATSUDA et al. 1983; ASTWOOD et al. 1996], wurde dem Magenverdau eine in vitro Darmverdauung unter Verwendung der Enzyme Trypsin, Pankreatin und Proteinase K angeschlossen. Die für die simulierte Magenverdauung verwendete Pepsinaktivität sowie die Variation der Inkubationsdauer orientierte sich an den von ASSELIN [1989], ASTWOOD et al. [1996] und MATSUDA et al. [1983] gewählten Parametern. Bereits beim Eintritt in den Magen kann es durch den niedrigen pH-Wert zur Hydrolyse der Proteine kommen, so daß neben der Inkubation mit verschiedenen Pepsinkonzentrationen die Einwirkung des pH-Wertes auf die Tomatenproteine untersucht wurde. In dem Extrakt der nur mit Säure behandelten Tomate konnten keine Unterschiede des Allergenspektrums im Vergleich zur nativen Tomate festgestellt werden. Zudem konnte mittels der EAST-Inhibition eine identische Allergenaktivität nachgewiesen werden. Einen geringfügigen Einfluß eines sauren Mediums auf die Allergene konnten BARNETT & HOWDEN [1986] an einem Glycoprotein der Erdnuß sowie KORTEKANGAS-SAVOLAINEN et al. [1983] an Hefeallergenen nachweisen. HONMA et al. [1994] stellten eine unveränderte Allergenität des Ovalbumins aus dem Hühnerei bis pH 3.0 fest. Die Einwirkung von Pepsin auf die Tomatenallergene induzierte einen deutlichen Abbau mehrerer Proteine, lediglich die Allergene bei 18, 36, 44 und > 70 kDa waren stabil. Die in der unspezifischen Silberfärbung detektierten neuen Banden im unteren MG-Bereich zeigten keine IgE-bindende Reaktivität. Eine Erhöhung der Enzymaktivität hatte eine weitere Hydrolyse der Allergene zur Folge. Während die allergene Bande bei einem MG von 36 kDa nicht mehr apparent war, konnte eine neue Bande mit einem etwas geringeren MG von ca. 30 kDa detektiert werden. Dies läßt die Vermutung zu, daß es sich bei der neuen Bande um ein Fragment des 36 kDa-Allergens handelt, bei welchem das IgE-bindende Epitop erhalten blieb. Dies stimmt mit Ergebnissen von MAHMOUD et al. [1992] überein, wonach für die Aktivität eines Allergens nicht die Stabilität des gesamten Proteins sondern lediglich die des Epitops von Bedeutung ist. In der Tomate zeigten sich allerdings keine Neo-Allergene, wie sie durch SCHWARZ et al. [1980] in Kuhmilch oder von POSCH et al

[1999] in Avocados nachgewiesen wurden. Durch die EAST-Inhibition konnte, entsprechend der Ergebnisse des IB, eine leichte Reduktion der allergenen Aktivität durch eine Hydrolyse mit Pepsin nachgewiesen werde. Dabei zeigten sowohl die Erhöhung der Pepsinaktivität als auch eine verlängerte Inkubationsdauer keinen Einfluß auf die allergene Potenz. YAGAMI et al. [2000] beschrieben Allergene der Kartoffel und Kiwi, welche über eine Inkubationsdauer von 16 Stunden resistent waren. Allerdings dokumentierten sie ebenso Latexallergene, welche schon nach 8 min hydrolysiert worden sind. Die Resistenz von Pfirsichallergenen im sauren Milieu unter Einwirkung von Pepsin konnte von VAN REE et al. [2000] belegt werden. Demgegenüber steht die Untersuchung am Apfel von JENSEN-JAROLIM et al. [1999]. Sie dokumentierten eine vollständige Hydrolyse des Hauptallergens Mal d 1 unter gastrischen Bedingungen. ASTWOOD et al. [1996] belegten ihre Aussage, daß ein Allergen die Magenpassage unter Erhaltung des Epitops überstehen muß, anhand von verschiedenen Lebensmitteln. Dabei zeigten sie, daß die Allergene eine höhere Persistenz gegenüber nicht IgE-reaktiven Proteinen aufwiesen und somit erst eine Aufnahme über die Mucosa möglich ist. Entsprechend der nachgewiesenen Resistenz einiger Tomatenallergene wären diese demnach zu einer Sensibilisierung des Organismus befähigt. Die Sensibilisierung gegen das Profilin der Tomate scheint dagegen eher über eine Kreuzreaktion erklärbar, da schon nach einer Inkubation mit der geringsten Pepsinaktivität dieses im IB nicht mehr nachweisbar ist. Die Instabilität des Profilins wird dabei über die Ausbildung eines Konformationsepitops erklärt, welches anhand von Röntgenstrahl- und NMR-Analysen bestätigt werden konnte [CEDERGREN-ZEPPEZAUER et al. 1993, VINSON et al. 1994]. Die Wahl der Enzymaktivität für die simulierte Darmverdauung orientierte sich an der Studie von ASSELIN et al. [1989]. Die Inkubation der zuvor einer Magenverdauung unterzogenen Tomate mit Trypsin bewirkte einen Abbau der allergenen Bande bei ca. 70 kDa, wohingegen sich das Allergen bei 44 kDa als überaus resistent erwies. Daneben wurde eine neue IgE-bindende Bande oberhalb 94 kDa detektiert. Auch die Inkubation mit Proteinase K führte zur Bildung einer neuen allergenen Bande im oberen MG-Bereich, wobei keine weiteren Banden mehr visualisiert wurden. Die Bildung dieser neuen allergenen Banden kann durch die Entstehung eines sogenannten Plasteins erklärt werden. Diese proteinähnliche Struktur wird durch die Reaktion des Hydrolates einer enzymatischen Spaltung mit proteolytischen Enzymen gebildet und weist ein höheres MG als die Ausgangssubstanz auf [ERIKSON & FAGERSON 1976]. Neben der Plastein-Reaktion kann nach ASSELIN et al. [1989] allerdings auch ein Peptid-Peptidcrosslinking für eine Neubildung von IgE-bindenden Strukturen verantwortlich sein. Die Inkubation mit Pankreatin hatte im Vergleich zum eingesetzten Extrakt der Pepsinverdauung keine weitere Hydrolyse zur Folge. Erst eine Erhöhung der Aktivität des Pankreatins führte zum Abbau der IgE-bindenden 70 kDa Bande, während durch die Verlängerung der Inkubationsdauer keine Allergenitätsminderung erzielt werden konnte. Dies stimmt mit dem Ergebnis von MAHMOUD et al. [1992] überein, welche anhand einer Pankreatinspaltung an Molkeproteinen demonstrierten, daß in den ersten 10 % der Gesamthydrolysezeit der Hauptteil der proteolytischen Reaktion abläuft und somit auch der größte Allergenitätsverlust zu erwarten ist. Die Tomatenallergene wiesen nach der simulierten gastrointestinalen Verdauung immer noch eine recht hohe Allergenität auf, welche auf eine hohe Persistenz dieser Proteine hindeutete. Die Allergene der Erdnuß zeigen gegenüber den proteolytischen Prozessen einer simulierten Magenverdauung mit anschließender Darmverdauung eine entsprechende Persistenz [VIETHS et al. 1999]. Es kam lediglich zu einer geringen Senkung der allergenen Aktivität. Im Extrakt der verdauten Erdnuß

konnte eine IgE-bindende Bande mit einem MG von 23 kDa nachgewiesen werden, welche aus der Hydrolyse des Hauptallergens der Erdnuß (66 kDa), Ara h 1 resultierte und somit ein Fragment desselben darstellt. DOMINGUEZ et al. [1990] beschrieben eine hohe Stabilität der Senfallergene gegenüber den Verdauungsprozessen. Im Gegensatz dazu steht die Studie von BURKS et al. [1991a], in welcher von einer fast 10-fachen Reduktion der allergenen Aktivität der Sojaallergene nach erfolgtem Verdauungsprozeß berichtet wird. Ebenso zeigen die Epitope der Haselnuß [Vieths et al. 1999] und die des Ovomuroid des Hühnereies [YAMADA et al. 2000] eine geringe Persistenz gegenüber Verdauungsenzymen. Es ist jedoch auffällig, daß in vielen Lebensmitteln sowohl persistente als auch labile Allergene vorhanden sind [YAGAMI et al. 2000]. Das Auftreten von labilen Allergenen kann dabei wahrscheinlich über die existierenden Kreuzreaktivitäten zu Inhalationsallergenen erklärt werden, wodurch über den inhalativen Weg der Organismus sensibilisiert werden kann..

Die Tomatenallergie wird häufig mit dem Latex-Frucht-Syndrom in Verbindung gebracht [ABECK et al. 1994; HELBING 1997; BREHLER et al. 1997; GARCIA ORTIZ et al. 1998, RECHE et al. 2001]. Aber auch im Zusammenhang mit einer Sensibilisierung gegen Birkenpollen [HANNUKSELA & LATHI 1977; PFAU et al 1996; VIETHS et al. 1996c] sowie einer Gräserpollinose findet sie Erwähnung [ORTOLANI et al. 1988; DE MARTINO et al. 1988; BOCCAFOGLI et al. 1994]. Daneben finden sich auch vereinzelt Berichte über eine Kreuzreaktion zwischen Tomaten und Beifußpollen [WÜTHRICH et al. 1990, PICHLER & STICH 1993]. Basierend auf diesen Erkenntnissen sollte nun die Evidenz der Kreuzreaktivität zu anderen pflanzlichen Lebensmitteln untersucht werden. Für diese Studie wurden die birkenpollenassoziierten Lebensmittel Apfel, Haselnuß, Litchi und Sellerie, die latexassoziierte Banane sowie die phylogenetisch verwandte Kartoffel und Paprika ausgewählt. Das für diese Untersuchungen zusammengestellte Poolserum wies eine EAST-Klasse ≥ 2 gegen sämtliche Extrakte auf. Der Extrakt des Hühnereies diente als Kontrolle der Methode und wurde in den Untersuchungen mitgeführt. Sowohl in der phylogentisch verwandten Kartoffel als auch in der Paprika konnten sämtliche, in der Literatur beschriebenen Allergene nachgewiesen werden. Beide Extrakte vermochten bei der IB-Inhibition des elektrophoretisch getrennten Tomatenextraktes eine Inhibition sämtlicher Tomatenallergene zu induzieren. Ebenso zeigten beide Extrakte in der EAST-Inhibition, bei welcher die Tomate festphasengekoppelt vorlag, eine ähnlich hohe Allergenaktivität. Die hohe Kreuzreaktivität innerhalb der Pflanzengruppe der *Solanaceae* wurde über die IB- bzw. EAST-Inhibition, bei welcher der Tomatenextrakt als Inhibitor diente, bestätigt. In der IB-Inhibition wurden sämtliche Allergene der Kartoffel eliminiert oder zumindest stark geschwächt, während die Paprikaallergene komplett gehemmt wurden. Ebenso waren die jeweils erreichten C_{50} -Werte der homologen Inhibitionen und der des Tomatenextraktes annähernd identisch. ORTEGA et al. [1999] untersuchten die Kreuzreaktivität der Pflanzengruppe der *Solanaceae* anhand des Tabaks. Dabei stellten sie mittels CAP-Inhibition und des Skin Prick Tests fest, daß die Tomatenallergene Homologien zu den Tabakallergenen aufweisen. Allerdings konnte zwischen dem Tabak und der Kartoffel trotz botanischer Verwandtschaft keine Kreuzreaktivität nachgewiesen werden. RECHE et al. [2001] dokumentierten mittels IB- und CAP-Inhibition eine sehr hohe Kreuzreaktivität zwischen der Kartoffel und der Tomate, welche sie unter anderem auf das zum Latexallergen Hev b 7 homologen Patatin mit einem MG von 44-46 kDa zurückführen. Auch HELBING [1997] vermutet, daß das Speicherprotein Patatin mit einem MG von 46 kDa eine wichtige kreuzreaktive Struktur beim Latex-Frucht Syndrom darstellt. Im Vergleich zu den botanisch

verwandten Lebensmitteln zeigte die latexassoziierte Banane eine schwächere immunologische Beziehung zu den Tomatenallergenen. In der IB-Inhibition vermochte der Extrakt der Banane die Tomatenallergene bei 44 und 65 kDa nicht vollständig zu inhibieren. Andersherum konnte die IgE-Bindung an das 43 kDa- Bananenallergen durch den Tomatenextrakt ebenfalls nicht komplett gehemmt werden. Entsprechend dazu lag der C_{50} -Wert der homologen EAST-Inhibition der Tomate bei einer Konzentration von 1.7 $\mu\text{g/mL}$, wohingegen eine Konzentration von 86.5 $\mu\text{g/mL}$ des Bananenextraktes für eine 50 %ige Inhibition nötig waren. Die EAST-Inhibition des festphasengekoppelten Bananenextraktes lieferte ähnliche Ergebnisse. Eine Kreuzreaktivität zwischen der Banane und der Tomate gilt damit als bestätigt, die wohl hauptsächlich auf die Strukturhomologie der Bananenallergene zum Latexallergen Hev b 7 zurückzuführen ist [BLANCO et al. 1994; ANDRE et al. 1995]. Bei der Charakterisierung der Allergene der birkenpollenassoziierten Lebensmittel Apfel, Haselnuß, Litchi und Sellerie konnten nicht alle in der Literatur beschriebenen Allergene detektiert werden. Während im Apfel sämtliche Allergene, unter anderem auch das Mal d 1, visualisiert wurden, wies das Poolserum keine spezifisches IgE gegen das Hauptallergen der Haselnuß bei 18 kDa, dem 16 kDa Allergen der Litchi sowie den Hauptallergenen Api g 1 und Api g 2 des Selleries mit MG von 16 bzw. 17 kDa auf. Während die Inkubation des Sellerieextraktes in der IB-Inhibition zu einer Schwächung aller IgE-bindenden Banden führte, war nach erfolgter Inkubation des Apfelextraktes noch eine deutliche Bande bei 65 kDa apparent. Durch die Litchi konnten die allergenen Banden bei MG von 26, 36 und 44 kDa nicht inhibiert werden. Die Inkubation mit dem Haselnußextrakt resultierte lediglich in der Inhibition des Tomatenprofilins. Alle anderen Banden waren weiterhin vorhanden. Diese Ergebnisse spiegelten sich auch in der EAST-Inhibition der festphasengekoppelten Tomate wider. Von den vier Extrakten besaß, entsprechend der IB-Inhibition, der Sellerieextrakt die höchste und der Haselnußextrakt die geringste Inhibitionsfähigkeit. Bei der Litchi bzw. der Sellerie als Festphasenkomponenten wurde jeweils eine allergene Bande bei 50 kDa durch die Tomate nicht inhibiert. Des weiteren zeigte das 23 kDa Allergen der Sellerie keine Kreuzreaktivität zu den Tomatenallergenen. In der EAST-Inhibition wiesen sowohl die Litchi als auch der Sellerie im Vergleich zur Tomate dagegen ähnliche C_{50} -Werte auf. Im Gegensatz dazu kam es durch die Tomate nur zu einer geringfügigen Inhibition des Apfels und der Haselnuß. Das Hauptallergen des Apfels, Mal d 1, zeigte in der IB-Inhibition keine immunologischen Ähnlichkeiten zu den Tomatenallergenen und konnte somit nicht durch diese inhibiert werden. Zudem bewirkte der Tomatenextrakt in der EAST-Inhibition lediglich eine maximale Inhibition von 26 %. Ähnliche Ergebnisse wurden anhand der Haselnuß erzielt. In der IB-Inhibition wurde keine Eliminierung der allergenen Bande bei 18 kDa durch die Tomate erreicht. Ebenso lag der C_{50} -Wert, resultierend aus der EAST-Inhibition des Tomatenextraktes mit 173.5 $\mu\text{g/mL}$ signifikant höher als der der homologen Inhibition mit dem Haselnußextrakt (0.9 $\mu\text{g/mL}$). Basierend auf diesen Ergebnissen kann nur von einer geringfügigen Kreuzreaktivität der Tomate zum Apfel und der Haselnuß ausgegangen werden. Da die jeweiligen Hauptallergene des Apfels bzw. der Haselnuß stark homolog zum Bet v 1 sind, wird vermutet, daß die Tomatenallergene keine immunologische Übereinstimmung mit diesem Birkenpollenallergen aufweisen. Diese Vermutung wird durch die Studie von FÖTISCH et al. [2001] gestützt, in welcher nur eine unwesentliche Inhibition der Tomatenallergenität durch rekombinates Bet v 1 erzielt werden konnte. Es ist daher zu vermuten, daß die in der Literatur beschriebene Kreuzreaktivität zu Birkenpollen in erster Linie auf Bet v 2 Homologe der Tomate und auf CCD zurückzuführen ist. Wie am Beispiel der Litchi

und Sellerie gezeigt, darf eine Kreuzreaktivität der Tomate mit birkenpollenassoziierten Lebensmitteln jedoch nicht unterschätzt werden.

5.2 Isolierung von Tomatenallergenen

Zur Isolierung eines Tomatenallergens wurde das 44 kDa-Allergen ausgewählt, da es basierend auf den vorangegangenen Untersuchungen nicht nur hinsichtlich der Sensibilisierungshäufigkeit sowie der Detektionsintensität von Interesse ist. Es schien zudem bei verschiedenen *pI* apparent zu sein und spielt nach RECHE et al. [2001] außerdem bezüglich der Latexassoziation der Tomate eine entscheidende Rolle. Der Isolierung bzw. Reinigung des Allergens sollte sich eine Identifizierung anschließen.

Bisher liegen wenige Arbeiten vor, die sich mit der Isolierung und Reinigung von Tomatenallergenen beschäftigten. Eine Charakterisierung der Allergene erfolgte lediglich anhand einer elektrophoretischen Trennung mit anschließender immunologischer Detektion. Die bislang durchgeführten Identifizierungen von Allergenen der Tomate über eine N-terminale Sequenzierung wurden ohne eine vorangestellte Isolierung durchgeführt [PETERSEN et al. 1996, FÖTISCH et al. 2001; KONDO et al. 2001]. Lediglich BLEUMINK et al. [1966] fraktionierten den Extrakt aus reifen Tomaten mittels sequentieller Präzipitation und anschließender IEC an einer DEAE-Sephadex-Säule. Dabei isolierten sie eine Fraktion, die immunologisch eine hohe allergene Potenz aufwies und in welcher Glycoproteine mit MG zwischen 20 und 30 kDa vorlagen [BLEUMINK et al. 1967]. Weitere Isolierungsversuche wurden ebenso wenig wie genauere Untersuchungen der Glycoproteine dieser Fraktion durchgeführt. Da mittels der 2D-Elektrophorese gezeigt werden konnte, daß der *pI* des zu isolierenden 44 kDa-Allergens im schwach sauren pH-Bereich liegt, wurde die IEC unter Verwendung einer Anionenaustauschersäule mit der unbekannten Tomatensorte durchgeführt. Die elektrophoretische Untersuchung der einzelnen Fraktionen zeigte, daß in fast jeder Fraktion eine allergene Bande mit einem MG von 44 kDa apparent war. Um eine Verschleppung dieses Allergens über den gesamten *pI*-Bereich ausschließen zu können, wurden drei Fraktionen mittels IEF untersucht, wodurch gezeigt werden konnte, daß die Trennung nach den *pI* mittels IEC erfolgreich verlief. In der Vergangenheit kamen Anionenaustauschersäulen bereits mehrfach erfolgreich zur Isolierung von Proteinen zum Einsatz. BURKS et al. [1991b] setzte eine Anionenaustauschersäule zur Isolierung des Hauptallergens Ara h 1 der Erdnuß ein. Ebenso konnten BERNHISEL-BROADBENT et al. [1994] über eine DEAE Sephacryl-Säule die Proteine Ovomucoid, Ovotransferin und Ovalbumin reinigen. An einem Resource Q-Material wurden die Kiwi Proteine Act c 1 [PASTORELLO et al. 1996] und Act c 2 [MÖLLER et al. 1997b] vorgereinigt. Auch SEPPÄLÄ et al. [1999] verwendeten eine Anionenaustauschersäule als ersten Schritt für eine weiterführende Isolierung des Patatins der Kartoffel.

Da mittels der IEC keine ausreichende Isolierung der Allergene erzielt werden konnte, wurde eine weitere Reinigung mittels RPC angeschlossen. Nach PASTORELLO & TRAMBAIOLI [2001] besitzt diese Methode eine sehr hohe Trennleistung sowie eine gute Reproduzierbarkeit. FAHLBUSCH et al. [1995] setzten die RPC als zweiten Schritt zur Isolierung des Apfelallergens Mal d 1 erfolgreich ein. Daneben wurde auch zur Reinigung des Patatins der Kartoffel die RPC eingesetzt [SEPPÄLÄ et al. 1999]. Für die weitere Reinigung der Allergene mit dem MG von 44 kDa und den unterschiedlichen *pI* von ca. 6.0, 5.3 bzw. 4.6 aus drei verschiedenen

Fractionen der IEC erwies sich die RPC als geeignet. Die isolierten Allergene wurden einer N-terminalen Sequenzanalyse unterzogen. Dabei wurde für alle drei isolierten Allergene die identische AS-Sequenz anhand von 15 Cyclen des Edman-Abbaus ermittelt. Durch eine Datenbankrecherche in SWISSPROT konnten alle drei analysierten Allergene aufgrund einer 100 %igen Übereinstimmung der AS-Sequenz als Polygalacturonase 2A identifiziert werden. Bei den als Polygalacturonase 2A identifizierten Allergenen mit unterschiedlichen *pI* könnte es sich um ein oder um Isoenzyme handeln. Eine andere Erklärung stellen die vier potentiellen N-glycosidisch gebundenen Kohlenhydrate dar. Eine unterschiedliche Glycosylierung der Polygalacturonase 2A würde verschiedene *pI* zur Folge haben. Ohne eine vorangestellte Isolierung vorzunehmen identifizierten KONDO et al. [2001] mittels N-terminaler Sequenzanalyse ebenfalls ein Majorallergen als Polygalacturonase 2A und gaben ein MG von 46 kDa an. Daneben identifizierten auch FÖTISCH et al. [2001] ein Allergen mit einem MG von 36 kDa als Polygalacturonase 2A. Auch sie gaben für die Polygalacturonase 2A verschiedene *pI* zwischen 6.8 und 7.5 an. Bei dem von FÖTISCH als Polygalacturonase 2A identifizierten 36 kDa Allergen könnte es sich um ein Bruchstück der Polygalacturonase 2A handeln. Ausgehend von dieser Vermutung wären auch die differierenden *pI* erklärbar, da hieraus eine unterschiedliche AS-Zusammensetzung resultiert. Aufgrund der hohen Homologie zwischen Polygalacturonasen verschiedenen Pflanzen [FÖTISCH et al. 2001] wird vermutet, daß die Polygalacturonase eine neue Klasse von Panallergenen repräsentiert. Zudem könnte über die Polygalacturonase die klinische Assoziation zwischen der Allergie gegen Gräserpollen und Tomaten erklärt werden [DE MARTINO et al. 1988].

Anhand den Ergebnissen der Trennung mittels IEC verschiedener Tomatensorten zeigte sich, daß in der Sorte «Balkonstar» ein 26 kDa-Allergen mit einem *pI* von ca. 5.3 apparent ist, welches in keiner anderen Sorte nachzuweisen war. Aufgrund dieses Ergebnisses erschien eine Isolierung sowie Identifizierung des Proteins von besonderem Interesse zu sein. Für die weitere Reinigung der IEC-Fraktion wurde die SEC gewählt, da sie bereits erfolgreich als letzter Reinigungsschritt für Allergene mit ausreichend differierenden MG eingesetzt wurde, welche zuvor mit anderen chromatographischen Methoden aus dem Gesamtextrakt isoliert worden sind [PASTORELLO & TRAMBAIOLI 2001]. So konnten z.B. das Senfallergen Sin a 1 [MENENDEZ-ARIAS et al. 1988] oder auch das Casein der Kuhmilch [MENA et al. 1992] erfolgreich isoliert werden. Im Gegensatz dazu wurde mittels SEC keine vollständige Isolierung des 26 kDa-Allergens erreicht; zudem erwies sich die SEC in Fraktionierungsversuchen als nicht reproduzierbar. Auch eine an die IEC angeschlossene Trennung mittels RPC führte zu keiner ausreichenden Isolierung des 26 kDa-Allergens. Die N-terminale Sequenzierung dieses Allergens erfolgte somit aus dem Extrakt der entsprechenden IEC-Fraktion. Bei dem Vergleich mit den Einträgen der Proteindatenbank SWISSPROT [2002] konnte eine 75 % ige Homologie zu dem Cystein Protease Inhibitor der Kartoffel festgestellt werden. SEPPÄLÄ et al [2001] identifizierten in der Kartoffel zwei Isoenzyme des Cystein Protease Inhibitors mit einem allergenen Potential, welche sie als Sol t 3.0101 und Sol t 3.0102 bezeichneten.

5.3 Ausblick

In der Literatur finden sich bislang keine Studien über die klinische Relevanz bzw. die Einteilung der Tomatenallergene in Minor- und Majorallergene. Daher sollte anhand eines ausreichend großen Patientenkollektives solch eine Charakterisierung der Allergene der

Tomate erfolgen. Des weiteren sollten in diesen Studien die sortenspezifischen Unterschiede berücksichtigt und verifiziert werden. Die Untersuchungen zur Stabilität der Tomatenallergene gegenüber einem proteolytischen Verdau zeigten, daß ein Teil der Tomatenallergene sehr resistent waren und somit zur Sensibilisierung über den Gastrointestinaltrakt befähigt wären. Diese bisher in einem einfachen „batch“-System durchgeführten Untersuchungen sollten durch einen Versuchsaufbau, welcher den dynamischen in-vivo Prozeß und somit die Absorption der Allergene durch die Mucosa berücksichtigt, ergänzt werden. Hinsichtlich der Kreuzreaktivität der Tomate könnten weitere Untersuchungen an der isolierten Polygalacturonase 2A mit rekombinanten Birkenpollenallergenen oder Latexallergenen durchgeführt werden, um die Relevanz dieses Allergens genauer bewerten zu können. Um die Apparenz potentiell vorhandener Kohlenhydratdeterminanten zu verifizieren, könnte eine Deglycosylierung des Proteins mit nachfolgender immunochemischer Detektion durchgeführt werden, wie sie bereits von BESLER et al. 1997 am Ovomuroid gezeigt wurde. Diese Methode würde es zudem ermöglichen, die erhaltenen Fragmente hinsichtlich ihrer MG mittels Massenspektrometrie zu bestimmen und dadurch eine Aussage über den Kohlenhydratanteil des Proteins zu machen. Da die AS-Sequenz des Allergens der Polygalacturonase 2A bereits bekannt ist, könnten mittels synthetisierten Peptiden, welche sich in ihrer AS-Sequenz überlappen, eventuell vorliegende Sequenzepitope identifiziert werden. Anhand des Hauptallergens Sol t 1 konnten unter Verwendung dieser Methodik bereits verschiedene Major- und Minorallergene identifiziert werden [ASTWOOD et al. 2000].

6 Zusammenfassung / Summary

Die vorliegende Arbeit hatte eine umfassende Charakterisierung der Allergene der Tomate zum Ziel. Neben der Charakterisierung sollte eine Methode zur Isolierung ausgewählter Allergene erarbeitet werden. Für die allergologischen Untersuchungen wurde ein Poolserum, bestehend aus Einzelseren mit spezifischen IgE-Gehalt gegen Tomate der EAST-Klasse ≥ 2 , eingesetzt. Die Bestimmung des allergenen Potentials und die Charakterisierung der Allergene erfolgte dabei mittels elektrophoretischer und immunologischer Verfahren. Zur Allergenisolierung wurden chromatographische Trennmethode eingesetzt.

Neben einem potentiellen Majorallergen mit einem MG von 44 kDa konnten in der Tomate noch weitere Allergene mit MG von 14, 18, 26, 28, 30, 36, 50, 65 und 70 kDa nachgewiesen werden. Die Charakterisierung der Tomatenallergene mittels IEF, zeigte, daß sich die pI der Allergene hauptsächlich auf den neutralen bis sauren pH-Bereich beschränken. Dabei wurden Banden bei pI von 3.8, 5.8 und 5.9 besonders intensiv detektiert. Anhand der 2D-Elektrophorese konnte den MG ein pI zugeordnet werden. Dabei zeigte sich, daß den Allergenen mit MG von 26, 44 und 70 kDa jeweils mehrere pI zugeordnet werden konnten, was auf die Anwesenheit von Isoallergenen hindeuten könnte.

Die Ergebnisse der Untersuchungen der zehn Tomatensorten «Balkonstar», «Togo Trefle», «Flamme», «Estrella», «Yellow King », «Tasty Tom», «Sweet million», «Roma», «El Salvador» und einer unbekannten Sorte zeigten bezüglich des Protein- und Allergenspektrums sortenspezifische Unterschiede. In der EAST-Inhibition zeigte die Sorte «Balkonstar» eine leicht erhöhte allergene Potenz im Vergleich zu den anderen Sorten, die eine vergleichbare Allergenität aufwiesen.

Die anhand von drei Sorten durchgeführten Untersuchungen zur Veränderung der Allergenität während des Reifungsprozesses führten zu einem einheitlichen Ergebnis. Die allergene Potenz der Früchte nahm während des Reifungsprozesses zu; analog dazu konnte im Allergenspektrum ein Konzentrationsanstieg der Allergene mit MG von 26, 30 und 44 kDa ermittelt werden.

Die Untersuchungen der verschiedenen Fruchtfragmente (Schale, Perikarp, Pulpa, Plazenta und Samen) von drei unterschiedlichen Tomatensorten des gleichen Reifestadiums belegten die signifikanten Unterschiede der Bestandteile hinsichtlich des Allergenspektrums, insbesondere des Samens. Dieser zeigte im Vergleich mit allen anderen Fragmenten ein unterschiedliches Allergenspektrum sowohl in der SDS-PAGE als auch der IEF, wobei in der SDS-PAGE insbesondere im MG-Bereich zwischen 16 und 30 kDa zusätzliche IgE-bindende Proteine auffällig waren. Zudem waren die Allergene bei 14 und 44 kDa im Samen nicht apparent. Anhand der IB-Inhibition konnte gezeigt werden, daß drei Allergene des Samens im Vergleich zu den anderen Allergenen differente Epitope tragen und zudem lediglich im Samen und der Pulpa vorhanden sind. Anhand der IEF konnte weiterhin gezeigt werden, daß sich auch die pI der Allergene des Samens von denen der anderen Fragmente unterscheiden. In der EAST-Inhibition konnte für den Samen eine deutlich schwächere allergene Potenz ermittelt werden.

Der Nachweis von Profilinen erfolgte unter Verwendung eines rekombinanten Anti-Birnenprofilin-Antikörpers. In der Gesamtfucht der Tomate konnte die allergene 14 kDa-

Bande als Profilin identifiziert werden. Außer im Samen, bei welchem im Profilinblot keine Bande detektiert werden konnte, war sie in sämtlichen Fruchtbestandteilen der Tomate vorhanden.

In der Tomate konnte eine Vielzahl von Glycoproteinen mit vier Methoden, welche auf zwei verschiedenen Prinzipien beruhen, nachgewiesen werden. Anhand der PAS-Färbung, welche auf der Spaltung mit Periodat beruht, konnten die Proteine mit MG 20, 26, 36 und 44 kDa als Glycoproteine identifiziert werden. Eine Inkubation der geblotteten Proteine des nativen Tomatenextraktes mit Periodat und einer anschließenden immunochemischen Detektion hatte die Eliminierung des 36 kDa Allergens sowie eine Intensitätsschwächung der 26 und 44 kDa Allergene zur Folge. Aufgrund dieser Ergebnisse ist bei diesen Allergenen eine Beteiligung der Kohlenhydrate am Epitopaufbau denkbar. Das zweite zur Detektion von Glycoproteinen eingesetzte Prinzip beruhte auf der Detektion derselben mit Lectinen. Unter Verwendung des Lectins Con A im Lectin-Blot konnten im MG-Bereich von 18 bis 70 kDa eine Vielzahl von Glycoproteinen nachgewiesen werden, wohingegen mittels RCA nur wenige und mittels PNA keine Glycoproteine nachweisbar waren. Die Lectin-AC wurde unter Verwendung der Lectine RCA und WGA durchgeführt. Mittels RCA war es möglich, das 30 kDa Allergen als Glycoprotein zu identifizieren. Ein weiteres allergenes Glycoprotein mit einem MG 44 kDa konnte unter Verwendung des Lectins WGA nachgewiesen werden. Aufgrund der verschiedenen Spezifität der verwendeten Lectine konnte zudem gezeigt werden, daß an dem Kohlenhydrataufbau der beiden allergenen Glycoproteine mit MG 30 und 44 kDa unterschiedliche Zucker beteiligt sind. Inwieweit diese Allergene Kohlenhydratdeterminanten tragen konnte jedoch nicht abschließend geklärt werden.

Gegenüber einer simulierten Magenverdauung der Tomate zeigten sich lediglich die Allergene mit MG von 44 und 36 kDa persistent. Die Inkubation mit Enzymen des Intestinaltraktes (Pankreatin bzw. Trypsin) führte zu einer weiteren Hydrolyse des 36 kDa-Allergens zu einem Molekül mit einem MG von 30 kDa unter Erhaltung des Epitops, wohingegen das 44 kDa weiterhin stabil war. Im niedermolekularen Bereich konnten keine IgE-bindenden Fragmente nachgewiesen werden.

Die mit der Tomate botanisch verwandten Lebensmittel Kartoffel und Paprika wiesen eine stark ausgebildete Kreuzreaktivität auf. Demgegenüber konnte keine Kreuzreaktivität der Tomate zu den Bet v 2 homologen Allergenen Mal d 1 des Apfels und dem 18 kDa Allergen der Haselnuß festgestellt werden. Somit zeigten diese beiden Lebensmittel auch nur eine schwach ausgeprägte Kreuzallergenität, welche auf Minorallergene der Birkenpollen bzw. der Haselnuß zurückzuführen ist. Zu den anderen untersuchten Lebensmitteln Banane, Litchi, Sellerie konnte dagegen eine deutliche immunologische Beziehung festgestellt werden.

Die Isolierung des 44 kDa Allergens erfolgte in zwei Reinigungsschritten. Im ersten Schritt erfolgte eine Vorreinigung des Gesamtextraktes mittels IEC an einer Anionenaustauschersäule. Drei Fraktionen dieser Trennung wurden anschließend jeweils gepoolt und über eine RPC-Säule weiter fraktioniert. Die so isolierten 44-kDa-Allergene mit verschiedenen pI (ca. pI 6.0, 5.3 bzw. 4.6) konnten jeweils über eine AS-Sequenzanalyse als Polygalacturonase 2A identifiziert werden.

Eine vollständige Isolierung des 26 kDa Protein mittels einer Kombination aus IEC und SEC, als auch die Kombination der IEC mit der RPC war nicht erfolgreich. Eine N-terminale

Sequenzierung dieses Allergens erfolgte daher aus der vorgereinigten IEC-Fraktion. Dabei zeigte sich eine 75 %ige Homologie des 26 kDa Allergens aus der Tomate zum Cystein Protease Inhibitor der Kartoffel.

The aim of the present study was an extensive examination of the allergens of tomatoes. Apart from characterisation, a method for the isolation of some selected allergens was a prime goal. For allergological investigations a pool serum was used which contained single sera that had specific IgE contents against tomato of EAST-class ≥ 2 . The determination of the allergenic potential and the characterisation of the allergens was performed using electrophoretical and immunological methods. For isolation of the allergens chromatographical separation techniques were applied.

Besides a potential major allergen with a molecular weight (MW) of 44 kDa, further allergens with MW of 14, 18, 26, 28, 30, 36, 50, 65 and 70 kDa were detected. Characterisation of the tomato allergens by IEF showed that the isoelectrical points (pI) of the allergens are mainly limited to neutral to acid pH. Major intensive bands were detected at pI values of 3.8, 5.8 and 5.9. On the basis of two-dimensional electrophoresis, pI could assign to the different molecular weights. Several allergens, i.e. those with MW 26, 44 and 70 kDa, had more than one pI, which might be an indication of the presence of isoallergens.

The results of the investigation of ten tomato cultivars «Balkonstar», «Togo Trefle», «Flamme», «Estrella», «Yellow King », «Tasty Tom», «Sweet million», «Roma», «El Salvador» and an unknown variety showed differences between the varieties with regard to both their protein- and their allergen spectrum. EAST-inhibition resulted in a slightly increased allergenic activity of the variety «Balkonstar» in comparison to the other cultivars, which exhibited a similar allergenicity.

Changes in the allergenic potential during ripening were investigated for three varieties. The result was a uniform allergenic potential increase during the maturing process. Correspondingly, an increase in the concentration of the allergens with MW of 26, 30 and 44 kDa could be observed.

Investigations of the different fragments of the fruit (peel, pericarp, pulpa, placenta and seed) of three varieties at the same stage of maturity resulted in significant differences of the fragments with regard to their allergenic spectrum. Especially the seed showed, in contrast to the other fragments, a different allergen spectrum, with SDS-page as well as with IEF. With SDS-page additional IgE binding proteins were observable, especially for MWs between 16 and 30 kDa. Furthermore the allergens with MWs of 14 and 44 kDa were not apparent in the seed. It was possible to show by IB-Inhibition that, in contrast to the other fragments, three allergens of the seed have different epitopes. These allergens are only present in the seed and the pulpa. On the basis of IEF it was possible to show that the isoelectrical points of the allergens in the seed are also different to those of the other fragments. EAST-Inhibition proves a significantly lower allergenic potential of the seed.

Profilins were detected by using a recombinant anti-pear profilin-antibody. The 14 kDa band of the complete tomato was identified as being a profilin. Except for the seed, for which no

band was detected in the profilin blot, the above mentioned band was apparent for all the other fragments of the fruit.

A large number of glycoproteins was detected by applying four different methods based on two distinct mechanisms. By PAS staining, based on splitting by periodate, proteins of the MW 20, 26, 36 and 44 kDa were identified as glycoproteins. The incubation of the blotted native tomato proteins with periodate followed by an immunological detection revealed an elimination of the 36 kDa allergen and an increased intensity of the 26 and 44 kDa allergens. These results led to the theory that for these allergens a carbohydrate structure is part of the epitope. The second method applied for detection of glycoproteins was based on detection with different lectins. By using Con A in the lectin blot a number of glycoproteins could be detected, whereas by using RCA only a few were detectable and with PNA no glycoproteins were verifiable. The lectin affinity chromatography was performed under application of the lectins RCA and WGA. By using RCA the 30 kDa allergen could be identified as a glycoprotein. Another allergenic glycoprotein with the MW of 44 kDa was shown by applying WGA. On account of the different specification of the lectins it could be shown that different sugars are involved in building the carbohydrate structure of the two glycoproteins with MW of 30 and 44 kDa. To what extent these allergens carried carbohydrate determinants could not be clarified.

Only the allergens of MW 36 and 44 kDa appeared to be resistant to simulated gastric digestion. Incubation with enzymes of the intestinal tract (pancreatin resp. trypsin) led to hydrolysis of the 36 kDa molecule, yielding a molecule of 30 kDa which maintains the epitope. The 44 kDa still remained stable. IgE binding fragments of lower MW were not detectable.

Botanically related vegetables such as potato and red pepper showed strong cross-reactivity to the tomato. In contrast, cross reactivity was determined neither with Bet v2 homologous allergens Mal d1 of the apple nor with the 18 kDa allergen of the hazelnut. Consequently only minor cross allergenic potential was observed for these foods, which can be traced back to minor allergens of birch pollen or hazelnut, respectively. In addition, a significant immunological relation was determined for other foods investigated, i.e. banana, lychee and celery.

The 44 kDa allergen was isolated in two cleaning up steps. In the first step the extract was purified by IEC with an anion exchange column. Three fractions of the separation were then pooled and further fractionated by use of an RPC-column. The isolated 44 kDa allergens with different IEP (pI 6.0, 5.3 resp. 4.6) were successfully identified using N-terminal sequencing as being polygalacturonase 2 A.

The complete isolation of the 26 kDa protein was not successful, neither by using a combination of IEC and SEC nor by combining IEC and RPC techniques. However, N-terminal sequencing was conducted using the pre-purified IEC fraction. The 26 kDa allergen of the tomato shares 75 % identity with the cysteine protease inhibitor of the potato.

7 Anhang

7.1 Gewinnen der Patientenserum

- ✎ 10 mL Blut mittels Serumröhrchen abnehmen
- ✎ mind. 30 min abkühlen lassen
- ✎ 10 min bei 4 °C und 4000 U/min zentrifugieren
- ✎ überstehendes Serum (ca. 3-4 mL) in Tubes abfüllen
- ✎ Seren bei -80 °C lagern

7.2 Extraktion der Proteine aus dem Lebensmittel

7.2.1 Tieftemperaturextraktion (TTE)

Die Tieftemperaturextraktion wird modifiziert nach VIETHS et al. [1992a] durchgeführt.

verwendete Lösungen

Diethylether / Aceton-Gemisch:	1:1 (v:v)	T = -80 °C
PBS (pH 7.4):	7.95 g	NaCl
	1.44 g	Na ₂ HPO ₄
	0.2 g	KH ₂ PO ₄
	0.2 g	KCl
	mit bidest. H ₂ O ad 1000 mL	

Acetonpulverherstellung

- ✎ 100 mL Aceton bei -80 °C für mind. 2 Stunden lagern
- ✎ 50 g des Analysenguts abwiegen
- ✎ in das vorgekühlte Aceton geben
- ✎ für mind. 2 Stunden bei -80 °C lagern
- ✎ mit dem Ultraturrax homogenisieren
- ✎ bei -20°C über Nacht lagern
- ✎ Homogenat über Büchnertrichter absaugen
- ✎ 3 mal mit je 20 mL kaltem Aceton (T = -20°C) und abschließend einmal mit einem Aceton / Diethylether-Gemisch (1:1; T = -20°C) waschen
- ✎ Rückstand trockensaugen
- ✎ in einen Rundkolben überführen
- ✎ 2 Stunden bei -80 °C durchfrieren lassen
- ✎ über Nacht lyophilisieren
- ✎ Lyophilisat fein vermahlen und bei -20 °C lagern
- ⇒ **Acetonpulver**

Proteinextrakte

- ✎ 0.5 - 3 g Acetonpulver einwiegen
- ✎ 15 mL PBS-Lsg. hinzufügen
- ✎ pH-Wert mit 0.1 mol/L NaOH auf pH 7.4 einstellen
- ✎ 1 h unter Eiskühlung rühren
- ✎ 1 h bei 4 °C & 3000 g zentrifugieren
- ✎ Rückstand abnutschen und verwerfen
- ✎ Filtrat in Aliquote (2 mL) portionieren und in Vials abfüllen
- ✎ Lyophilisieren und bei -20°C lagern
- ⇒ **PBS-Extrakt**

7.2.2 In-vitro Verdau

Im Rahmen der in-vitro Verdauung werden die Enzyme entsprechend den in den Tabellen 7-1 & 7-2 aufgeführten Bedingungen eingesetzt.

verwendete Lösungen

HCl: 4 mol/L	122 mL	HCl (36 %ig)
		mit dest. H ₂ O ad 1000 mL
NaOH-Lsg: 0.1 mol/L	4 g	NaOH
		mit dest. H ₂ O ad 1000 mL

Tab. 7-1: Bedingungen der simulierten Magenverdauung

Enzym		pH-Wert	Enzymkonzentration	Inkubationszeit [min]
Magenverdau	--	1.2	--	60, 120
	Pepsin	1.2	2·10 ⁵ Units/L	60, 120
	Pepsin	1.2	4·10 ⁵ Units/L	60, 120
	Pepsin	1.2	1·10 ⁶ Units/L	60, 120
	Pepsin	1.2	1·10 ⁷ Units/L	60, 120

Tab. 7-2: Bedingungen der simulierten Darmverdauung

	Enzym	pH-Wert	Enzymkonzentration	Inkubationszeit [min]
Darmverdau	--	1.2	--	60
	--	7.5	--	120
	Pepsin	1.2	$1 \cdot 10^6$ Units/L	120
	Pankreatin	7.5	Enzym : Frucht 1 : 25	60, 120
	Pepsin	1.2	$1 \cdot 10^6$ Units/L	120
	Pankreatin	7.5	Enzym : Frucht 1 : 12.5	60, 120
	Pepsin	1.2	$1 \cdot 10^6$ Units/L	120
	Trypsin	7.5	$200 \cdot 10^5$ Units/L	60, 120
	Pepsin	1.2	$1 \cdot 10^6$ Units/L	120
	Trypsin	7.5	$400 \cdot 10^5$ Units/L	60, 120
	Pepsin	1.2	$1 \cdot 10^6$ Units/L	60
	Pankreatin	7.5	Enzym : Frucht 1 : 12.5	60
	Proteinase	7.5	18500 Units/L	60, 120
	Pepsin	1.2	$1 \cdot 10^6$ Units/L	60
	Pankreatin	7.5	Enzym : Frucht 1 : 12.5	60
	Proteinase	7.5	74000 Units/L	60, 120
	Pepsin	1.2	$1 \cdot 10^6$ Units/L	60
	Pankreatin	7.5	Enzym : Frucht 1 : 12.5	60
	Proteinase	7.5	148000 Units/L	60, 120

Die Extraktion der proteolytisch behandelten Früchte erfolgt direkt aus den verdauten Lösungen.

in-vitro Magenverdau:

- ✧ 20 g frische Tomaten in der Moulinette homogenisieren
- ✧ mit 4 mol/L HCl pH-Wert auf 1.2 einstellen
- ✧ Zugabe von definierter Enzymmenge (Vergleich Tab. 7-1)
- ✧ bei 37° im Umlufttrockenschrank unter Rühren für verschiedene Zeiten (Vergleich Tab. 7-1) inkubieren
- ✧ mit 1 mol/L NaOH pH auf 7.5 bringen und dadurch Pepsin inaktivieren
- ✧ Suspension 30 min bei 4 °C & 10000 U/min zentrifugieren
- ✧ Rückstand abnutschen und verwerfen
- ✧ Filtrat in Aliquote (2 mL) portionieren und in Vials abfüllen
- ✧ Lyophilisieren und bei -20°C lagern

in-vitro Darmverdau:

- ✧ 20 g frische Tomaten in der Moulinette homogenisieren
- ✧ mit 4 mol/L HCl pH-Wert auf 1.2 einstellen
- ✧ Zugabe von $1 \cdot 10^6$ Units/L Pepsin
- ✧ bei 37° im Umlufttrockenschrank unter Rühren für 60 bzw. 120 min inkubieren
- ✧ mit 1 mol/L NaOH pH auf 7.5 bringen
- ✧ Zugabe des Enzyms zur Simulation des Darmverdaus (Vergleich Tab. 7-2)

- ✧ bei 37° im Umlufttrockenschrank unter Rühren für verschiedene Zeiten (Vergleich Tab. 7-2) inkubieren
- ✧ Suspension für 20 min bei 90 °C erhitzen
- ✧ 30 min bei 4 °C & 10000 U/min zentrifugieren
- ✧ Rückstand abnutschen und verwerfen
- ✧ Filtrat in Aliquote (2 mL) portionieren und in Vials abfüllen
- ✧ Lyophilisieren und bei -20°C lagern

7.3 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgt nach der Methode von BRADFORD [1976].

verwendete Lösungen

Lösung 1:	10 mL	Ethanol (96 %)
	20 mL	Phosphorsäure (88%)
	35 mg	Coomassie Serva Blue G
Lösung 2:	3 mL	Lösung 1
	3 mL	Phosphorsäure (88 %)
	1.5 mL	Ethanol (96 %)
	42.5 mL	bidest. H ₂ O

Die Lösung 2 wird bei RT unter Lichtausschluß aufbewahrt

Standardlösungen:	400 µg BSA / mL	20 mg BSA ad 50 mL H ₂ O (ST)
	300 µg BSA / mL	18.75 mL ST ad 25 mL H ₂ O
	200 µg BSA / mL	12.50 mL ST ad 25 mL H ₂ O
	100 µg BSA / mL	6.25 mL ST ad 25 mL H ₂ O
	50 µg BSA / mL	3.125 mL ST ad 25 mL H ₂ O
	20 µg BSA / mL	1.25 mL ST ad 25 mL H ₂ O
	10 µg BSA / mL	0.625 mL ST ad 25 mL H ₂ O
Probelösungen:	die PBS-Extrakte werden direkt bzw. falls notwendig verdünnt zur Messung eingesetzt	

Durchführung

- ✧ 50 µL Standard- bzw. Probelösung in je eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte pipettieren (für den Blindwert 50 µL PBS)
- ✧ 200 µL Lösung 2 hinzugeben
- ✧ im ELISA-Reader 10 sec schütteln, nach 5 min bei $\lambda = 590$ nm gegen Blindwert vermessen

7.4 Enzymallergosorbent-Test (EAST)

7.4.1 Herstellung der Allergenscheiben

Bromcyanaktivierung

Die Bromcyanaktivierung sowie die Kopplung der Scheiben erfolgt nach der von MÖLLER et al. [1997a] modifizierten Methode nach CESKA & LUNDKVIST [1972].

verwendete Lösungen

NaOH-Lsg.: 1 mol/L	4 g	NaOH	ad 100 mL bidest. H ₂ O
NaHCO₃-Lsg.: 0.005 mol/L	2.1 g	NaHCO ₃	ad 10 L bidest. H ₂ O
NaOH-Lsg.: 10 % ig	10 g	NaOH	ad 100 mL bidest. H ₂ O
Natriumhypochloritlsg.:	12.2 g	NaClO ₄	ad 100 mL dest. H ₂ O

Durchführung

- ✧ 15 g Papierscheiben (ca. 5000 Stück) in einem mit 250-mL-Tropftrichter und pH-Meter versehenen 1-L-Zweihalskolben in 150 mL bidest. H₂O kurz quellen lassen
- ✧ inzwischen 15.0 g Bromcyan in 450 mL bidest. H₂O unter Rühren lösen (im Abzug mit Atemschutzmaske durchzuführen)
- ✧ Bromcyanlösung zur Papierscheibensuspension hinzugeben
- ✧ Durch Zutropfen von 1 mol/L NaOH pH-Wert auf 10-10.5 einstellen und solange einhalten, bis 75 mL verbraucht sind. Der pH-Wert darf nicht über 11.5 steigen
- ✧ Lösung über einen Büchnertrichter absaugen
- ✧ Scheiben insgesamt 12 x mit je 0.005 mol/L NaHCO₃-Lsg. waschen, je 2 min stehen lassen, absaugen
- ✧ anschließend nacheinander 2 x mit je 375 mL folgender Lösungen waschen:
 - ⇒ dest. H₂O
 - ⇒ Aceton: H₂O (25:75, v:v)
 - ⇒ Aceton: H₂O (50:50, v:v)
 - ⇒ Aceton: H₂O (75:25; v:v)
 - ⇒ Aceton
- ✧ Bromcyanaktivierte Scheiben lyophilisieren
- ✧ Scheiben bei -20 °C lagern

Entsorgung der Bromcyanabfälle

- ☞ BrCN-Lösung in 10 %iger Natronlauge 1 h stehenlassen
- ☞ bei einem pH-Wert von 10-11 einen 50 % igen Überschuß an Natriumhypochloritlsg. zugeben
- ☞ über Nacht stehenlassen
- ☞ Lösung auf einen pH-Wert von 7 einstellen (Gasentwicklung !) und den Überschuß an Hypochlorit mit Hydrogensulfit zerstören
- ☞ Lösung über das Abwasser entsorgen

Kopplung der Proteinextrakte an die Scheiben*verwendete Lösungen*

Inkubationspuffer:	I	15.6 g	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
			ad 1000 ml mit bidest. H_2O
	II	8.4 g	NaHCO_3
			ad 1000 ml mit bidest. Wasser
	III	190 mL	I
		803 mL	II
			mit 4 mol/L HCl auf pH 7.4 einstellen
	IV	800 mL	III
		3 g	BSA
		37.22 g	EDTA
		2 g	NaN_3
		2 mL	Tween 20
			mit 4 M HCl auf pH 7.4 einstellen
NaHCO ₃ -Lsg.:		21.0 g	NaHCO_3
0.5 mol/L			ad 500 mL dest. H_2O
			pH auf 8.4 einstellen
NaHCO ₃ -Lsg.:		4.2 g	NaHCO_3
0.1 mol/L			ad 500 ml dest. H_2O
			pH auf 9.5 einstellen
Ethanolaminpuffer:		5 mL	$\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}$
			ad 500 mL dest. H_2O
			mit 4 mol/L HCl auf pH 9.2 einstellen

Natriumacetatpuffer: 0.1 mol/L	4.2 g Natriumacetat
	ad 500 mL dest. H ₂ O mit 4 mol/L HCl auf pH 4.0 einstellen

Durchführung

- ✧ Extrakte in bidest. H₂O aufnehmen und auf eine Proteinkonzentration von ca. 20 µg/mL einstellen
- ✧ 100 mL entsprechend verdünnte Extraktlösung in einen 250 mL-Iodzahlkolben füllen
- ✧ ca. 300 bromcyanaktivierte Papierscheiben (ca. 0.63 g) hinzugeben
- ✧ Lösung über Nacht bei 4 °C rühren
- ✧ Überstand absaugen (Wasserstrahlpumpe)
- ✧ Papierscheiben mit 100 mL 0.5 mol/L NaHCO₃-Lösung waschen, anschließend absaugen
- ✧ 100 mL Ethanolaminpuffer hinzugeben
- ✧ 2 h bei Raumtemperatur rühren
- ✧ absaugen und nacheinander mit folgenden Lösungen waschen:
 - ⇒ 3 x mit jeweils 100 mL 0.1 mol/L NaHCO₃-Lösung
 - ⇒ 2 x mit jeweils 100 mL 0.1 mol/L Natriumacetat-Lösung
 - ⇒ 2 x mit jeweils 100 mL 0.5 mol/L NaHCO₃-Lösung
- ✧ letzte Waschlösung gründlich absaugen
- ✧ Papierscheiben mit 100 mL dest. H₂O einmal spülen und mit dest. H₂O in einen 250-mL-Rundkolben überführen, Wasser gründlich absaugen
- ✧ 2 h in der Tiefkühltruhe einfrieren
- ✧ Papierscheiben über Nacht lyophilisieren
- ✧ lyophilisierte Papierscheiben in der Tiefkühltruhe bei -20 °C lagern

7.4.2 EAST-Bestimmung

Die EAST-Bestimmung wird entsprechend der Anweisung des verwendeten Testkits „Spez. IgE ELISA TR (RV)“ der Firma Allergopharma (Reinbek, Germany) durchgeführt.

verwendete Lösungen

Waschlösung:	entsprechend Testkit (enthält Tween 20, PBS)
Konjugatlösung:	entsprechend Testkit (enthält anti-Human-IgE, konjugiert mit AP) 1:1 mit Allergenverdünnungslösung verdünnt
Substratlösung:	entsprechend Testkit (enthält MgCl ₂)
Färbetabletten:	entsprechend Testkit (enthält PNPP (p-Nitrophenyposphat))
Färbelösung:	1 Färbetablette in 5 mL Substratlösung lösen
Stopplösung:	entsprechend Testkit (1 mol/L NaOH)
Referenzallergenscheiben:	festphasengekoppelter Lieschgrasextrakt

Referenzlösungen:	Kalibrierreihe mit vier Seren
	A = 0.35 U/mL spez. IgE gegen Lieschgras (EAST-Klasse 1)
	B = 0.7 U/mL spez. IgE gegen Lieschgras (EAST-Klasse 2)
	C = 3.5 U/mL spez. IgE gegen Lieschgras (EAST-Klasse 3)
	D = 17.5 U/mL spez. IgE gegen Lieschgras (EAST-Klasse 4)

Durchführung

- ✎ für die Bestimmung benötigte Allergenscheiben in Inkubationspuffer tauchen und anschließend auf Filterpapier trocknen
- ✎ Referenzscheiben nicht in Inkubationspuffer tauchen
- ✎ je eine Scheibe in eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte geben
- ✎ je 50 μ L Patientenserum bzw. Kontrollserum auf die Allergenscheiben und je 50 μ L Referenzserum auf die Referenzscheiben pipettieren
- ✎ Mikrotiterplatte mit Parafilm abdecken und 1 h bei 37 °C unter Lichtausschluß inkubieren
- ✎ 250 μ L Waschlösung zupipettieren und nach 10 min absaugen
- ✎ Waschvorgang 2 mal wiederholen
- ✎ in jede Vertiefung 50 μ L Konjugatlösung (1:1 verdünnt) pipettieren
- ✎ Mikrotiterplatte mit Parafilm abdecken und über Nacht unter Lichtausschluß inkubieren
- ✎ 250 μ L Waschlösung zupipettieren und nach 10 min absaugen
- ✎ Waschvorgang 2 x wiederholen
- ✎ 200 μ L Färbelösung in jede Vertiefung pipettieren
- ✎ zusätzlich 200 μ L Färbelösung in 2 leere Vertiefungen pipettieren
- zur Bestimmung des Reagenzienblindwertes-
- ✎ 1 h bei 37 °C unter Lichtausschluß im Trockenschrank inkubieren
- ✎ 100 μ L Stopplösung zupipettieren und 10 sec schütteln
- ✎ 250 μ L aus jeder Vertiefung in eine korrespondierende Vertiefung einer leeren Mikrotiterplatte überführen
- ✎ bei $\lambda = 405$ nm photometrisch mittels ELISA-Reader vermessen

Auswertung in EAST-Klassen

Tab. 7-3: Einteilung der EAST-Klassen

EAST Klasse	IgE-Gehalt [U/mL]
EAST Klasse 0	0 – 0.35
EAST Klasse 1	0.35 – 0.70
EAST Klasse 2	0.70 – 3.50
EAST Klasse 3	3.50 – 17.50
EAST Klasse 4	> 17.50

7.5 EAST-Inhibition

Die EAST-Inhibition erfolgt nach einer von MÖLLER et al. [1997] modifizierten Methode nach VIETHS et al. [1993b] unter Verwendung des in-vitro Testkits „Spez. IgE ELISA TR (RV)“ der Firma Allergopharma (Reinbek, Germany).

verwendete Lösungen

Allergenverdünnungslsg:	300 mg	BSA
	100 µL	Tween 20
	50 mg	NaN ₃
	ad 100 mL PBS	
Ovalbuminlsg.:	10 mg	Ovalbumin
	ad 10 mL Allergenverdünnungslösung	
Konjugatlsg.:	entsprechend dem Testkit (enthält Anti-Human-IgE, konjugiert mit AP)	
	1:1 mit Allergenverdünnungslösung verdünnt	
Serum:	1:1 mit Allergenverdünnungslösung verdünnt	

Durchführung

- ✧ für die Bestimmung benötigte Allergenscheiben in Inkubationspuffer tauchen und anschließend auf einem Filterpapier trocknen
- ✧ jeweils eine Allergenscheibe in je eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte überführen
- ✧ jeweils folgende Lösungen auf die Allergenscheiben pipettieren:
 - ⇒ 50 µL unverdünnter Inhibitorextrakt & 50 µL Serum
 - ⇒ 50 µL Inhibitorextrakt (1:10) & 50 µL Serum
 - ⇒ 50 µL Inhibitorextrakt (1:100) & 50 µL Serum
 - ⇒ 50 µL Inhibitorextrakt (1:1000) & 50 µL Serum
 - ⇒ 50 µL Inhibitorextrakt (1:10000) & 50 µL Serum
 - ⇒ 50 µL Inhibitorextrakt (1:100000) & 50 µL Serum
 - ⇒ ohne Inhibitor (B₀): 50 µL Allergenverdünnungslsg. & 50 µL Serum
 - ⇒ unspezifische Bindung (B_u): 50 µL Ovalbuminlsg. & 50 µL Serum
 - ⇒ nicht spezifische Bindung (NSB): 100 µL Allergenverdünnungslsg.
- ✧ Mikrotiterplatte mit Parafilm abdecken und 3 h bei 37 °C unter Lichtausschluß inkubieren
- ✧ 250 µL Waschlösung zupipettieren und nach 10 min absaugen
- ✧ Waschvorgang 2 mal wiederholen
- ✧ nach dem letztem Waschvorgang gründlich absaugen
- ✧ in jede Vertiefung 50 µL Konjugatlösung (1:1 mit Allergenverdünnungslösung verdünnt) pipettieren
- ✧ Mikrotiterplatte mit Parafilm abdecken und über Nacht bei Raumtemperatur unter Lichtausschluß inkubieren
- ✧ 250 µL Waschlösung zupipettieren und nach 10 min absaugen
- ✧ Waschvorgang 2 mal wiederholen
- ✧ nach dem letzten Waschvorgang gründlich absaugen

- ✧ jeweils 200 μL Färbelösung in die Vertiefungen pipettieren
- ✧ für die Bestimmung des Blindwertes 2 x jeweils 200 μL Färbelösung in zwei leere Vertiefungen geben
- ✧ 1 h bei 37 °C unter Lichtausschluß im Trockenschrank inkubieren
- ✧ 100 μL Stopplösung zupipettieren und 10 sec schütteln
- ✧ 250 μL aus jeder Vertiefung in eine korrespondierende Vertiefung einer leeren Mikrotiterplatte überführen
- ✧ bei $\lambda = 405 \text{ nm}$ photometrisch mittels ELISA-Reader vermessen

Auswertung

Die Berechnung der prozentualen Inhibition erfolgt über folgende Formel:

$$\text{Inhibition}[\%] = \frac{(B_o - B)}{(B_o - \text{NSB})} \cdot 100$$

B_o : Meßwerte ohne Inhibitorzusatz

B : Meßwerte der einzelnen Inhibitionsstufen

NSB: Nichtspezifische Bindung

7.6 SDS-PAGE (NuPAGE™)

Die Probenaufarbeitung erfolgt entsprechend VIETHS et al. [1992c]. Zur SDS-PAGE wird das NuPAGE™ Elektrophorese System mit Fertiggelelen und -lösungen der Firma Novex™ (San Diego, CA, USA) entsprechend der angegebenen Vorschriften verwendet.

Probenvorbereitung

verwendete Lösungen

Probenpuffer (pH 6.8):	3.03 g	Tris
	2.5 mL	β -Mercaptoethanol
	5.0 mL	Glycerin
	2.0 g	SDS
	0.01 g	Bromphenolblau
	150 μL	Pyronin Y-Lösung (1%ig in H_2O , w:v)
	40 mL	bidest. H_2O

Die Lösung mit 4 mol/L HCl auf pH 6.8 einstellen und mit bidest. H_2O ad 50 mL

Durchführung

- ✧ Lyophilisierte Proteinextrakte in bidest. H_2O aufnehmen und einstellen
- ✧ Extrakte 1:1 mit Probenpuffer versetzen
- ✧ 3 min bei 90 °C im Wasserbad reduzieren

Bis-Tris gepufferte NuPAGE™*verwendete Lösungen*

Elektrodenpuffer	97.6 g	MES (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure)
NuPAGE™	60.6 g	Tris Base
MES-SDS Running Buffer:	10 g	SDS
	3.0 g	EDTA
		mit bidest. H ₂ O ad 500 mL

Vor Gebrauch 1:19 mit dest. H₂O verdünnen

Elektrodenpuffer	104.6 g	MOPS (3-(N-morpholino)propansulfonsäure)
NuPAGE™	60.6 g	Tris Base
MOPS-SDS Running Buffer:	10 g	SDS
	3 g	EDTA
		mit bidest. H ₂ O ad 500 mL

Vor Gebrauch 1:19 mit dest. H₂O verdünnen

verwendete Gele

NuPAGE™	Totalamidkonzentration:	10 %
10 % Bis-Tris Gel:	Puffer:	Bis-Tris
	Gel-Maße:	8 cm x 8 cm x 1 mm
	Gel-Typ:	10, 12 well & 2 D-well

NuPAGE™	Totalamidkonzentration:	12 %
12 % Bis-Tris Gel:	Puffer:	Bis-Tris
	Gel-Maße:	8 cm x 8 cm x 1 mm
	Gel-Typ:	10, 12 well & 2 D-well

Durchführung

- ✧ Gel-Kassette aus der Verpackung entnehmen und mit bidest. H₂O spülen
- ✧ Klebestreifen von der Unterseite der Gel-Kassette entfernen
- ✧ den Kamm aus der Gel-Kassette herausziehen
- ✧ Probenslots mit Elektrodenpuffer spülen
- ✧ Gel-Kassette entsprechend der Novex-NuPAGE™-Vorschrift in der Elektrophorese-Kammer (Xcell II Mini Cell) plazieren
- ✧ Kammern mit Elektrodenpuffer befüllen
- ✧ Probenslots mittels HPLC-Spritze mit 5-30 µL Probelsg. bzw. Markerlsg. - je nach Slotgröße und Proteingehalt - beladen
- ✧ Elektrodenbrücke auflegen
- ✧ Spannung (200 V) anlegen
- ✧ den Lauf beenden, wenn die aus dem Probenpuffer stammenden Farbstoffe an der Unterseite des Gels (Anode) angelangt sind
- ✧ Strom ausschalten, Elektrophorese-Kammer öffnen und Gel-Kassette entnehmen
- ✧ Gel-Kassette aufbrechen und Gel vom Kunststoffträger (Gel-Kassette) ablösen

☞ Gel direkt färben (Silber- bzw. CBB-Färbung) oder zum Semidry-Blot einsetzen

Zusammensetzung der Molekulargewichtsmarker

Tab. 7-4: Zusammensetzung des Molekulargewichtsmarkers I (14-94 kDa)

Protein	Molekulargewicht [kDa]		A	B	C
Phosphorylase	94.0	→ I			
Rinderserumalbumin	67.0	→ II			
Ovalbumin	43.0	→ III			
Carboanhydrase	30.0	→ IV			
Trypsininhibitor	20.1	→ V			
α-Lactalbumin	14.4	→ VI			

A: Verteilung im 10 % Bis-Tris Gel unter Verwendung des NuPAGE™ MES-SDS Running Buffer

B: Verteilung im 10 % Bis-Tris Gel unter Verwendung des NuPAGE™ MOPS-SDS Running Buffer

C: Verteilung im 12 % Bis-Tris Gel unter Verwendung des NuPAGE™ MES-SDS Running Buffer

Das fertige Proteingemisch des MG-Markers wird in 1 mL Probenpuffer aufgenommen und entsprechend der Beschreibung unter 7.6 reduziert.

7.7 IEF (NuPAGE™)

Zur IEF wird das NuPAGE™ Elektrophorese System mit Fertiggelelektroden und -lösungen der Firma Novex™ (San Diego, CA, USA) entsprechend der angegebenen Vorschriften verwendet.

verwendete Lösungen

Kathodenpuffer:	5.8 g	Lysin (freie Base)
NuPAGE™ IEF Cathode Buffer	mit bidest. H ₂ O ad 100 mL	

Vor Gebrauch 1:9 mit bidest. H₂O verdünnen und mit Helium 10 min entgasen

Anodenpuffer:	2.4 mL	Phosphorsäure (85 %ig)
NuPAGE™ IEF-Anode Buffer	mit bidest. H ₂ O ad 100 mL	

Vor Gebrauch 1:49 mit bidest. H₂O verdünnen

Probenpuffer:	Glycerin bidest. H ₂ O
----------------------	--------------------------------------

verwendete Gele

NuPAGE™ IEF Gel:	pl:	3-7 & 3-10
	Gel-Maße:	8 cm x 8 cm x 1 mm
	Gel-Typ:	10 well & 12 well

Durchführung

- ✧ Lyophilisierte Proteinextrakte in bidest. H₂O aufnehmen und entsprechend einstellen
- ✧ 1:1 mit Probenpuffer versetzen
- ✧ Aufbau der Elektrophoresekammer und Fertiggelvorbereitungen entsprechend 7.6
- ✧ Kathodenkammer mit Novex™ IEF-Cathode Buffer befüllen
- ✧ Anodenkammer mit Novex™ IEF-Anode Buffer befüllen
- ✧ Elektrodenbrücke auflegen
- ✧ Spannung wie folgt anlegen:
 - ⇒ 100 Volt für 1 h
 - ⇒ 200 Volt für 1 h
 - ⇒ 500 Volt für 1 h
- ✧ Gel entsprechend 7.6 entnehmen und direkt zur Färbung oder zum Semidry-Blot einsetzen

*Zusammensetzung des pI-Markers***Tab. 7-5:** Zusammensetzung des pI-Markers

Protein	pI-Wert	A
Cytochrom C	10.7	
Ribonuclease A	9.5	
Lectin	8.3	
	8.0	
Myoglobin	7.8	
	7.4	
Carbonic anhydrase	6.9	
	6.0	
β-Lactoglobulin	5.3	
	5.2	
Trypsin inhibitor	4.5	
Glucose oxidase	4.2	
Amyloglucosidase	3.5	

A: Verteilung im IEF Gel im pI-Bereich von 3-7

7.8 2D-Elektrophorese

Die 2D-Elektrophorese wird modifiziert nach GÖRG et al. [1988] unter Verwendung von IEF bzw. SDS Fertiggele und -lösungen der Firma Novex™ (San Diego, CA, USA) durchgeführt.

verwendete Lösungen

Tris-HCl-Puffer; pH 6.8:	6.06 g	Tris-HCl
	0.4 g	SDS
		ad 100 mL mit bidest. H ₂ O mit 4 M HCl ad pH 6.8 einstellen
DTT: (frisch ansetzen!)	125 mg	DTT (α -Dithiothreitol)
		ad 250 mL mit bidest. H ₂ O
Äquilibratorlösung:	2.0 g	SDS
	36 g	Harnstoff
	3 mg	EDTA
	3 mg	Bromphenolblau
	3 mg	Pyronin-Y
	10 mL	Tris-HCl-Puffer
	35 mL	Glycerin
		ad 100 mL mit bidest. H ₂ O

Durchführung

- ✧ IEF analog 7.7 durchführen
- ✧ einen Slot-Streifen der IEF ausschneiden
- ✧ Gelstreifen in ein Pyrexglas überführen und mit 15 mL Äquilibratorlösung und 200 μ L DTT-Lösung versetzen
- ✧ 3 min bei 90 °C reduzieren
- ✧ Gelstreifen auf 2d-well Gel auflegen
- ✧ elektrophoretische Trennung analog 7.6 durchführen
- ✧ Nach vollständigem Probeneintritt in das 10 % Bis-Tris-Gel den IEF-Gelstreifen entfernen
- ✧ Gel direkt färben (Silberfärbung) oder zum Semidry-Blot einsetzen

7.9 Semidry-Blot

7.9.1 Semidry-Blot auf NC-Membranen

Der Semidry-Blot auf NC-Membranen erfolgt modifiziert nach KHYSE-ANDERSEN [1984].

verwendete Lösungen

Anodenpuffer I (pH 10.4):	18.15 g	Tris
0.3 mol/L Tris	0.05 g	NaN ₃
20 % Ethanol	100 mL	Ethanol (96 %ig)
mit bidest. H ₂ O ad 500 mL		
Anodenpuffer II (pH 10.4):	1.52 g	Tris
0.025 mol/L Tris	0.05 g	NaN ₃
20 % Ethanol	100 mL	Ethanol (96 %ig)
mit bidest. H ₂ O ad 500 mL		
Kathodenpuffer (pH 7.6):	2.6 g	EACA (6-Aminohexansäure)
0.04 mol/L EACA	0.05 g	SDS
0.01 % SDS	0.05 g	NaN ₃
20 % Ethanol	100 mL	Ethanol (96 %ig)
mit bidest. H ₂ O ad 500 mL		

Durchführung

- ☞ die Blotmembran entsprechend der Größe der Gele zurechtschneiden
- ☞ Graphitkathode mit bidest. Wasser anfeuchten
- ☞ 4 Lagen Haushaltstücher mit Kathodenpuffer tränken und auf die Kathode legen
- ☞ aus der Gel-Kassette entnommenes Gel auf die blauen Haushaltstücher legen
- ☞ Blotmembran in Anodenpuffer II tränken und luftblasenfrei auf das Gel legen
- ☞ Bereiche - an denen kein Transfer erfolgen soll - mit Kunststoffstreifen abdecken
- ☞ 2 Lagen Haushaltstücher mit Anodenpuffer II tränken und auf Blotmembran legen
- ☞ 4 Lagen Haushaltstücher mit Anodenpuffer I tränken und auf den Stapel legen
- ☞ Luftblasen aus dem Stapel rollen
- ☞ mit bidest. Wasser angefeuchtete Graphitanode auflegen
- ☞ Semidry-Blot unter den folgenden Bedingungen durchführen:

⇒ SDS-Gel

- 30 Volt
- 0.8 mA/cm²
- 80 min

⇒ IEF-Gel

- 15 Volt
- 0.25 mA/cm²
- 130 min

- ☞ NC-Membran bei RT trocknen lassen und anschließend entsprechend färben

7.9.2 Semidry-Blot auf PVDF-Membranen

Die Durchführung erfolgt analog nach WARD et al. [1990].

verwendete Lösungen

Elektrodenpuffer (pH 11)	554 mg	CAPS ((3-Cyclohexyl-amino)-1-propansulfonsäure)
10 mmol/L CAPS	25 mL	Methanol
10 % Methanol		
		mit bidest. Wasser ad 250 mL

Durchführung

- ✧ SDS-PAGE bzw. IEF analog 7.6 bzw. 7.7 durchführen
- ✧ PVDF-Blotmembran zurechtschneiden & einige Sekunden mit Methanol befeuchten
- ✧ 15 min in Elektrodenpuffer äquilibrieren
- ✧ SDS-PAGE-Gel 30 min in Elektrodenpuffer lagern
- ✧ Graphitkathode mit bidest. Wasser anfeuchten
- ✧ 6 Lagen Haushaltstücher in Elektrodenpuffer tränken und auf die Kathode legen
- ✧ Gel auf die Tücher legen
- ✧ Blotmembran luftblasenfrei auf das Gel legen
- ✧ freie Stellen - an denen kein Transfer erfolgen soll - mit Kunststoffstreifen abdecken
- ✧ 6 Lagen Haushaltstücher in Elektrodenpuffer tränken und auf Blotmembran legen
- ✧ Luftblasen aus dem Stapel rollen
- ✧ angefeuchtete Graphitanode auflegen
- ✧ Blotbedingungen:
- ✧ 30 Volt
- ✧ 0.8 mA/cm²
- ✧ 70 min
- ✧ Membran bei RT trocknen und anschließend zur Färbung einsetzen

7.10 Immunoblot

Die immunochemische Detektion erfolgt unter Anwendung des Verstärkersystems nach VIETHS et al. [1992a].

verwendete Lösungen

PBS (pH 7.4):	7.95 g	NaCl	
	1.44 g	Na ₂ HPO ₄	
	0.2 g	KH ₂ PO ₄	
	0.2 g	KCl	
	mit bidest. H ₂ O ad 1000 mL		
Blockierlösung:	5 g	Magermilchpulver	
5% Magermilchpulver	100 µL	Tween 20	
0.1 % Tween 20			
0.01 mol/L PBS		mit PBS ad 100 mL	
Inkubationspuffer:	100 mg	BSA	
0.1 % BSA	50 µL	Tween 20	
0.05 % Tween 20			
0.01 mol/L PBS		mit PBS ad 100 mL	
Waschpuffer:	50 µL	Tween 20	
0.05 % Tween 20			
0.01 M PBS		mit PBS ad 100 mL	
Patientenseren:	1:14	in Inkubationspuffer	
Anti-Human-IgE:	1:4000	in Inkubationspuffer	
Anti-Kaninchen-IgG (biotinyliert):	1:6000	in Inkubationspuffer	
Streptavidin-HRP:	1:20000	in Inkubationspuffer	
Umpufferlösung (pH 6.0):	121.2 mg	Tris	
0.01 mol/L Tris		in 80 mL bidest. H ₂ O lösen mit 4 mol/L HCl auf pH 6.0 einstellen mit bidest. H ₂ O ad 100 mL	
Färbelösung:	Lösung 1:	24 mg	TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)
	(frisch ansetzen)	80 mg	DONS (Dioctylnatriumsulfosuccinat)
			mit Ethanol (96 %ig) ad 10 mL
	Lösung 2 (pH 5.0):	0.94 g	Citronensäure
		1.82 g	Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O
			in 80 mL bidest. H ₂ O lösen pH 5.0 einstellen mit bidest. H ₂ O ad 100 mL
Färbelösung 1 und 2 im Verhältnis 1:3 mischen			
20 µL H ₂ O ₂ zu je 40 mL Färbelösung geben			

Durchführung

- ✧ Proteine analog 7.6 bzw. 7.7 auftrennen
- ✧ Semidry-Blot entsprechend 7.9.1 durchführen
- ✧ Blotmembran trocknen lassen
- ✧ NC-Membran in ca. 0.4 cm breite Streifen schneiden und in Färbekammer einlegen
- ✧ unspezifische Färbung 2 mal 15 min mit Blockierlösung unterbinden
- ✧ über Nacht mit Patientenserum inkubieren
- ✧ dreimal für je 5 min mit Waschpuffer waschen
- ✧ 1 h mit anti-Human-IgE inkubieren
- ✧ mit Waschpuffer 3 mal 5 min spülen
- ✧ 1 h mit anti-Kaninchen-IgG inkubieren
- ✧ mit Waschpuffer 3 mal 5 min spülen
- ✧ 20 min mit HRPkonjugiertem Streptavidin inkubieren
- ✧ mit Waschpuffer 3 mal 5 min spülen
- ✧ 1 min mit Umpufferlösung konditionieren
- ✧ ca. 5 min. mit Färbelösung - bis zur ausreichenden Färbung - behandeln
- ✧ trocknen und digital archivieren

7.11 Immunoblot-Inhibition

Diese Detektion wird entsprechend VIETHS et al. [1995b] durchgeführt.

verwendete Lösungen

Entsprechend 7.10

Durchführung

- ✧ Semidry-Blot analog 7.9.1 durchführen
- ✧ NC-Membran in Streifen schneiden
- ✧ 2 mal 15 min. mit Blockierlösung behandeln
- ✧ Proteinextrakte auf 400 µg/mL mit bidest. Wasser einstellen ⇒ **Inhibitorlösung**
- ✧ zeitgleich:
 - ⇒ pro zu inhibierenden NC-Streifen 100 µL Poolserum mit je 200 µL Inhibitorlösung versetzten und mit Inkubationspuffer ad 1.5 mL verdünnen
 - ⇒ zudem 100 µL Poolserum mit 200 µL Ovalbuminlsg. (1 mg/mL in Inkubationspuffer) und 1.2 mL Inkubationspuffer versetzten ⇒ **unspezifische Inhibition**
- ✧ jeweils 1 h bei Raumtemperatur vorinkubieren, dann auf die Streifen geben
- ✧ je 1 Streifen ohne Inhibitor und 100 µL Poolserum bzw. Kontrollserum sowie 1.4 mL Inkubationspuffer behandeln
- ✧ Inkubation mit jeweiliger Inhibitorlösung über Nacht
- ✧ Immunochemische Detektion entsprechend 7.10

7.12 Profilinnachweis

Der Nachweis auf Profilin wird nach der Methode von VIETHS et al. [1994a] und FÄH et al. [1995] durchgeführt.

verwendete Lösungen

Anti-Kaninchen-Birnen-Profilin:	1:10000 in Inkubationspuffer
--	------------------------------

Durchführung

- ☞ Immunoblot – entsprechend 7.10 – bis zur Blockierung durchführen
- ☞ über Nacht mit rekombinantem Anti-Birnen-Profilin inkubieren
- ☞ wie unter 7.10 beschrieben färben

7.13 Unspezifische Färbung der Proteine im Gel

7.13.1 Silberfärbung

Die Durchführung dieser Färbung entspricht der Methode nach HEUCKESHOVEN & DERNICK [1986].

verwendete Lösungen

Fixierlösung: (frisch ansetzen !)	15 mL 5 mL	Ethanol (96 %ig) Eisessig
mit bidest. H ₂ O ad 50 mL		
Inkubationslösung:	15 mL 3.4 g 0.1 g 300 µL	Ethanol (96 %ig) Natriumacetat Na ₂ S ₂ O ₃ · 5 H ₂ O Glutardialdehyd (25 %ig)
mit bidest. H ₂ O ad 50 mL		
Versilberungslösung:	0.1 g 10 µL	AgNO ₃ Formaldehyd (37 %ig)
mit bidest. H ₂ O ad 50 mL		
Entwicklungslösung: (pH 11.8)	1.25 g 5 µL	Na ₂ CO ₃ Formaldehyd (37 %ig)
mit bidest. H ₂ O ad 50 mL		
Stopplösung:	0.93 g	Titriplex III
mit bidest. H ₂ O ad 50 mL		

Durchführung

- ✧ Proteinauftrennung wie in Kapitel 7.6 bzw. 7.7 beschrieben
- ✧ Gel in eine Kunststoff- oder Glaswanne überführen
- ✧ mind. 30 min mit Fixierlsg. behandeln
- ✧ anschließend mind. 30 min mit Inkubationslsg. konditionieren
- ✧ fünfmal für je 5 min mit bidest. H₂O waschen
- ✧ 20 min mit Versilberungslösung inkubieren
- ✧ 1 min mit bidest. H₂O waschen
- ✧ 1 min mit Entwicklungslsg. spülen
- ✧ 3-7 min mit Entwicklungslsg. - bis Banden gut sichtbar sind - behandeln
- ✧ 15 min mit der Stopplösung behandeln
- ✧ digitalisieren

7.13.2 Coomassie-Brilliant-Blue (CBB)-Färbung

Die Färbung erfolgt analog der Vorschrift nach FLING & GREGERSON [1986].

verwendete Lösungen

Fixierende Färbelsg.:	0.5 g	Coomassie R-250
50 % Ethanol	250 mL	Ethanol (96 %ig)
12 % Eisessig	60 mL	Eisessig
0.1 % Coomassie R-250		
		mit bidest. H ₂ O ad 500 mL
Entfärbelsg.:	90 mL	Ethanol (96 %ig)
18 % Ethanol	40 mL	Eisessig
8 % Essigsäure		
		mit bidest. H ₂ O ad 500 mL

Durchführung

- ✧ Proteine entsprechend 7.6 bzw. 7.7 auftrennen
- ✧ Gel in eine Kunststoffwanne überführen
- ✧ über Nacht mit Färbelsg. versetzen
- ✧ Hintergrund des Gels mit Entfärbelsg. bis zum Hervortreten der Proteinbanden entfärben
- ✧ Entfärbevorgang durch Zugabe von Cellulosetüchern beschleunigen
- ✧ Digital archivieren

7.14 Unspezifische Färbung von Proteinen auf Membranen

7.14.1 Brilliant Black-Färbung auf NC-Membranen

Die unspezifische Visualisierung der Proteine auf Membranen erfolgt modifiziert nach HANCOCK & TSANG [1983].

verwendete Lösungen

NaOH-Lsg.: 0.2 mol/L	8.0 g	NaOH	
			mit bidest. H ₂ O ad 1000 mL
PBS-Tween-Lsg.:	9.76 g	NaCl	
	2.9 g	Na ₂ HPO ₄	
	0.24 g	NaH ₂ PO ₄	
	0.1 g	NaN ₃	
	0.5 mL	Tween 20	
			mit bidest. H ₂ O ad 1000 mL
Färbelsg.:	250 µL	Brilliant-Black-Tinte	
	2.5 mL	Eisessig	
			mit PBS-Tween-Lsg. ad 250 mL

Durchführung

- ☞ Proteine entsprechend 7.6 bzw. 7.7 auftrennen
- ☞ Semidry-Blot analog Kapitel 7.9.1 durchführen
- ☞ Membran in NaOH-Lsg. 5 min äquilibrieren
- ☞ mit PBS-Tween-Lsg. viermal 10 min waschen
- ☞ mit Färbelsg. – bis zur ausreichenden Visualisierung der Proteine - behandeln

7.14.2 Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung auf PVDF-Membran

Die CBB-Färbung erfolgt in nach der Methode von WARD et al. [1990].

verwendete Lösungen

Fixierende Färbelsg.:	0.5 g	Coomassie R-250	
50 % Methanol	250 mL	Methanol	
12 % Eisessig	60 mL	Eisessig	
0.1 % Coomassie R-250			mit bidest. H ₂ O ad 500 mL
Entfärbelsg.:	50 mL	Methanol	
50 % Methanol			mit bidest. H ₂ O ad 100 mL

Durchführung

- ✧ Semidry-Blot entsprechend 7.9.2 durchführen
- ✧ PVDF-Membran mit dest. H₂O spülen
- ✧ Für einige Sekunden mit Methanol konditionieren
- ✧ 1-2 min mit Färbelsg. behandeln
- ✧ bis zur Entfärbung des Hintergrundes mit Entfärbelsg versetzen
- ✧ mit dest. H₂O spülen
- ✧ Membran bei RT trocknen

7.15 Nachweis von Kohlenhydratstrukturen**7.15.1 Periodsäure-Schiff (PAS)-Färbung**

Dieser Nachweis erfolgt nach MÜHLAU [2000].

verwendete Lösungen

Fixierlösung:	70 mL	Methanol
70 % Methanol	10 mL	Essigsäure
10 % Essigsäure		
mit dest. H ₂ O ad 100 mL		
Periodlösung:	7 mL	Essigsäure
30 % Essigsäure	1 g	Periodsäure
1 % Periodsäure		
mit dest. H ₂ O ad 100 mL		
Schiffs-Reagenz:	Fertiglösung	

Durchführung

- ✧ Proteine entsprechend 7.6 bzw. 7.7 auftrennen
- ✧ 30 min mit Fixierlsg. behandeln
- ✧ 5 min mit bidest. H₂O waschen
- ✧ über Nacht bei 4 °C unter Lichtausschluß mit Schiffs-Reagenz behandeln
- ✧ Hintergrund des Gels bidest. H₂O bis zum Hervortreten der Banden entfärben
- ✧ digitalisieren

7.15.2 Periodatspaltung

Der Nachweis von Kohlenhydratstrukturen mittels Periodatspaltung erfolgt nach der Methode von VIETHS et al. [1995b].

verwendete Lösungen

Periodatlösung; pH 5.0:	2.13 g	NaIO ₄
0.1 mol/L	0.08 g	Natriumacetat
0.01 mol/L.		
		ad 100 mL mit bidest. H ₂ O
Deaktivierte Periodatlösung:	2.13 g	NaIO ₄
0.1 mol/L	0.08 g	Natriumacetat
0.01 mol/L	0.91 g	Sorbit
0.05 mol/L		
		ad 100 mL mit bidest. H ₂ O
Sorbitlsg.:	0.91 g	Sorbit
0.5 mol/L		
		ad 100 mL mit bidest. H ₂ O

Durchführung

- ✎ Immunoblot - analog 7.10 - bis zum Blockieren durchführen
- ✎ Je 1 Blotstreifen mit je 1.5 mL Periodatlösung bzw. deakt. Periodatlösung 2 h im Dunkeln inkubieren
- ✎ Reaktion durch Zugabe von 1.5 mL Sorbitlösung unterbrechen
- ✎ dreimal mit Inkubationspuffer waschen
- ✎ Streifen mit Patientenseren inkubieren
- ✎ entsprechend Kapitel 7.10 anfärben

7.15.3 Lectin Blot

Der Nachweis auf Kohlenhydratstrukturen unter Verwendung von biotynilierten Lectinen wird in Anlehnung an die Methode von VIETHS et al. [1994b] durchgeführt.

verwendete Lösungen

biotinylierte Lectine:	Con A, PNA und RCA
Lectinlösungen:	1 mg der biotinylierten Lectine in 1 mL PBS aufnehmen und 1:1000 in Inkubationspuffer ($\approx 1 \mu\text{g/mL}$)

Durchführung

- ✎ Immunoblot – entsprechend 7.10 – bis zur Blockierung durchführen
- ✎ 1 h mit jeweiliger Lectinlsg. inkubieren
- ✎ wie unter 7.10 beschrieben färben

7.15.4 Nachweis mittels Affinitätschromatographie

Der Nachweis von Kohlenhydratstruktur mittels einer spezifischen Affinitätschromatographie unter Verwendung der Lectine Con A, WGA und RCA erfolgt entsprechend den Methoden von CARTELLIERI [2002]. Die Durchführung der Affinitätschromatographie erfolgte am GKSS-Forschungszentrum Geesthacht.

AC-Bedingungen

	WGA-Träger	RCA-Träger
Pumpe:	Merck Hitachi Pump L-7100	
Detektor:	Merck Hitachi DA-Detector L-7450	
Messwellenlänge:	$\lambda = 214 \text{ nm}$	
Auswerteinheit:	Auswertesoftware HSM (HPLC System Manager) Merck Hitachi	
Probenaufgabevolumen:	0.67 mL	
Trennsäule	WGA-Toyopearl	RCA-Silica
Adsorptionspuffer:	0.01 mol/L Phosphatpuffer 0.15 mol/L NaCl pH 7.2	0.01 mol/L Phosphatpuffer 0.15 mol/L NaCl pH 7.2
Elutionspuffer:	0.2 mol N-Acetylglucosamin im Adsorptionspuffer	0.1 mol/L Lactose im Adsorptionspuffer
Probe:	SEC-Retenate	
Flow:	0.3 mL/min	

Durchführung

- ✎ Extraktion der Proteine gemäß 7.2.1
- ✎ zur Abtrennung von störenden Zuckern den Extrakt über die SEC-Säule (siehe 7.16.2) geben
- ✎ SEC-Retenate dialysieren
- ✎ zur Affinitätschromatographie einsetzen

7.16 Methoden zur Proteinisolation

7.16.1 IEC

Die Proteinisolation über die IEC erfolgt in Anlehnung an die Methoden nach BALESTRIERI et al. [1990], MÖLLER [1997] & SEPPÄLLÄ et al. [1999]. Die Proteinextraktion erfolgt gemäß der Tieftemperaturextraktion unter Verwendung des Tris-HCl-Puffers anstatt des in 7.2.1 beschriebenen PBS, um zusätzliche Salze zu vermeiden.

IEC-Bedingungen

Pumpe:	Merck Hitachi Pump L-7100
Detektor:	Merck Hitachi UV-Detector L-7400
Messwellenlänge:	$\lambda = 214 \text{ nm}$
Auswerteinheit:	PC, Chrom Star 4.14
Probenaufgabevolumen:	1 mL – Probenschleife
Trennsäule	Source™ 15 Q, 5.50 x 10 mm
Eluent A:	0.02 mol/L Tris-HCL, pH 8.0
Eluent B:	0.02 mol/L Tris-HCL & 0.5 mol/L NaCL, pH 8.0
Gradient:	0-5 min 100 % Eluent A 5-70 min linear auf Eluent A / B; 75 % / 25 % 70-80 min linear auf 100% Eluent B 80-81 min 100 % Eluent B 81-85 min linear auf 100 % Eluent A 85-100 min 100 % Eluent A, Equilibration
Probe:	Proteinextrakt aus dem Acetonpulver (mittels Eluent I extrahiert)
Flow:	1 mL/min

Kalibrierung

- ✧ Standardprotein gemäß Tab. 7-2 ad 100 mL Eluent A lösen
- ✧ 1 mL der Lösung injizieren und gemäß obenbeschriebenen Bedingungen trennen

Tab. 7-6: Kalibrierung der IEC-Säule

Standardprotein	Einwaage [mg/100 mL]	pI	Retentionszeit [min]
Myoglobin	8.1	7.4	5.6
Conalbumin	22.3	6.1	39.3
α -Lactalbumin	2.2	4.8	59.2
Ovalbumin	9.1	4.6	70.7
Amyloglucosidase	8.1	3.5	97.2

7.16.2 SEC

Die Proteinisolierung über die SEC erfolgt modifiziert nach HAGEL et al. [1989].

SEC-Bedingungen

Pumpe:	Merck Hitachi Pump L-7100
Detektor:	Merck Hitachi UV-Detector L-7400
Messwellenlänge:	$\lambda = 214 \text{ nm}$
Auswerteinheit:	PC, Chrom Star 4.14
Probenaufgabevolumen:	1 mL – Probenschleife
Trennsäule	Sephacryl S 100, 250 x 10 mm
Eluent :	0.03 mol/L NaCl; 0.01 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$; pH 7.0 isokratisch
Probe:	Dialysierte Retanate der IEC
Flow:	1 mL/min

Kalibrierung

- ↗ Standardprotein gemäß Tab. 7-3 ad 100 mL Eluent A lösen
- ↗ 1 mL der Standardlösung injizieren und gemäß obigen Bedingungen trennen

Tab. 7-7: Kalibrierung der SEC-Säule

Standardprotein	Einwaage [mg/100 mL]	Molekulargewicht [kDa]	Retentionszeit [min]
Rinderserumalbumin	2	67.0	25.9
Ovalbumin	2	43.0	33.8
Ribonuclease A	2	13.7	54.5

7.16.3 RP-HPLC

Die Proteinisolierung an einer Umkehrphasen (RP)-Säule erfolgt modifiziert nach FAHLBUSCH et al. [1995].

RPC-Bedingungen

Pumpe:	Merck Hitachi Pump L-7100
Detektor:	Merck Hitachi UV-Detector L-7400
Messwellenlänge:	$\lambda = 214 \text{ nm}$
Auswerteinheit:	PC, Chrom Star 4.14
Probenaufgabevolumen:	1 mL – Probenschleife
Trennsäule	Source TM 15 RPC, 60 x 10 mm
Eluent A:	0.1 mol/L TFA
Eluent B:	Acetonitril
Gradient:	0-30 min linear auf Eluent A / B; 50 % / 50 % 30-35 min linear auf Eluent A / B; 20 % / 80 % 35-40 min 100 % Eluent A, Equilibration
Probe:	Dialysierte Retenate der IEC
Flow:	1 mL/min

7.17 Dialyse

Das Entsalzen der Retenate der IEC und SEC erfolgt mit Slide-A-Lyzer[®] 10 K Dialyse-Kammern der Firma Pierce (Rockford, USA) unter Einhaltung der entsprechenden Vorschriften.

- ✧ Lyophilisierte Retenate in 1 - 2.5 mL bidest. H₂O aufnehmen und in die Dialyse-Kammer injizieren
- ✧ über Nacht bei 4°C gegen bidest. H₂O dialysieren
- ✧ Dialysat lyophilisieren
- ✧ Für weitere Untersuchungen in bidest. H₂O aufnehmen

7.18 N-terminale Sequenzierung

Durchführung

- ✧ PVDF-Membran analog Kapitel 7.14.2 unspezifisch anfärben
- ✧ Entsprechende Proteinbanden mittels Skalpell ausschneiden
- ✧ In Eppendorftubes überführen und zur Sequenzierung geben –Proteinmindestmenge: 50 pmol
- ✧ Die Auswertung erfolgt über eine Datenbankrecherche im Internet – z.B. SWISSPROT

7.19 Charakterisierung der verwendeten Patientenseren

Tab. 7-8: Patientenseren

Nr.	Patient	Jhrg – Geschl.	EAST-Klasse – Spez. IgE-Gehalt [U/mL]	Klinische Symptome	Allergenbanden im Immunoblot [kDa]
1	BG	56 - ♂	3 - 5.753	kA	14; 43; 50; 65; 70
2	BN	78 - ♀	2 - 2,436	JM,AT,E,RH	43
3	DA	72 - ♂	2 - 2.094	RH	14; 26; 43; 50
4	DR	65 - ♂	2 - 0.752	SL, JM	14; 26; 30; 43
5	EH	69 - ♀	2 - 0,719	kA	43; 50; 70
6	GC	70 - ♀	2 - 0,787	E, U, RH	43; 50; 65; 70
7	HI	57 - ♀	3 - 6,241	kA	14; 36; 43
8	HKD	54 - ♂	3 - 12.517	E, ÜB, UT	26; 28; 30; 36; 43; 50; 65; 70
9	HU	47 - ♀	3 - 5,125	SB,AT, E	14; 26; 30; 36; 43; 65; 70
10	KG	64 - ♀	2 - 1.338	JM	43; 65; 70
11	KJ	69 - ♂	3 - 14.563	kA	14; 26; 36; 43; 65; 70
12	KK	55 - ♀	2 - 1.749	SL	36
13	KR	85 - ♂	2 - 2.581	BS, ÜB, KB	43
14	KS	50 - ♀	2 - 2.129	E, UT	14; 20; 26; 28; 30; 36; 43; 50; 65; 70
15	LK	42 - ♂	2 - 3.257	RH	< 14; 43
16	MM	54 - ♂	2 - 1,247	kA	14; 43
17	PE	69 - ♀	2 - 0.928	N, AT,BS	30; 36; 43
18	RA	68 - ♀	2 - 0,763	UT	26; 43
19	RC	62 - ♀	2 - 0,958	UT	26
20	RF	53 - ♂	4 - 60.18	E, ÜB, JM, UT	14; 26; 30; 36; 43; 50; 65; 70
21	RH	64 - ♂	2 - 2.093	N, SB, AT,JM, U	14; 43; 70
22	RT	73 - ♂	2 - 0,777	ND, JM,AT	14; 43
23	SA	58 - ♂	3 - 6,807	JM, SL, E	14; 20; 26; 28; 30; 36; 43; 50; 65; 70
24	SDo	65 - ♀	2 - 1,872	E, JM	18; 26; 43
25	SD	74 - ♂	2 - 0.825	kA	43; 50; 65; 70
26	SF	67 - ♂	2 - 0,936	E, JM, ÜB,SB	43; 50; 65; 70
27	SH	kA - ♀	2 - 1,338	UT	43

Nr.	Patient	Jhrg – Geschl.	EAST-Klasse – Spez. IgE-Gehalt [U/mL]	Klinische Symptome	Allergenbanden im Immunoblot [kDa]
28	SI	68 - ♀	2 - 1,802	JM, RH	14; 26; 30; 43
29	SL	72 - ♂	2 - 1,084	JM, BH	14; 43
30	WJ	44 - ♂	2 - 1.445	JM, E, SB	14; 26; 30; 36; 43; 65; 70
31	WP	48 - ♂	2 - 1.356	kA	14; 26; 30; 36; 43; 65; 70
32	WS	44 - ♂	3 - 4.030	JM, AT,SB	43; 70
33	WU	41 - ♀	3 - 4.493	UT,SB	30; 36; 43; 70

kA: keine Angabe
 RH: Rhinitis
 SL: Schwellung der Lippen
 E: Ekzeme
 ND: Neurodermitis
 SB Schluckbeschwerden
 KB: Kreislaufbeschwerden
 AT: Augentränen
 BS: Bauchschmerzen
 JM: Jucken im Mundbereich
 UT: Urtikaria
 AT: Atemnot
 ÜB: Übelkeit
 BH: Brennen im Hals

Tab. 7-9: Zusammensetzung des Poolserums

Poolserum	Serenzusammensetzung
Tomate	DR, HDH, KR, KS, LK, PE, RH, RF, WJ, WS, WU

Tab. 7-10: Zusammensetzung des Poolserums der Untersuchungen zur Kreuzreaktivität

Seren	EAST-Klasse - spez. IgE-Gehalt [U/mL]				
	Tomate	Kartoffel	Paprika	Sellerie	Litchi
HKD, RF, WU, SL, KS, HI, UH, AS, WS	3 5.368	3 5.455	3 4.694-	2 2.846	2 3.185
AE					
41 - ♀					
Seren	EAST-Klasse - Spez. IgE-Gehalt [U/mL]				
	Banane	Apfel	Haselnuß	Ei	
HKD, RF, WU, SL, KS, HI, UH, AS, WS	3 3.363	2 2.856	2 2.362	--	--
AE				4	
41 - ♀	--	--	--	> 7.5	

7.20 Untersuchungsmaterial

In nachstehender Tabelle sind alle untersuchten Tomatenvarietäten unter Angabe ihrer besonderen Merkmale aufgeführt.

Tab. 7-11 Übersicht über die verwendeten Tomatenvarietäten

Varietät	Reifungs- bzw. Phänotyp	Anbaugebiet	besondere Merkmale
«Balkonstar»	Buschtomate	Deutschland Vier & Marschland	--
«Roma»	Buschtomate	Deutschland	pflaumenförmige Form
«Togo Trefle»	Buschtomate Fleischtomate	Deutschland Vier & Marschland	geriffelte Form
«Flamme»	Stabtomate	Deutschland	--
«Estrella»	Stabtomate	Deutschland Vier & Marschland	--
«El Salvador»	Strauchtomate Cherrytomate	Deutschland	--
«Sweet million»	Stabtomate Cherrytomate	Deutschland Vier & Marschland	tiefrote Frucht
«Tasty Tom»	Strauchtomate	Deutschland	--
«Yellow King »	Buschtomate	Deutschland	--
unbekannte Sorte	Strauchtomate	Deutschland Vier & Marschland	leuchtend rote Frucht

7.21 Probenextrakte

In diesem Abschnitt sind sämtliche untersuchten Proteinextrakte mit ihren dazugehörigen, für die Elektrophorese, eingestellten Proteingehalten aufgeführt; entsprechend den Abschnitten der Ergebnisse sortiert.

Tab. 7-12: Allergencharakterisierung

Extrakt	Methode	Proteinkonzentration [µg/mL]
«Balkonstar»	SDS-PAGE	277
«Balkonstar»	IEF	330
«Balkonstar»	2D-Elektrophorese	2533

Tab. 7-13: Sortenvergleich

Extrakt	Methode	Proteinkonzentration [µg/mL]
«Balkonstar»	SDS-PAGE	277
«Sweet million»	SDS-PAGE	285
«Togo Trefle »	SDS-PAGE	257
«Roma»	SDS-PAGE	242
«Flamme»	SDS-PAGE	328
«Estrella»	SDS-PAGE	245
«Yellow King »	SDS-PAGE	257
unbekannte Sorte	SDS-PAGE	382
«Tasty Tom»	SDS-PAGE	300
«El Salvador»	SDS-PAGE	259

Tab. 7-14: Reifung

Extrakt	Methode	Proteinkonzentration [µg/mL]
«Balkonstar», grün	SDS-PAGE	303
«Balkonstar»; orange	SDS-PAGE	250
«Balkonstar», rot	SDS-PAGE	277
«Balkonstar»; dunkelrot	SDS-PAGE	267

Tab. 7-15: Tomatenbestandteile

Extrakt	Methode	Proteinkonzentration [µg/mL]
«Estrella»; Gesamtfrucht	SDS-PAGE	245
	IEF	181
«Estrella»; Fruchtfleisch	SDS-PAGE	191
	IEF	172
«Estrella»; Samen	SDS-PAGE	369
	IEF	283
«Estrella»; Plazenta	SDS-PAGE	203
	IEF	293
«Estrella»; Schale	SDS-PAGE	361
	IEF	339
«Estrella»; Pulpa	SDS-PAGE	154
	IEF	275

Tab. 7-16: Tomatenbestandteile, IB-Inhibition

elektrophoretisch getrennter Extrakt	Proteinkonzentration [$\mu\text{g/mL}$]	Inhibitor	Proteinkonzentration [$\mu\text{g/mL}$]
«Estrella»; Samen	369	«Estrella»; Gesamtfrucht	205
		«Estrella»; Fruchtfleisch	196
		«Estrella»; Samen	190
		«Estrella»; Plazenta	210
		«Estrella»; Schale	239
		«Estrella»; Pulpa	218

Tab. 7-17: Profilinnachweis

Extrakt	Methode	Proteinkonzentration [$\mu\text{g/mL}$]
«Estrella»; Gesamtfrucht	Profilinblot	245
«Estrella»; Fruchtfleisch	Profilinblot	191
«Estrella»; Samen	Profilinblot	369
«Estrella»; Plazenta	Profilinblot	203
«Estrella»; Schale	Profilinblot	361
«Estrella»; Pulpa	Profilinblot	154

Tab. 7-18: Nachweis von Kohlenhydratstrukturen im Gel und der Membran

Extrakt	Methode	Proteinkonzentration [$\mu\text{g/mL}$]
«Balkonstar»	PAS-Färbung	277
«Balkonstar»	Periodatspaltung	277
«Balkonstar»	Lectin-Blot	277

Tab. 7-19: Nachweis von Kohlenhydratstrukturen nach Affinitätschromatographie

Extrakt	Methode	Proteinkonzentration [$\mu\text{g/mL}$]
«Estrella»	RCA; Durchlauf	39
«Estrella»	RCA; Elution	97
«Estrella»	WGA; Durchlauf	15
«Estrella»	WGA; Elution	51

Tab. 7-20: in vitro Verdau; Tomate: unbekannte Sorte

Extrakt	Enzym	Enzymkonz.	pH-Wert	Inkubationsdauer [min]	Proteinkonzentration [µg/mL]
nativ		--	--	--	439
M1		--	1.2	120	340
M2	Pepsin	$2 \cdot 10^5$ Units/L	1.2	120	349
M3	Pepsin	$4 \cdot 10^5$ Units/L	1.2	120	461
M4	Pepsin	$1 \cdot 10^6$ Units/L	1.2	120	284
M5	Pepsin	$1 \cdot 10^7$ Units/L	1.2	120	289
D1	Pepsin	$1 \cdot 10^6$ Units/L	1.2	120	159
	Trypsin	$2 \cdot 10^7$ Units/L	7.5	120	
D2	Pepsin	$1 \cdot 10^6$ Units/L	1.2	120	85
	Pankreatin	1:25; E:F	7.5	120	
D3	Pepsin	$1 \cdot 10^6$ Units/L	1.2	60	168
	Pankreatin	1:12.5; E:F	7.5	120	
D4	Pepsin	$1 \cdot 10^6$ Units/L	1.2	60	293
	Pankreatin	1:12.5; E:F	7.5	120	
	Proteinase K	$185 \cdot 10^2$ Units/L	7.5	120	

E:F Enzym:Frucht-Verhältnis

Tab. 7-21: verwendete Enzyme

Enzym	Proteinkonzentration [µg/mL]
Pepsin	4900
Trypsin	200
Pankreatin	600
Proteinase K	450

Tab. 7-22: Kreuzreaktivität

Extrakt	Sorte	Methode	Proteinkonzentration [µg/mL]
Tomate	«Balkonstar»	SDS-PAGE	277
Kartoffel	«Karlina»	SDS-PAGE	347
Paprika	«California wonder»	SDS-PAGE	315
Sellerie	unbekannt	SDS-PAGE	403
Litchi	«Mauritius»	SDS-PAGE	240
Banane	unbekannt	SDS-PAGE	363
Apfel	«Golden Delicious»	SDS-PAGE	3620
Haselnuß	«Neapler»	SDS-PAGE	2100
Ei	Trockenei	SDS-PAGE	382

Tab. 7-23: Kreuzreaktivität, IB-Inhibition I

elektrophoretisch getrennter Extrakt	Proteinkonzentration [µg/mL]	Inhibitor	Proteinkonzentration [µg/mL]
Tomate	389	Tomate	245
		Kartoffel	242
		Paprika	219
		Sellerie	196
		Litchi	189
		Banane	203
		Apfel	234
		Haselnuß	215
		Ei	284

Tab. 7-24: Kreuzreaktivität, IB-Inhibition II

elektrophoretisch getrennter Extrakt	Proteinkonzentration [µg/mL]	Inhibitor	Proteinkonzentration [µg/mL]
Kartoffel	403	Kartoffel	274
		Tomate	221
Paprika	394	Paprika	239
		Tomate	221
Sellerie	384	Sellerie	195
		Tomate	221
Litchi	401	Litchi	204
		Tomate	221
Banane	379	Banane	199
		Tomate	221
Apfel	406	Apfel	239
		Tomate	221
Haselnuß	419	Haselnuß	224
		Tomate	221
Ei	421	Ei	229
		Tomate	221

7.22 Ergebnisse der EAST-Inhibition

Tab. 7-25: Sortenunterschiede; Festphase: «Balkonstar»

Inhibitor	Konzentration [µg/mL]	Extinktion [Skt]	Extinktion OA [Skt]	Extinktion B ₀ [Skt]	Extinktion NSB [Skt]	Inhibition [%]	C ₅₀ -Wert [µg/mL]
«Balkonstar»	1394	0.175	1.711	2.009	0.101	96	0.7
	139.4	0.298				90	
	13.94	0.560				76	
	1.394	0.921				57	
	0.1394	1.339				35	
	0.01394	1.731				15	
«Togo Trefle »	3512	0.233	1.711	2.009	0.101	93	19.3
	351.2	0.645				71	
	35.12	0.983				54	
	3.512	1.275				38	
	0.3512	1.466				28	
	0.03512	1.771				13	
«Sweet million»	1909	0.217	1.711	2.009	0.101	94	10.3
	190.9	0.558				76	
	19.09	0.934				56	
	1.909	1.388				33	
	0.1909	1.516				26	
	0.01909	1.727				15	
«Roma»	3116	0.231	1.711	2.009	0.101	93	8.4
	311.6	0.509				79	
	31.16	0.916				57	
	3.116	1.162				44	
	0.3116	1.539				25	
	0.03116	1.789				12	
«Flamme»	502	0.094	0.752	0.742	-0.015	86	26.0
	50.2	0.286				60	
	5.02	0.554				25	
	0.502	0.684				8	
	0.0502	0.784				0	
«Estrella»	621	0.058	0.752	0.742	-0.015	90	14.7
	62.1	0.215				70	
	6.21	0.457				38	
	0.621	0.632				15	
	0.0621	0.628				15	
«El Salvador»	831.0000	0.189	1.711	2.009	0.101	95	9.2
	83.1000	0.662				71	
	8.3100	1.074				49	
	0.8310	1.523				25	
	0.0831	1.635				20	
	0.0083	1.852				8	

Inhibitor	Konzentration [µg/mL]	Extinktion [Skt]	Extinktion OA [Skt]	Extinktion B ₀ [Skt]	Extinktion NSB [Skt]	Inhibition [%]	C ₅₀ -Wert [µg/mL]
«unbekannte Sorte»	460.0000	0.233	0.735	0.722	0.151	86	21.3
	46.0000	0.379				60	
	4.6000	0.550				30	
	0.4600	0.587				24	
	0.0460	0.642				14	
	0.0046	0.690				6	
«Tasty Tom»	1358.0000	0.138	1.355	1.325	0.109	98	3.9
	135.8000	0.349				80	
	13.5800	0.469				57	
	1.3580	0.728				44	
	0.1358	1.039				23	
	0.0136	1.253				6	
«Yellow King »	450.0000	0.217	0.744	0.762	0.153	89	10.7
	45.0000	0.368				65	
	4.5000	0.511				41	
	0.4500	0.583				29	
	0.0450	0.651				18	
	0.0045	0.647				19	

Tab. 7-26: Reifung; Festphase: «Balkonstar», rot

Inhibitor	Konzentration [µg/mL]	Extinktion [Skf]	Extinktion OA [Skf]	Extinktion B ₀ [Skf]	Extinktion NSB [Skf]	Inhibition [%]	C ₅₀ -Wert [µg/mL]
«Balkonstar»; rot	1394	0.175	1.711	2.009	0.101	96	0.7
	139.4	0.298				90	
	13.94	0.560				76	
	1.394	0.921				57	
	0.1394	1.339				35	
«Balkonstar»; grün	1492	0.168	1.711	2.009	0.101	97	8.4
	149.2	0.497				79	
	14.92	0.932				56	
	1.492	1.398				32	
	0.1492	1.589				22	
«Balkonstar»; orange	995	0.165	1.711	2.009	0.101	97	5.5
	99.5	0.448				82	
	9.95	0.941				56	
	0.955	0.378				33	
	0.0955	1.513				26	
«Balkonstar»; dunkelrot	1004	0.163	1.711	2.009	0.101	97	0.7
	100.4	0.342				87	
	10.04	0.743				66	
	1.004	1.000				53	
	0.1004	1.352				34	

Tab. 7-27: Tomatenbestandteile; Festphase: «Estrella», Gesamtfrucht

Inhibitor	Konzentration [µg/mL]	Extinktion [Skt]	Extinktion OA [Skt]	Extinktion B ₀ [Skt]	Extinktion NSB [Skt]	Inhibition [%]	C ₅₀ -Wert [µg/mL]
«Estrella»; Gesamtfrucht	471	0.084	0.743	0.760	0.012	90	3.7
	47.1	0.195				76	
	4.71	0.359				54	
	0.471	0.649				16	
	0.0471	0.685				10	
«Estrella»; Plazenta	510	0.054	0.743	0.760	0.012	94	3.0
	51.0	0.147				82	
	5.10	0.327				58	
	0.510	0.581				24	
	0.0510	0.653				14	
«Estrella»; Schale	454	0.055	0.743	0.760	0.012	94	5.2
	45.4	0.155				81	
	4.54	0.398				48	
	0.454	0.525				31	
	0.0454	0.609				20	
«Estrella»; Fruchtfleisch	492	0.063	0.743	0.760	0.012	93	3.1
	49.2	0.182				77	
	4.92	0.328				58	
	0.492	0.625				18	
	0.0492	0.697				8	
«Estrella»; Pulpa	406	0.056	0.743	0.760	0.012	94	3.6
	40.6	0.238				70	
	4.06	0.379				51	
	0.406	0.539				30	
	0.0406	0.604				21	
«Estrella»; Samen	496	0.400	0.743	0.760	0.012	48	nicht erreicht
	49.6	0.612				20	
	4.96	0.644				15	
	0.496	0.680				11	
	0.0496	0.742				2	

Tab. 7-28: in-vitro-Magendauung; Festphase Tomate, nativ

Inhibitor	Konzentration [µg/mL]	Extinktion [Skt]	Extinktion OA [Skt]	Extinktion B ₀ [Skt]	Extinktion NSB [Skt]	Inhibition [%]	C ₅₀ -Wert [µg/mL]
unbekannte Sorte, nativ	410.0000	0.207	0.613	0.722	0.151	90	4.6
	41.0000	0.332				68	
	4.1000	0.442				49	
	0.4100	0.592				23	
	0.0410	0.665				10	
	0.0041	0.689				6	
ohne Pepsin t > 120 min pH > 1.2	466.0000	0.184	0.613	0.722	0.151	94	4.9
	46.6000	0.299				74	
	4.6600	0.440				49	
	0.4660	0.625				17	
	0.0466	0.620				18	
	0.0047	0.687				6	
mit Pepsin c > 2·10 ⁵ U/kg t > 120 min pH > 1.2	299.0000	0.269	1.052	1.079	0.195	92	30.9
	29.9000	0.642				49	
	2.9900	0.890				21	
	0.2990	1.021				7	
	0.0299	1.023				6	
	0.0030	1.125				0	
mit Pepsin c > 4·10 ⁵ U/kg pH > 1.2 t > 120 min	344.0000	0.194	1.052	1.079	0.195	100	17.0
	34.4000	0.524				63	
	3.4400	0.895				21	
	0.3440	0.996				9	
	0.0344	1.031				5	
	0.0034	1.038				5	
mit Pepsin c > 1·10 ⁶ U/kg t > 120 min pH > 1.2	332.0000	0.225	1.052	1.079	0.195	97	23.8
	33.2000	0.580				56	
	3.3200	0.975				12	
	0.3320	1.097				0	
	0.0332	1.106				0	
	0.0033	1.132				0	
mit Pepsin c > 1·10 ⁷ U/kg t > 120 min pH > 1.2	110.0000	0.475	1.052	1.079	0.195	68	42.2
	11.0000	0.864				24	
	1.1000	1.081				0	
	0.1100	1.059				2	
	0.0110	1.117				0	
	0.0011	1.077				0	

Fortsetzung Tab. 7-28

Inhibitor	Konzentration [µg/mL]	Extinktion [Skf]	Extinktion OA [Skf]	Extinktion B ₀ [Skf]	Extinktion NSB [Skf]	Inhibition [%]	C ₅₀ -Wert [µg/mL]
Pepsin	267.0000	0.654	0.683	0.722	0.151	12	nicht erreicht
	26.7000	0.703				3	
	2.6700	0.654				12	
	0.2670	0.726				0	
	0.0267	0.709				2	

Tab. 7-29: in-vitro-Darmdauung; Festphase Tomate, nativ

Inhibitor	Konzentration [µg/mL]	Extinktion [Skf]	Extinktion OA [Skf]	Extinktion B ₀ [Skf]	Extinktion NSB [Skf]	Inhibition [%]	C ₅₀ -Wert [µg/mL]
Trypsin c > 2·10 ⁷ U/kg t > 120 min pH > 7.5	399.0000	0.332	0.837	0.901	0.153	76	61.3
	39.9000	0.572				44	
	3.9900	0.680				30	
	0.3990	0.822				11	
	0.0399	0.837				8	
	0.0040	0.824				10	
Pankreatin 1:25 t > 120 min pH > 7.5	460.0000	0.234	0.613	0.722	0.151	86	71.1
	46.0000	0.484				42	
	4.6000	0.550				30	
	0.4600	0.602				21	
	0.0460	0.642				14	
	0.0046	0.690				6	
Pankreatin 1:12.5 t > 120 min pH > 7.5	493.0000	0.279	0.837	0.901	0.153	83	64.9
	49.3000	0.561				45	
	4.9300	0.747				21	
	0.4930	0.792				15	
	0.0493	0.842				8	
	0.0049	0.867				4	
Proteinase K c > 185·10 ² U/kg t > 120 min pH > 7.5	468.0000	0.334	0.837	0.901	0.153	76	99.3
	46.8000	0.621				37	
	4.6800	0.867				4	
	0.4680	0.888				2	
	0.0468	0.913				0	
	0.0047	0.884				2	
Trypsin	173.0000	0.731	0.786	0.772	0.128	6	nicht erreicht
	17.3000	0.729				7	
	1.7300	0.774				0	
	0.1730	0.730				7	
	0.0173	0.734				6	
	0.0017	0.814				0	

Fortsetzung Tab. 7-29

Inhibitor	Konzentration [µg/mL]	Extinktion [Skt]	Extinktion OA [Skt]	Extinktion B ₀ [Skt]	Extinktion NSB [Skt]	Inhibition [%]	C ₅₀ -Wert [µg/mL]
Pankreatin	128.0000	0.666	0.786	0.772	0.128	16	nicht erreicht
	12.8000	0.686				13	
	1.2800	0.734				6	
	0.1280	0.694				12	
	0.0128	0.789				0	
	0.0013	0.874				0	
Proteinase K	153.0000	0.740	0.786	0.772	0.128	5	nicht erreicht
	15.3000	0.697				12	
	1.5300	0.738				5	
	0.1530	0.768				1	
	0.0153	0.785				0	
	0.0015	0.803				0	

Tab. 7-30: Kreuzreaktivitäten I; Festphase Tomate

Inhibitor	Konzentration [µg/mL]	Extinktion [Skt]	Extinktion OA [Skt]	Extinktion B ₀ [Skt]	Extinktion NSB [Skt]	Inhibition [%]	C ₅₀ -Wert [µg/mL]
Tomate	211	0.1355	0.465	0.099	0.458	90	1.7
	21.1	0.2150				68	
	2.11	0.3285				37	
	0.211	0.4010				17	
	0.0211	0.4010				8	
Kartoffel	30.4	0.195	0.465	0.099	0.458	75	12.7
	3.04	0.258				58	
	3.04	0.363				37	
	0.304	0.430				7	
	0.0304	0.525				0	
Paprika	2520	0.151	0.465	0.099	0.458	86	16.8
	252	0.194				74	
	25.2	0.265				55	
	2.52	0.360				29	
	0.252	0.482				0	
Sellerie	388.0000	0.344	1.510	1.808	0.138	89	22.6
	38.8000	0.874				53	
	3.8800	1.297				30	
	0.3880	1.528				15	
	0.0388	1.544				10	
	0.0139	1.671				10	

Fortsetzung Tab. 7-30

Inhibitor	Konzentration [µg/mL]	Extinktion [Skt]	Extinktion OA [Skt]	Extinktion B ₀ [Skt]	Extinktion NSB [Skt]	Inhibition [%]	C ₅₀ -Wert [µg/mL]
Litchi	315.0000	0.616	1.510	1.808	0.138	71	88.8
	31.5000	1.266				32	
	3.1500	1.660				9	
	0.3150	1.826				0	
	0.0315	1.898				0	
	0.0032	1.847				0	
Banane	303.0000	0.558	1.510	1.808	0.138	75	86.5
	30.3000	1.320				29	
	3.0300	1.426				23	
	0.3030	1.850				0	
	0.0303	1.889				0	
	0.0139	1.931				0	
Apfel	338.0000	0.396	1.510	1.808	0.138	85	41.8
	33.8000	1.032				46	
	3.3800	1.530				17	
	0.3380	1.752				3	
	0.0338	1.939				0	
	0.0034	1.985				0	
Haselnuß	375.000	0,839	1.510	1.808	0.138	57	171.6
	37.500	1,233				34	
	3.750	1,535				16	
	0.3750	1,752				3	
	0.0375	1,713				6	
	0.037	1,736				4	
Ei	402.0000	1.824	1.510	1.808	0.138	0	nicht erreicht
	40.2000	1.835				0	
	4.0200	1.819				0	
	0.4020	1.872				0	
	0.0402	1.849				0	
	0.0040	1.894				0	

Tab. 7-31: Kreuzreaktivitäten II; Festphase: verschiedene Gemüse & Früchte

Inhibitor	Konzentration [µg/mL]	Extinktion [Skt]	Extinktion OA [Skt]	Extinktion B ₀ [Skt]	Extinktion NSB [Skt]	Inhibition [%]	C ₅₀ -Wert [µg/mL]
Kartoffel; homolog	211.0000	0.133	0.590	0.536	0.117	96	5.9
	21.1000	0.229				73	
	2.1100	0.346				45	
	0.2110	0.428				26	
	0.0211	0.513				6	
«Balkonstar»	304.0000	0.181	0.590	0.536	0.117	85	3.1
	30.4000	0.262				65	
	3.0400	0.353				44	
	0.3040	0.500				9	
	0.0304	0.561				0	
Paprika; homolog	123	0.1440	0.589	0.536	0.116	93	4.1
	12.3	0.2620				65	
	1.23	0.3465				45	
	0.123	0.4885				11	
	0.0123	0.6050				0	
«Balkonstar»	282	0.1480	0.589	0.536	0.116	92	2.1
	28.2	0.2385				71	
	2.82	0.3439				46	
	0.282	0.4555				19	
	0.0282	0.5240				3	
Sellerie; homolog	473.0000	0.291	0.575	0.530	0.288	99	18.7
	47.3000	0.373				65	
	4.7300	0.463				28	
	0.4730	0.527				1	
	0.0473	0.526				2	
	0.0047	0.578				0	
«Balkonstar»	368.0000	0.286	0.575	0.530	0.288	101	15.2
	36.8000	0.374				64	
	3.6800	0.465				27	
	0.3680	0.513				7	
	0.0368	0.520				4	
	0.0037	0.472				24	

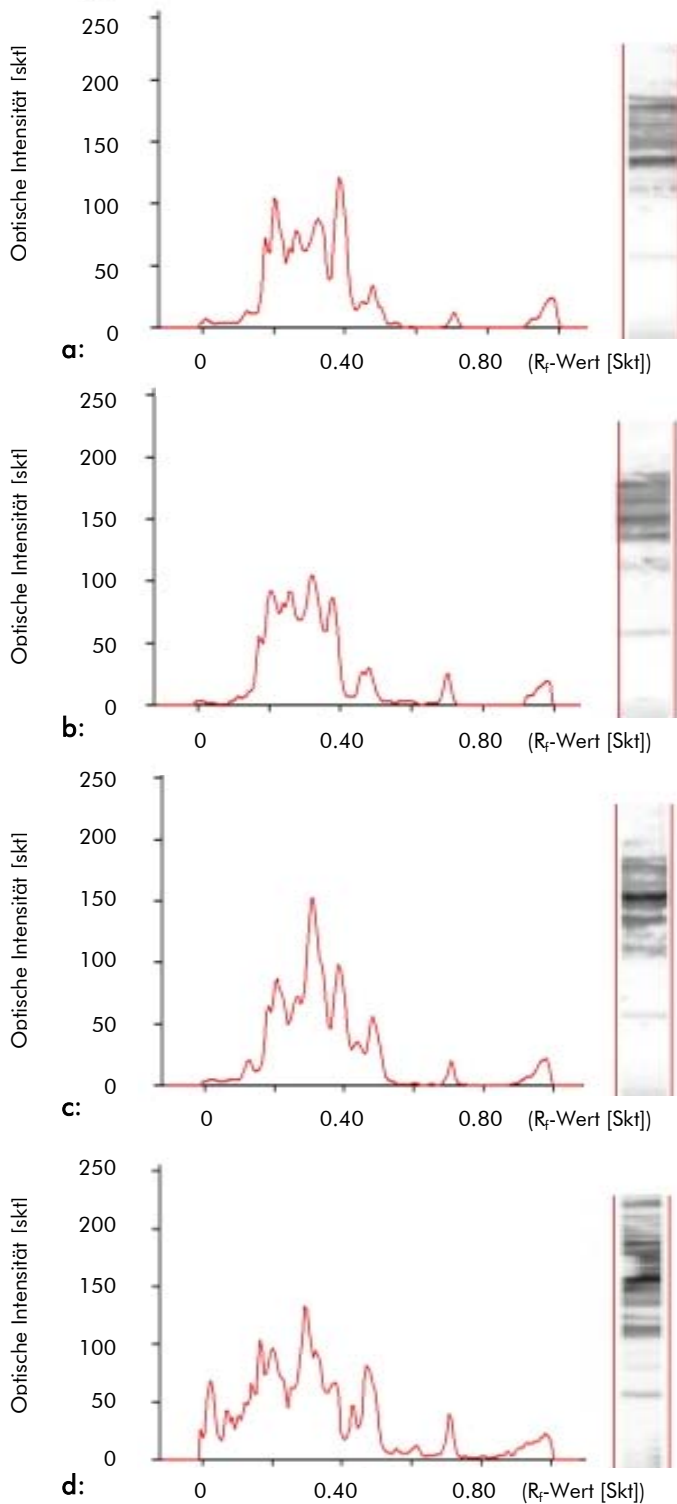
Fortsetzung Tab. 7-31

Inhibitor	Konzentration [µg/mL]	Extinktion [Skt]	Extinktion OA [Skt]	Extinktion B ₀ [Skt]	Extinktion NSB [Skt]	Inhibition [%]	C ₅₀ -Wert [µg/mL]
Litchi; homolog	422.0000	0.208	0.470	0.505	0.165	87	42.2
	42.2000	0.335				50	
	4.2200	0.395				32	
	0.4220	0.481				1	
	0.0422	0.503				1	
	0.0042	0.536				0	
«Balkonstar»	368.0000	0.254	0.470	0.505	0.165	74	69.3
	36.8000	0.366				41	
	3.6800	0.405				29	
	0.3680	0.454				15	
	0.0368	0.513				0	
	0.0037	0.511				0	
Banane; homolog	297.0000	0.270	1.019	0.967	0.142	84	61.3
	29.7000	0.685				34	
	2.9700	0.988				0	
	0.2970	0.966				0	
	0.0297	1.002				0	
	0.0030	1.014				0	
«Balkonstar»	457.0000	0.327	1.019	0.967	0.142	78	41.6
	45.7000	0.549				51	
	4.5700	0.689				34	
	0.4570	0.803				20	
	0.0457	0.904				8	
	0.0046	0.893				9	
Apfel; homolog	362.0000	0.398	1.052	1.011	0.300	86	28.8
	36.2000	0.639				52	
	3.6200	0.806				29	
	0.3620	0.895				16	
	0.0362	0.936				10	
	0.0036	0.993				2	
«Balkonstar»	433.0000	0.828	1.052	1.011	0.300	26	nicht erreicht
	43.3000	0.812				28	
	4.3300	0.920				13	
	0.4330	0.940				10	
	0.0433	0.944				9	
	0.0043	0.940				10	

Fortsetzung Tab. 7-31

Inhibitor	Konzentration [µg/mL]	Extinktion [Skt]	Extinktion OA [Skt]	Extinktion B ₀ [Skt]	Extinktion NSB [Skt]	Inhibition [%]	C ₅₀ -Wert [µg/mL]
Haselnuß; homolog	410.0000	0.157	0.483	0.425	0.141	94	0.9
	41.0000	0.162				92	
	4.1000	0.184				85	
	0.4100	0.335				32	
	0.0410	0.478				0	
	0.0041	0.447				0	
«Balkonstar»	468.0000	0.263	0.483	0.425	0.141	57	173.5
	46.8000	0.310				41	
	4.6800	0.678				17	
	0.4680	0.923				0	
	0.0468	0.948				0	
	0.0047	0.429				0	
Ei; homolog	402.0000	0.025	0.643	0.669	0.018	99	0.3
	40.2000	0.033				98	
	4.0200	0.093				88	
	0.4020	0.296				57	
	0.0402	0.946				0	
	0.0040	0.950				0	
«Balkonstar»	436.0000	1.015	0.643	0.669	0.018	0	nicht erreicht
	43.6000	1.390				0	
	4.3600	1.109				0	
	0.4360	1.234				0	
	0.0436	0.870				0	
	0.0044	0.784				0	

7.23 Densitogramme



Allergen	Start [Rf]	Ende [Rf]	Area
14 kDa	0.680	0.707	50
26 kDa	0.471	0.476	82
30 kDa	0.462	0.470	55
36 kDa	0.357	0.421	777
44 kDa	0.286	0.357	839
650 kDa	0.248	0.286	421
65 kDa	0.186	0.229	580
70 kDa	0.152	0.186	277

Allergen	Start [Rf]	Ende [Rf]	Area
14 kDa	0.671	0.730	107
26 kDa	0.468	0.512	136
30 kDa	0.443	0.468	92
36 kDa	0.350	0.411	556
44 kDa	0.282	0.348	927
50 kDa	0.245	0.286	483
65 kDa	0.179	0.223	563
70 kDa	0.150	0.179	199

Allergen	Start [Rf]	Ende [Rf]	Area
14 kDa	0.678	0.730	78
26 kDa	0.457	0.535	382
30 kDa	0.418	0.455	193
36 kDa	0.355	0.418	679
44 kDa	0.275	0.355	1346
50 kDa	0.236	0.275	457
65 kDa	0.188	0.236	575
70 kDa	0.154	0.188	219

Allergen	Start [Rf]	Ende [Rf]	Area
14 kDa	0.680	0.737	146
26 kDa	0.452	0.528	545
30 kDa	0.414	0.450	197
36 kDa	0.355	0.411	402
44 kDa	0.263	0.355	1526
50 kDa	0.245	0.263	473
65 kDa	0.177	0.243	766
70 kDa	0.150	0.179	412

Abb. 7-1: Densitogramme der Immunoblots verschiedener Reifestufen

a: «Balkonstar»; grün

b: «Balkonstar»; orange

c: «Balkonstar»; rot

d: «Balkonstar»; dunkelrot

7.24 Chemikalien. Geräte. Verbrauchsmaterialien & Zubehör

7.24.1 Chemikalien

Aceton	Merck	F R11. S9-16-23.2-33
6-Aminohexansäure	Merck	
Ammoniumhydrogencarbonat	Merck	Xn R22
Ammoniumperoxodisulfat. p.A.	Merck	Xn R8-22-42/43. S17-26-43.1
Amyloglucosidase	Fluka	
Anti-Human-IgE (Kaninchen)	Dako	
Anti-Kaninchen-IgG. biotinyliert (Ziege)	Dako	
Brilliant-Black-Tinte	Pelikan	
Bovine Serum Albumin. pH 7. reinst	Serva	
Bromcyan	Merck	T ⁺ C R26/27/28-34. S9-26-45
Bromphenolblau	Merck	
Chymotrypsinogen A	Pharmacia	
Citronensäure	Merck	
Coomassie Brilliant Blue R/G 250	Serva	
Conalbumin	Fluka	
3-Cyclohexylamino-1-propansulfonsäure (CAPS)	Serva	
Diethylether	Merck	F ⁺ R12-19. S9-16-29-33
Dioctylnatriumsulfosuccinat (DONS)	Fluka	Xn R22. S22-24/25
EAST-Testkit „Spez. IgE ELISA TR (RV)“	Allergopharma	
EDTA (Titriplex)	Merck	
Essigsäure. > 99 %	Fluka	C R10-35. S2-23.2-26
Ethanol 96 %	Merck	F R11. S7-16
Ethanolamin	Merck	Xi R20-36/37/38
Formaldehyd. 37 %	Merck	T R23/24/25-40-43. S26-36/37-44-51
Glutardialdehyd. 25 %	Merck	T R25-36/37/38-42/43. S36-44
Glycerin 87 %	Fluka	
IEF-Anodenpuffer	Invitrogen	
IEF-Kathodenpuffer; pH 3 - 7	Invitrogen	
di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck	
α -Lactalbumin	Sigma	
Magermilchpulver	Glücksklee	
Methanol	Merck	T F R11-23/25. S2-7-16-25
2-Mercaptoethanol	Serva	T R22-24-36/37/38. S26-36/37-45
MOPS SDS Running Buffer	Invitrogen	
MES SDS Running Buffer	Invitrogen	
MG-Marker / SDS-PAGE (2.5-16.9 kDa)	Merck	
MG-Marker / SDS-PAGE (14-94 kDa)	Pharmacia	
Myoglobin	Sigma	
pI-Marker / IEF (pI 3 – 10)	Serva	
Natriumacetat-Trihydrat	Merck	

Natriumazid	Merck	T ⁺ R28-32. S28.1
Natriumcarbonat, wasserfrei	Merck	Xi R36. S22-26
Natriumchlorid	Merck	
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck	
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva	Xn R20/22-36/38. S26-28
Natriumhydrogencarbonat	Merck	
Natriumhydrogensulfit	Merck	C R31-34. S2-24/25-26
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck	
Natriumhydroxid	Merck	C R35. S226-37/39
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Merck	
Ovalbumin	Fluka	
Pancreatin (Porcine Pancreas)	Sigma	
Pepsin aus Schweinemagenschleimhaut (452 Units/mL)	Sigma	
ortho-Phosphorsäure, 85 %	Merck	C R34. S26-36/37/39-45
PBS-Tabletten	Serva	
Proteinase K Typ XI aus Tritirarchium album (13.4 Units/mg)	Sigma	
Pufferlösung (pH 4.0)	Merck	
Pufferlösung (pH 7.0)	Merck	
Pyronin Y	Fluka	
Ribonuclease A	Pharmacia	
Salzsäure, 37 %	Merck	C R34-37. S26-36/37/39-45
Silbernitrat	Merck	C R34. S26-45
Source TM Q; Säulenmaterial IEC	Pharmacia	
Source TM RP15; Säulenmaterial RPC	Pharmacia	
Streptavidin-HRP-Konjugat	Medac	
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	Fluka	
Titriplex III (EDTA)	Merck	Xn R22
Trichloressigsäure	Merck	C R35. S24/25-26-45
Tris-hydroxymethylaminomethan (Tris)	J.B. Baker	Xi R36/38
Trypsin Typ I aus Rinderpankreas (10900 BAEE Units/mg)	Sigma	
Tween [®] 20	Serva	
Wasserstoffperoxid, 30 %	Merck	C R34. S28-36/39

7.24.2 Geräte

Blot-Einheit	Multiphor IINova Blot 2117-250	Pharmacia
Elektrophorese-Kammer	EI-9001-Xcell II Mini Cell	Novex (San Diego, CA, USA)
Elektroelutionskammer	Biotrap	Schleicher & Schüll (Dassel, Deutschland)
ELISA-Reader	Microplate Reader MRX	Dynex Technologies (Frankfurt, Deutschland)
Kühlschrank		Eisfink (Asperg, Deutschland)
Kühltruhe (-20 °C)		
Kühltruhe (-80 °C)	KLS 3085-1	Kryotec (Hamburg, Deutschland)

Gefriertrocknungsanlage	Gamma A	Christ (Osterode, Deutschland)
	Beta 1-16	Christ (Osterode, Deutschland)
Magnetrührer		Heidolph (Schwabach, Deutschland)
pH-Elektrode	H 6160	Schott (Mainz, Deutschland)
pH-Meter	CG 801	Schott (Mainz, Deutschland)
HPLC-Pumpe	Pump L-7100	Merck-Hitachi (Darmstadt, Deutschland)
Schüttler	Typ 3016	GFL (Hannover, Deutschland)
Säulen	Chromatographiesäule C10/10	Amersham Pharmacia (Uppsala, Schweden)
Säulenadapter	Adapter AC 10	Amersham Pharmacia (Uppsala, Schweden)
Stromversorger I	Multi Drive XL	LKB
Thermostat	MGW Lauda RMT 6	Lauda (Lauda-Königshofen, Deutschland)
Trockenschrank		Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland)
Ultra-Turrax	T 20	Jahnke und Kunkel (Staufen i. Br., Deutschland)
UV-Detektor	UV-Detektor L-7400	Merck-Hitachi (Darmstadt, Deutschland)
Vortex	Reax Top	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Waage (fein)	1202 MP	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Waage (grob)	1602 004	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Wasserbad	FS 2	Haake (Karlsruhe, Deutschland)
Zentrifuge	3 K 15	Sigma (Osterode, Deutschland)

7.24.3 Verbrauchsmaterialien & Zubehör

Blotmembranen	Nitrocellulose, 0.2 μ m PVDF	Schleicher & Schüll (Dassel, Deutschland) Amersham Pharmacia (Uppsala, Schweden)
Dauer-Elektrodenbrücken	Haushaltstücher	Vileda (Weinheim, Deutschland)
Elektroelutionsmembranen	BT1 / BT2	Schleicher & Schüll (Dassel, Deutschland)
Färbe-Kunststoffschalen	8 Kammern	Bio Rad (Herkules, CA, USA)
Filterpapierscheiben	Rundfilter 6 mm	Schleicher & Schüll (Dassel, Deutschland)
Kolbenhubpipetten	0.5 μ L – 5 mL	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Probengefäße	Glas, 4 mL	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Reaktionsgefäße	Safe Lock, 2 mL	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Stepper		Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipettenspitzen		Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Membranfilter	45 μ m	Schleicher & Schuell (Dassel, Deutschland)
NuPAGE™ 10 % Bis-Tris Gele	1 mm; 10, 12 & 2D well	Novex (San Diego, CA, USA)
NuPAGE™ 12 % Bis-Tris-Gele	1 mm; 12 well	Novex (San Diego, CA, USA)
NuPAGE™ IEF 3-7	1 mm; 12 well	Novex (San Diego, CA, USA)
Parafilm		American National Can (Neenah, WI, USA)
Mikrotiterplatten	Minisorb, 96 Kavitäten	Nunc (Roskilde, Dänemark)

8 Literaturverzeichnis

- AALBERSE RC, KOSTHE V & CLEMENTS JGJ (1981) Immunoglobulin E antibodies that crossreact with vegetable foods, pollen and Hymenoptera venom; *J Allergy Clin Immunol* **68**: 356-364
- AALBERSE RC & VAN REE R (1997) Crossreactive carbohydrate determinants; *Clin Rev Allergy Immunol* **15**: 375-387
- AALBERSE RC (2000) Structural biology of allergens; *J Allergy Clin Immunol* **106**: 228-238
- AAS K, BACKMANN A, BELIN L & WEEKE B (1978) Standardization of allergen extracts with appropriate methods. The combined use of skin prick testing and radio-allergosorbent tests; *Allergy* **33**: 130-137
- ABECK D, BÖRRIES M, KUWERT C, STEINKRAUS V, VIELUF D & RING J (1994) Nahrungsmittelanaphylaxie bei Latexallergie; *Hautarzt* **45**: 364-347
- AHLROTH K, ALENIUS H, TURJANMAA K, MÄKINEN-KILJUNEN S, REUNALA T & PALOSUO T (1995) Crossreacting allergens in natural rubber latex and avocado; *J Allergy Clin Immunol* **96**: 167-173
- ANDRÉ F, ANDRÉ C, COLIN L, CACARACI F & CAVAGNA S (1994) Role of new allergens and of allergen consumption in the increased incidence of food sensitizations in France; *Toxicology* **93**: 77-83
- ANDRE L, GUILLOUX L & ANDRE C (1995) Frequency of cross-sensitivities between latex, banana, chestnut, avocado and kiwi in 50 carriers of food allergy; *Allergy* **50**: 125
- ASERO R, MISTRELLO G, RONCAROLO D, DE VRIES SC, GAUTIERF MF, CIURANA CLF, VERBEEK E, KNUL-BRETTLOVA TMV, AKKERDAAS JH, BULDER I, AALBERSE RC & VAN REE R (2001) Lipid Transfer protein: a pan-allergen in plant-derived foods that is highly resistant to pepsin digestion; *Int Arch Allergy Immunol* **124**: 67-69
- ASHER MI, KEIL U, ANDERSON HR, BEASLEY R, CRANE J, MARTINEZ F, MITCHELL EA, PEARCE N, SIBBALD B & STEWART AW (1995) International study of asthma and allergies in childhood (ISAAC): rationale and methods; *Eur Respir J* **8**(3): 483-491
- ASSELIN J, HÉBERT J & AMIOT J (1989) Effects of in vitro proteolysis on the allergenicity of major whey proteins; *J Food Sci* **54**: 1037-1039
- ASTWOOD JD, LEACH JN & FUCHS RL (1996) Stability of food allergens to digestion in vitro; *Nature Biotechnol* **14**: 1269-1273
- ASTWOOD J, ALIBHAI M, LEE T, FUCHS R & SAMBPOSON HA (2000) Identification and characterization of IgE binding epitopes of patatin a major food allergen of potato; *J Allergy Clin Immunol* **105**: 184
- AULEPP H & VIETHS S (1992) Probleme der Nahrungsmittelallergie; *Dtsch Lebensm Rundsch* **88**: 171-179
- BALESTRIERI C, CASTALDO D, GIOVANE A, QUAGLIUOLO L, SERVILLO L (1990) A glycoprotein inhibitor of pectin methylesterase in kiwi fruit (actinidia chinensis); *Eur J Biochem* **193**: 183-187
- BALLMER-WEBER BK, WÜTHRICH B, WANGORSCH A, FOETISCH K, ALTMAN F & VIETHS S (2001) Carrot allergy: double blind placebo-controlled food challenge and identification of allergens; *J Allergy Clin Immunol* **108**: 310-307
- BARNETT D & HOWDEN MEH (1986) Partial characterisation of an allergenic glycoprotein from peanut (*Arachis hypogaea* L.); *Biochem Biophys Acta* **882**: 97-105

- BAUER L, EBNER C, HIRSCHWEHR R, WÜTHRICH B, PICHLER C, FRITSCH R, SCHEINER O & KRAFT D (1996) IgE cross-reactivity between birch pollen, mugwort pollen and celery is due to at least three distinct cross-reacting allergens: immunoblot investigation of birch-mugwort-celery-syndrome; *Clin Exp Allergy* **26**: 1161-1170
- BERNHISEL-BROADBENT J, DINTZIS HM, DINTZIS RS & SAMPSON HA (1994) Allergenicity and antigenicity of chicken egg ovomucoid (Gal d 3) compared with ovalbumin (Gal d 1); *J Allergy Clin Immunol* **93**: 1047-1059
- BESLER M, STEINHART H & PASCHKE A (1997) Allergenicity of the hen's egg white proteins: IgE-binding of native and deglycosylated Ovomucoid *Food Agric Immunol* **9**: 277-288
- BHALLA PL, SWOBODA I & SINGH MB (2001) Reduction in Allergenicity of grass pollen by genetic engineering; *Int Arch Allergy Immunol* **124**: 51-54
- BINDSLEV-JENSEN C (1998) FOOD ALLERGY; *BMJ* **316**: 1299-1302
- BIRCHER AJ, VAN MELLE G, HALLER E, CURTY B & FREI PC (1994) IgE to food allergens are highly prevalent in patients allergic to pollen, with and without symptoms of food allergy; *Clin Exp Allergy* **24**: 367-374
- BIRD CR, SMITH CJS, RAY JA, MOUREAU P, BEVAN MW, BIRD AS, HUGHES S, MORRIS PC, GRIERSON D & SCHUCH W (1988) The tomato polygalacturonase gene ripening-specific expression in transgenic plants; *Plant Mol Biol* **11**: 651-662
- BLANCO C, CARRILLO T, CASTILLO R, QUIRALTE J & CUEVAS M (1994) Latex allergy: clinical features and cross reactivity with fruits; *Ann Allergy* **73**: 309-314
- BLEUMINK E, BERRENS L & YOUNG E (1966) Studies on the atopic allergen in ripe tomato fruits. I. Isolation and identification of the allergen; *Int Arch Allergy* **30**: 132-145
- BLEUMINK E, BERRENS L & YOUNG E (1967) Studies on the Atopic Allergen in Ripe Tomato Fruits. II. Further Chemical Characterization of the Purified Allergen; *Int Arch Allergy* **31**: 25-37
- BOCCAFOGLI A, VICENTINI L, CAMERANI A, COGLIATI P, D'AMBROSI A & SCOLOZZI F (1994) Adverse food reactions in patients with grass pollen allergic respiratory disease; *Allergy* **73**: 301-308
- BOWLES DJ (1990) Defense-related proteins in higher plants; *Annual review of biochemistry*; **59**: 873-907
- BRADFORD MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding; *Anal Biochem* **72**: 248-254
- BREHLER R, THEISSEN U, MOHR C & LUGER T (1997) „Latex-fruit syndrome”: frequency of cross-reacting IgE antibodies; *Allergy*; **52**: 404-410
- BREITENEDER H, PETTENBURGER K, BITO A, VALENTA R, KRAFT D, RUMPOLD H, SCHEINER O & BREITENBACH M (1989) The gene coding for the major birch pollen allergen Bet v 1 is highly homologous to a pea diseases resistance response gene; *EMBO J* **8**:1935-1938
- BREITENEDER H & EBNER C (2000) Molecular and biochemical classification of plant derived food allergens; *J Allergy Clin Immunol* **106**(1): 27-36

- BRUIJNZEL-KOOMEN C, ORTOLANI C, AAS K, BINDSLEV-JENSEN C, BJÖRKSTEN B & WÜTHRICH B (1995) Adverse reactions to food: Position paper of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology; *Allergy* **50**: 623-635
- BUISSERET PD (1988) Allergie: Wenn die Immunantwort Fehler macht; in: Spektrum der Wissenschaft: Immunsystem; *Spektrum Akademischer Verlag - Heidelberg* 140-150
- BURKS AW, WILLIAMS LW, HELM RM, THRESHER W, BROOKS JR & SAMPSON HA (1991a) Identification of soy protein allergens in patients with atopic dermatitis and positive soy challenges; determination of change in allergenicity after heating or enzyme digestion; in: Nutritional and Toxicological Consequences of Food Processing (Friedman M, ed) Plenum Press New York 295-307
- BURKS AW, WILLIAMS LW, HELM RM, CONNAUGHTON C, COCKRELL G & O'BRIEN T (1991b) Identification of a major peanut allergen, Ara h 1, in patients with atopic dermatitis and positive peanut challenges; *J Allergy Clin Immunol* **88**: 172-179
- BUSCHMANN L (1996) Nahrungsmittelallergien und Pseudoallergien; *Akt Ernähr Med* **21**: 161-164
- CABALLERO T, PASCUAL C, GARCIA-ARA MC, OJEDA JA & MARTIN-ESTEBAN M (1997) IgE cross-reactivity between mugwort pollen (*Artemisia vulgaris*) and hazelnut (*Abellana nux*) in sera from patients with sensitivity to both extracts; *Clin Exp Allergy* **27**: 1203-1211
- CABALLERO T & MARTIN-ESTEBAN M (1998) Association between pollen hypersensitivity and edible vegetable allergy: a review; *Invest Allergol Clin Immunol* **1**: 6-16
- CALKHOVEN PG, AALBERSE M, KOSHTA VL, POS O, OEI HD & AALBERSE RC (1987) Cross reactivity among birch pollen, vegetables and fruits as detected by IgE antibodies is due to at least three distinct cross reactive structures; *Allergy* **42**: 382-390
- CARTELLIERI SM (2002) Entwicklung eines biospezifischen Trennverfahrens für die Fraktionierung und Aufreinigung von Glykokonjugaten, Dissertation Universität Hamburg
- CASTELS MC, PASCUAL C, MARTIN ESTEBAN M & OJEDA JA (1986) Allergy to white potato; *J Allergy Clin Immunol* **78**: 1110-1114
- CASTILLO R, DELGADO J, QUIRALTE J, BLANCO C & CARRILLO T (1996) Food hypersensitivity among adult patients: epidemiological and clinical aspects; *Allergol Immunopathol (Madrid)* **24**: 93-97
- CEDERGREN-ZEPPEZUAER ES, GOONESKERE NCW, ROZYCKI MD, MYSLIK JC, LINDBERG U & SCHUTT CE (1994) Crystallization and structure determination of bovine profilin at 2.0 resolution; *J Mol Biol* **240**: 459-475
- CESKA M & LUNDKVIST U (1972) A new and simple radioimmunoassay method for the determination of IgE; *Immunochem* **9**: 1021-1030
- CHANDRA RK, GILL B & KUMARI S (1993) Food allergy and atopic disease: pathogenesis, diagnosis, prediction of high risk, and prevention; *Ann Allergy* **71**: 495-503
- CHANDRA RK (1997) Food hypersensitivity and allergic disease: a selective review; *Am J Clin Nutr* **66**: 526-529
- CHINN S, BURNEY P, SUNYER J, JARVIS D & LUCZYNSKA C (1999) Sensitization to individual allergens and bronchial responsiveness in the ECRHS. European Community Respiratory Health Survey; *Eur Respir J* **14**: 876-884
- CLEMENTS RL (1965) Fruit proteins: extraction and electrophoresis; *Anal Biochem* **13**: 390-401

- COLLIN-WILLIAMS C & LEVY LD (1984) Allergy on food other than milk; in: CHANDRA RK ed.; *Food Intolerances; Elsevier-New York* 137-186
- COOMBS RRA & GELL PGH (1963) The classification of allergic reactions underlying disease; in: *Clinical aspects of immunology; Davis-Philadelphia* 317
- CZAJA-BULSA G & BACHORSKA J (1998) Alergia pokarmowa u dzieci z pyłkowicą w rejonie pomorza zachodniego (Food allergy in children with pollinosis in the western sea coast region); *Pol Merkuriusz Lek*; **5**: 338-340
- DANSCHER A, CRESPO JF & PASCUAL CY (1998) Specific IgE to recombinant vegetal panallergen (rBet v 2) and fruit allergy in pollinic patients; *Allergy* **53**: 614-618
- DARNOWSKI DW, VALENTA R & PARTHASARATHY MV (1996) *Planta* **198**: 158-161
- DE MARTINO M, NOVEMBRE E, COZZA G, DE MARCO A, BONAZZA P & VIERUCCI A (1988) Sensitivity to tomato and peanut allergens in children monosensitive to grass pollen; *Allergy* **43**: 206-213
- DIAZ-PERALES A, COLLADA C, BLANCO C, SANCHEZ-MONGE R, CARILLO T, ARAGONCILLO C & SALCEDO G (1999) Cross-reactions in Latex-fruit-syndrome: A relevant role of chitinases but not of complex asparagine-linked glycans; *J Allergy Clin Immunol* **104**: 681-687
- DIEZ-GOMEZ ML, QUIRCE S, CUEVAS M, SANCHEZ-FERNANDEZ C, BAZ G, MORADIELLOS FJ & MARTINEZ AQ (1999) Fruit-polln-latex cross-reactivity: Implication of profilin (Bet v 2); *Allergy* **55**: 712-717
- DOMINGUEZ J, CUEVAS M, URENA V, MUNOZ T & MONEO I (1990) Purification and characterization of an allergen of mustard seed; *Ann Allergy* **64**: 352-357
- DREBORG S & FOUCARD T (1983) Allergy to apple, carrot and potato in children with birch pollen allergy; *Allergy* **38**: 167-72
- DREBORG S (1988) Food allergy in pollen-sensitive patients; *Ann Allergy* **61**: 41-46
- DREBORG S, BOUSQUET J, LØWENSTEIN H & FREW AJ (1994) Reponse to what is a "major" allergen? by Berrens L; *Clin Exp Allergy* **24**: 610-611
- EBNER C, BIRKNER T, VALENTA R, RUMPOLD H, BREITENBACH M, SCHEINER O & KRAFT D (1991) Common epitopes of birch pollen and apples – studies by Western and Northern blot; *J Allergy Clin Immunol* **88**: 588-594
- EBNER C, HIRSCHWEHR R, BAUER L, BREITENEDER H, VALENTA R, EBNER H, KRAFT D & SCHEINER O (1995) Identification of allergens in fruits and vegetables: IgE cross-reactivities with the important birch allergens Bet v 1 and Bet v 2 (birch profilin); *J Allergy Clin Immunol* **95**: 962-969
- EIGENMANN PA & SAMPSON HA (1998) Interpreting skin prick tests in evaluation of food allergy in children; *Pediatr Allergy Immunol* **9**: 186-191
- ERIKSON S & FAGERSON IS (1976) The plastein reaction and its applications: A review; *J Food Sci* **41**: 490
- ERIKSSON NE, FORMGREN H & SVENONIUS E (1982) Food hypersensitivity in patients with pollen allergy; *Allergy* **37**: 437-443
- ETESAMIFAR M & WÜTHRICH B (1998) IgE-vermittelte Nahrungsmittelallergie bei 383 Patienten unter Berücksichtigung des oralen Allergie-Syndroms; *Allergologie* **21**: 451-457

- FÄH J, WÜTHRICH B & VIETHS S (1995) Anaphylactic reaction to lychee fruit: evidence for sensitization to profilin; *Clin Exp Allergy* **25**: 1018-1023
- FAHLBUSCH B, RUDESCHKO O, MÜLLER WD, SCHLENGVOIGT G, VETTERMANN S & JÄGER L (1995) Purification and characterization of the major allergen from apple and its allergenic cross-reactivity to Bet v 1; *Int Arch Allergy Immunol* **108**: 119-126
- FERNANDEZ-RIVAS M & CUEVAS M (1999) Peels of Rosaceae fruits have a higher allergenicity than pulps; *Clin Exp Allergy* **29**: 1239-1247
- FLING PS & GREGERSON DS (1986) Peptide and protein molecular weight determination by using a high molarity tris buffer system without urea; *Anal Biochem* **155**: 83-88
- FÖTISCH K, ALTMANN F, HAUSTEIN D & VIETHS S (1999). Involvement of carbohydrate epitopes in the IgE response of celeryallergic patients; *Int Arch Allergy Immunol* **120**: 30-42
- FÖTISCH K, YEUL SON D, ALTMANN F, AULEPP H, CONTI A, HAUSTEIN D & VIETHS S (2001) Tomato (*Lycopersicon esculentum*) allergens in pollen-allergic patients; *Eur Food Res Technol* **213**: 259-266
- FRANKE W (1997) Nutzpflanzenkunde: Nutzbare Gewächse der gemäßigten Breiten, Subtropen und Tropen; 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- FUCHS RL, REAM JE, HAMMOND BG, NAYLOR MW & LEIMGRUBER G (1993) Safety assessment of the neomycin phosphotransferase II (NPTII) protein; *Bio Technology* **11**: 1543-1547
- FUCHS T, SPITZAUER S, VENTE C, HEVLER J, KAPIOTIS S, RUMPOLD H, KRAFT D & VALENTA R (1997) Natural Latex, grass pollen and weed pollen share IgE epitopes; *J Allergy Clin Immunol* **100**: 356-364,
- FUCHS HC, WILLERROIDER M, BALLMER-WEBER B, SUSANI M, THALHAMER J, WÜTHRICH B, BREITENEDER H & HOFFMANN-SOMMERGRUBER K [2002] Molecular and immunological characterisation of two new food allergens, Lye 1 and Cap a 2, profilin from bell pepper (*capsicum annuum*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*); *Allergy* **57**: 80
- FUNES E, MILAN JM, PAGAN JA, LOPEZ JA, GARCIA FJ, NEGRO JM, HERNANDEZ J, POLO F & RICO YP (1999) Alergia a *anaracadiaceae*, Identificación de alergenos; *Allerg Immunol Clinic* **14**: 82-88
- GACIA-OLMEDO F, MOLINA A, SEGURA A & MORENO M (1995) The defense role of nonspecific lipid transfer proteins in plants; *Trends in Microbiology* **3(2)**: 72-74
- GALLATI H & PRACHT L (1985) Peroxidase aus Meerrettich: Klinische Studien und Optimierung der Peroxidase-Aktivitätsbestimmung mit den Substraten H₂O₂ und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin; *J Clin Chem Clin Biochem* **23**: 453-460
- GARCIA ORTIZ JC, COSMES MARTIN P & LOPEZ-ASUNSOLO A (1995) Melon sensitivity shares allergens with plantago and grass pollens; *Allergy* **50**: 269-273
- GARCIA ORTIZ JC, MOYANO JC, ALVAREZ M, BELLIDO J (1998) Latex allergy in fruit-allergic patients; *Allergy* **53**: 532-536
- GARCIA-CASADO G, SANCHEZ-MONGE R, CHRISPEELS MJ, ARMENTIA A, SALCEDO G & GOMEZ L (1996) Role of complex asparagine-linked glycans in allergenicity of plant glycoproteins; *Glycobiology* **6**: 471-477

- Geha R (1995) Immunreaktion in Abwesenheit einer Infektion; in: Janeway C & Travers P (Hrsg.) Immunologie; *Spektrum Akademischer Verlag-Heidelberg* 489-538
- GLICK BR & PASTERNAK JJ (1995) Molekulare Biotechnologie; *Spektrum Akademischer Verlag-Heidelberg*
- GÖRG A, POSTEL W, GÜNTHER S (1988) The current status of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients, *Elektrophoresis* **9**: 531-546
- GRIERSON D, TUCKER GA, KEEN J, RAY J, BIRD CR & SCHUCH W (1986) Sequencing and identification of a cDNA clone for tomato polygalacturonase; *Nucleic Acids Res* **14**: 8595-8603
- GUTTMAN A (1996) Capillary sodium dodecyl-sulfate gel electrophoresis of proteins. *Elektrophoresis* **17**: 1333-1341
- HAGEL K, LUNDSTRÖM H, ANDERSSON T & LINDBLOM H (1989) Properties, in theory and practice, of novel gel filtration media for standard liquid chromatography; *J Chromatogr* **104**: 329-344
- HANCOCK K & TSANG VCW (1983) Indian Ink staining of proteins on nitrocellulose paper; *Anal Biochem* **133**: 157-162
- HANDMAN E & JARVIS HM (1985) Nitrocellulose-Based Assays for the Detection of Glycolipids and other Antigens: Mechanism of Binding to Nitrocellulose; *J Immunol Meth* **83**: 113-123
- HANNUKSELA M & LATHI A (1977) Immediate reactions to fruits and vegetable; *Contact Dermatitis* **3**: 79-84
- HEFLE SL (1996) The chemistry and biology of food allergens; *Food Technol* **50**: 86-92
- HEISS S, FISCHER S, MÜLLER WD, WEBER B, HIRSCHWEHR R, SPITZAUER S, KRAFT D & VALENTA R (1996) Identification of a 60 kd cross-reactive allergen in pollen and plant-derived food; *J Allergy Clin Immunol* **98**: 938-947
- HELBING A (1997) Wichtige kreuzreaktive Allergene; *Schweiz Med Wochenschr* **127** 382-389
- HELBING A (1998) Nahrungsmittel-Allergie; *Praxis* **87**: 1309-1315
- HEUKESHOVEN J & DERNICK R (1986) Neue Ergebnisse zum Mechanismus der Silberfärbung; In: Radola BJ (ed.), *Elektrophoreseforum*, TU München 22-27
- HILL DJ, HOSKING CS & HEINE RG (1999) Clinical spectrum of food allergy in children in Australia and south-east Asia: identification and targets for treatment; *Ann Med* **31**: 272-281
- HIRSCHWEHR R, VALENTA R, EBNER C, FERREIRA F, SPERR WR, VALENT P, ROHAC M, RUMPOLD H, SCHEINER O & KRAFT D (1992) Identification of common allergenic structures in hazel pollen and hazelnuts: A possible explanation for sensitivity to hazelnuts in patients allergic to tree pollen; *J Allergy Clin Immunol* **90**: 927-936
- HOFFMANN-SOMMERGUBER K (2000) Plant allergens and pathogenesis-related proteins. What do they have in common?; *Int Arch Allergy Immunol* **122**: 155-166
- HONMA K, KOHNO Y, SAITO K, SHIMOJO N, TSUNOO H & NIIMI H (1994) Specificities of IgE, IgG and IgA antibodies to ovalbumin. Comparison of binding activities to denaturated ovalbumin or ovalbumin fragments of IgE antibodies with those of IgG and IgA antibodies; *Int Arch Allergy appl Immunol* **103**: 28-35

- HSIEH LS, MOOS JR M & LIN Y (1995) Characterization of apple 18 and 31 kd allergens by microsequencing and evaluation of their content during storage and ripening; *J Allergy Clin Immunol* **96**: 960-970
- ISHIZAKA T, CAMPBELL DH & ISHIZAKA K (1960) Internal antigenic determinants in protein molecules; *Proc Soc Exp Biol Med* **103**: 5-9
- ISHIZAKA K & ISHIZAKA T (1967) Identification of gamma-E-antibodies as a carrier of reaginic activity; *J Immunol* **99**: 1187-1198
- JANEWAY CA & TRAVERS P (1995) Immunologie; *Spektrum Akademischer Verlag-Heidelberg*
- JANKIEWICZ A, AULEPP H, BALTES W, BÖGL KW, DEHNE LI, ZUBERBIER T & VIETHS S (1996) Allergic sensitization to native and heated celery root in pollen sensitive patients investigated by skin test and IgE binding; *Int Arch Allergy Immunol* **111**: 268-278
- JANKIEWICZ A, BALTES W, BÖGL KW, DEHNE LI, JAMIN A, HOFFMANN A, HAUSTEIN D & VIETHS S (1997) Influence of food processing on the immunochemical stability of celery allergens; *J Sci Food Agric* **75**: 359-370
- JANKIEWICZ A, AULEPP H, ALTMANN F, FÖTISCH K & VIETHS S (1998) Serological investigation of thirty celery allergic patients with particular consideration of the thermal stability of IgE binding celery allergens; *Allergo J* **7**: 87-95
- JENSEN-JAROLIM E, SANTNER B, LEITNER A, GRIMM R, SCHEINER O, EBNER C & BREITENEDER H (1998) Bell peppers (*Capsicum annuum*) express allergens (profilin, pathogenesis-related protein P23 and Bet v 1) depending on the horticultural strain; *Int Arch Allergy Immunol* **116**: 103-109
- JENSEN-JAROLIM E, WIEDERMANN U, GANGLBERGER E, ZURCHER A, STADLER BM, BOLTZ-NITULESCU G, SCHEINER O & BREITENEDER H (1999) Allergen mimotopes in food enhance type I allergic reactions in mice; *FASEB J* **13**: 1586-1592
- JOHANSSON SG & BENNICH H (1967) Immunological studies of an atypical (myeloma) immunoglobulin; *Immunology* **13**: 381-394
- JOHNSON DA, GAUTSCH JW, SPORTSMAN JR & ELDER JH (1984) Improved technique utilizing nonfat dry milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose; *Gene Anal Technol* **1**: 3-11
- KADER JC (1996) Lipid transfer proteins in plants; *Annu Physiol Plant Mol Biol* **47**: 627-654
- KARDINAAL ALM (1991) Epidemiology of food allergy and food intolerances; in: SOMGYI JC, MÜLLER HR & OCKHUITZEN TH eds.; Food allergy and intolerances Nutritional aspects and developments; *Karger-Base* 105-115
- KAY AB (1997) Concepts of allergy and hypersensitivity; in: KAY AB; Allergy and allergic diseases, 1. edition, *Blackwell Science-London*
- KIMBER I, KERKVLIT NI, TAYLOR SL, ASTWOOD JD, SARLO K & DEARMAN RJ (1999) Toxicology of protein allergenicity: prediction and characterization; *Toxicol Sci* **48**: 157-162
- KINDER H, SCHARF B, STEINHART H & PASCHKE A. (1999) Investigation of IgE-binding Patterns and Allergenicity of Mango Fruit Allergens in Different Varieties; *Internet Symposium on Food Allergens* **1**: 43-49

- KING TP & THOMAS W (1994) Allergen nomenclature; *Int Arch Allergy Immunol* **105**: 224-233
- KLEINE-TEBBE J & RYTTER M (1997) IgE-vermittelte Nahrungsmittelallergien; *H+G* **3**: 184-192
- KONAN KN & VIQUEZ OM (2002) Downregulation of Ara h 2, a major peanut allergen in transgenic peanut plants; *J Allergy Clin Immunol* **109**: 163-167
- KONDO Y, URISUS A & TOKUDA R (2001) Identification and characterization of the allergen in the tomato fruit by immunoblotting; *Int Arch Allergy Immunol* **126**: 294-299
- KORTEKANGAS-SAVOLAINEN O, SAVOLAINEN J, EINARRSON R (1993) Gastrointestinal stability of baker's yeast allergens: an in vitro study; *Clin Exp Allergy* **23**: 587-590
- KREFT D, BAUER R & GÖRLICH R (1995) Nahrungsmittelallergene - Charakteristika und Wirkungsweise; *de Gruyter-Berlin/New York*
- KRISTENSEN A, SCHOU C & ROEPSTORFF P (1997). Determination of isoforms, N-linked glycan structure and disulfide linkages of the major cat allergen Fel d 1 by mass spectrometric approach; *Biol Chem* **378**: 899-908
- KYHSE-ANDERSEN J (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose; *J Biochem Biophys Methods* **10**: 203
- LEHRER SB, HORNER WE & REESE G (1996) Why are some proteins allergenic? Implications for biotechnology; *Crit Rev Food Sci Nutr* **36**: 553-564
- LEHRER SB, AYUSO R & REESE G (2002) Current understanding of food allergens; *Ann N Y Acad Sci* **964**: 69-85
- LEISTNER E & BRECKLE SW (1988) Pharmazeutische Biologie; *Georg Thieme Verlag, Stuttgart /New York*
- LEITNER A, JENSEN-JAROLIM E, GRIMM R, WÜTHRICH B, EBNER H, SCHEINER O, KRAFT D & EBNER C (1998) Allergens in pepper and paprika. Immunologic investigation of the celery-mugwort-spice-syndrome; *Allergy* **53**: 36-41
- LEVY DA, MOUNEDJI N, NOIROT C & LEYNADIER F (2000) Allergic sensitization and clinical reactions to latex, food and pollen in adult patients; *Clin Exp Allergy* **30**: 270-275
- LICHTENSTEIN LM (1993) Allergy and the immune system; *Sci Am* **9**: 85-93
- LINDHORST TK (2000) Struktur und Funktion von Kohlenhydraten; *Chemie in unserer Zeit* **34**: 38-52
- LOOMIS WD (1974) Overcoming problems of phenolic and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles; *Methods Enzymol* **31**: 528-544
- LÜTTKOPF D, BALLMER WEBER BK, WÜTHRICH B & VIETHS S (2000) Celery allergens in patients with positive double-blind placebo controlled food challenge; *J Allergy Clin Immunol* **106**: 390-399
- MAHMOUD MI, MALONE WT, CORDLE CT (1992) Enzymatic Hydrolysis of Casein: Effect of Degree of Hydrolysis on Antigenicity and Physical Properties; *J Food Sci* **57**: 1223-1229
- MALMQUIST G & LUNDELL N (1992) Characterization of the influence of displacing salts on retention in gradient elution ion exchange chromatography of proteins and peptides; *J Chromatogr* **627**: 107-124
- MARTINEZ A, MARTINEZ J & PALACIOS R (1995) The panallergenic character of profilin; *ACI News* **7**: 85-94

- MATSUDA T, WATANABE K & NAKAMURA R (1983) Immunochemical and physical properties of peptic-digested ovomucoid; *J Agric* **31**: 942-946
- MCEVILY AJ, IYENGAR R & OTWELL WS (1992) Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages; *Crit Rev Food Sci Nutr* **32**: 253-273
- MEKORI YA (1996) Introduction to allergic diseases; *Crit Rev Food Sci Nutr* **36**: 1-18
- MENA M, SANCHEZ-MONGE R, GOMEZ L, SALCEDO G & CARBONERO P (1992) A major allergen associated with baker's asthma disease is a glycosylated monomeric inhibitor of insect alpha-amylase: cDNA cloning and chromosomal location of the gene; *Plant Mol Biol* **20**: 451-458
- MENENDEZ-ARIAS L, MONEO I, DOMINGUEZ J & RODRIGUEZ R (1988) Primary structure of the major allergens of yellow mustard (*Sinapis alba* L. seed, Sin a 1); *Eur J Biochem* **177**: 159-166
- MÖLLER M (1997) Charakterisierung von Allergenen tropischer Früchte unter Berücksichtigung von Kreuzreaktivitäten; Dissertation der Universität Hamburg
- MÖLLER M, PASCHKE A, VIELUF D, KAYMA M, VIETHS S & STEINHART H (1997a) Characterization of allergens in kiwi fruit and detection of cross-reactivity with allergens of birch pollen and related fruit allergens; *Food Agric Immunol* **9**: 107-121
- MÖLLER M, KAYMA M, STEINHART H, PASCHKE A (1997b) Isolation and characterization of a major allergen in kiwi fruit; *Z Lebensm Unters Forsch A* **205**: 364-369
- MONERET-VAUTRIN DA & KANNY G (1995) Food-induced anaphylaxis. A new french multicenter survey; *Ann Gastroenterol Hepatol (Paris)* **3**: 256-263
- MÜHLAU A (2000) Isolierung und Charakterisierung von immunologisch aktiven Glycoproteinen aus *Baptisia tinctoria* (Wilder Indigo); *Dissertation der Philipps-Universität Marburg*
- NACLERIO RM, BAROODY F (1998) Understanding the inflammatory processes in upper allergic airway disease and asthma; *J Allergy Clin Immunol* **101**: 345-351.
- NILSEN BM, SLETTEN K, SMESTAD-PAULSEN B, O'NEILL M & VAN HALBECK A (1991) Structural analysis of the glycoprotein allergen Art v II from the pollen of mugwort; *J Biol Chem* **266**: 2660-2668
- ORTEGA N, QUIRALTE J, BLANCO C, CASTILLO R ALVAREZ MJ & CARILLO T (1999) Tobacco allergy: demonstration of cross reactivity with other members of Solanaceae family and mugwort pollen; *Ann Allergy Asthma Immunol* **82**: 194-197
- ORTOLANI C, ISPANO M, PASTORELLO E, BIGI A & ANSALONI R (1988) The oral allergy syndrome; *Ann Allergy* **61**: 47-52
- ORTOLANI C, ISPANO M, PASTORELLO EA, ANSALONI R & MAGRI GC (1989) Comparison of results of skin prick tests (with fresh foods and commercial food extracts) and RAST in 100 patients with oral allergy syndrome; *J Allergy Clin Immunol* **83**(3): 683-690
- ORTOLANI C, PASTORELLO EA, FARIOLI L, ISPANO M, PRAVETTONI V, BERTI C, INCORVAIA C & ZANUSSI C (1993) IgE-mediated allergy from vegetable allergens; *Ann Allergy* **71**: 470-476
- PASCHKE A., KINDER H., ZUNKER K., WIGOTZKI M., WEBBECHER R., VIELUF D. & STEINHART H. (2001) Characterization of allergens in mango fruit and ripening dependence of the allergenic potency; *Food Agric Immunol* **13**: 51-61

- PASTORELLO EA, PRAVETTONI V, ISPANO M, FARIOLI L, ANSALONI R, ROTONDO F, INCORVAIA C, ASMAN I, BENGTSSON A & ORTOLANI C (1996) Identification of the allergenic components of kiwi fruit and evaluation of their crossreactivity with timothy and birch pollen; *J Allergy Clin Immunol* **98**: 601-610
- PASTORELLO EA, ORTOLANI C, BAROGLIO C, PRAVETTONI V, ISPANO M, GIUFFRIDA MG, FORTUNATO D, FARIOLI L, MONZA M, NAPOLITANO L, SACCO M, SCIBOLA E & CONIT A (1999) Complete amino acid sequence determination of the major allergen of peach (*Prunus persica*) Pru p 1; *Biol Chem* **380**:1315-1320
- PASTORELLO EA & TRAMBAIOLI C (2001) Isolation of food allergens; *J Chromatogr B* **756**: 71-84
- PEARCE N, SUNYER J, CHENG S, CHINN S, BJÖRKSTEN B, BURR M, KEIL U, ANDERSON HR & BURNEY P (2000) Comparison of asthma prevalence in the ISAAC and the ECRHS. ISAAC steering committee and the European community respiratory health survey. International study of asthma and allergies in childhood; *Eur Respir J* **16**: 420-426
- PETERSEN A, VIETHS S, AULEPP H, SCHLAACK M & BECKER WM (1996) Ubiquitous structures responsible for IgE cross-reactivity between tomato fruit and grass pollen allergens; *J Allergy Clin Immunol* **98**: 805-815
- PETERSEN A & MUND C (2000) Investigations on the carbohydrate moieties of glycoprotein allergens; *J Chromatogr B*; **756**: 141-150
- PFAU A, STOLZ W, LANDTHALER M & PRZYBILLA B (1996) Neue Aspekte zur Nahrungsmittelallergie; *Dtsch med Wschr* **121**: 346 – 350
- PHILLIPS DJ, CHELI PJ, DION DM, HODGON HL, POMFRET AM & SAN SOUCI BR (1992) Schemes for efficient protein purification on a family of polymeric ion exchanges in glass columns; *J Chromatogr* **599**: 239-253
- PICHLER WJ & STICH O (1993) Nahrungsmittelallergien bei Pollensensibilisierungen. Teil II: Kreuzreaktionen bei Beifußpollen-Sensibilisierungen; *Allergologie* **16**: 494-501
- POSCH A, WHEELER CH, CHEN Z, FLAGGE A, DUNN MJ, PAPENFUSS F, RAULF-HEIMSOTH M & BAUR X (1999) Class I endochitinase containing a hevein domain is the causative in latex associated avocado allergy *Clin Exp Allergy* **29**: 667 - 672
- READ SM & NORTHCOTE DH (1981) Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie Blue G dye binding assay for protein; *Anal Biochem* **116**: 53-64
- RECHE M, PASCUAL CY, VICENTE J, CABALLERO T, MARTIN-MUNOZ F, SANCHEZ S & MARTIN-ESTEBAN M (2001) Tomato allergy in children and young adults: cross-reactivity with latex and potato; *Allergy* **56**: 1197-1201
- REED AJ, KRETZMER KA, NAYLOR MW, FINN RF & MAGIN KM (1996) Safety assessment of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase protein expressed in delayed ripening tomatoes, *J Agric Food Chem* **44**: 388-394
- REINDL J, RIHS HP, SCHEURER S, WANGORSCH A, HAUSTEIN D, VIETHS S (2002) IgE reactivity to profilin in pollen-sensitized subjects with adverse reactions to banana and pineapple; *Int Arch Allergy Immunol* **128**: 105-114
- RING J (1988) Angewandte Allergologie; 2. Auflage; *Medizin Verlag GmbH - München*
- RING J, BROCKOW K & BEHRENDT H (2001) Adverse reactions to foods; *J Chromatogr B* **756**: 3-10

- ROBERTSON DM, PAGANELLI R & DINWIDDIE R (1982) Milk antigen absorption in the preterm and term neonate; *Arch Dis Child* **57**: 369-372
- ROITT IM (1993) Leitfaden der Immunologie; 4. Auflage; *Blackwell Wissenschaft-Berlin*
- ROITT IM, BROSTOFF J & MALE DK (1995) Immunology; 3 Auflage; *Georg Thieme Verlag - Stuttgart/New York*
- ROTH L, DAUNDERER M & KORMANN K (1988) Giftpflanzen-Pflanzengifte: Vorkommen-Wirkung-Therapie/Allergische und phytotoxische Reaktionen; 3. Auflage; *Ecomed Verlagsgesellschaft mbH - Landsberg*
- SAMPSON HA & METCALFE DD (1991) Immediate reactions to foods; in: Food allergy; METCALFE DD, SAMPSON HA & SIMON RA ed; *Blackwell Scientific Publishers - Cambridge* 99-112
- SAMPSON HA (1991) Immunologic mechanisms in adverse reaction to foods; *Immunol Allergy Clin North Am* 701-716
- SAMPSON HA (1992a) Fatal and near-fatal anaphylactic reactions to foods in children and adolescents; *N Engl J Med* **327**: 380-384
- SAMPSON HA (1992b) Food Hypersensitivity: Manifestations, diagnosis and natural history; *Food Technol* **46**: 141-144
- SAMPSON HA (1999) Food allergy. part 1: Immunopathogenesis and clinical disorders; *J Allergy Clin Immunol* **103**: 717-728
- SANCHEZ-MONGE R, LOMBARDERO M, GARCIA-SELLES FJ, BARBER D & SALCEDO G (1999) Lipid-transfer proteins are relevant allergens in fruit allergy; *J Allergy Clin Immunol* **103**: 514-519
- SCHEURER S, WANGORSCH A, HAUSSTEIN D & VIETHS S (2000) Cloning of the minor allergen Api g 4, profilin vom celery (*Apium graveolens*) and its cross-reactivity with birch pollen profilin Bet v 2; *Clin Exp Allergy* **30**: 962-971
- SCHEURER S, WANGORSCH A, NERKAMP J, SKOV PS, BALLMER-WEBER B, WÜTHRICH B, HAUSTEIN D & VIETHS S (2001a) cross-reactivity within the profilin panallergen family investigated by comparison of recombinant profilins from pear (Pyr c 4), cherry (Pru av 4) and celery (Api g 4) with birch pollen profilin (Bet v 2); *J Chromatogr B* **756**: 315-325
- SCHEURER S, PASTORELLO EA, WANGORSCH A, KÄSTNER M, HAUSTEIN D & VIETHS S (2001b) Recombinant allergens Pru av 1 and Pru av 3 and a newly identified lipid transfer protein in the in vitro diagnosis of cherry allergy; *J Allergy Clin Immunol* **107**: 724-731
- SCHWARZ HR, NERURKAR LS, SPIES JR, SCANLON RT, BELLANTI JA (1980) Milk hypersensitivity: RAST studies using new antigens generated by pepsin hydrolysis of beta-lactoglobulin; *Ann Allergy* **45**: 242-245
- SCHUBERT S, STEINHART H & PASCHKE A (submitted) The influence of different potato (*solanum tuberosum*) strains and technological processing on allergenicity
- SEPPÄLÄ U, ALENIUS H, TURJANMAA K, REUNALA T, PALOSUO T, KALKINEN N (1999) Identification of patatin as a novel allergen for children with positive skin prick test responses to raw potato; *J Allergy Clin Immunol* **103**: 165-171

- SEPPÄLÄ U, MAJAMAA H, TURJANMAA K, HELIN J, REUNALA T, KALKINEN N & PALOSUO T (2001) Identification of four novel potato (*Solanum tuberosum*) allergens belonging to the family of soybean trypsin inhibitors; *Allergy* **56**: 619-626
- SHEEHY RE, PEARSON J, BRADY CJ & HIATT WR (1987) Molecular characterization of tomato fruit polygalacturonase; *Mol Gen Genet* **208**: 30-36
- SON DY, SCHEURER S, HOFFMANN A, HAUSTEIN D & VIETHS S (1995) Pollen-related food allergy: cloning and immunological analysis of isoforms and mutants of Mal d 1, the major apple allergen, and Bet v 1, the major birch pollen allergen; *Eur J Nutr* **38**: 201-215
- SPREITZER H (1996) Nahrungsmittelallergene; *ÄAZ* **6**: 248-253
- STAIGER CJ, GOOBODY KC, HUSSEY PJ, VALENTA R, DROBAK BK & LOYD CW (1993) The profilin multigene family of maize: different expression of three isoforms; *Plant J* **4**: 631-641
- STANLEY JS & BANNON GA (1999) Biochemistry of food allergens; *Clin Rev Allergy Immunol* **17**: 279-291
- STINIZ A, HEITZ T, PRASAD V, WIEDERMANN-MERDINOGLU S, KAUFFMANN S, GEOFFROY P, LEGRAND M & FRITIG B (1993) Plant `pathogenesis related` proteins and their role in defense against pathogens; *Biochimie* **75**: 687-692
- STOTT DI (1989) Immunoblotting and dot blotting; *J Immunol Meth* **119**: 153-187
- STRACHAN D, SIBBALD B, WEILAND S, AIT-KHALED N, ANABWANI G, ANDERSON HR, ASHER M, BEASLEY R, BJÖRKTÉN B, BURR M, CLAYTON T, CRANE J, ELLWOOD P, KEIL U, LAI C, MALLOL J, MARTINEZ F, MITCHELL E, MONTEFORT S, PEARCE N, ROBERTSON C, SNAH J, STEWART A, VAN MENTINS E & WILLIAMS H (1997) Worldwide variations in prevalence of symptoms of allergic rhinoconjunctivitis in children: the international study of asthma and allergies in childhood (ISAAC); *Pediatr Allergy Immunol* **8**: 161-176
- SUNYER J, BASAGANA X, BURNEY P & ANTÓ JM (2000) International assessment of the internal consistency of respiratory symptoms; Study (ECRHS); *Am J Respir Crit Care Med* **162**: 930-935
- SUTTON BJ & GOULD HJ (1993) The human IgE network; *Nature* **366**: 421-428
- SWISSPROT (2002) <http://www.expasy.ch>
- TAYLOR SL (1992) Chemistry and detection of food allergens; *Food Technol* **46**: 146-152
- THIEL C (1988) Nahrungsmittelallergien bei Pollenallergikern (sogenannte pollenassoziierte Nahrungsmittelallergien); *Allergologie* **11**: 397-410
- THOMAS WR, SMITH W & HALES BJ (1998) House dust mite allergen characterisation: Implications for T-cell responses and immunotherapy; *Int Arch Allergy Immunol* **115**: 9-14
- TOBWIN H & GORDON J (1984) Immunoblotting and dot blotting – current status and outlook; *J Immunol Meth* **72**: 3131-340
- TRETTET V, Altmann F, Kubelka V, März L & Becker WM (1993). Fucose alpha 1,3-linked to the core region of glycoprotein N-glycans creates an important epitope for IgE from honeybee venom allergic individuals; *Int Arch Allergy Immunol* **102**: 259-266
- VALENTA R, DUCHENE M, EBNER C, VALENT P, SILLABER C, DEVILLER P, FERREIRA F, TEIKL M, EDELMAN H, HIRSCHWEHR R, EBNER C, KRAFT D & SCHEINER O (1992a) Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens; *J Exp Med* **175**: 377-385

- VALENTA R, DUCHENE M, VRTALA S, VALENT P, SILLABER C, FERREIRA F, TEJKL M, HIRSCHWEHR R, EBNER C, KRAFT D & SCHEINER O (1992b) Profilin, a novel plant pan-allergen; *Int Arch Allergy Immunol* **99**: 271-273
- VALLIER P, DECHAMP R, VALENTA R, VIAL O & DEVILLER P (1992) Purification and characterisation of an allergen from celery immunochemically related to an allergen present in several other plant species. Identification as a profilin; *Clin Exp Allergy* **22**: 774-782
- VAN REE R, VOITENKO V, VAN LEEUWEN WA & AALBERSE RC (1992) Profilin is a cross reactive allergen in pollen and vegetable foods; *Int Arch Allergy Immunol* **98**: 97-104
- VAN REE R, FERNANDEZ-RIVAS M, CUEVAS M, VAN WIJNGAARDEN M & AALBERSE RC (1995) Pollen-related allergy to peach and apple: an important role for profilin; *J Allergy Clin Immunol* **95**: 726-734
- VAN REE R, AKKERDAAS JH, VAN LEEUWEN WA, VOITENKO V, VAN LEEUWEN WA, FERNANDEZ-RIVAS M, ASERO R, KNUL-BRETTLOVA V, KNULST A & AALBERSE RC (2000) New perspectives for the diagnosis of food allergy; *ACI Int* **12**: 7-12
- VANEK-KREBITZ M, HOFFMANN-SOMMERGRUBER K, LAIMER DE CAMARA MACHADO M, SUSANI M, EBNER C, KRAFT D, SCHEINER O & BREITENEDER H [1995] Cloning and Sequencing of Mal d 1, the major allergen from apple (*Malus domestica*) and its immunological relationship to Bet v 1, the major birch pollen allergen, *Biochem Biophys Res Commun* **211**: 538-551
- VIELUF D, BEIL D, BEAUREGARD K, VIELUF I, KINDER H, BEHRENDT H, STEINHART H & RING J (1997) Xenobiotics and food allergy: in vivo and in vitro studies in patients with apple allergy;. *Int Arch Allergy Immunol* **113**: 352-54
- VIETHS S, SCHÖNING B, BROCKMANN S & AULEPP H (1992a) Untersuchungen zur Allergie gegen Lebensmittel pflanzlicher Herkunft: Herstellung und Charakterisierung von Obst- und Gemüseextrakten für serologische Untersuchungen; *Dtsch Lebensm Rundsch* **88**: 239-43 & 273-78
- VIETHS S, SCHÖNING B & BALTES W (1992b) Allergy to fruits and vegetables in pollen-sensitive patients: Allergen characterization by IgE immunoblotting and peroxidase staining; *Food Agric Immunol* **4**: 181-197
- VIETHS S, BROCKMANN S & SCHÖNING B (1992c) Nahrungsmittelallergie gegen Obst und Gemüse: Eine aktuelle serologische Untersuchung zur Sensibilisierung von Pollenallergikern; *Allergologie* **15**: 367-379
- VIETHS S, SCHÖNING B, AULEPP H & BALTES W (1993a) Identifizierung kreuzreagierender Allergene in Pollen und pflanzlichen Lebensmitteln; *Lebensmittelchemie* **47**: 49-53
- VIETHS S, SCHÖNING B & JANKIEWICZ A (1993b) Occurrence of IgE binding allergens during ripening of apple fruits. *Food Agric Immunol* **5** 93-105
- VIETHS S, JANKIEWICZ A, SCHÖNING B & AULEPP H (1994a) Apple allergy: the IgE-binding potency of apple strains is related to the occurrence of the 18 kDa allergen; *Allergy* **49**: 262-271
- VIETHS S, MAYER M & BAUMGARD M (1994b) Food allergy: specific binding of IgE-Antibodies from plant food sensitized individuals to carbohydrate epitopes; *Food Agri Immunol* **6**: 453-463
- VIETHS S, JANKIEWICZ A, WÜTHRICH B & BALTES W (1995a) Immunoblot study of the IgE binding allergens in celery; *Ann Allergy Asthma Immunol* **75**: 48-55
- VIETHS S, JANCK K, AULEPP H & PETERSEN A (1995b) Isolation and characterization of the 18 kDa major apple allergen and comparison with the major birch pollen allergen (Bet v 1); *Allergy* **50**: 421-430

- VIETHS S, JANKIEWICZ A, SCHOENING B & HAUSTEIN D (1996a) Profilin - Ubiquitäre Proteine mit spezifischer physiologischer Funktion und potente Pflanzenallergene. Teil 1: Regulation der Aktinpolymerisation; *Allergo J* **5**: 89-98
- VIETHS S, JANKIEWICZ A, SCHOENING B & HAUSTEIN D (1996b) Profilin - Ubiquitäre Proteine mit spezifischer physiologischer Funktion und potente Pflanzenallergene. Teil 2: Signaltransduktion, Molekülstruktur und Allergenität; *Allergo J* **5**: 157-172
- VIETHS S, KRUGER S & SCHÖNING B (1996c) Methodologie zur Erfassung von Kreuzsensibilisierung gegen Gemüse bei Pollenallergikern; in: Wüthrich B; Nahrungsmittel und Allergie; *Dustri-Verlag-München* 65-89
- VIETHS S, AULEPP H, BECKER WM & BUSCHMANN L (1996d) Characterization of labile and stable allergens in foods of plant origin; in: EISENBRAND G, AULEPP H, DAYAN AD, ELIAS PS, GRUNOW W, RING J, SCHLATTER J Food allergies and intolerances; *Verlag Chemie - Weinheim* 130-148
- VIETHS S, REINDL J, MÜLLER U, HOFFMANN A & HAUSTEIN D (1999) Digestibility of peanut and hazelnut allergens investigated by a simple in vitro procedure; *Eur Food Res Technol* **20**: 379-388
- VINSON VK, ARCHER SJ; LATTMANN EE, POLLARD TD & TORCHIA DA (1994) Three-dimensional solution structure of Acanthamoeba profilin I; *J Cell Biol* **122**: 1277-1283
- VON PIRQUET C (1906) Allergie; *Münch Med Wschr* **30**:1457-1458
- WAFFENSCHMIDT S & JAENICKE L (1991) Glycoproteine und Pflanzen-Zellkommunikation; *Chemie in unserer Zeit* **25**: 29-43
- WAHL R, LAU S, MAASCH HJ & WAHN U (1990) IgE-mediated reactions to potatoes; *Int Arch Allergy Appl Immunol* **92**: 168-174
- WAHN U (2000) What drives the allergenic march?; *Allergy* **55**: 591-599
- WARD LD, REID GE, MORITZ RL & SIMPSON RJ (1990) Strategies for internal amino acid sequence analysis of proteins separated by polyacrylamide gel electrophoresis; *J Chromatogr* **519**: 199-216
- WIGOTZKI M, STEINHART H & PASCHKE A (2000) Influence of varieties, storage and heat treatment on IgE-binding proteins in hazelnuts (*Corylus avellana*); *Food Agric Immunol* **12**: 217-219
- WILSON IBH & ALTMANN F (1998) Structural analysis of N-glycans from allergenic grass, ragweed and tree pollens: core $\alpha(1,3)$ -fucose and xylose present in all pollens examined; *Glycoconj J* **15**: 1055-1570
- WORLD HEALTH ORGANISATION (WHO)/IUIS allergen list: <http://www.allergen.org>
- WÜTHRICH B, STÄGER J & JOHANSSON SGO (1990) Celery allergy associated with birch and mugwort pollinosis; *Allergy* **45**: 566-571
- WÜTHRICH B (1993) Zur Nahrungsmittelallergie: Häufigkeit der Symptome und der allergieauslösenden Nahrungsmittel bei 402 Patienten; *Allergologie* **16**: 280-287
- WÜTHRICH B & SCHMID-GRENDELMEIER P (1995) Nahrungsmittelallergien; *Internist*; **36**: 1052-1062
- WÜTHRICH B (1996) Diagnostik-Häufigkeit der Symptome und der allergieauslösenden Nahrungsmittel bei Erwachsenen; in: WÜTHRICH B (ed.) Nahrungsmittel und Allergie; *Düstri-Verlag – München*

- YAGAMI T, HAISHIMA Y, NAKAMURA A, OSUNA H & IKEZAWA Z (2000) Digestibility of allergens extracted from natural rubber latex and vegetable foods; *J Allergy Clin Immunol*; **106**: 752-762
- YAMADA K, URISU A, KAKAMI M, KOYAMA H, TOKUDA R, WADA E, KONDO Y, ANDO H, MOTITA Y & TORRI S (2000) IgE-binding activity to enzyme-digested ovomucoid distinguishes between patients with contact urticaria to egg with and without overt symptoms on ingestion; *Allergy* **55**: 565-569
- YOUNG E, STONEHAM MD, PETRUCKEVITCH A, BARTON J & RONA R (1994) A population study of intolerances; *Lancet* **343**: 1127-30
- YUNGINGER JW (1991) Food antigens; in: C RA; Food allergy; *Blackwell-Oxford* 36-51
- ZELENY R, ALTMANN F & PRAZNIK W (1999) Structural characterisation of the N-linked oligosaccharide from tomato fruit; *Phytochemistry* **51**: 199-210
- ZUNKER K (2001) Untersuchungen zur Allergenität der Mango und der Litchi; Dissertation Universität Hamburg

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Silke Schubert
Geburtsdatum: 07. Februar.1973
Geburtsort: Hamburg
Familienstand: ledig

Ausbildung

Schulbildung:	1979 - 1983:	Grundschule Eduardstraße; Hamburg
	1983 - 1987:	Helene - Lange - Gymnasium; Hamburg
	1987 - 1992:	Bismarck Gymnasium; Hamburg
	1992	Abschluß: Allgemeine Hochschulreife
Berufsbildung:	1992 - 1995:	Ausbildung zum Chemielaboranten; Universität Hamburg; Fachbereich Chemie
	1995	Abschluß: staatlich anerkannte Chemielaborantin
Studium:	1995 - 2000	Studium der Lebensmittelchemie; Universität Hamburg
	2000	Abschluß: Erste Lebensmittelchemische Staatsprüfung; Diplom in Lebensmittelchemie
Promotion:	2000 -2003	Themengebiet: „Lebensmittelallergien“; Universität Hamburg

Berufstätigkeit

Arbeitsverhältnis:	2000 - 2002	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Bio- und Lebensmittelchemie; Universität Hamburg
	2002 - 2003	praktisches halbes Jahr im Rahmen der Zweiten Lebensmittelchemischen Staatsprüfung am Institut für Hygiene und Umwelt

Vorträge, Poster & Publikationen

S. SCHUBERT, H. STEINHART & A. PASCHKE

„Veränderung der Allergenität von Kartoffeln im Verlauf der Kartoffelflockenherstellung“

Vortrag - Arbeitstagung des Regionalverbandes Nord der GDCh, Fachgruppe Lebensmittelchemie in Hannover, April 2001

S. SCHUBERT, H. STEINHART & A. PASCHKE

„Die Allergenität von Kartoffeln in Abhängigkeit von der Sorte“

Poster - Deutscher Lebensmittelchemikertag der GDCh in Braunschweig; September 2001

S. SCHUBERT, H. STEINHART & A. PASCHKE

„Isolierung und Charakterisierung eines Tomatenallergens“

Vortrag - Deutscher Lebensmittelchemikertag der GDCh in Braunschweig; Frankfurt 2002

M. WIGOTZKI, S. SCHUBERT, H. STEINHART & A. PASCHKE (2000) Effects of in vitro Digestion on the IgE-binding Activity of Proteins from Haselnuts (*Corylus avellana*); *Internet Symposium on Food Allergens* **2**: 1-8

S. SCHUBERT, H. STEINHART & A. PASCHKE (2003) The influence of different potato (*solanum tuberosum*) strains and technological processing on allergenicity; *Food and Agriculture Immunology* **15**: 41-53

S. SCHUBERT, H. STEINHART & A. PASCHKE (submitted) Allergenicity of six varieties of tomato (*Lycopersicon lycoperscum*) and the expression of allergens in different fragments of the fruit

S. SCHUBERT, H. STEINHART & A. PASCHKE (submitted) Purification and characterisation of tomatoallergens

S. SCHUBERT, H. STEINHART & A. PASCHKE (submitted) Influence of a simple in-vitro digestion on the allergenicity of tomato
