

Charakterisierung von Allergenen der Litchi

Dissertation

zum Erlangen des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg

aus dem
Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie,
Abteilung Lebensmittelchemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Sonja Hoppe
aus Hamburg

Hamburg 2006

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2001 bis Oktober 2004 unter der Anleitung von Prof. Dr. Dr. Steinhart am Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung Lebensmittelchemie der Universität Hamburg angefertigt.

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

Begutachtende der Disputation:

Prof. Dr. Dr. H. Steinhart

Prof. Dr. E. Stahl-Biskup

Dr. M. Körs

Tag der Disputation: 26.6.2006

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Dr. H. Steinhart und Frau Dr. A. Paschke möchte ich für die Überlassung des Themas und die Betreuung danken.

Herrn Prof. Dr. B. Bisping danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Ein besonderer Dank geht an Iris Kellermeyer, Olga Riabova, Agnes Scudlo und Denise Hahn, die tatkräftig am Gelingen der Arbeit mitgewirkt haben.

Bei Herrn Dr. Weißbecher und den Mitarbeitern der Dermatologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf möchte ich mich für die Kooperation bei der Rekrutierung der Patienten bedanken.

Danken möchte ich auch den Patienten, die ihr Blut gespendet haben und somit die Durchführung der Untersuchungen ermöglichten.

Weiterhin danke ich den Mitarbeitern des Instituts für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, den Mitarbeitern des GKSS Forschungszentrums Geesthacht, den Mitarbeitern des Instituts für Organische Chemie der Universität Hamburg sowie Herrn Dr. H. D. Kratzin und den Mitarbeitern der Abteilung Molekulare Neurobiologie des Max-Planck-Instituts für Experimentelle Medizin in Göttingen für ihre Unterstützung.

Außerdem möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe Allergie für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Nicht zuletzt möchte ich all denen danken, die stets an mich geglaubt und mich unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Problemstellung und Arbeitsplan	2
1.2. Grundlagen der allergischen Reaktion	3
1.2.1. Begriffsbestimmungen	3
1.2.2. Immunologische Reaktionen	5
1.2.2.1. Mechanismus der Typ I-Reaktion	6
1.3. Lebensmittelallergien	8
2. Material	10
2.1. Patientenseren	10
2.2. Litchi	10
3. Methoden	12
3.1. Methodenübersicht	12
3.2. Proteinextraktion	13
3.3. Bestimmung des Proteingehaltes	14
3.4. EAST	14
3.5. Elektrophorese	14
3.5.1. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	15
3.5.2. Isoelektrische Fokussierung (IEF)	15
3.5.3. Zweidimensionale-Elektrophorese	16
3.6. Dot Blot	16
3.7. Semidry Blotting	16
3.8. Immunoblot (IB)	17
3.9. Immunoblot-Inhibition	18
3.10. Profilin-Blot	19
3.11. Nachweis von Glycoproteinen	19
3.11.1. Nachweis von Glycoproteinen durch Periodatspaltung	19
3.11.2. Nachweis von Glycoproteinen mit Lectinen	20
3.12. Unspezifische Färbungen	20
3.13. Methoden zur Allergenisolierung	21
3.13.1. Ammoniumsulfatfällung	21
3.13.2. Gelpermeationschromatographie (GPC)	21
3.13.3. Affinitätschromatographie (AC)	22

3.13.4.	Ionenaustauschchromatographie (IEC)	22
3.13.5.	Umkehrphasenchromatographie (RPC)	23
3.14.	Entsalzen von Protein- und Peptidextrakten	23
3.15.	Methoden zur Identifizierung der Allergene	23
3.15.1.	N-terminale Sequenzierung	23
3.15.2.	Verdau im Gel	24
3.15.3.	MALDI-TOF	25
3.15.4.	MALDI-TOF/TOF	25
4.	Ergebnisse	26
4.1.	Proteinextraktion	26
4.2.	Charakterisierung des Allergenspektrums mittels SDS-PAGE/IB	28
4.3.	Charakterisierung des Allergenspektrums mittels IEF/IB	30
4.4.	Charakterisierung des Allergenspektrums mittels 2D-Elektrophorese/IB	31
4.5.	Nachweis von Glycoproteinen	34
4.6.	Profilinnachweis	36
4.7.	Isolierung von Litchiallergenen	37
4.7.1.	Ammoniumsulfatfällung	37
4.7.2.	GPC	38
4.7.3.	IEC	42
4.7.3.1.	Anionenaustauschchromatographie	42
4.7.3.2.	Kationenaustauschchromatographie	47
4.7.3.3.	AC / IEC	49
4.7.3.4.	RPC / IEC	51
4.8.	Identifizierung von Allergenen	52
4.8.1.	N-terminale Sequenzierung	53
4.8.2.	Bestimmung des PMF mittels MALDI-TOF	54
4.8.3.	MALDI-TOF/TOF	56
4.9.	In-vitro Verdauung	57
5.	Diskussion	64
5.1.	Charakterisierung von Allergenen	64
5.2.	Isolierung von Allergenen	67
5.3.	Identifizierung von Allergenen	70
5.4.	In-vitro Verdauung von Allergenen	73
6.	Zusammenfassung / Summary	80

7. Anhang	84
7.1. Gewinnung der Patientenseren	84
7.2. Untersuchungsmaterial	84
7.3. Proteinextraktion aus Früchten	84
7.3.1. Tieftemperaturextraktion	84
7.3.2. Extraktion nach BJÖRKSTEN et al. (1980)	85
7.4. Proteinbestimmung	86
7.5. EAST	86
7.5.1. Bromcyanaktivierung der Scheiben	86
7.5.2. Entsorgung der Bromcyananfalle	87
7.5.3. Kopplung der Extrakte an die Scheiben	88
7.5.4. EAST-Bestimmung	89
7.6. Elektrophorese	90
7.6.1. SDS-PAGE	90
7.6.2. IEF	93
7.6.3. 2D-Elektrophorese	94
7.7. Dot Blot	95
7.8. Semidry Blot	96
7.8.1. Semidry Blot auf NC-Membranen	96
7.8.2. Semidry Blot auf PVDF-Membranen	97
7.9. Immunfärbung	98
7.10. Immunoblot-Inhibition	99
7.11. Profilinblot	100
7.12. Unspezifische Färbung von Proteinen im Gel	100
7.12.1. Silberfärbung	100
7.12.2. Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung	101
7.13. Unspezifische Färbung von Proteinen auf Membranen	101
7.13.1. Ponceau-Färbung auf NC-Membranen	101
7.13.2. Kolloidale Goldfärbung	102
7.13.3. Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung auf PVDF Membranen	102
7.14. Nachweis von Glycoproteinen	103
7.14.1. Periodsäure-Schiffsche-Färbung	103
7.14.2. Periodatspaltung	103
7.14.3. Lectinblot	104
7.15. Methoden zur Allergenisolierung	105

7.15.1.	Ammoniumsulfatfällung	105
7.15.2.	GPC	105
7.15.3.	AC	106
7.15.4.	IEC	106
7.15.4.1.	Anionenaustauschchromatographie	106
7.15.4.2.	Kationenaustauschchromatographie	108
7.15.5.	RPC	108
7.16.	Verdau im Gel	109
7.17.	Entsalzen	110
7.17.1.	Entsalzen von Proteinlösungen	110
7.17.2.	Entsalzen von Peptidlösungen	110
7.18.	N-terminale Sequenzierung	111
7.19.	MALDI-TOF und MALDI-TOF/TOF-Messungen	111
7.20.	Charakterisierung der Patientenserum	112
7.21.	Chemikalien, Geräte, Verbrauchsmaterial und Zubehör	114
7.21.1.	Chemikalien	114
7.21.2.	Geräte	117
7.21.3.	Verbrauchsmaterial	118
8.	Literaturverzeichnis	119

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AC	Affinitätschromatographie
APA	<i>Abrus precatorius</i> Agglutinin, Lectin
bidest.	bidestilliert
Bis-Tris-HCl	Bis-(2-hydroxyethyl-)imino-tris-(hydroxymethyl-)methan-HCl
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
CA	Concanavalin A, Lectin
CAPS	(3-Cyclohexyl-amino-)-1-propansulfonsäure
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CCD	Kreuzreagierende Kohlenhydratdeterminanten (crossreacting carbohydrate determinates)
CF	Coomassie Brilliant Blue-Färbung
DONS	Dioclylnatriumsulfosuccinat
DTT	Dithiothreitol
EACA	6-Aminohexansäure
EAST	Enzymallergosorbent-Test
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
GF	Goldfärbung
GPC	Gelpermeationschromatographie
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
IB	Immunoblot
IEC	Ionenaustauschchromatographie
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IF	Immunfärbung
K	Kontrolle
konz.	konzentriert
Ig	Immunglobulin
Lsg.	Lösung
M	männlich
M	Marker
MALDI	matrix assisted laser desorption ionization
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MG	Molekulargewicht
MGB	Molekulargewichtsbereich

Abkürzungsverzeichnis

MHC	major-histocompatibility complex
Min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
NC	Nitrocellulose
O	Ovalbumin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PF	Ponceau Färbung
PHT	Phenylthiohydantoin
pI	Isoelektrischer Punkt
PMF	Peptide Mass Fingerprint
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
RAST	Radioallergosorbent-Test
RPC	Umkehrphasenchromatographie (reversed phase chromatography)
RT	Raumtemperatur
SchF	Schiffsche Färbung
SDS	Natriumlaurylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SF	Silberfärbung
Tab.	Tabelle
TFA	Trifluoressigsäure
TMB	Tetramethylbenzidin
TOF	time of flight
TPA	<i>Tetragonolobus purpureas</i> Agglutinin, Lectin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)methan
TTBS	Tween-Trisgepufferte Kochsalzlösung (tween-tris buffered saline)
UV	Ultraviolett
W	weiblich
WGA	Lectin Wheat Germ Agglutinin, Lectin
2D	zweidimensional

1. Einleitung

Der Begriff Allergie bezeichnet eine spezifische Änderung der immunologischen Reaktionslage im Sinne einer krankmachenden Überempfindlichkeit (RING, 1988).

Bei einer Lebensmittelallergie handelt es sich um eine individuelle Erkrankung des Organismus, die sich in einer Vielzahl von klinischen Symptomen äußert. Am häufigsten sind Haut, Respirationstrakt, Gastrointestinaltrakt und das Herz-Kreislaufsystem betroffen (SAMPSON 1992a).

Verschiedene epidemiologische Studien deuten auf die Zunahme von allergischen Erkrankungen in den letzten Jahren hin (AULEPP und VIETHS, 1992; ANDRE et al., 1994, MAZIAK et al. 2003). Die Angaben über den Anteil der Bevölkerung, der an einer Lebensmittelallergie leidet, wird aber je nach Studie unterschiedlich eingeschätzt. Sie reichen von 1 % (HELBING, 1994), 2 % (BRUIJNZEEL-KOOMEN et al., 1995) und 1 – 5 % (VIETHS et al. 1994a) bis zu 7 – 10 % (REICH, 1993). SAMPSON (1992b) berichtet, dass 5 % der Kinder und 2 % der Erwachsenen an einer Lebensmittelallergie leiden. Diese uneinheitlichen Schätzungen beruhen auf der oft ungenauen Abgrenzung der Lebensmittelallergie gegenüber Lebensmittelintoleranzreaktionen (RING, 1988; REICH; 1993).

Lebensmittelallergene können sowohl tierischen als auch pflanzlichen Ursprungs sein, wobei die Allergien durch unverarbeitete Lebensmittel, deren Bestandteile und durch Stoffwechselmetaboliten ausgelöst werden (THIEL, 1991). Allergene sind Proteine oder Glycoproteine (AULEPP und VIETHS, 1992), die laut VIETHS et al. (1993) ein Molekulargewicht (MG) zwischen 10 und 70 kDa besitzen.

1.1. Problemstellung und Arbeitsplan

Lebensmittelallergien verlaufen überwiegend als Immunglobulin (Ig) E vermittelte Soforttyp-Reaktionen vom Typ I und können von vielen tierischen und pflanzlichen Lebensmitteln hervorgerufen werden. Zu nennen sind z.B. Milch, Eier, Nüsse, Soja, Erbsen, Kartoffeln und exotische Früchte wie Banane, Kiwi, Mango oder Litchi. Die Bedeutung von exotischen Früchten hinsichtlich der Ernährung der Europäer ist in den letzten Jahren aufgrund verbesserter Transportmöglichkeiten gestiegen.

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Allergenität vom Typ I der Litchi (*Litchi chinensis* SONN.). Sie gehört wie Longan und Rambutan zur Familie der *Sapindaceae* und stammt aus Südchina.

Um eine verbesserte Diagnostik und Therapie von Lebensmittelallergien sowie eine Verminderung des allergenen Potenzials mit lebensmittel- bzw. gentechnologischen Methoden herbeiführen zu können, ist es erforderlich, Allergene zu identifizieren, die Allergenstruktur aufzuklären und ihre Stabilität zu bewerten.

Bei der Untersuchung von Lebensmittelallergenen wie in diesem Fall bei Litchiallergenen ist zuerst das gesamte Allergenspektrum zu untersuchen. Weiter müssen einzelne Allergene isoliert und identifiziert werden. Studien dieser Art erfolgten u.a. hinsichtlich Weizen (SANDER et al. 2001), am Hauptallergen des Apfels (VIETHS et al. 1995a; HSIEH et al. 1995) und der Kiwi (MÖLLER et al. 1997; PASTORELLO et al. 1998). Anhand der erhaltenen Strukturinformationen können Aussagen über die biologische Funktion der Proteine gemacht werden. Neben der Identifizierung von Allergenen wird des Weiteren ihre Stabilität gegenüber Enzymen des menschlichen Magen-Darmtraktes untersucht.

Grundlage für diese in-vitro Verdauungsversuche ist die Tatsache, dass die Stabilität der Epitope gegenüber den verwendeten Verdauungsenzymen in-vivo sowohl für die Sensibilisierungsphase des Immunsystems als auch für die Auslösung der Symptome einer Lebensallergie von großer Bedeutung ist (VIETHS et al., 1999). Für diese Studie werden nicht die Gesamtheit der Proteine, sondern einzelne Allergene eingesetzt, um gezielt verfolgen zu können, ob nach einer in-vitro Verdauung Proteinfragmente entstehen, die intakte Epitope beinhalten. Ähnliche Stabilitätsstudien an Lebensmittelallergenen wurden von ASTWOOD et al. (1996) und ODANI et al. (1997) vorgenommen.

Im Rahmen dieser Arbeit werden elektrophoretische Methoden wie Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Isoelektrische Fokussierung, 2-dimensionale Elektrophorese und immunologische Methoden wie Enzymallergosorbent-Test (EAST) und Immunfärbung zur Charakterisierung der Allergene bzw. der Patientenserum eingesetzt. Außerdem werden Allergene chromatographisch und elektrophoretisch insofern aufgearbeitet, dass sie mittels N-terminaler Sequenzierung, MALDI-TOF oder MALDI-TOF/TOF identifiziert werden können. Darüber hinaus erfolgt eine Stabilitätsuntersuchung isolierter Allergene gegenüber einer in-vitro Verdauung, die,

entsprechend dem menschlichen Magen-Darmtrakt, in zwei Phasen, d.h. unter simulierten Magen- und Darmbedingungen, erfolgt.

1.2. Grundlagen der allergischen Reaktion

1.2.1. Begriffsbestimmungen

Die erste Definition des Begriffes Allergie als „spezifisch veränderte Reaktionsfähigkeit des Organismus“ stammt von VON PIRQUET (1906). Nach RING (1988) ist eine Allergie eine spezifische Änderung der immunologischen Reaktionslage im Sinne einer krankmachenden Überempfindlichkeit.

Antigene sind Substanzen, die nach ihrem Eindringen in einen Organismus entweder über die Aktivierung von B-Lymphozyten die Produktion spezifischer Antikörper oder durch die Aktivierung von T-Lymphozyten eine spezifische Immunantwort auslösen. Die Antigen-Antikörper-Reaktion ist hochspezifisch. Als Allergene werden Antigene bezeichnet, die bei einem sensibilisierten Organismus eine allergische Reaktion hervorrufen. Allergene sind Proteine oder Glycoproteine. Die Angaben über MG von Allergenen schwanken stark. So geben AULEPP und VIETHS (1992) ein minimales MG von 4 kDa an und berichten von Allergenen mit MG von mehr als 100 kDa. Nach SAMPSON (1991) und TAYLOR et al. (1987) besitzen Allergene ein MG von 15 bis 60 kDa und nach VIETHS et al. (1993) liegt das MG zwischen 10 und 70 kDa.

Vielen Allergenen wird eine Resistenz gegenüber Enzymen und Säureeinwirkung zugeschrieben, so dass sie die intestinale Mucosa des Menschen in immunogener Form erreichen. Möglich ist auch die Spaltung des Moleküls unter Bildung epitoptragender Fragmente, die eine allergische Reaktion auslösen können. Außerdem muss ein Allergen von der Darmschleimhaut absorbiert werden. Dies ist vermutlich bei einem MG >70 kDa nicht möglich. Das MG eines Allergens ist aus diesem Grunde begrenzt (TAYLOR et al., 1987).

Allergene müssen aber eine Mindestgröße von ca. 10 kDa besitzen, um allergische Reaktionen auslösen zu können, d.h. die Antikörperproduktion anregen zu können.

Peptide mit MG kleiner 1 kDa sind nach Bindung an ein anderes Protein als Trägermolekül in der Lage, allergen zu wirken und werden als Haptene bezeichnet (AULEPP und VIETHS, 1992).

Isoallergene sind Allergene mit der gleichen biologischen Funktion und einer Sequenzhomologie von mindestens 67 % (KING und THOMAS, 1994).

In der Regel enthält ein Lebensmittel mehrere Allergene, die entsprechend ihrer Bedeutung in Haupt- und Nebenallergene eingeteilt werden. Ein Hauptallergen bindet IgE-Antikörper von mindestens 50 % der Seren eines Kollektivs aus mehr als 50 Atopikern. Alle anderen Allergene werden als Nebenallergene bezeichnet (DREBORG et al., 1994). Mit dem Begriff Epitop oder Determinante wird der Bereich eines Allergens bezeichnet, an dem ein Antikörper bindet. Allergene können mehrere Epitope tragen (GALLIN et al., 1987; GLICK und PASTERNAK, 1995). Sie werden in Sequenz- und Konformationsepitope unterschieden, wobei Sequenzepitope von der Aminosäuresequenz abhängen und Konformationsepitope auf der Sekundär- bzw. Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine basieren (AULEPP und VIETHS, 1992).

Die Reaktion eines Antikörpers mit strukturell ähnlichen Epitopen verschiedener Allergene stellt das Phänomen der Kreuzreaktion dar (AULEPP und VIETHS, 1992).

Antikörper, auch als Ig bezeichnet, sind Substanzen, die von B-Lymphozyten gebildet werden und spezifisch an die entsprechenden Antigene binden.

Bei Antigenen handelt es sich hauptsächlich um Proteine, aber auch Glycoproteine und Polysaccharide spielen eine Rolle (AULEPP und VIETHS, 1992).

Der Mensch besitzt fünf verschiedene Ig-Klassen, nämlich IgG, IgA, IgM, IgD und IgE, die sich hinsichtlich Größe, elektrischer Ladung, Aminosäurezusammensetzung und Kohlenhydratanteil unterscheiden.

Ig bestehen aus zwei identischen leichten und schweren Polypeptidketten, die durch Disulfidbrücken verbunden sind (s. Abb. 1-1).

Ihre jeweilige Spezifität basiert auf einer unterschiedlichen Sequenz der antigenbindenden Bereiche. Außerdem gibt es eine für jede Ig-Klasse konstante Region mit gleicher Aminosäuresequenz, die die Funktionalität des Antikörpers festlegt (KLEIN, 1991; ROITT, 1993; JANEWAY, 1993).

Die Funktionen der einzelnen Ig-Klassen sind sehr unterschiedlich. So werden durch Anlagerung von IgG an Zellen Angriffe von phagozytierenden Zellen gegen diese Zellen möglich. IgM dagegen kann Antigene binden und agglutinieren. IgA ist an der Abwehr von Bakterien und Viren in den Schleimhäuten beteiligt. Die genaue Funktion des IgD ist nicht bekannt. IgE dienen zum einen der Abwehr gegen Wurmparasiten, zum anderen sind sie an der allergischen Typ-I-Reaktion beteiligt (KREFT et al., 1995).

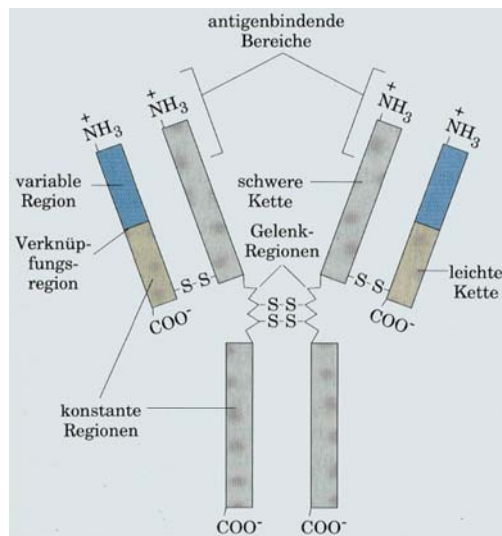


Abb. 1-1: Aufbau eines Ig-Antikörpers (KREFT et al., 1995)

1.2.2. Immunologische Reaktionen

Immunologische Überempfindlichkeitsreaktionen zeigen verschiedene Formen der Manifestation. Nach COOMBS und GELL (1963) können die allergischen Reaktionen vereinfacht in vier Typen eingeteilt werden.

Bei allergischen Reaktionen vom Typ I (Sofort-Typ) führt die Sensibilisierung des Organismus gegen die jeweiligen Allergene zur Bildung von IgE. Diese binden über einen Rezeptor an basophile Granulozyten oder Mastzellen. Nach wiederholtem Kontakt mit dem Allergen kommt es zu einer Kreuzvernetzung der IgE-Antikörper, Degranulation der Mastzellen und Freisetzung von Mediatoren, die zu den Symptomen einer Allergie führen (s. 3.2.1).

Bei der zellständigen zytotoxischen Allergen-Antikörper-Reaktion vom Typ II bindet das Antigen an die Oberfläche körpereigener Zellen. IgG- oder IgM-Antikörper lösen eine Immunreaktion gegen die körpereigenen Zellen aus und es kommt zur zytotoxischen Aktion von K- Zellen oder zur komplementvermittelten Lyse der Zellen.

Bei Immunkomplexreaktionen vom Typ III bilden IgG- oder IgM-Antikörper mit Antigenen Immunkomplexe, die das Komplementsystem aktivieren. Folge können persistierende Infektionen, autoimmune Immunkomplexerkrankungen oder lokale Schädigungen sein.

Die Typ IV-Reaktion ist eine zellvermittelte Immunreaktion oder verzögerte Überempfindlichkeit. Dabei kommt es zur Ausbildung von immunreaktiven Lymphozyten.

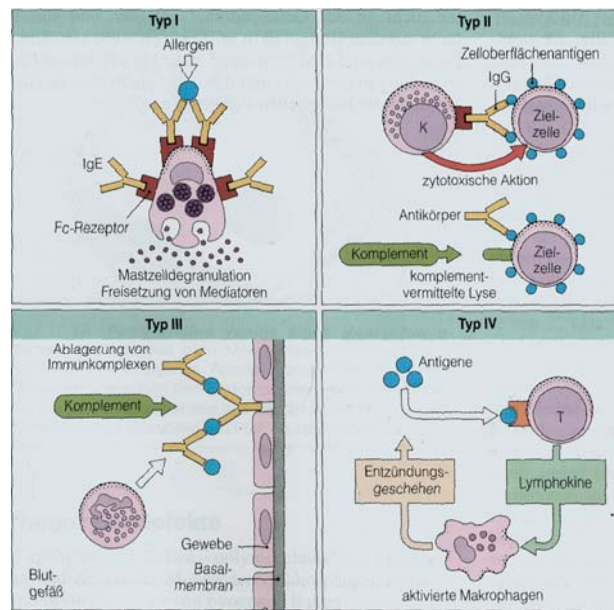


Abb. 1-2: Typen der Überempfindlichkeitsreaktionen (ROITT et al. 1995)

Toxische Reaktionen sind von Überempfindlichkeitsreaktionen, zu denen auch die Lebensmittelallergie (immunologische Überempfindlichkeitsreaktion) zählt, abzugrenzen. Andere nicht-immunologische Überempfindlichkeitsreaktionen wie Intoleranzen (z.B. Lactoseintoleranz, Enzymopathie) und sogenannte Pseudoallergien imitieren das Bild einer allergischen Erkrankung (RING et al., 2001). Bei pseudoallergischen Reaktionen liegen keine immunologischen Reaktionen zu Grunde und trotzdem zeigt sich das klinische Bild einer Lebensmittelallergie. Diese Reaktionen sind dosisabhängig und treten bereits bei der ersten Exposition auf (REICH, 1993).

Enzymopathien sind Enzymdefekte, die sich durch eine verminderte oder gesteigerte Enzymaktivität äußern (BRUIJNZEEL-KOOMEN et al., 1995).

Die klinischen Symptome einer toxischen Reaktion sind denen einer Lebensmittelallergie sehr ähnlich, werden aber durch Substanzen mit pharmakologischer Wirkung oder toxische Substanzen ausgelöst (WÜTHRICH, 1996).

1.2.2.1. Mechanismus der Typ I-Reaktion

Bei den meisten Lebensmittelallergien liegt der Pathomechanismus der Überempfindlichkeit vom Soforttyp zu Grunde (KREFT, 1995). Nach SPREITZER (1996) verlaufen 90 % der Lebensmittelallergien nach diesem Mechanismus. Vor dem ersten Auftreten klinischer Symptome erfährt der Organismus eine Sensibilisierung gegen das jeweilige Antigen.

1.2.2.1.1. Sensibilisierung

Beim ersten Kontakt des Organismus mit dem Antigen treten keine klinischen Symptome auf. Während der Sensibilisierungsphase gelangt das Allergen in den Organismus, um dort von antigenpräsentierenden Zellen, den Makrophagen, aufgenommen und enzymatisch abgebaut zu werden. Allergenfragmente werden zusammen mit MHC (major-histocompatibility complex)-Klasse-Molekülen auf der Oberfläche der Zelle präsentiert. Werden sie von T-Lymphozyten erkannt, schütten diese Lymphokine aus und regen so bereits an das Allergen gebundene B-Lymphozyten an, zu Plasmazellen heranzureifen und Antikörper zu produzieren. Die Bildung von IgE kann über Monate anhalten. Sie binden aufgrund ihrer Molekülstruktur an IgE-Rezeptoren von Mastzellen und basophilen Granulozyten (ESSER, 1990; BLASER, 1993; LICHTENSTEIN, 1993; ENGELHART, 1994; JANEWAY et al., 2002).

1.2.2.1.2. Freisetzung von Mediatoren

Bei erneutem Kontakt des sensibilisierten Organismus mit dem Antigen treten in kurzer Zeit klinische Symptome auf. Das Allergen bindet an IgE, die entweder frei im Blut oder an Mastzellen oder basophilen Granulozyten gebunden vorliegen.

Durch Bindung eines Allergens an zwei zellengebundene Antikörper (bridging) resultiert in Folge einer Abstandsänderung zwischen den Antikörpern eine Veränderung der Zelloberfläche.

Als Folge daraus werden Enzyme der Zellmembran aktiviert und eine Vielzahl chemischer Reaktionen ausgelöst, was zur Freisetzung von Mediatoren aus separierten Bereichen der Zelle (Granula), der Exocytose, führt. Mediatoren sind z.B. vasoaktive Amine wie Histamin, Serotonin und Heparin.

Im Weiteren erfolgt die Degranulation, d.h. die Granula bewegen sich zur Plasmamembran und fusionieren mit dieser, um ihren Inhalt auf der Außenseite der Zelle zu sezernieren. Außerdem werden weitere Mediatoren wie Prostaglandine und Leukotrine freigesetzt. (RING, 1988; KLEIN, 1991; ROITT, 1993; LICHTENSTEIN, 1993; HOLGATE und CHURCH, 1993;).

Die von den Mastzellen ausgeschütteten Mediatoren lösen die klinischen Symptome der Lebensmittelallergie aus. Darüber hinaus dringen sie in Blutgefäße ein und bewirken die Bildung von Adhäsionsmolekülen auf den Mediatoren und auf der inneren Zellschicht der Gefäße. Auf diese Weise haften die Immunzellen des Blutes an den Endothelzellen und gelangen mit Hilfe der Adhäsionsmoleküle in Form von diffundierenden Immunzellen in das umliegende Gewebe. Weitere Mediatoren werden ausgeschüttet und das Gewebe geschädigt. Dies äußert sich im Auftreten klinischer Symptome (KLEIN, 1991; HOLGATE und CHURCH, 1993; LICHTENSTEIN, 1993).

1.3. Lebensmittelallergien

Allergien gegen Lebensmittel äußern sich nach WÜTHRICH (1986) allgemein mit Symptomen an Haut (ca. 50 %), Gastrointestinaltrakt (ca. 20 %) und den Atemwegen (10 bis 15 %). Die klinischen Symptome reichen von Erbrechen, Bauchschmerzen, Gastroenteritis mit Diarrhoe, Urtikaria, asthmoiden Beschwerden, allergischer Rhinitis bis hin zu anaphylaktischen Schockreaktionen, die tödlich verlaufen können (BROSTOFF und CHALLACOMBE, 1987).

In der Regel treten die Symptome innerhalb kurzer Zeit nach Verzehr des Lebensmittels, in seltenen Fällen erst nach Stunden, auf (HELBING, 1994).

Lebensmittelallergien sind in bis zu 81 % der Fälle mit einer Sensibilisierung gegen Pollen assoziiert (ERIKSSON et al., 1982; AULEPP und VIETHS, 1992).

Basis dieser Reaktion sind Strukturähnlichkeiten zwischen Inhalations- und alimentären Antigenen. Sie werden von IgE gleichermaßen erkannt. Meist wird die Antikörperbildung durch inhalative Allergene induziert und die Lebensmittelallergie kann ohne Vorliegen einer Pollinose auftreten (HELBING, 1997).

Das „Sellerie-Beifuß-Karotten-Gewürz-Syndrom“ bei dem 70 % der Beifußpollenallergiker außerdem allergisch auf Sellerie, Fenchel, Karotten und verschiedene Gewürze reagieren, ist als Beispiel zu nennen (AULEPP und VIETHS, 1992).

Viele Studien beschreiben Profilin als mögliche Auslöser von Kreuzreaktionen (VALENTA et al., 1992a; VAN REE et al. 1992; EBNER, et al., 1995; PETERSEN et al., 1996; BAUER et al., 1996). Diese Substanzen sind in allen eukaryontischen Zellen enthalten und werden von VALENTA et al. (1991) als bedeutende Allergene in Pollen und pflanzlichen Lebensmitteln beschrieben. Sie weisen MG von 14-16 kDa und eine ausgeprägte Sequenzhomologie auf (VALENTA et al. 1992b).

Auch der Verzehr der exotischen Frucht Litchi kann nach MONTAG et al. (1996) zu allergischen Reaktionen führen. Sie beschreiben das Auftreten eines Erythems am Stamm mit einzelnen Urtikariae nach Verzehr frischer Litchi und weisen mittels RAST (Radioallergosorbent-Test)-Inhibition die Kreuzreaktivität der Frucht mit Beifuß-, Wegerich-, Birken- und Gräserpollen nach. GIANNATTASIO et al. (1995) berichten von einer Patientin, die nach dem Verzehr von frischen Litchis an generalisierter Urtikaria, Ödemen und Krämpfen der Bronchialmuskeln litt. Frühere Hauttests zeigten eine Sensibilisierung gegen verschiedene Gräserpollen an. LEPP et al. (1992) dokumentieren den Fall einer Patientin mit Juckreiz, Lippen- und Fingerschwellungen, Atembeschwerden und Diarrhoe, was entweder auf den Verzehr eines Litchi beinhaltenden Obstsalates oder auf Gewürze zurückzuführen ist. Die Frau zeigte nach oraler Provokation mit frischen Litchis Schocksymptome. Durch Haut- und RAST-Tests konnte bei der Patientin außerdem eine Sensibilisierung gegen Gras- und Beifußpollen, Sesam, Sellerie, Sonnenblumenkerne und verschiedene Gewürze festgestellt werden. Der Verzehr frischer Litchis kann aber auch

anaphylaktische Schockreaktionen hervorrufen (FÄH et al., 1995). In der Frucht konnte ein 16 kDa Allergen identifiziert werden, bei dem es sich um ein pflanzliches Panallergen handelt, das für die Kreuzreaktionen zwischen Litchi, verschiedenen Obst- und Gemüsesorten sowie Pollen verantwortlich zu sein scheint (VIETHS et al., 1993; FÄH et al., 1995). Das Profilin trägt die Nomenklatur Lit c 1 (FÄH et al., 1995; ALLALLERGY, 30.11.04). Die Kreuzreaktivität zwischen einem Minorallergen der Birkenpollen mit einem MG von 35 kDa und einem Litchiallergen mit vergleichbarem MG beschreiben WELLHAUSEN et al. (1996).

ZUNKER (2001) untersuchte die IgE-bindenden Proteine der Litchi mittels Immunoblot und konnte das Auftreten von Kreuzreaktionen mit Pollen und verschiedenen Obst- und Gemüsesorten belegen. Das 40 kDa Allergen zeigt eine starke Sequenzhomologie mit der Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase des weißen Senfs.

KARAMLOO et al. (2001) weisen mittels EAST-Inhibitor mit festphasengebundenem Birnenallergen Pyr c 5 die Präsenz homologer Allergenstrukturen auf Pyr c 5 und Allergenen der Litchi nach.

2. Material

2.1. Patientenserum

Die Seren, die für die allergologischen Untersuchungen eingesetzt wurden, stammen von Patienten mit einer Lebensmittelallergie vom Typ I oder einer Sensibilisierung gegen Litchi. Die Allergiker wurden in Zusammenarbeit mit der Abteilung Allergologie der Hautklinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf einbestellt. Nach Dokumentation der anamnestischen Befunde wurde den Patienten Blut abgenommen, wie unter 7.1 beschrieben das Serum gewonnen und dessen Gehalt an spezifischem IgE mittels EAST (s. Anhang 7.5) ermittelt. Die eingesetzten Patientenserum besitzen EAST-Klassen von mindestens 2 und sind im Anhang unter 7.20 dokumentiert.

Aus gleichen Volumina der Patientenserum 1 bis 21 wird ein Poolserum erstellt, das bei der Durchführung von Immunoblot und Dot Blot eingesetzt wird. Als Negativkontrolle wird das Serum einer nicht atopischen Person eingesetzt.

2.2. Litchi

Die Litchi (*Litchi chinensis* SONN.) gehört wie Longan und Rambutan zur Familie der *Sapindaceae* und stammt aus Südchina, wo sie seit 2000 Jahren genutzt wird. Angebaut wird sie heute in den trockenen Tropen der ganzen Welt, wie in Indien, Madagaskar, Südafrika, Kenia, Brasilien, Florida, Hawaii und Australien. Der 10 - 12 m hohe, mit Fiederblättern besetzte Baum trägt trugdoldige Blütenstände mit bis zu 30 weißen, fünfzähligen Blüten. Der oberständige Fruchtknoten entwickelt sich zu pflaumengroßen Nüssen mit einer dünnen, leicht zerbrechlichen, weinroten, später braunen Schale. Die Schale erscheint wie aus fünf- oder sechseckigen Feldern zusammengesetzt, jedes Feld in der Mitte mit einer kurzen zipfeligen Spitze endend. Die Schale umschließt einen von einem dicken, fleischigen weißen Arillus bedeckten, glänzend braunen, ungenießbaren Samen. Der süße Samenmantel besitzt ein an Sauerkirschen erinnerndes Aroma mit muskatartigem Beigeschmack. Die Vermehrung der Pflanze geschieht vegetativ (FRANKE, 1997).



Abb. 2-1: Litchi

Der essbare Anteil einer Litchi enthält im Mittel 81.2 % Wasser, 16.8 % Kohlenhydrate, 0.9 % Eiweiß und 0.3 % organische Säuren (Souci et al., 2000).

Litchis müssen reif geerntet werden, da sie keiner Nachreifung unterliegen und werden überwiegend roh verzehrt.

Für die Untersuchungen wurden frische Früchte vom Hamburger Großmarkt eingesetzt (siehe Anhang 7.2).

3. Methoden

3.1. Methodenübersicht

Ziel der Arbeit ist die Charakterisierung, Isolierung und Identifizierung von Allergenen der Litchi. In Abb. 2-1 sind die einzelnen Methoden und ihre Zusammenhänge schematisch dargestellt.

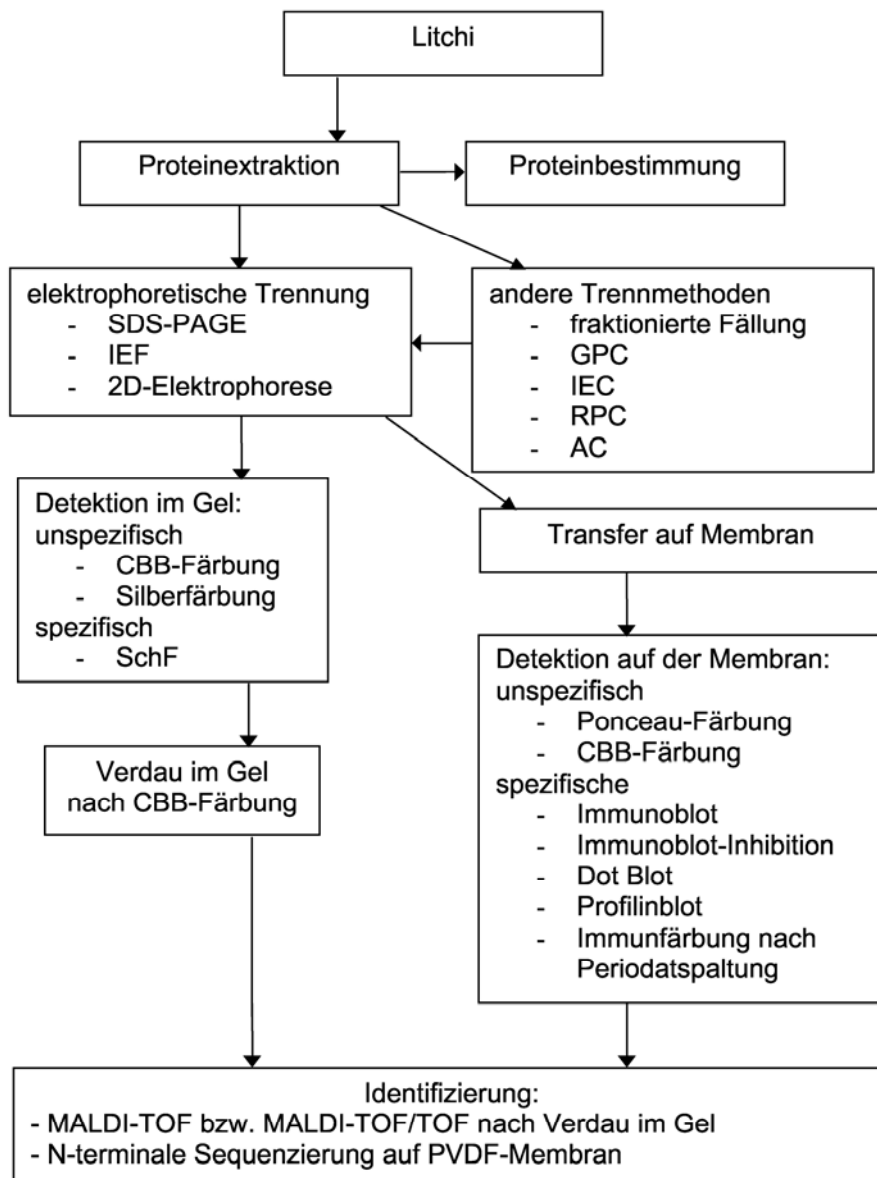


Abb. 3-1: Methodenübersicht

3.2. Proteinextraktion

Eine Voraussetzung für die Untersuchung von Lebensmittelallergenen besteht in der quantitativen und reproduzierbaren Extraktion der Proteine und Glycoproteine aus den Früchten (AAS et al. 1978). Die Extraktion von Proteinen aus pflanzlichen Lebensmitteln ist aufgrund des geringen Proteingehaltes und des Vorliegens von phenolischen Verbindungen im Ausgangsmaterial schwierig (LOOMIS, 1974).

Bei der Extraktion mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) bei 4 °C aus zerkleinertem Gewebe, wie industriell überwiegend verfahren wird, kann es zu Allergenitätsverlusten kommen. Dies ist in der Freisetzung von Phenolen in Folge der Zerstörung von Zellkompartimenten begründet, die durch Phenoloxidasen in Gegenwart von Luftsauerstoff zu Chinonen oxidieren und unter Ausbildung von kovalenten Bindungen mit den Proteinen reagieren können (MCEVILY et al., 1992; VIETHS et al. 1992c; VIELUF et al., 1997).

Da in der Litchi phenolische Verbindungen vorliegen, muss eine Extraktionsmethode gewählt werden, bei der dieses Problem berücksichtigt wird. Es wird zum einen die von CLEMENTS (1965) entwickelte und von VIETHS et al. (1992b) modifizierte Tieftemperaturextraktion und zum anderen eine Methode von BJÖRKSTEN et al. (1980) angewandt.

Proteinextraktion nach CLEMENTS (1965) und VIETHS et al. (1992b)

Bei der Tieftemperatur wird das Fruchtfleisch bei mindestens – 40 °C in Aceton homogenisiert, die Suspension filtriert, der Rückstand gewaschen und lyophilisiert. Das auf diese Weise erhaltene Acetonpulver enthält keine störenden phenolischen Verbindungen, da diese acetonlöslich sind und somit weitgehend abgetrennt werden. Außerdem sind eventuell vorhandene Enzyme bei diesen tiefen Temperaturen weitgehend inaktiv. Die Proteine werden aus dem erhaltenen Acetonpulver mit PBS oder bidest. Wasser extrahiert (s. Anhang 7.3.1).

Proteinextraktion nach BJÖRKSTEN et al. (1980)

Bei der Extraktion nach BJÖRKSTEN et al. (1980) wird durch Einsatz von Diethyldithiocarbamat und Ethylendiamintetraacetat (EDTA) über die Hemmung von Enzymaktivitäten sowie durch den Zusatz von Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP), das die phenolischen Verbindungen adsorbiert, die unerwünschte Bräunungsreaktion unterdrückt. Das zerkleinerte Ausgangsmaterial wird mit der Suspension versetzt, homogenisiert und zentrifugiert (Durchführung s. Anhang 7.3.2).

3.3. Bestimmung des Proteingehaltes

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgt photometrisch unter Verwendung von Coomassie Brilliant Blue (CBB) G 250 nach der Methode von BRADFORD (1976). Die negativ geladenen Farbstoffmoleküle lagern sich an Aminogruppen der Proteine an, wodurch ein blauer Komplex entsteht, der bei 590 nm photometrisch vermessen wird. Die Messung ist bereits zwei Minuten nach Zugabe des Farbreagenzes möglich (READ und NORTHCOLE, 1981). In der Probenlösung eventuell enthaltene Kohlenhydrate und Natriumionen stören die Messung nicht. Die quantitative Bestimmung erfolgt mit Hilfe einer Rinderserumalbumin (BSA)- Kalibriergerade. Die Nachweisgrenze beträgt 0.05 µg/ml. Die Durchführung erfolgt nach Anhang 7.4.

3.4. EAST

Bei dem EAST handelt es sich um eine enzymimmunologische Methode zur Bestimmung des Gehaltes an freiem, spezifischem IgE im Serum. Dabei liegen die Allergene an Cellulosescheiben gekoppelt vor. Zur Herstellung der Allergenscheiben werden bromcyanaktivierte Cellulosescheiben mit Allergenextrakten der nativen Litchi inkubiert, was zu einer kovalenten Bindung der Allergene an die Cellulosescheiben führt (CESKA und LUNDKVIST, 1972). Die Allergenscheiben werden mit Patientenseren inkubiert, so dass die IgE-Antikörper der Seren an die Allergene binden. Die gebundenen Antikörper werden mit alkalischer Phosphatase gelabelten Anti-IgE markiert. Nach Zugabe von p-Nitrophenylphosphat wird dieses von der alkalischen Phosphatase zu gelbem p-Nitrophenolat umgesetzt. Die Intensität der Färbung ist direkt proportional zur IgE-Menge und wird photometrisch bei 405 nm vermessen. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe von Referenzseren mit bekanntem IgE-Gehalt gegen Lieschgras. Die Seren werden entsprechend ihrem IgE-Gehalt in EAST-Klassen (0 bis 4) eingeteilt. Die Durchführung ist unter 7.5 beschrieben.

3.5. Elektrophorese

Die Elektrophorese basiert auf dem Prinzip der Wanderung geladener Moleküle im elektrischen Gleichstromfeld in Richtung der Elektrode mit der entgegengesetzten Ladung. Die Fraktionierung eines Gemisches erfolgt aufgrund unterschiedlicher Ladungen und Massen. Die Trennschärfe der Elektrophorese wird durch Wanderungsgeschwindigkeit, Pufferzusammensetzung, Temperatur, Feldstärke und Beschaffenheit des Trägermaterials beeinflusst.

3.5.1. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine mit dem anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat belegt, so dass die Eigenladung der Proteine überdeckt und das Masse-/ Ladungsverhältnis der Micellen, mit Ausnahme von Glycoproteinen, gleich ist. Dies hat zur Folge, dass die Proteine nach ihrem MG getrennt werden (GUTTMAN, 1996).

Außerdem werden die Disulfidbrücken der Proteine mit 2-Mercaptoethanol reduktiv gespalten, was zu einer Auffaltung der Proteine und einer einheitlichen Micellenform führt. Die Trennung erfolgt in restriktiven Gelen, die in Folge ihrer kleinen Porengröße die Wanderung von großen Micellen stärker behindert als die von kleinen. Aus diesem Zusammenhang folgt die Proportionalität der Wanderungsgeschwindigkeit zu dem MG der Proteine. Die Zuordnung der MG erfolgt mit Molekulargewichtsmarkern im Bereich von 14 - 94 kDa bzw. 2.5 - 200 kDa.

Als Trenngele dienen Polyacrylamidgele, die durch Copolymerisation von Acrylamidmonomeren mit N,N'-Methylenbisacrylamid als Vernetzer hergestellt werden. Die Porengröße ist durch die Totalamidkonzentration und den Vernetzungsgrad reproduzierbar eingestellt. Es werden Polyacrylamid-Fertiggele vom Typ NOVEX™ NuPAGE (Novex, San Diego, CA, USA) verwendet. Dabei handelt es sich um Bis-(2-hydroxyethyl-)imino-tris-(hydroxymethyl-)methan-HCl (Bis-Tris-HCl) gepufferte Polyacrylamidgele mit einer Totalamidkonzentration von 10 bzw. 12 %.

Die Auftrennung des gesamten Proteinspektrums erfolgt mit 10 %igen Gelen unter Verwendung des 2-(N-Morpholino-)ethansulfonsäure (MES)-SDS-Puffers, während die gezielte Trennung der Proteine im oberen Molekulargewichtsbereich (MGB) von > ca. 40 kDa mit 10 %igen Gelen und dem 3-(N-Morpholino-)propansulfonsäure (MOPS)-SDS-Puffer erfolgt. Dagegen wird eine gute Trennung von Proteinen im unteren MGB (< ca. 20 kDa) mit 12 %ige Gelen unter Verwendung des 2-(N-Morpholino-)ethansulfonsäure (MES)-SDS-Puffers erzielt.

Die kontinuierliche Auftrennung der Proteine erfolgt nach Herstellerangaben mit Hilfe des NuPAGE™ Elektrophorese Systems (Novex, San Diego, CA, USA). Durchführung s. Anhang 7.6.1.

Für die Reduktion der Proteine wird ein Probenpuffer nach VIETHS et al. (1992a) verwendet (s. Anhang 7.6.1).

3.5.2. Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Bei der IEF werden die Proteine in einem elektrischen Feld durch einen pH-Gradienten nach ihren isoelektrischen Punkten (pI) getrennt. Sie wandern entsprechend ihrer Ladung im Gradienten in Richtung Anode oder Kathode und werden beim Erreichen des pH-Wertes, an dem ihre Nettoladung Null entspricht, fokussiert.

In der vorliegenden Arbeit werden Pre-Cast Gele (Novex, San Diego, CA, USA) vom Typ IEF-Gel, pH 3-7 verwendet. Mit diesen Gelen ist eine Auftrennung von Proteinen mit pI von 3-7 möglich. Die Zuordnung der pI erfolgt anhand eines definierten pI-Markers. Die Durchführung ist im Anhang 7.6.2 beschrieben.

3.5.3. Zweidimensionale-Elektrophorese

Die zweidimensionale (2D)-Elektrophorese stellt eine Kombination von IEF und SDS-PAGE dar. Zuerst werden die Proteine mittels IEF entsprechend ihren pI getrennt, danach erfolgt in der zweiten Dimension die Trennung nach dem MG mittels SDS-PAGE. Auf diese Weise kann eine hohe Auflösung komplexer Proteingemische bzw. eine Trennung von Isoproteinen erreicht werden (Durchführung siehe Anhang 7.6.3).

3.6. Dot Blot

Der Begriff Dot Blot bezeichnet das punktförmige Auftragen einer Proteinlösung auf eine Membran. Dabei wird der Extrakt direkt auf eine Nitrocellulose (NC)-Membran aufgebracht. Nach Trocknen und Blockieren freier Bindungsstellen kann eine Immunfärbung angeschlossen werden. Für die Detektion von Epitopstrukturen kann mit sehr geringen Proteinkonzentrationen gearbeitet werden.

Die Präsenz von stabilen Epitopen auf Peptiden kann nach SOMAN et al. (2000), PASTORELLO und TRAMBAIOLI (2001) und YU et al. (2002) auf diese Weise überprüft werden.

Die Methode wird zum Nachweis allergener Strukturen auf Peptiden, die durch enzymatische Spaltung isolierter Allergene entstanden sind, eingesetzt. Somit kann das allergene Potenzial von Peptiden nachgewiesen werden, deren MG für eine Analyse mit SDS-PAGE und anschließendem Immunoblot zu gering ist (Durchführung s. Anhang 7.7).

3.7. Semidry Blotting

Blotting bezeichnet den Transfer von Makromolekülen aus einem Trägermaterial (Trägergel) auf die immobilisierende Oberfläche einer Membran.

Beim Semidry Blotting erfolgt der Transfer aus der Gelmatrix auf die Blotmembran in Folge eines Gleichstromfeldes, das zwischen zwei horizontal angeordneten Graphitelektroden angelegt wird (TOWBIN und GORDON, 1984). Das Gel und die Membran befinden sich dabei zwischen zwei mit Puffern getränkten Tüchern.

Für den Transfer auf eine NC-Membran wird ein diskontinuierliches Puffersystem verwendet, das einen gleichmäßigen und effektiven Transfer ermöglicht, eingesetzt (KYSE-ANDERSEN, 1984; STOTT, 1989).

Nach dem Transfer liegen die Proteine für spezifische Reaktionen wie z.B. eine Immunfärbung frei zugänglich vor.

Die Bindung der Proteine an die Membran erfolgt wahrscheinlich über hydrophobe Wechselwirkungen. Die Porengröße der Membran ist von großer Bedeutung, da die Bindungskapazität der Membran mit abnehmender Porengröße steigt (HANDMAN und JARVIS, 1985).

Werden die Proteine nicht auf eine NC-, sondern auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran transferiert, wird ein kontinuierliches Puffersystem nach WARD et al. (1990) verwendet. PVDF-Membranen sind im Gegensatz zu NC-Membranen stabil gegenüber den Reagenzien des Edman-Abbaus, so dass die Allergene für eine N-terminale Sequenzierung auf eine PVDF-Membran geblottet werden. Die Durchführung ist unter 7.8 dokumentiert.

3.8. Immunoblot (IB)

Der IB stellt die Kombination des Transfers von Proteinen auf eine immobilisierte Membran mit einer anschließenden Immunfärbung dar.

Bei einer Immunfärbung handelt es sich um eine spezifische Proteinfärbung mit IgE-Antikörpern aus Patientenseren auf einer Blotmembran (STOTT, 1989). Diese Detektionsmethode ermöglicht die spezifische Anfärbung allergener Proteine.

Nach dem Blotting erfolgt eine Blockierung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran mit Magermilchpulver (JOHNSON et al. 1984; AHLROTH et al. 1995) und eine Inkubation mit Patientenseren. Die Antikörper der Seren binden spezifisch an die immobilisierten Allergene. Um die Empfindlichkeit der Detektion zu erhöhen, wird ein Verstärkersystem nach VIETHS et al. (1992b) verwendet. Auf diese Weise wird eine Nachweisgrenze von 0.5 ng Protein/ mm² Membran erreicht.

In diesem System werden Anti-Human-IgE vom Kaninchen, biotinyliertes Anti-Kaninchen-IgG von der Ziege und Streptavidin-Meerrettichperoxidase (HRP)-Konjugat eingesetzt. Die Empfindlichkeit der Detektion wird verstärkt, indem das Anti-Kaninchen-IgG in Folge seiner Mehrfachbiotynilierung mehrere Streptavidin-(HRP)-Konjugat-Moleküle binden kann.

Die Anfärbung der allergenen Proteine erfolgt mit einer enzymatischen Reaktion. Als Substrat wird 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) verwendet, das unter Beteiligung von Dioctylnatriumsulfosuccinat (DONS) und Wasserstoffperoxid durch HRP zu einem blauen Radikalkation oxidiert. Dieses bindet an die Proteine, so dass sie als blaue Banden sichtbar werden. Die Färbung ist nicht stabil und kann nur kurze Zeit unter

Lichtausschluss gelagert werden, so dass eine Dokumentation sofort erfolgen muss (GALLATI und PRACHT, 1985). Die Anfärbung erfolgt nach 7.9.

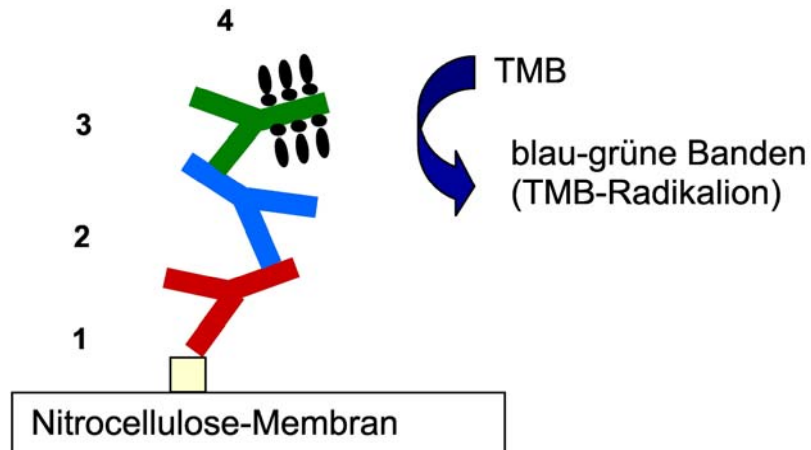


Abb. 3-2: Prinzip des IB

IgE-Antikörper der Patientenseren binden an Allergene, die auf der Blotmembran immobilisiert sind (1). Diese werden nacheinander mit Anti-Human-IgE von Kaninchen (2) und dann mit mehrfach biotinyliertem Anti-Kaninchen-IgG von der Ziege (3) inkubiert. An ein Anti-Kaninchen-IgG binden mehrere Streptavidin-HRP-Moleküle (4). Durch enzymatische Farbreaktion entsteht die Blaufärbung der Allergenbanden.

3.9. Immunoblot-Inhibition

Die Immunoblot-Inhibition kann zur Identifizierung von kreuzreagierenden Allergenen herangezogen werden (VIETHS et al. 1995b). Bei der Untersuchung liegen Allergene entsprechend dem IB festphasengebunden vor und konkurrieren mit anderen in Lösung befindlichen Allergenen um eine Bindung mit IgE-Antikörpern der Patientenseren.

Die elektrophoretisch getrennten und auf NC-Membran transferierten Allergene werden nach Blockieren freier Bindungsstellen mit Seren versetzt, die zuvor mit Inhibitorlösungen, d.h. Proteinextrakten, inkubiert wurden. Es schließt sich eine Immunfärbung nach 7.9 an.

Bei Vorliegen gleicher Epitope auf den Allergenen der Festphase und der Inhibitorlösung tritt eine Schwächung oder Eliminierung der Detektion der festphasengebundenen Allergene auf (Durchführung s. 7.10).

3.10. Profilin-Blot

Die Detektion von Profilinen erfolgt mit polyklonalen Antikörpern, die nach der Immunisierung von Kaninchen mit Profilinen aus Pollen oder Lebensmitteln gewonnen werden (VIETHS et al, 1994b; FÄH et al., 1995). Bei dieser Methode wird die starke Homologie der Profileine verschiedener Herkunft ausgenutzt. Profileine zeigen sowohl bezüglich verschiedener Lebensmittel als auch zwischen Lebensmitteln und Pollen häufig kreuzreaktive Eigenschaften. Für die Identifizierung der Profileine der Litchi werden chromatographisch und elektrophoretisch getrennte Extrakte eingesetzt, die nach Blotten auf eine NC-Membran und Blockieren freier Bindungsstellen mit einem vom Paul-Ehrlich-Institut (Langen, Deutschland) zur Verfügung gestellten Antikörper inkubiert werden, der gegen rekombinantes Birnenprofilin Pyr c 4 gerichtet ist. Im Weiteren wird wie bei der Immunfärbung verfahren (Durchführung s. Anhang 7.11).

3.11. Nachweis von Glycoproteinen

Bei vielen pflanzlichen Proteinen handelt es sich um Glycoproteine, wobei der Massenanteil der Kohlenhydrate stark schwankt und bis zu 90 % betragen kann. Die wichtigsten Kohlenhydratkomponenten sind D-Galactose, L-Arabinose, L-Rhamnose, D-Mannose und L-Fucose (WAFFENSCHMIDT und JAENIKE, 1991).

Für die physiologische Bedeutung ist der Kohlenhydratanteil von großer Bedeutung und auch bei einigen Allergenen von Pollen und pflanzlichen Lebensmitteln handelt es sich um Glycoproteine (BREITENEDER et al., 1989; NILSEN et al., 1991). Die Bedeutung des Kohlenhydratanteils für die Allergenität ist bisher nicht eindeutig geklärt.

Der Nachweis von Glycoproteinen der Litchi wird mit Hilfe der Periodatspaltung sowie unter Verwendung von Lectinen geführt.

3.11.1. Nachweis von Glycoproteinen durch Periodatspaltung

Vicinale Hydroxylgruppen von Kohlenhydraten können mit Periodat oxidativ unter Bildung von Formaldehyd und Ameisensäure gespalten werden.

Entsprechend diesem Prinzip werden Glycoproteine bei der Periodsäure-Schiffschen-Färbung (SchF) nach elektrophoretischer Trennung im Gel mit Periodat behandelt und die entstehenden Aldehyde mit dem Schiffschen Reagenz (Fuchsin, Schwefelsäure) umgesetzt, so dass die Glycoproteine als violette Banden im Gel sichtbar werden (Durchführung s. 7.14.1).

Um zu untersuchen, ob die Kohlenhydrate einen Einfluss auf das allergene Potenzial besitzen, wird ein Litchiextrakt elektrophoretisch getrennt, auf eine NC-Membran transferiert, mit Periodat inkubiert und eine Immunfärbung nach 7.9 angeschlossen. Bei einer eventuellen Beteiligung von Kohlenhydraten an der Epitopstruktur tritt in Folge dieser Behandlung eine Eliminierung oder Schwächung der Detektion der IgE-bindenden Proteine auf. Zu beachten ist, dass bei dieser Methode auch empfindliche Aminosäuren oder Aminosäureester oxidiert werden. So kann eine Schwächung der Immunfärbung eventuell auch auf diese Weise entstehen (Durchführung s. 7.14.2).

3.11.2. Nachweis von Glycoproteinen mit Lectinen

Lectine sind pflanzliche oder tierische Proteine oder Glycoproteine, die spezifisch an definierte Kohlenhydrate binden. Diese Eigenschaft wird bei der Methode des Lectin-Blots ausgenutzt. Dabei wird ein Litchiextrakt elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine NC-Membran geblottet und mit biotinylierten Lectinen verschiedener Spezifität inkubiert. Im Weiteren wird analog zur Immunfärbung verfahren (Durchführung s. Anhang 7.14.3).

3.12. Unspezifische Färbungen

Das Proteinmuster von elektrophoretisch getrennten Proteinen wird in Gelen und auf Membranen mit folgenden Methoden sichtbar gemacht.

Der Silberfärbung im Gel liegt die Reduktion von Silberionen zu elementarem Silber zugrunde (HEUCKESHOVEN und DERNICK, 1986). Mit einer Nachweisgrenze von 0.05 – 0.1 ng/ mm² zählt sie zu den empfindlichsten unspezifischen Färbungen. Die Proteine werden dabei in der Gelmatrix mit Essigsäure fixiert und durch Zugabe von Glutardialdehyd vernetzt. Bei dieser Methode liegt eine irreversible Denaturierung der Proteine vor. Sie können nicht zu weiteren Untersuchungen eingesetzt werden.

Im Gegensatz dazu führt die CBB-Färbung mit einer Nachweisgrenze von 30 ng/ mm² zu einer reversiblen Färbung. Sie beruht auf der Anlagerung des Farbstoffs Coomassie-Brilliant-Blue G 250 an die Proteine. Diese Färbung wird mit geringen Modifikationen für die Detektion in Gelen und auf PVDF-Membranen eingesetzt.

Außerdem erfolgt die unspezifische Anfärbung auf NC-Membranen durch Anlagerung des Farbstoffes Ponceau S an die Proteine (Ponceau-Färbung). Die Nachweisgrenze dieser reversiblen Färbung ist vergleichbar mit der der Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung; die Durchführung gelingt aber in kürzerer Zeit. Außerdem wird die kolloidale Goldfärbung nach DANSCHER und NOORGARD (1983) genutzt, um Proteine auf NC-Membranen zu visualisieren. Dabei werden kolloidal gelöste HAuCl₄-Moleküle an die Proteine angelagert und rote Banden sichtbar. Mit einer Nachweisgrenze von ca. 1 ng/mm² ist die

Empfindlichkeit mit der der Silberfärbung vergleichbar (MOEREMANS et al., 1985; YAMAGUCHI und ASAKAWA, 1988; LI et al., 1989). Die Immunaktivität der Proteine bleibt bei dieser Methode erhalten (EGGER und BIENZ, 1987), so dass eine Immunfärbung angeschlossen werden kann. Die Durchführungen erfolgen entsprechend 7.12 bzw. 7.13.

3.13. Methoden zur Allergenisolierung

Die Isolierung von Lebensmittelallergenen kann mit chromatographischen und elektrophoretischen Methoden erfolgen.

Im Rahmen dieser Arbeit werden die Gelpermeations-, Ionenaustausch-, Umkehrphasen- und Affinitätschromatographie eingesetzt, um Allergene der Litchi zu isolieren. Außerdem wird eine fraktionierte Fällung der Litchiproteine vorgenommen.

3.13.1. Ammoniumsulfatfällung

Neben chromatographischen und elektrophoretischen Methoden kann ein Proteingemisch auch durch fraktionierte Fällung aufgetrennt werden. Die Fällung kann z.B. mit Ammoniumsulfat erfolgen. Durch die Zugabe von Ammoniumsulfat wird die Hydrathülle eines Proteins zerstört und es fällt aus. Um eine Fraktionierung des Litchiproteingemisches zu erzielen, wird es mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung versetzt. Dabei werden Präzipitate nach Fällung mit 40, 60 und 80 % gesättigter Ammoniumsulfatlösung mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung sowie IB untersucht (Durchführung s. Anhang 7.15.1).

3.13.2. Gelpermeationschromatographie (GPC)

Bei dem säulenchromatographischen Verfahren der GPC wird ein Gemisch nach der Molekülgröße getrennt. Die Fraktionierung erfolgt an einer Gelmatrix und die Proteine werden, basierend auf einem sterischen Ausschlussprinzip, mit abnehmender Molekularmasse eluiert.

Als Säulenmaterial dient SephacrylTM S 100 der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden), ein Gemisch aus N,N'-Methylenbisacrylamid und Allyldextran mit einem Durchmesser von 47 µm. Es ist für die Trennung von Peptiden und Proteinen mit MG von ca. 1–100 kDa geeignet.

Die Elution der Proteine wird in Anlehnung an MÖLLER (1997) mit einem 0.01 M Phosphatpuffer, pH 7.0 mit 0.03 M NaCl durchgeführt und die Proteine werden UV-photometrisch bei 280 nm detektiert (Durchführung s. Anhang 7.15.2).

3.13.3. Affinitätschromatographie (AC)

Die bereits beschriebene sehr spezifische Bindung von Lectinen an definierte Kohlenhydrate wird bei der AC mit Lectinen ausgenutzt. Die Lectine sind auf dem Säulenmaterial immobilisiert, so dass die Glycoproteine des Litchiextraktes deren Kohlenhydratrest der Spezifität des Lectins entspricht, retardiert und anschließend mit einer Zuckerlösung eluiert werden. Die affinitätschromatographische Trennung eines Litchiextraktes nach Aufreinigung mittels GPC und Dialyse erfolgt nach CARTELLIERI (2002) in Zusammenarbeit mit dem GKSS Forschungszentrum Geesthacht (Durchführung s. Anhang 7.15.3)

3.13.4. Ionenaustauschchromatographie (IEC)

Mit Hilfe der IEC können Proteine unter sehr milden Bedingungen getrennt werden, so dass ihre biologische Aktivität erhalten bleibt (MALMQUIST und LUNDEL, 1992).

Die Trennung basiert auf den unterschiedlichen Affinitäten der Proteine zu den Festionen des Säulenmaterials. Sie ist abhängig von Größe und Ladung der Moleküle sowie von der Zusammensetzung der mobilen Phase, da die Proteine mit den Ionen der mobilen Phase um eine Bindungsstelle an den Festionen der stationären Phase konkurrieren. Im allgemeinen werden Anionenaustauschersäulen eingesetzt, um saure Proteine, Kationenaustauschersäulen um basische Proteine zu trennen. Für die Fraktionierung der Litchiproteine wird sowohl eine Anionenaustauscher- als auch eine Kationenaustauschersäule verwendet.

Als Anionenaustauschersäule wird eine ResourceTM Q (6ml) der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden) eingesetzt. Das Ionenaustauscherharz besteht aus Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymer mit Ammoniumgruppen als Festionen. Die Elution der Proteine gelingt in Anlehnung an MÖLLER (1997) und SEPPÄLÄ et al. (1999) mit einem 0.02 molaren Tris (Tris-(hydroxymethyl)methan)-HCl-Puffer bei einem konstanten pH-Wert von 8.0 unter Verwendung eines Salzgradienten.

Zur Trennung der basischen Proteine wird die Kationenaustauschersäule ResourceTM S (6 ml) der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden) bevorzugt und die Proteine mit Eluenten verschiedener Pufferzusammensetzungen und pH-Werte mit Hilfe eines NaCl-Gradienten fraktioniert. Die Detektion erfolgt in beiden Fällen UV-photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm (Durchführung s Anhang 7.15.4).

3.13.5. Umkehrphasenchromatographie (RPC)

Die Trennung an einer Umkehrphase beruht auf hydrophoben Wechselwirkungen der Proteine mit der Festphase.

Für die Fraktionierung der Lichiproteine wird das Säulenmaterial SourceTM 15RPC von Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden), bestehend aus Polystyrol-Divinylbenzol, eingesetzt. Die Elution wird mit einem Trifluoressigsäure (TFA)/Acetonitril-Gradienten durchgeführt und die Proteine UV-photometrisch bei 280 nm detektiert (Durchführung s. Anhang 7.15.5).

3.14. Entsalzen von Protein- und Peptidextrakten

Bei vielen Aufreinigungsschritten wie z.B. chromatographischen Trennungen werden Lösungen mit einem erheblichen Salzgehalt eingesetzt, der anschließende Untersuchungen stört. Aus diesem Grund werden die Proteinextrakte einer Dialyse unterzogen. Diese erfolgt nach Herstellerangaben unter Verwendung von Slide-A-LyzerTM Dialysekammern mit einer Ausschlussgröße von 3.5 kDa (Durchführung s. Anhang 7.17.1).

Peptide, die aufgrund ihrer geringen Größe nicht dialysiert werden können, werden unter Verwendung von ZIP-TIPsTM (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) entsalzt. Dabei handelt es sich um Pipettenspitzen, in die ein Chromatographiebett, in diesem Fall eine C-18-RP-Phase, eingelagert ist.

Die zu reinigenden Peptide werden durch die Festphase retardiert, die Salze ausgewaschen und die Peptide im Anschluss eluiert. Die Durchführung erfolgt nach Herstellerangaben und ist im Anhang 7.17.2 dokumentiert.

3.15. Methoden zur Identifizierung der Allergene

3.15.1. N-terminale Sequenzierung

Die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz erfolgt mittels Edman-Abbau (EDMAN und BEGG, 1967). Das Prinzip dieser Reaktionskaskade ist die stufenweise Abspaltung und Identifizierung einzelner Aminosäuren vom N-terminalen Ende der Proteinkette. Die Reaktion beruht auf der Kopplung von Phenylisothiocyanat an die endständige Aminosäure, deren Abspaltung als Phenylisothiocarbamoylpeptid und der anschließenden Konvertierung zur stabilen Phenylthiohydantoin-(PHT)-Aminosäure. Diese PHT-Derivate werden mittels RPC und nachfolgender UV-Detektion identifiziert. Die

zyklisch ablaufende Reaktion ermöglicht die Routinebestimmung von Polypeptiden, sie ist allerdings auf ca. 50 Aminosäuren limitiert.

Für die Sequenzanalyse wurden die Proteine elektrophoretisch getrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und anschließend mit CBB unspezifisch gefärbt. Die zu untersuchenden Banden wurden ausgeschnitten und dem Edman-Abbau unterworfen (Durchführung s. Anhang 7.18). Die zur Sequenzanalyse benötigte Mindestmenge beträgt 50 pmol und ist meist durch die Visualisierbarkeit mit CBB gewährleistet. Die Sequenzierung der ausgeschnittenen Proteine erfolgt in Zusammenarbeit mit dem Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie des UKE.

3.15.2. Verdau im Gel

Der Verdau im Gel erfolgt in Anlehnung an ROSENFELD et al. (1992). Die Proteine werden elektrophoretisch aufgetrennt, mit CBB angefärbt, Proteinbanden ausgeschnitten, entfärbt und im Gel enzymatisch gespalten.

Für den Verdau im Gel werden keine Gesamtproteinextrakte, sondern Fraktionen der IEC eingesetzt.

Für die in-vitro Magenverdauung wird Pepsin [EC 3.4.23.1] aus der Magenschleimhaut von Schweinen bei einem pH-Wert von 2.0 und einer Inkubationszeit von 2 Stunden eingesetzt.

Die simulierte Darmverdauung wird einzeln und kombiniert mit den Enzymen Trypsin [3.4.21.4] und Chymotrypsin [EC 3.4.21.1] aus der Rinderbauchspeicheldrüse bei deren pH-Optimum von pH 8.9 durchgeführt.

Die Enzymaktivitäten sind in Tabelle 3-1 zusammengestellt (s. 4.9.).

Tab. 3-1: Enzym-Substrat-Verhältnisse

Allergen	Substratmenge [μg]	Enzymaktivität [nkat]		
		Pepsin	Trypsin	Chymotrypsin
14 kDa	0.2	0.5876 – 0.8263	0.0714	0.1167
25 kDa	1.3	3.8194 – 5.3710	0.0714	0.1167
28 kDa	1.3	3.8194 – 5.3710	0.0714	0.1167
55 kDa	0.2	0.5876 – 0.8263	0.0714	0.1167
70 kDa	0.2	0.5876 – 0.8263	-	-

Der Verdau mit der Endoproteinase Lys c [EC 3.4.21.50] aus *Lysobacter enzymogenes* erfolgt in dem vom Hersteller angegebenen Enzym-Substrat-Verhältnis von 1:20 bei dem pH-Optimum des Enzyms von 8.9.

Die entstandenen Peptide werden aus der Matrix extrahiert und die erhaltenen Lösungen für Dot Blot- und Immunoblot-Untersuchungen eingesetzt. Außerdem wird ein Allergen unter Verwendung dieser Methode mit Trypsin gespalten und die Peptide massenspektrometrisch untersucht. Die Durchführung ist unter 7.16 beschrieben.

3.15.3. MALDI-TOF

Bei einem MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption ionization - time of flight) - Massenspektrometer wird die in einer Matrix befindliche Probe mit einem Laser bestrahlt und die Analyten aufgrund ihrer Flugzeit analysiert.

Bei der MALDI befindet sich der Analyt in einer Matrix aus kleinen organischen Molekülen, die bei der Wellenlänge des die Probe bestrahlenden Lasers absorbieren. Durch kurze Laserimpulse wird die Bildung von gasförmigen Ionen induziert. Die Matrix absorbiert die Energie des Lasers und überträgt sie auf die Probe, die so schonend verdampft wird.

Als Massenanalysator wird der sogenannte Flugzeitanalysator (TOF, time of flight) eingesetzt.

Dabei werden die geladenen Teilchen in einem elektrischen Feld beschleunigt, wobei alle gleich geladenen Ionen dieselbe Energie erhalten. So weisen sie nach dem Verlassen der Beschleunigungsstrecke in Abhängigkeit von ihrer Masse unterschiedliche Geschwindigkeiten auf.

Nach einer Eichung mit Referenzsubstanzen bekannter Masse kann die Masse der Analyten anhand ihrer Flugzeit ermittelt werden.

MALDI-TOF-Untersuchungen wurden mit tryptischen Peptiden eines isolierten Allergens durchgeführt, um es mit Hilfe des Peptide Mass Fingerprints (PMF) zu identifizieren (Durchführung s. Anhang 7.19). Die Messung erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg mit einem Biflex III-Gerät der Firma Bruker Daltonik (Bremen, Deutschland).

3.15.4. MALDI-TOF/TOF

Im Gegensatz zum MALDI-TOF können mit einem MALDI-TOF/TOF außerdem MS/MS Spektren ausgewählter Peptide aufgenommen werden. Diese ermöglichen die Identifizierung des Proteins durch Datenbankrecherche. Für die Messung wird ein Allergen eingesetzt, das zuvor im Gel mit Trypsin gespalten wurde. Die Messung erfolgt in Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Abteilung Molekulare Neurobiologie in Göttingen mit dem Ultraflex der Firma Bruker Daltonik (Bremen, Deutschland).

4. Ergebnisse

4.1. Proteinextraktion

Da das Ziel dieser Arbeit in einer umfangreichen Charakterisierung sowie Isolierung und Identifizierung von Litchiallergenen besteht, muss eine quantitative und reproduzierbare Methode zur Extraktion der Proteine aus den nativen Früchten eingesetzt werden, die die Basis aller folgenden Untersuchungen sein wird. Außerdem sollen die Proteine während der Extraktion keine Veränderung gegenüber dem nativen Zustand erfahren. Ein Problem stellen in diesem Zusammenhang phenolische Verbindungen und Enzyme dar. Des Weiteren müssen die Proteinextrakte lagerfähig sein.

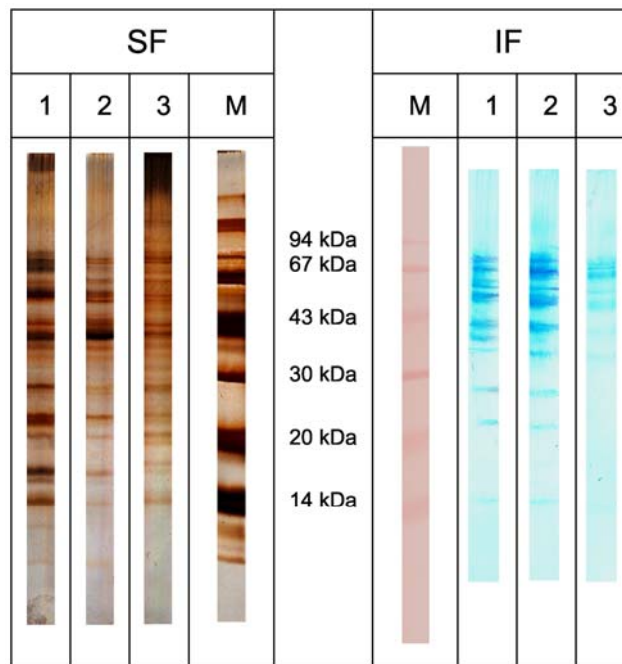
Zwei Methoden mit denen sowohl die Problematik der phenolischen Verbindungen aber auch die der proteolytischen Enzyme berücksichtigt werden, sind zum einen die von CLEMENTS (1965) entwickelte und von VIETHS et al. (1992b) modifizierte Tieftemperaturextraktion und zum anderen eine Methode nach BJÖRKSTEN et al. (1980).

Die Proteine der Litchi werden mit beiden Methoden extrahiert und die Proteingehalte sowie das Protein- und Allergenspektrum der Extrakte untersucht.

An die Tieftemperaturextraktion schließt sich eine Extraktion mit PBS oder bidest. Wasser aus dem gewonnenen Acetonpulver an. Bei dem Einsatz von bidest. Wasser können eventuelle Störungen durch Salze bei nachfolgenden Untersuchungen oder chromatographischen Trennungen ausgeschlossen werden. Bei der Extraktion nach BJÖRKSTEN et al. (1980) wird das Material lediglich unter Zusatz einer Diethyldithiocarbamat, EDTA und PVPP beinhaltenden Suspension homogenisiert und zentrifugiert, so dass der apparative Aufwand deutlich geringer ist und damit weniger Zeit für die Aufarbeitung benötigt wird. Alle erhaltenen Proteinlösungen werden nach der Methode von BRADFORD (1976) bezüglich ihres Proteingehaltes untersucht, um eine quantitative Einschätzung der Extraktion der Proteine aus den Früchten machen zu können. Außerdem werden die Lösungen mittels SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung und IB analysiert.

Zur Herstellung des Acetonpulvers werden 386.26 g essbarer Anteil der Früchte (500 g Litchis bzw. 22 Früchte) eingesetzt und 47.99 g Acetonpulver erhalten. Durch Extraktion mit bidest. Wasser können 321 mg und mit PBS 407 mg Protein gewonnen werden. Die Extraktion nach BJÖRKSTEN et al. (1980) liefert dagegen aus 250 g des essbaren Anteils nur 7 mg Protein. Die Tieftemperaturextraktion unter Verwendung von PBS führt zur größten Proteinausbeute. Etwas geringer ist die Ausbeute bei der Extraktion mit bidest. Wasser (78.9 %). Die Methode nach BJÖRKSTEN et al. (1980) erweist sich hingegen als ungeeignet (2.7 % der Proteinmenge, die bei der Tieftemperaturextraktion mit PBS gewonnen wird).

Neben der quantitativen Bewertung wird das Protein- und Allergenspektrum der jeweiligen Extrakte untersucht. Abb. 4-1 dokumentiert die Ergebnisse der verschiedenen Methoden.



M: MG-Marker	1: Tieftemperaturextraktion, PBS	2: Tieftemperaturextraktion, bidest. Wasser
SF: Silberfärbung	3: Extraktion nach BJÖRKSTEN et al. (1980)	
IF: Immunfärbung		

Abb. 4-1: Silberfärbung und IB verschiedener Extraktionsmethoden (SDS-PAGE: 10 %iges Bis-Tris Gel, MES-Puffer)

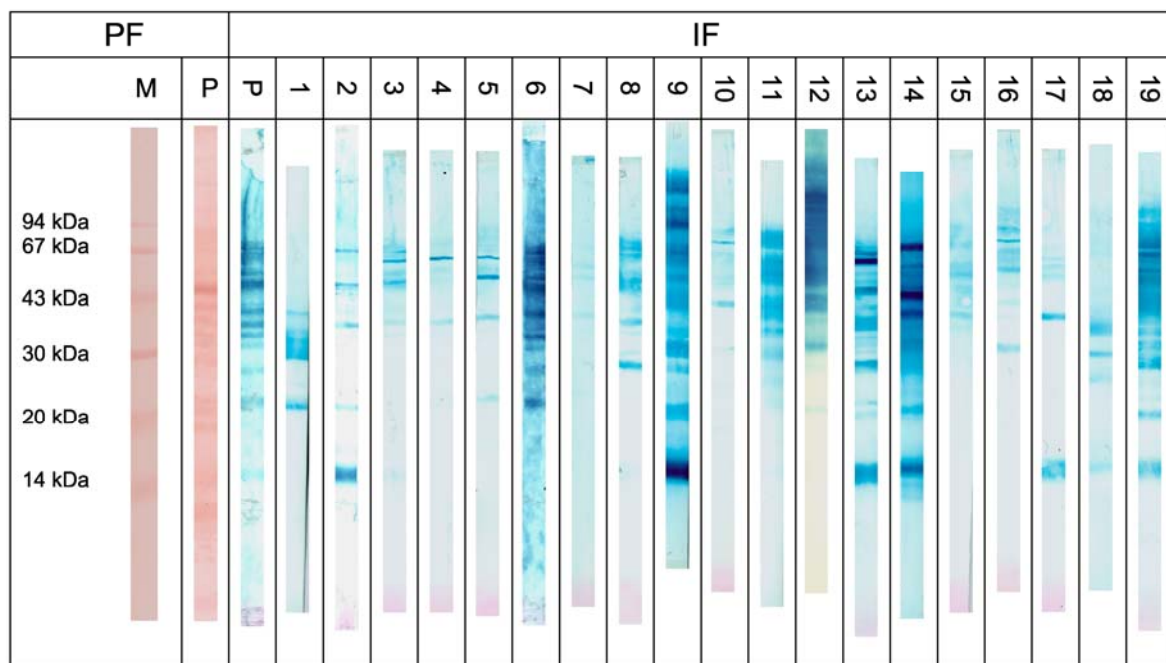
Der wässrige Extrakt und der PBS-Extrakt aus dem Acetonpulver zeigen sowohl nach Silberfärbung als auch im IB keine Unterschiede. Leichte Intensitätsunterschiede der Detektion können auf geringe Konzentrationsunterschiede der Extrakte zurückgeführt werden. Die Methode nach BJÖRKSTEN et al. (1980) liefert einen Proteinextrakt, dessen Gesamtproteinmuster dem der anderen annähernd entspricht. Im IB zeigt sich aber ein anderes Bild: In dem wässrigen und PBS-Extrakt aus Acetonpulver werden IgE-bindende Proteine mit MG von 14 bis 94 kDa detektiert. Im Gegensatz dazu zeigt der IB des Extraktes nach BJÖRKSTEN et al. (1980) weniger Allergene. Die Färbung von IgE-bindenden Proteinen im MGB von ca. 14 bis 40 kDa bleibt aus. Dieser Extrakt enthält nur Allergene mit größeren MG von ca. 40 bis 94 kDa.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sich die Methode nach BJÖRKSTEN et al. (1980) nicht für eine Extraktion der Litchiproteine eignet, da zum einen die Proteinausbeute sehr gering ist, zum anderen aber auch das Allergenspektrum weniger IgE-bindende Proteine aufweist als bei den anderen Methoden. Die Tieftemperaturmethode eignet sich, um die Proteine aus den nativen Früchten zu

extrahieren. Der Einsatz von PBS liefert im Gegensatz zu bidest. Wasser eine etwas höhere Proteinausbeute, Protein- und Allergenspektrum sind jedoch gleich. Da einige Untersuchungsmethoden und chromatographische Trennungen durch die Anwesenheit von Salzen gestört werden, besteht die Möglichkeit, PBS-Extrakte durch Dialyse zu entsalzen oder wässrige Extrakte einzusetzen. Bei einer Dialyse ist mit Proteinverlusten zu rechnen, die größer sind als die Minderausbeute bei einer wässrigen Extraktion (21 %). Deshalb werden alle Untersuchungen, bei denen die Anwesenheit von Salzen nicht stört mit PBS-Extrakten aus Acetonpulver durchgeführt. Für Untersuchungen, die nur mit salzfreien Lösungen möglich sind, werden hingegen wässrige Extrakte eingesetzt.

4.2. Charakterisierung des Allergenspektrums mittels SDS-PAGE/IB

Für die Charakterisierung des Allergenspektrums der Litchi wurden in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf Patienten mit einer Sensibilisierung gegen Litchi einberufen. Mit Hilfe der Seren von 39 Patienten konnten daraufhin die IgE-bindenden Proteine der Litchi detektiert werden, wobei alle Seren eine EAST-Klasse von mindestens 2 aufweisen (s. Anhang 7.20).



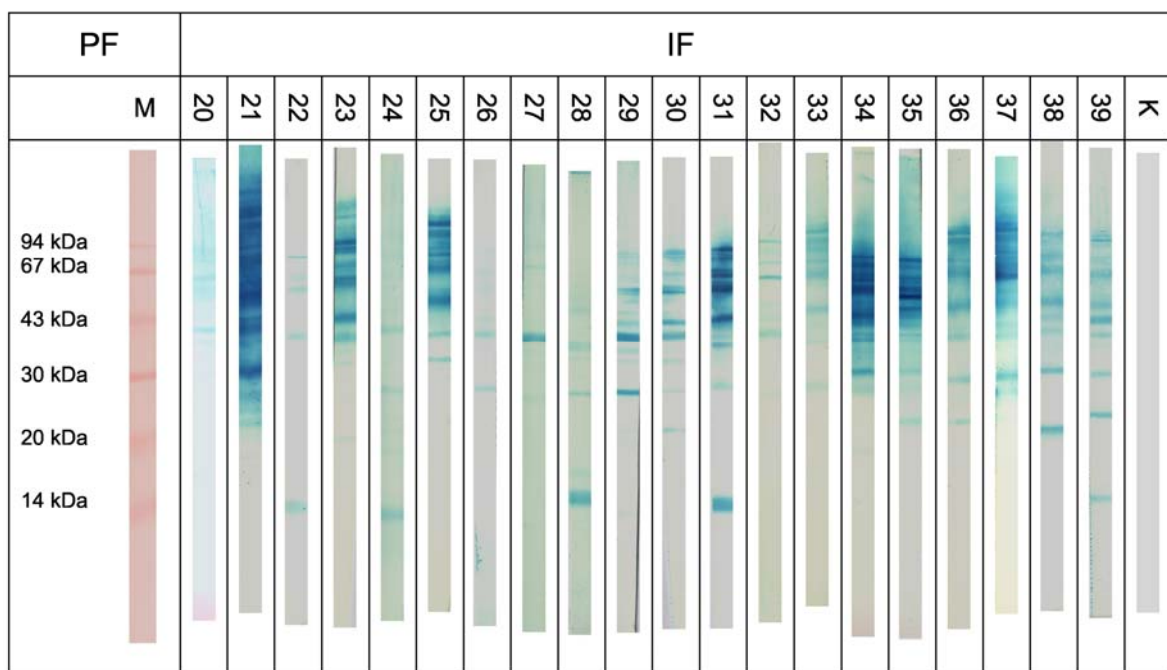
M: MG-Marker
 P: Proteinextrakt
 PF: Ponceau-Färbung
 1-19: Immunoblot mit Einzelseren

Abb. 4-2a: IB zum Allergennachweis mit Einzelseren
 (SDS-PAGE: 10 %iges Bis-Tris Gel, MES-Puffer)

Ergebnisse

Für die Untersuchung wurde ein Litchiextrakt elektrophoretisch aufgetrennt, die Proteine auf eine NC-Membran transferiert und die IgE-bindenden Proteine unter Verwendung der einzelnen Seren angefärbt. Die Bestimmung der MG erfolgte mit einem Ponceau S-gefärbten Marker (M). Das Serum eines Nicht-Atopikers diente als Kontrolle (K).

Die Allergene weisen MG von 14 bis ca. 94 kDa auf (Abb. 4-2 a und b). Auf den Immunoblots sind IgE-bindende Proteine mit MG von 14, 25, 28, 32, 40, 43, 55, 60, 65 und 70 kDa nachweisbar. Des Weiteren sind nicht diskret getrennte Proteine im MGB von 70 bis 94 kDa erkennbar. In Spalte P ist die Immunfärbung unter Verwendung eines Poolserums dargestellt. Es besteht zu gleichen Teilen aus den Seren 1 bis 21. Auf Grundlage des ungefärbten Kontrollblots können unspezifische Färbungen ausgeschlossen werden.



M: MG-Marker

20-39: Immunoblot mit Einzelseren

K: Kontrolle

Abb. 4-2b: IB zum Allergennachweis mit Einzelseren
(SDS-PAGE: 10 %iges Bis-Tris Gel, MES-Puffer)

Eine Einteilung der Allergene in Haupt- und Nebenallergene ist mit einem Patientenkollektiv von 39 Allergikern nicht möglich; es können aber Aussagen über die Bedeutung der einzelnen Allergene gemacht werden.

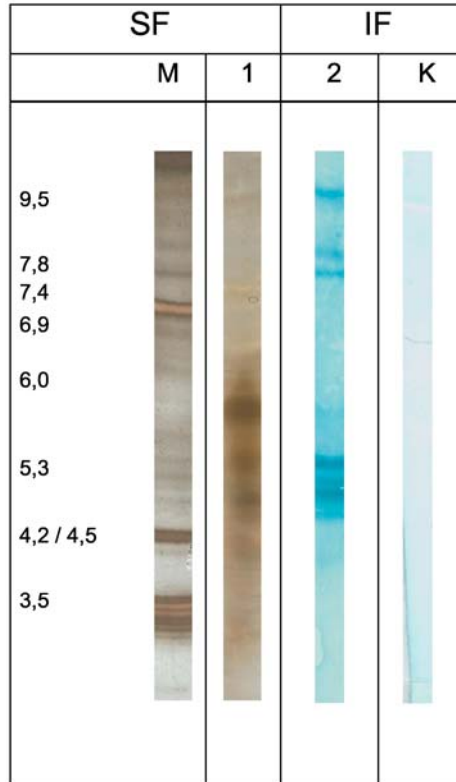
Auffällig ist, dass 92 % der Seren das 55 kDa Allergen detektieren (s. Tab. 4-1). Eine untergeordnete Bedeutung kommt den Allergenen mit MG von 14, 60 und 65 kDa zu. Sie werden von weniger als 40 % der Seren detektiert.

Tab.: 4-1: Bedeutung der Allergene

MG [kDa]	14	25	28	32	35	40	43	55	60	65	70	>70
Anzahl der Seren	14	17	26	16	25	29	26	36	6	8	30	28
Anteil [%]	36	44	67	41	64	74	67	92	15	21	77	72

4.3. Charakterisierung des Allergenspektrums mittels IEF/IB

Neben dem MG stellt der *pl* ein wichtiges Charakteristikum eines Allergens dar. Für deren Bestimmung wird eine IEF durchgeführt. Die Proteine werden elektrophoretisch aufgetrennt und unspezifisch silbergefärbt. Des Weiteren werden die IgE-bindenden Proteine nach Blotten auf eine NC-Membran unter Verwendung eines Poolserums visualisiert. Die Bestimmung der *pl* erfolgt mit Hilfe eines *pl*-Markers. Abb. 4-3 stellt die spezifische und unspezifische Färbung dar.



M: *pl*-Marker
K: Kontrolle

1, 2: Gesamtextrakt

Abb.4-3: IEF, Silberfärbung und IB

Die Silberfärbung des Extraktes (1) zeigt, dass viele Litchiproteine einen pI im sauren Bereich von ca. 3.5 bis 6.0 aufweisen. Es werden Proteine mit sauren pI von ca. 3.5, 4.0, 4.5, 4.7, 5.2, 5.7 und 6.0 angezeigt. Im neutralen und basischen Bereich sind Proteine mit einem pI von ca. 6.4, 6.9, 7.5, 7.8 und 9.5 erkennbar.

Nach Immunfärbung (2) kann festgehalten werden, dass die Litchiallergene einen pI von ca. 9.5 - 4.0 besitzen. IgE-bindende Proteine mit sauren pI von ca. 4.0, 4.5, 4.7, 5.0, 5.2, 5.7 und 6.0 werden genauso detektiert wie Allergene mit neutralen bis basischen pI von ca. 6.4, 7.5, 7.8 und 9.5. Die meisten Litchiallergene weisen aber pI im sauren Bereich zwischen ca. 4.0 und 5.2 auf. Unspezifische Färbungen können mit dem Kontrollserum ausgeschlossen werden.

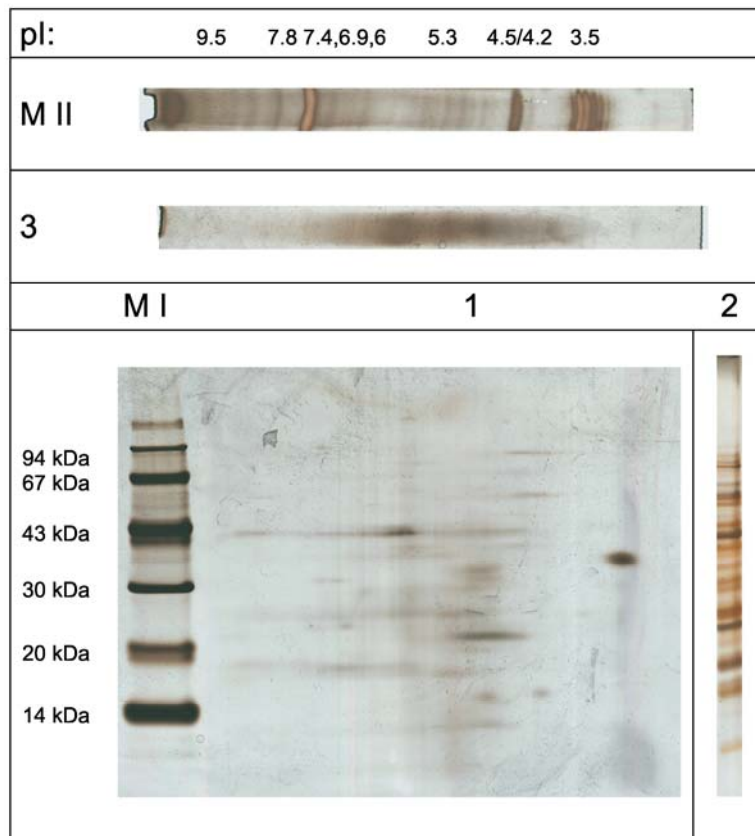
4.4. Charakterisierung des Allergenspektrums mittels 2D-Elektrophorese/IB

Mit der 2D-Elektrophorese werden die Proteine erst nach ihren pI und anschließend nach MG getrennt. Somit ist eine stärkere Auftrennung und damit Charakterisierung des Gesamtproteins der Litchi als mit der SDS-PAGE oder IEF allein möglich. Auch eventuell vorliegende Isoallergene werden getrennt. Zu diesem Zweck werden die Litchiproteine erst mittels IEF und nach Reduktion mit Hilfe der SDS-PAGE (10 %iges Bis-Tris-Gel) aufgetrennt. Die unspezifische Detektion erfolgt durch Silberfärbung und die Visualisierung der Allergene nach Blotten auf eine NC-Membran durch Immunfärbung. Die Zuordnung der MG und pI gelingt anhand von definierten Markern.

Die Ergebnisse sind in Abb. 4-4 dargestellt. Das silbergefärbte Proteinspektrum der Litchi weist Proteine mit MG von ca. 10 - 94 kDa und den dazugehörigen pI von ca. 3.3 - 9.5 auf.

Auffällig ist, dass zahlreiche Proteine mit gleichem MG aber unterschiedlichem pI vorliegen. Die MG dieser Proteine betragen ca. 14, 18, 25, 28, 30, 32, 36, 38, 40 und 55 kDa. Außerdem werden einzelne Proteine mit MG von 10, 20, 22, 43, 67, 70 und 94 kDa detektiert. Die Zuordnung der MG und pI ergibt sich aus Tabelle 4-2.

Ergebnisse



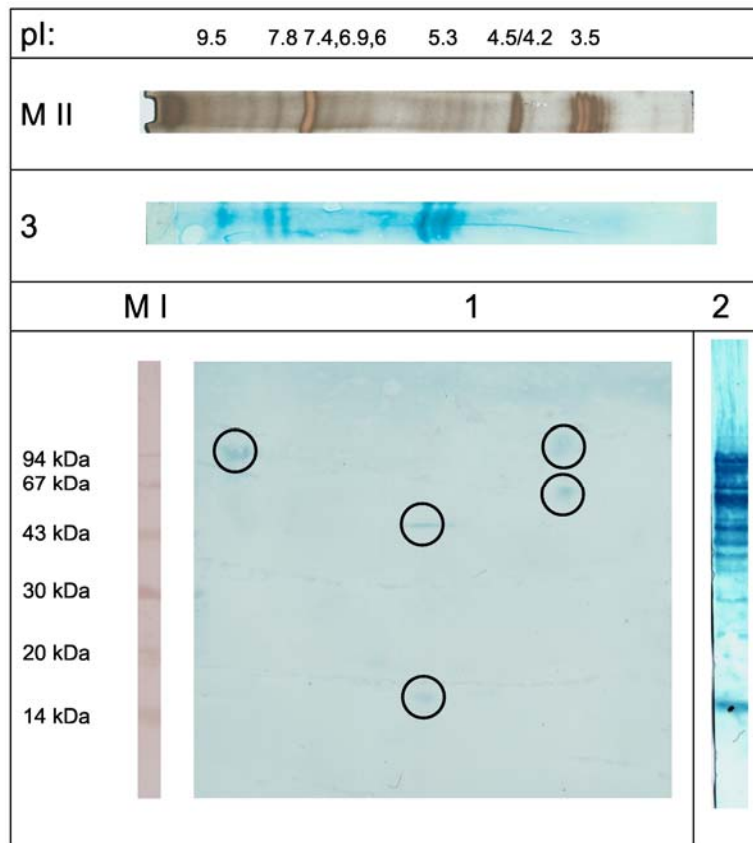
M I: MG-Marker	1: Gesamtextrakt, 2D
M II: pI-Marker	2: Gesamtextrakt, SDS-PAGE
	3: Gesamtextrakt, IEF

Abb. 4-4: 2D-Elektrophorese, Silberfärbung
(SDS-PAGE: 10 %iges Bis-Tris Gel, MES-Puffer)

Tab.: 4-2: Zuordnung von MG und pI

MG [kDa]	10	14	18	20	22	25	28	30	32	36	38	40	43	55	67	70	94
pI	4.7	3.6 4.7	4.8 5.5 6.9 8.0	5.1	7.0	5.0 5.2 5.6 5.9 7.0 7.9	4.7 5.2 5.7 6.9	4.6 7.2 7.3	3.3 4.6	5.3 5.5	4.7 5.5	4.9 5.5 7.3 8.3	4.4	4.2 5.6	4.3	5.7	4.1

Der IB (Abb. 4-5) dokumentiert das Vorliegen von IgE-bindenden Proteinen mit MG von ca. 14 - 94 kDa und den dazugehörigen pI von ca. 8.3 - 3.7.



M I: MG-Marker

M II: pI-Marker

1: Gesamtextrakt, 2D

2: Gesamtextrakt, SDS-PAGE

3: Gesamtextrakt, IEF

Abb. 4-5: 2D-Elektrophorese, IB (SDS-PAGE: 10 %iges Bis-Tris Gel, MES-Puffer)

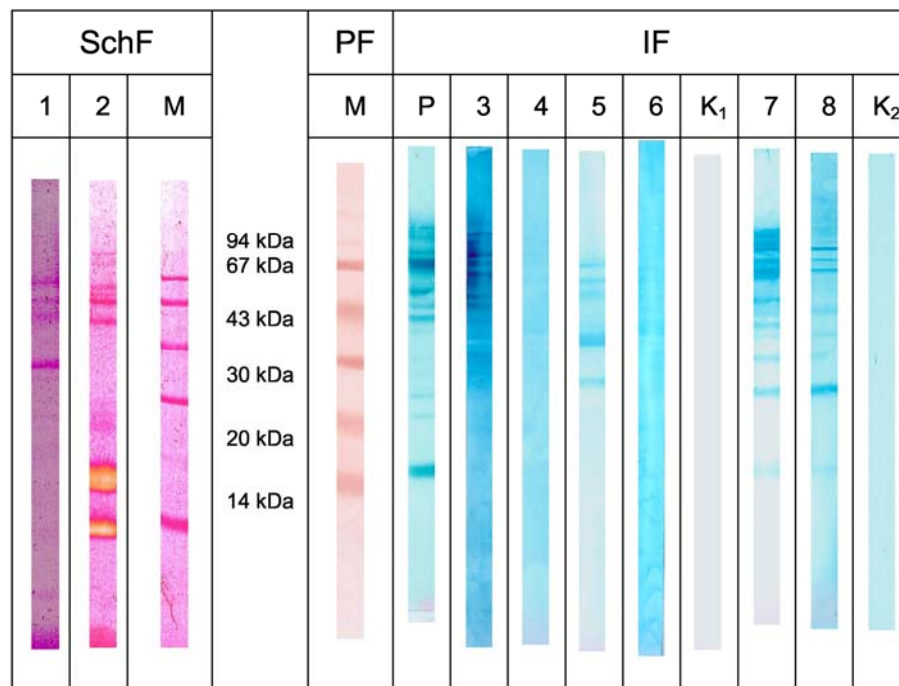
Dem Allergen mit einem MG von 14 kDa entspricht ein pI von 5.2. Außerdem werden Allergene mit MG von 43 kDa und einem pI ca. 5.2 sowie mit einem MG von 55 kDa und pI von 3.8 detektiert. Des Weiteren liegen zwei IgE-bindende Proteine mit einem MG von 94 kDa und pI von 3.7 und 8.8 vor.

Die Tatsache, dass bei dieser Untersuchung weniger Allergene detektiert werden als beim eindimensionalen IB, kann auf die hohen Proteinverluste bei der Analyse zurückgeführt werden. Die Allergene, die im IB stark detektiert werden, können auch nach zweidimensionaler Auftrennung nachgewiesen werden. Der Einsatz größerer Proteinmengen ist nicht möglich, da diese zu einer unzureichenden Auftrennung insbesondere der ersten Dimension führen.

4.5. Nachweis von Glycoproteinen

Der Nachweis von Kohlenhydratresten erfolgt mit Hilfe verschiedener Methoden: Das Vorliegen von Glycoproteinen wird mit Hilfe des Schiffschens Reagenzes untersucht. Um zu klären, welche Zuckerreste die Glycoproteine charakterisieren, wird die Methode des Lectinblots eingesetzt und die eventuelle Beteiligung von Kohlenhydraten am Epitop der Litchiallergene wird mit Immunoblot-Untersuchungen in Kombination mit einer Periodatbehandlung der Proteine analysiert.

Die Proteine werden mittels SDS-PAGE (10 %iges Bis-Tris-Gel) aufgetrennt und die Glycoproteine im Gel unter Verwendung des Schiffschens Reagenzes angefärbt. Als Positivkontrolle dienen der Marker und ein Standard aus Molkenproteinen, die Glycoproteine beinhalten. In dem Elektropherogramm (Abb. 4-6) ist erkennbar, dass die Glycoproteine der Standardsubstanzen auf diese Weise sehr gut angefärbt werden.



M: MG-Marker	1: Gesamtextrakt	5: Lectin TPA
P: Proteinextrakt mit Poolserum inkubierter	2: Molkenproteine	6: Lectin WGA
K ₁ : Kontrolle, Lectine	3: Lectin CA	7: Periodat deaktiviert
K ₂ : Kontrolle, Periodatspaltung	4: Lectin APA	8: Periodat
SchF: Schiffsche Färbung		

Abb. 4-6: Nachweis von Glycoproteinen: Schiffsches Reagenz, Lectine, Periodatspaltung (SDS-PAGE: 10 %iges Bis-Tris Gel, MES-Puffer)

Nach Färbung der Glycoproteine der Litchi sind im MGB von 40, 65, 67 und 90 kDa stark violett gefärbte Banden zu erkennen. Außerdem werden Glycoproteine mit MG von 38

und 43 kDa in Form schwach violett gefärbter Banden nachgewiesen. Diese Ergebnisse zeigen, dass in der Litchi Glycoproteine vorliegen.

Die Frage, welche Zuckerreste vorliegen, wird mit der Methode des Lectinblots untersucht. Zu diesem Zweck werden die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine NC-Membran transferiert, nach Blockieren freier Bindungsstellen mit biotinylierten Lectinen inkubiert und analog zum IB gefärbt. Die verwendeten Lectine weisen unterschiedliche Spezifitäten auf: Concanavalin A (CA) bindet spezifisch α -D-Mannose und α -D-Glucose, *Abrus precatorius* Agglutinin (APA) D-Galactose, *Tetragonolobus purpureas* Agglutinin (TPA) α -L-Fucose und *Triticum vulgare* Agglutinin (Wheat germ Agglutinin, WGA) N-Acetylglucosamin.

Abb. 4-6 verdeutlicht, dass die Inkubation mit CA zu einer Detektion zahlreicher Glycoproteine mit MG von ca. 18 bis 94 kDa führt. Es kann davon ausgegangen werden, dass α -D-Mannose oder α -D-Glucose Teil der Zuckerreste sind. APA, das spezifisch an D-Galactose bindet, zeigt keine Reaktion mit den Proteinen der Litchi. Die Beteiligung dieses Zuckers an einem Kohlenhydratrest der Glycoproteine kann folglich ausgeschlossen werden.

Im Gegensatz dazu zeigt der Lectinblot unter Verwendung von TPA diskrete Banden im MGB von 25, 35, 45, 50 und 67 kDa sowie schwach gefärbte Banden im MGB von ca. 18 und 20 kDa, was das Vorliegen von α -L-Fucose anzeigt. N-Acetylglucosamin kann bei Glycoproteinen der MG 40, 43, 65 und 70 kDa schwach detektiert werden. Unspezifische Bindungen können durch Vergleich mit einem Litchiextrakt, der ohne Lectinzusatz gefärbt wurde, ausgeschlossen werden.

Im Weiteren stellt sich die Frage, ob die nachgewiesenen Kohlenhydratreste an Epitopstrukturen der Litchiallergene beteiligt sind. Um dies zu klären, werden die Allergene mit Periodat behandelt. Nach elektrophoretischer Trennung, Blotten auf eine NC-Membran und Blockieren der freien Bindungsstellen werden die Proteine mit Periodat behandelt und anschließend immungefärbt. Die Periodatbehandlung führt zu einer Oxidation am Kohlenhydratrest. Bei Beteiligung einer Kohlenhydratstruktur an einem Epitop tritt eine Eliminierung oder Schwächung der Immunfärbung des betreffenden Allergens auf.

Als Kontrolle dient zum einen ein Blotstreifen, der mit desaktivierter Periodatlösung inkubiert wird und zum anderen ein mit Periodat behandelter Blotstreifen, der mit dem Serum eines Nicht-Atopikers behandelt wird. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Abb. 4-6 dargestellt. Im Vergleich zum unbehandelten Litchiextrakt zeigt der periodatbehandelte Extrakt eine deutlich geringere Anzahl Allergenbanden. Besonders im MGB > 43 kDa ist eine Auslöschung der Detektion zu beobachten.

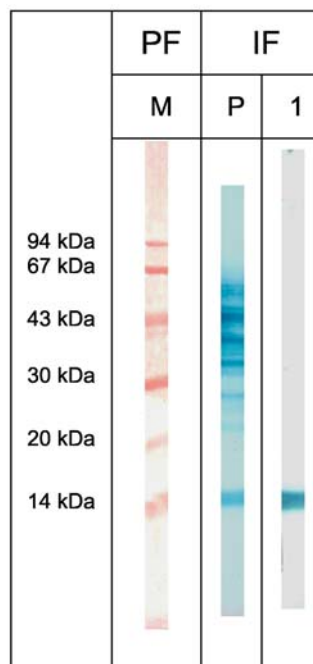
In diesem Bereich sind nur drei IgE-bindende Proteine mit MG von 67, 75 und 94 kDa erkennbar. Außerdem fällt auf, dass das Allergen mit dem MG von ca. 40 kDa nicht mehr

detektiert wird. Die Behandlung mit deaktivierter Periodatlösung führt nicht zu einer Veränderung des Allergenspektrums der Litchi.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sehr wahrscheinlich Kohlenhydratreste an Epitopen der Litchiallergene beteiligt sind. Die ausbleibende Detektion der Allergene kann aber auch durch eine Oxidation empfindlicher Aminosäuren hervorgerufen werden.

4.6. Profilinnachweis

Um zu klären, ob es sich bei dem 14 kDa Allergen der Litchi um ein ubiquitär vorkommendes Profilin handelt, wird ein Profilin-Blot durchgeführt. Dabei werden die elektrophoretisch getrennten Proteine auf eine NC-Membran transferiert und nach Blockieren freier Bindungsstellen mit einem Anti-Birnenprofilin-Antikörper inkubiert. Die weitere Detektion erfolgt analog zur Immunfärbung. Das Ergebnis ist in Abb. 4-7 dargestellt.



M: MG-Marker
 P: Proteinextrakt mit Poolserum inkubiert
 1: Gesamtprotein, Profilinblot

Abb. 4-7: Profilinnachweis (SDS-PAGE: 10 %iges Bis-Tris Gel, MES-Puffer)

Deutlich ist eine Bande im MGB von 14 kDa sichtbar, so dass davon auszugehen ist, dass auch in der Litchi das Profilin vorliegt, was bereits in anderen Organismen nachgewiesen wurde und für Kreuzreaktionen verantwortlich ist. Ob dieses Allergen in Form mehrerer Isoallergene vorliegt, soll nach vorangegangener chromatographischer Trennung untersucht werden.

4.7. Isolierung von Litchiallergenen

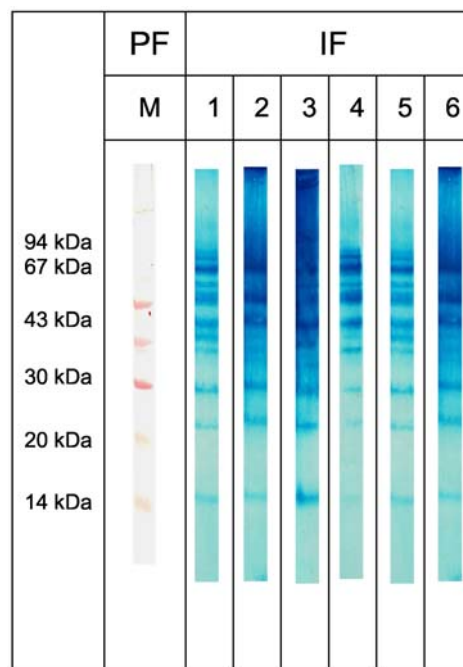
Für die Isolierung von Litchiallergenen werden verschiedene chromatographische Methoden und eine fraktionierte Fällung eingesetzt. Die Methoden der Ammoniumsulfatfällung, GPC, AC, IEC und RPC werden auf ihre Eignung, das vorliegende Proteingemisch zu trennen, untersucht. Nach erfolgter Trennung sollen Allergene in der Weise vorliegen, dass sie für eine Identifizierung eingesetzt werden können. Besonderes Interesse gilt den Allergenen, die von der Mehrheit der Patientenseren detektiert werden, wie z.B. das IgE-bindende Protein mit einem MG von 55 kDa, das im IB von 92 % der Seren detektiert wird.

4.7.1. Ammoniumsulfatfällung

Neben chromatographischen Methoden bietet auch die Methode der fraktionierten Fällung die Möglichkeit, ein Proteingemisch aufzutrennen. Obwohl die Isolierung eines einzelnen Allergens allein auf Grundlage einer fraktionierten Fällung unwahrscheinlich ist, kann aber die Abtrennung einiger Proteine gelingen, die in einem weiteren, z.B. chromatographischen Schritt gereinigt werden können. Ein weiterer Vorteil der Proteinfällung ist die Abtrennung der Zucker, die in den wässrigen und PBS-Extrakten der Litchi enthalten sind und eventuell eine chromatographische Trennung beeinträchtigen.

Um die Eignung der Ammoniumsulfatfällung zur Fraktionierung der Litchiproteine zu untersuchen, wird ein Litchiextrakt mit einer Ammoniumsulfatlösung versetzt. Die Fällung der Proteine erfolgt unter Verwendung eines wässrigen und eines PBS-Extraktes. Dabei werden die Proteinlösungen mit einer gesättigter Ammoniumsulfatlösung versetzt, so dass der Anteil der gesättigten Ammoniumsulfatlösung 40-, 60- und 80 % beträgt.

Nach jedem Fällungsschritt werden die ausgefallenen Proteine durch Zentrifugation abgetrennt. Die so erhaltenen Extrakte werden elektrophoretisch getrennt und silbergefärbt (nicht dargestellt) sowie nach Blotten auf eine NC-Membran immungefärbt. Die Immunfärbung ist in Abb. 4-8 dargestellt. Von dem Überstand der letzten Fällung wird der Proteingehalt nach BRADFORD (1976) bestimmt. Da mit dieser Methode keine Proteine nachgewiesen werden können, ist von einer quantitativen Fällung auszugehen, und der Überstand wird nicht weiter untersucht.



M: MG-Marker	1: Tieftemperaturextraktion, PBS, 40 % (NH ₄) ₂ SO ₄	4: Tieftemperaturextraktion, bidest. Wasser, 40 % (NH ₄) ₂ SO ₄
	2: Tieftemperaturextraktion, PBS, 60 % (NH ₄) ₂ SO ₄	5: Tieftemperaturextraktion, bidest. Wasser, 60 % (NH ₄) ₂ SO ₄
	3: Tieftemperaturextraktion, PBS, 80 % (NH ₄) ₂ SO ₄	6: Tieftemperaturextraktion, bidest. Wasser, 80 % (NH ₄) ₂ SO ₄

Abb. 4-8: Ammoniumsulfatfällung (SDS-PAGE: 10 %iges Bis-Tris Gel, MES-Puffer)

Alle Fraktionen enthalten IgE-bindende Proteine mit MG von ca. 14 bis 94 kDa. Eine Auftrennung ist nicht erkennbar.

Hiermit erweist sich die durchgeführte Fällung nicht geeignet, um das vorliegende Proteingemisch zu fraktionieren.

Für die chromatographische Isolierung von Allergenen werden deshalb wässrige oder PBS-Extrakte ohne vorangegangene Fällung eingesetzt.

4.7.2. GPC

Da die Profilinblot-Untersuchungen den Schluss zulassen, dass ein Profilin, dem starke kreuzreaktive Eigenschaften zugeschrieben werden, in der Litchi vorliegt, soll im Folgenden untersucht werden, ob Epitope des Profilins auch auf anderen Allergenen der Litchi präsent sind. Zu diesem Zweck wird der Gesamtextrakt chromatographisch aufgetrennt und eine Immunoblot-Inhibition durchgeführt.

Da sich das Profilin hinsichtlich seines MG (14 kDa) stark von den anderen Allergenen (ca. 25 - 80 kDa) unterscheidet, erfolgt eine Auftrennung des Extraktes mittels GPC.

Die Trennung wird unter Verwendung des Säulenmaterials Sephacryl™ S 100 mit einem 0.01 M Phosphatpuffer, pH 7.0 mit 0.03 M NaCl in Anlehnung an MÖLLER (1997) und einer UV-photometrischen Detektion bei 280 nm durchgeführt.

Substanzen mit bekanntem MG werden eingesetzt, um die Trennbedingungen zu optimieren und das Trennsystem zu kalibrieren. Ein Chromatogramm eines PBS-Extraktes der Litchi ist in Abb. 4-9 dokumentiert.

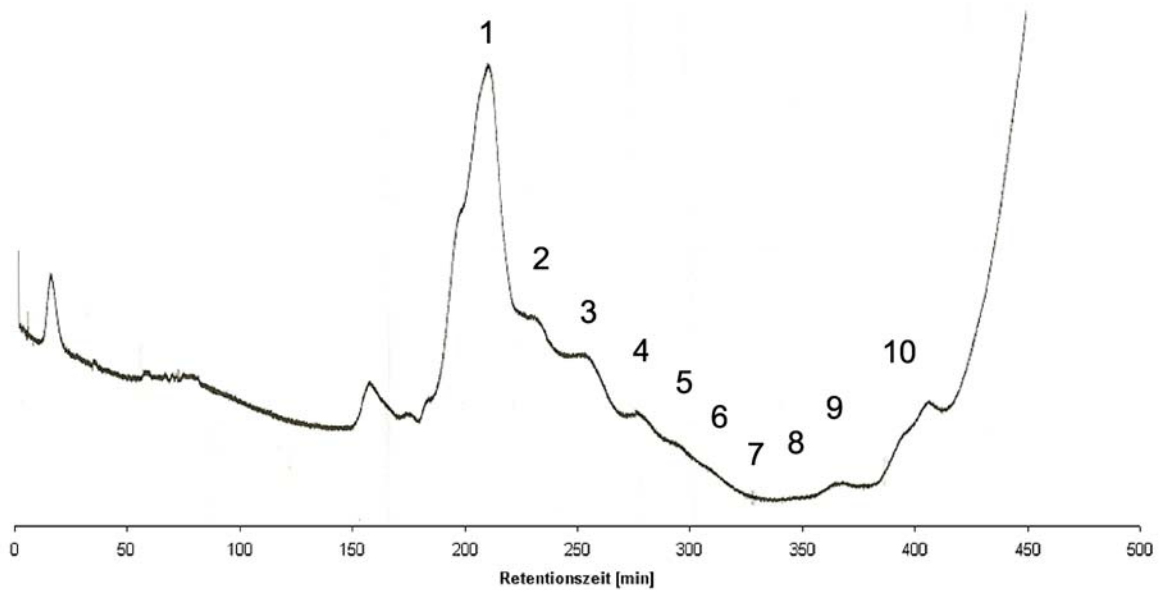


Abb. 4-9: GPC-Chromatogramm eines Litchiextraktes

Die erhaltenen Fraktionen 1 bis 10 werden mit SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung sowie IB untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 4-10 dargestellt und zeigen, dass die Fraktionen 1 bis 5 alle IgE-bindenden Proteine bis auf das Profilin beinhalten.

Die Fraktionen 9 und 10 enthalten das Profilin mit einem MG von ca. 14 kDa sowie geringe Anteile von Begleitproteinen. In den Fraktionen 6 bis 8 sind alle Allergene der Litchi vertreten, das Profilin jedoch nur in Spuren.

Ergebnisse

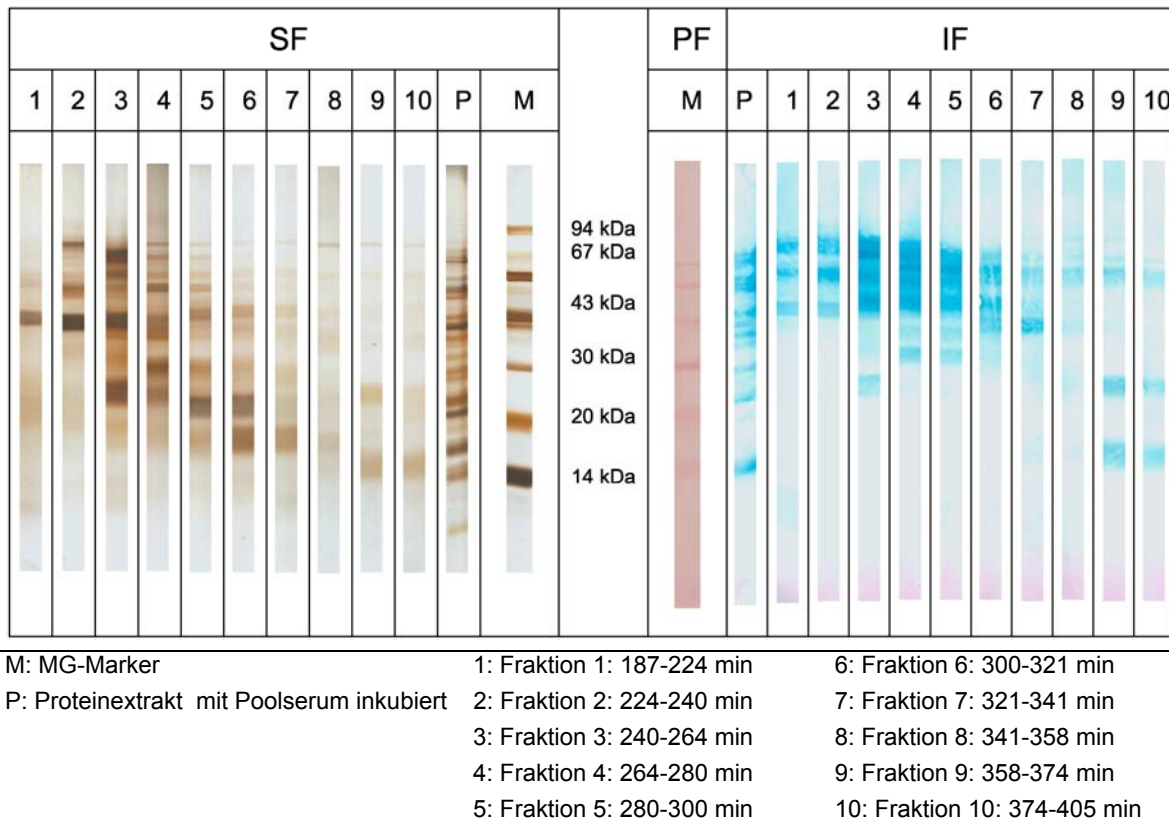
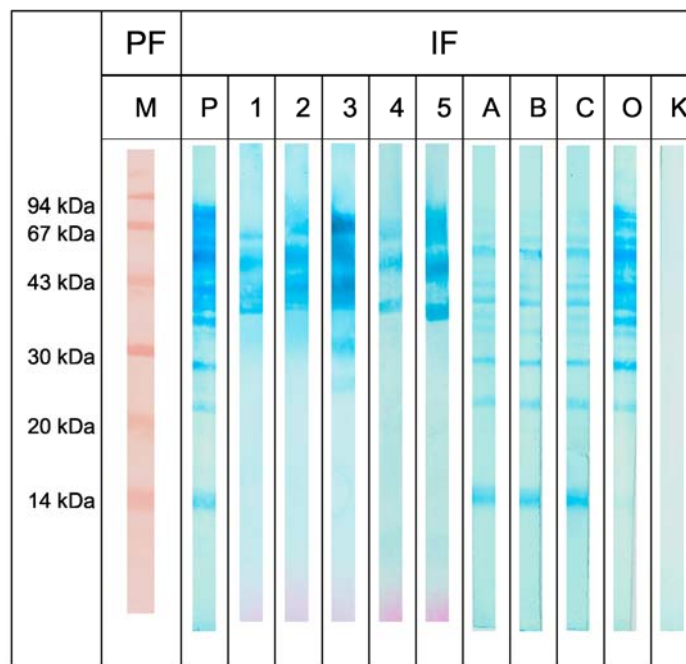


Abb. 4-10: Silberfärbung und IB der GPC-Fractionen eines Litchiextraktes (SDS-PAGE: 10 %iges Bis-Tris Gel, MES-Puffer)

Um eine eventuelle Kreuzreaktivität zwischen dem Profilin und einem der anderen Litchiallergene nachzuweisen, wird der gesamte Litchiextrakt elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine NC-Membran geblottet und freie Bindungsstellen blockiert. Danach wird die Membran mit Serum versetzt, das zuvor mit Inhibitorlösungen in Form der Fraktionen 1 bis 5 inkubiert wurde. Existieren auf den Allergenen der Inhibitorlösung gleiche Epitope wie auf den Allergenen der Festphase, tritt bei der anschließenden Immunfärbung eine Auslöschung bzw. Schwächung der Detektion der entsprechenden IgE-bindenden Proteine auf. Unspezifische Färbungen werden zum einen mit einer Ovalbuminlösung als Inhibitor, zum anderen mit dem Serum eines Nicht-Atopikers ausgeschlossen.

Wie Abb. 4-11 dokumentiert, resultiert die Behandlung der Seren mit den Inhibitorlösungen in einer starken Detektionsminderung der Allergene, die sowohl auf der Festphase als auch in den Inhibitorlösungen eingesetzt werden, nicht aber in einer Schwächung der Detektion des Profilins (Abb. 4-11: A, B und C). Folglich befinden sich die Epitope des Profilins nicht auf anderen Allergenen der Litchi.

Ergebnisse



M: MG-Marker	1: Inhibitorlösung 1 (203-210 min)	5: Inhibitorlösung 5 (240-264 min)
P: Gesamtprotein	2: Inhibitorlösung 2 (220-226 min)	A: Inhibition mit Inhibitor 1 + 2
O: Ovalbumin	3: Inhibitorlösung 3 (244-250 min)	B: Inhibition mit Inhibitor 3
K: Kontrolle	4: Inhibitorlösung 4 (224-240 min)	C: Inhibition mit Inhibitor 4 + 5

Abb. 4-11: Immunoblot-Inhibition mit GPC-Fractionen

Festphase: Litchiextrakt

Inhibitorlösungen: GPC-Fractionen eines Litchiextraktes (angegeben sind die Elutionszeiten der Fractionen)

(SDS-PAGE: 10 %iges Bis-Tris Gel, MES-Puffer)

Das MG des Profilins, das in den GPC-Fractionen 9 und 10 enthalten ist, wird auf Grundlage der gemittelten Retentionszeit durch Vergleich mit den Retentionszeiten der Standardsubstanzen abgeschätzt und kann mit 14 kDa angegeben werden. Dies stimmt mit der Abschätzung auf Basis von Immunoblotuntersuchungen überein.

Die Methode der GPC ist zwar geeignet, Profilin von den anderen IgE-bindenden Proteinen abzutrennen, eine Isolierung anderer Allergene scheint aber aufgrund sehr ähnlicher MG nicht möglich. Deshalb werden andere chromatographische Methoden zur Isolierung der Litchiallergene eingesetzt.

4.7.3. IEC

Eine weitere Möglichkeit zur Fraktionierung eines Proteingemisches stellt die IEC dar. Diese Methode hat den Vorteil, dass sie sehr schonend für die Proteine ist.

4.7.3.1. Anionenaustauschchromatographie

Bei der Charakterisierung der Litchiallergene konnte festgestellt werden, dass viele Allergene einen sauren pI aufweisen. Dies ermöglicht die Trennung der Allergene mit Hilfe der Anionenaustauschchromatographie. Zu diesem Zweck wird die Trennsäule Resource™ Q mit einem 0.02 molaren Tris-HCl-Puffer bei einem konstanten pH-Wert von 8.0 unter Verwendung eines Salzgradienten eingesetzt (s. 7.15.4.1). Die Detektion der Proteine wird UV-photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm vorgenommen. Das chromatographische System wird mit Standardsubstanzen, deren pI bekannt sind, optimiert und kalibriert (s. 7.15.4.1). Ein Chromatogramm des Litchiextraktes ist in Abb. 4-12 dokumentiert (Gradient I).

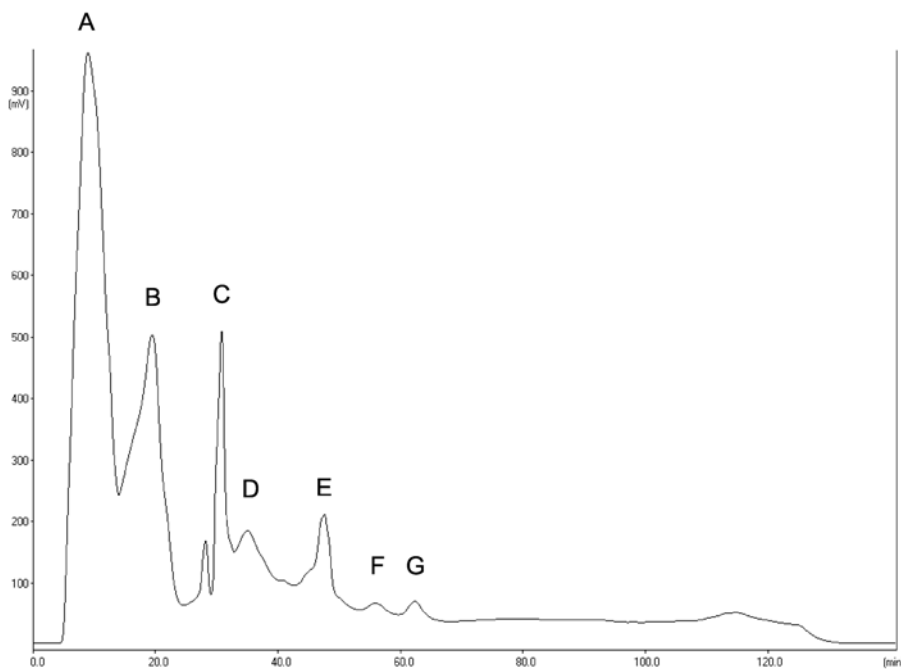


Abb.: 4-12: IEC-Trennung eines Litchiextraktes

Die Substanzen, die bei 280 nm detektiert werden, eluieren innerhalb der ersten 65 min des Chromatographielaufes. Auf Basis der Retentionszeiten der Allergene können durch Vergleich mit Retentionszeiten von Standardsubstanzen die pI der Allergene abgeschätzt werden. Auffällig ist, dass viele Substanzen sehr früh (4.6 - 13.8 min) eluieren und nicht

retardiert werden. Dabei handelt es sich um basische Proteine oder andere UV-aktive Inhaltstoffe der Litchi, die von diesem Chromatographiesystem nicht retardiert werden. Die Proteine werden entsprechend Abb. 4-12 fraktioniert und mittels SDS-PAGE und IB untersucht (s. 4-13).

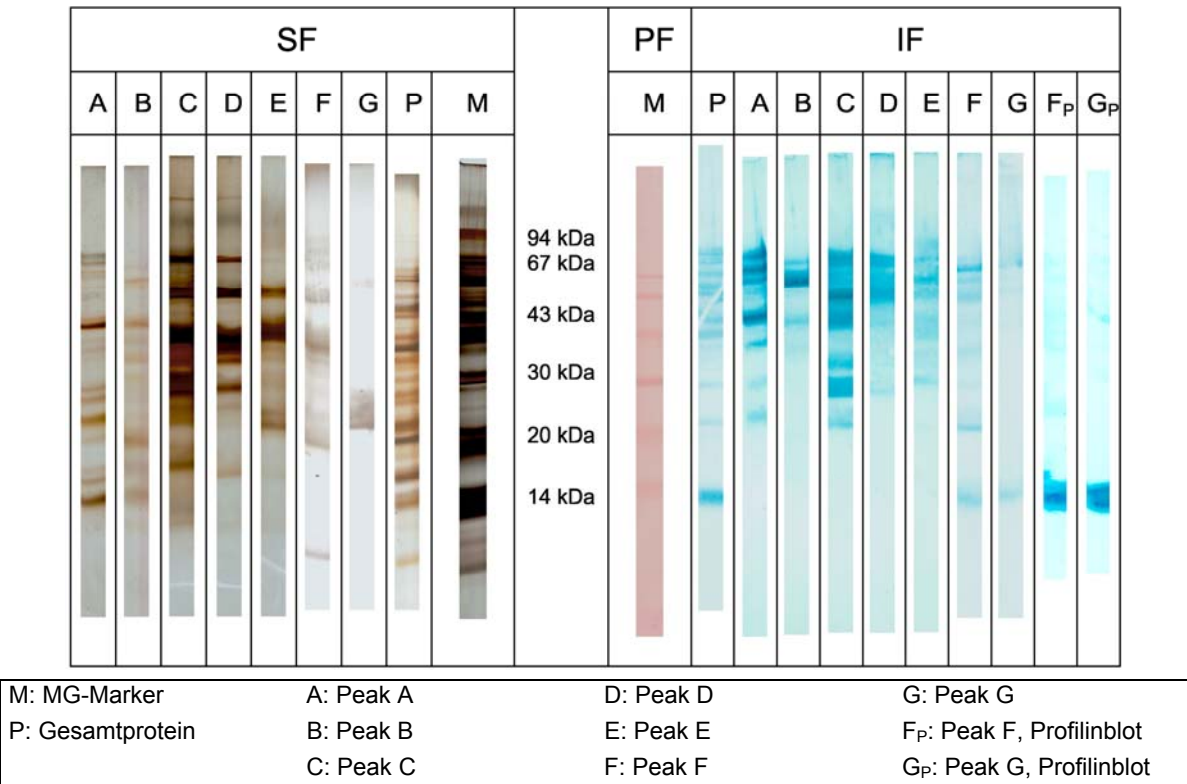


Abb. 4-13: Silberfärbung und IB der IEC-Fraktionen eines Litchiextraktes
(SDS-PAGE: 10 %iges Bis-Tris Gel, MES-Puffer)

Die Silberfärbung der Proteine (Abb 4-13) verdeutlicht, dass in allen Fraktionen mehr als ein Protein vorliegt. In Fraktion A sind zahlreiche Proteinbanden erkennbar. Am stärksten werden Proteine mit MG von 10, 23 und 40 kDa angefärbt. Außerdem werden Proteine im MGB von 10 bis 94 kDa schwach detektiert.

Der IB dieser Fraktion weist IgE-bindende Proteine im MGB von 25, 28, 40 und 43 kDa nach. Außerdem sind nicht diskret getrennte Banden im Bereich von 67 bis 94 kDa erkennbar. Diese Proteine werden aufgrund ihres basischen pI, der ca. 7.2 beträgt, nicht von der Säule retardiert.

Die unspezifische Färbung der Fraktion B zeigt Proteine mit MG von 10 bis 70 kDa. Dabei werden diskrete Banden im Bereich von 10, 20, 35, 40 kDa detektiert. Das Allergenspektrum belegt das Vorliegen von Allergenen mit MG von 35, 43, 60 und 65 kDa. Die Proteine dieser Fraktion besitzen einen pI von ca. 6.5.

Auffällig ist, dass in Fraktion C neben schwach angefärbten Proteinen mit MG von ca. 18, 65 und 70 kDa Proteine mit MG von ca. 25, 28, 32 und 55 kDa sehr stark detektiert werden. Alle Proteine anderer Fraktionen werden weniger intensiv angefärbt. Diese Proteine werden mit Ausnahme der 18 und 70 kDa Proteine unter Verwendung von

Patientenseren als Allergene identifiziert. Der pI der Proteine kann mit ca. 5.8 angegeben werden.

Das Protein- und Allergenspektrum der vierten Fraktion, deren Proteine einen pI von 5.6 aufweisen, gleicht in ihrer Zusammensetzung der vorherigen Fraktion, die Färbung ist aber sehr viel schwächer.

Fraktion E enthält Proteine mit MG von 22, 40 und 50 kDa. Der geschätzte pI der Proteine beträgt ca. 4.8. Allergene dieser Fraktion weisen MG von 28, 40, 55 und 65 kDa auf. Die Fraktionen F und G beinhalten nur sehr wenige und schwach detektierte Proteine mit MG von 5 bis 50 kDa. Interessant ist aber, dass in diesen Fraktionen mittels IB jeweils ein IgE-bindendes Protein mit einem MG von 14 kDa nachgewiesen werden kann. Daneben liegen in Fraktion F Allergene mit MG von 25, 65 und 70 kDa vor. Die letzte Fraktion enthält außerdem ein 70 kDa Allergen.

Ob es sich bei den 14 kDa Allergenen der Fraktionen F und G um Profiline handelt, wird mittels Profilinblot untersucht. Der in Abb 4-13 dargestellte Blot zeigt, dass diese Allergene auch unter Verwendung eines Anti-Birnenprofilin-Antikörpers angefärbt werden können. Die beiden 14 kDa Allergene mit unterschiedlichen pI von ca. 4.3 und 3.9, die sich aus einer ungleichen Retentionszeit ergeben, sind Profiline. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass das Profilin der Litchi in zwei Isoformen vorliegt.

Ziel der Trennung ist, Allergene der Litchi in der Weise von Begleitproteinen oder anderen Allergenen abzutrennen, dass sie für eine Identifizierung eingesetzt werden können.

Fraktion B enthält IgE-bindende Proteine mit MG von 35, 43, 60 und 65 kDa. Sie können aber nach dieser chromatographischen Trennung nicht identifiziert werden, da zu viele Begleitsubstanzen eine eindeutige Bestimmung unmöglich machen. Deshalb soll die Fraktion B in einem zweiten chromatographischen Schritt an einer Umkehrphase weiter aufgetrennt werden (siehe 4.7.5).

Die in Fraktion C enthaltenen Allergene sind von großem Interesse, da sie von vielen Patientenseren detektiert werden. Das 55 kDa Allergen liegt in dieser Fraktion hinreichend abgetrennt von Begleitproteinen vor, so dass es nach elektrophoretischer Trennung und Blotten auf PVDF-Membran mit CBB angefärbt und für die Bestimmung seiner N-terminalen Sequenz eingesetzt wird.

Die anderen Allergene dieser Fraktion sollen durch eine weitere IEC-Trennung von einander separiert werden. Für eine erfolgreiche Aufreinigung bzw. Identifizierung müssen die Fraktionen mehrerer Chromatographieläufe vereinigt werden, damit eine hinreichend große Proteinmenge gewonnen werden kann. Um dies in möglichst kurzer Zeit zu erreichen, wird der Chromatographielauf von 140 auf 65 min verkürzt (Chromatographiebedingungen siehe Anhang 7.15.4.1, Gradient II). Die Zusammensetzung der Fraktion C ändert sich dabei nicht. Es erfolgt aber keine Trennung später eluierender Proteine.

Um die gepoolten Proteine der Fraktion C weiter aufzutrennen, werden sie erneut mit derselben Chromatographiesäule aber einem anderen Salzgradienten (s. 7.15.4.1, Gradient III) eluiert. Bei diesem Gradienten wird durch einen langsameren Anstieg des Salzgehaltes eine bessere Auftrennung erzielt. Der Extrakt wird entsprechend Abb. 4-14 fraktioniert und nach elektrophoretischer Trennung mittels IB untersucht sowie auf eine PVDF-Membran transferiert und mit CBB unspezifisch angefärbt. Die resultierende Fraktionierung ist in Abb. 4-15 dargestellt.

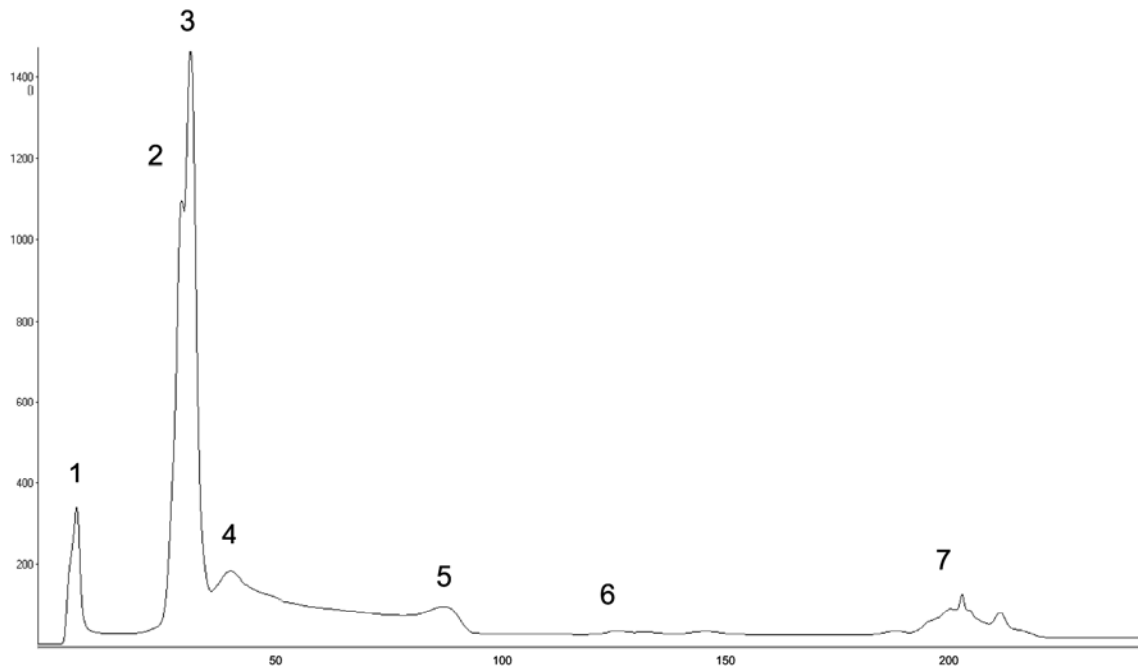
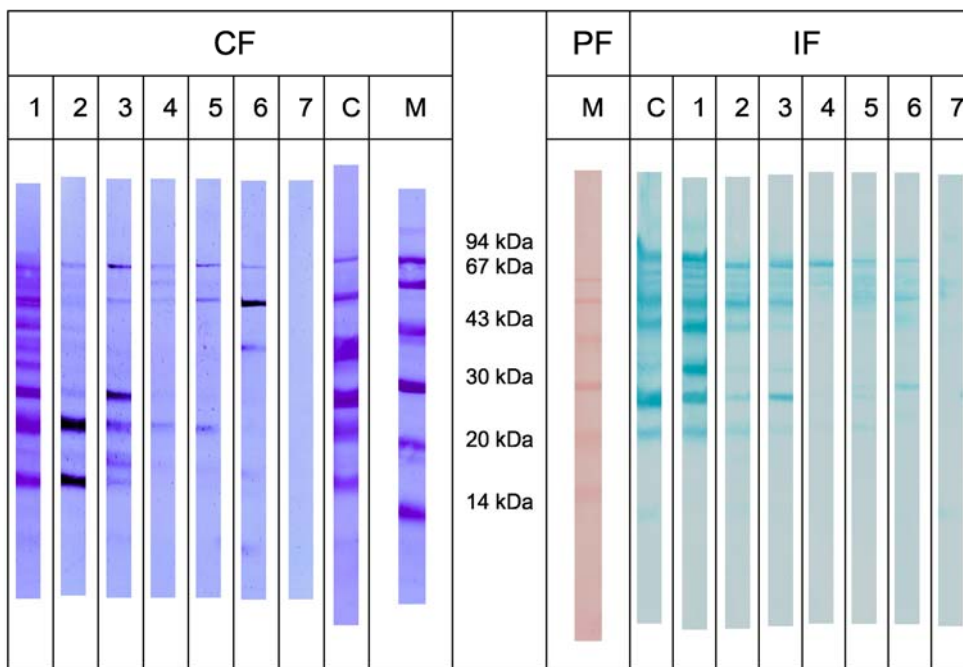


Abb. 4-14: IEC-Chromatogramm der Auftrennung von Peak C

Das Chromatogramm der zweiten IEC-Trennung verdeutlicht eine Auftrennung der eingesetzten Proteine. Sie werden entsprechend der 7 Peaks fraktioniert. Von besonderer Bedeutung sind die ersten drei Peaks, da sie den größten Teil der Proteine repräsentieren. Die unspezifische Färbung (Abb. 4-15) bestätigt die Auftrennung der Proteine der Fraktion C.

Fraktion 1 enthält Proteine mit MG von 18, 25, 28 und 32 kDa. Daneben werden nicht diskret getrennte Proteine im MGB von 40 bis 70 kDa angefärbt. Die Immunfärbung weist die Proteine mit MG von 25, 28 und 32 kDa als Allergene aus. Weitere Allergene werden im MGB von 40 bis 70 kDa als nicht diskret getrennte Banden visualisiert. Das Proteinspektrum der zweiten Fraktion beinhaltet ebenfalls Proteine mit MG von 18 und 25 kDa. Sehr schwach werden außerdem Proteine im MGB von 28, 65 und 70 kDa nachgewiesen. Das Allergenspektrum dieser Fraktion weist eine Bande im MGB von 25 kDa sowie mehrere Banden im Bereich von 40 bis 70 kDa auf. Im MGB von 28 kDa ist eine Bande sehr schwach angefärbt.



M: MG-Marker	1: Peak 1	5: Peak 5
CF: CBB-Färbung	2: Peak 2	6: Peak 6
	3: Peak 3	7: Peak 7
	4: Peak 4	C: Peak C, 1. IEC-Trennung

Abb. 4-15: CBB gefärbter Blot und IB der IEC-Fraktionierung von Peak C (SDS-PAGE: 10 %iges Bis-Tris Gel, MES-Puffer)

Der dritte und größte Peak des Chromatogramms repräsentiert Proteine mit MG von 18, 25, 28, 65 und 70 kDa. In dieser Fraktion werden dieselben Allergene nachgewiesen wie in den vorangegangenen Fraktionen. Lediglich das 28 kDa Allergen ist in diesem Fall stärker angefärbt.

Im IB der Fraktionen 4 bis 7 sind nur wenige IgE-bindende Proteine nachweisbar. Sie sind nicht von Interesse, da ihre Detektion so schwach ist, dass davon auszugehen ist, dass sie als Allergen eine untergeordnete Rolle spielen.

Besonders auffällig ist, dass die Allergene mit MG von 25 und 28 kDa in mehreren Fraktionen nachgewiesen werden. Ein 25 kDa Allergen wird in den ersten drei Fraktionen visualisiert während IgE-bindende Proteine mit MG von 28 kDa in Fraktion 1 und 3 deutlich erkennbar sind. Ob es sich bei diesen Allergenen mit gleichem MG aber unterschiedlichem *pI* um Isoallergene handelt, soll eine Sequenzanalyse klären. Des Weiteren wird das 32 kDa Allergen im IB der ersten Fraktion nachgewiesen. Auch dieses Protein wird mittels Edman-Abbau untersucht. Die *pI* der Allergene in den Fraktionen 1 bis 3 betragen ca. 7.37, 7.01 und 7.04.

Die erfolgte Trennung ermöglicht es, die IgE-bindenden Proteine mit MG von 25, 28 und 32 kDa für eine N-terminale Sequenzierung einzusetzen.

4.7.3.2. Kationenaustauschchromatographie

Bei der Anionenaustauschchromatographie zeigte sich, dass einige Allergene der Litchi von der verwendeten Chromatographiesäule nicht retardiert werden. Diese Allergene eignen sich aufgrund ihres basischen pI für die Trennung mit einer Kationenaustauschersäule.

Deshalb wird eine weitere Fraktionierung mit der Kationenaustauschersäule Resource™ S vorgenommen. Für die Elution werden verschiedene Pufferzusammensetzungen und pH-Werte sowie unterschiedliche NaCl-Gradienten eingesetzt. Die Detektion erfolgt UV-photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm. Die Chromatographiebedingungen werden unter Verwendung des Gesamtextraktes der Litchi optimiert.

Dabei werden Natriumhydrogenphosphat-, Tris-HCl- und ein Citratpuffer eingesetzt. Bei allen Systemen werden pH-Wert sowie Ionenstärke des Start- und Elutionspuffers variiert. Die beste Trennung konnte mit einem Citratpuffer bei konstantem pH-Wert von 3.0 erreicht werden. Die Ionenstärke des Startpuffers wurde mit 0.01 mol/l so gering wie möglich gewählt und die Elution der Proteine mit einem NaCl-Gradienten von 0 bis 0.175 mol/l durchgeführt (Durchführung s. Anhang 7.15.4.2). In Abb. 4-16 ist ein Chromatogramm des Litchiextraktes dargestellt. Es sind deutlich fünf von einander getrennte Peaks zu erkennen.

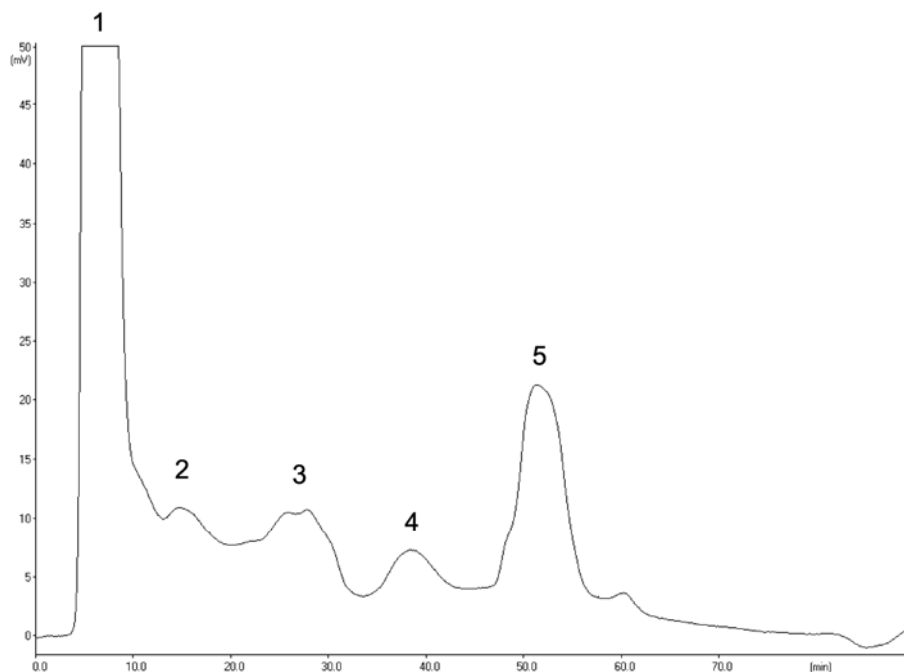


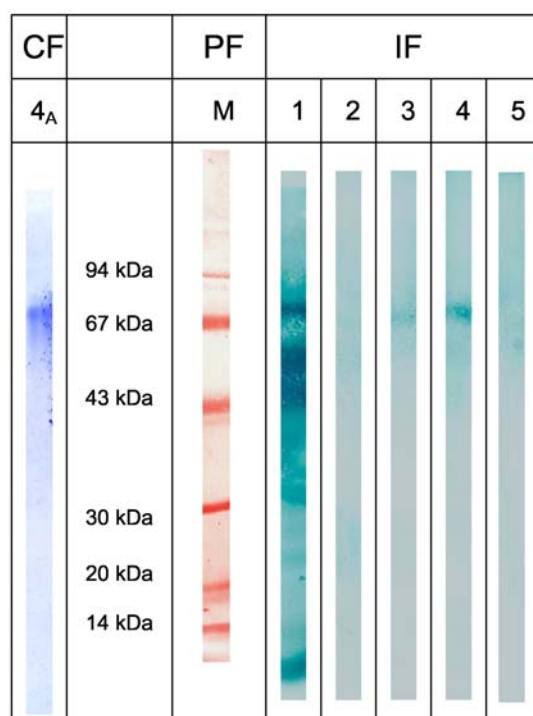
Abb. 4-16: Kationenaustauschchromatographie: Chromatogramm eines Litchiextraktes

Die Proteine werden entsprechend Abb. 4-16 fraktioniert und mittels IB untersucht. Der überwiegende Teil der Litchiallergene des Gesamtextraktes eluiert trotz der geringen Ionenstärke des Startpuffers im Totvolumen des Chromatographiesystems. In den

Ergebnisse

Fraktionen 2, 3 und 5 können mittels IB keine Allergene nachgewiesen werden. Auffällig ist aber eine einzelne diskrete Bande in Fraktion 4. Dabei handelt es sich um ein 70 kDa Allergen. Da es im IB und Silbergel (nicht abgebildet) nur sehr schwach angefärbt wird, ist davon auszugehen, dass es nur einen sehr geringen Anteil am Gesamtprotein der Litchi darstellt. Deshalb werden die Proteine mit basischem pI, die in der Totzeit der Anionenaustauschchromatographie eluieren, gepoolt, dialysiert und mit Hilfe der Kationenaustauschchromatographie aufgetrennt. Das 70 kDa Allergen wird so isoliert und nach Blotten auf eine PVDF-Membran mit CBB angefärbt (Abb. 4-17). Die Trennbedingungen sind gut auf die Isolierung des Allergens aus dem Proteingemisch des Totvolumens der Anionentauschersäule anwendbar. Nach erfolgter Aufreinigung mit zwei chromatographischen Systemen liegt ein isoliertes Allergen vor.

Es zeigt sich aber, dass das Allergen in sehr geringer Konzentration im Ausgangsmaterial vorliegt und die Aufarbeitung verlustreich ist. Trotz vorangestellter Konzentrierung mittels Anionenaustauschchromatographie reicht die Proteinmenge nicht für eine Identifizierung aus.



M: MG-Marker	1: Peak 1 2: Peak 2	3: Peak 3 4: Peak 4	5: Peak 5 4 _A : Peak 4 aus Fraktion A
--------------	------------------------	------------------------	---

Abb. 4-17: : CBB gefärbter Blot und IB von Fraktionen der Kationenaustauschchromatographie (SDS-PAGE: 10 %iges Bis-Tris Gel, MES-Puffer)

4.7.3.3. AC / IEC

Mit Hilfe des Lectinblots konnte festgestellt werden, dass zahlreiche Glycoproteine in der Litchi vorliegen. Da es wahrscheinlich ist, dass es sich bei einigen Allergenen um Glycoproteine handelt, wird die spezifische Bindung der Lectine an bestimmte Zucker bei der AC ausgenutzt, um Glycoproteine aus dem Litchiextrakt zu isolieren.

Der Lectinblot zeigt, dass viele Glycoproteine α -D-Mannose oder α -D-Glucose sowie α -L-Fucose enthalten. Eine Isolierung mit Lectinen dieser Spezifität erscheint nicht sinnvoll, da auf diese Weise kein einzelnes Glycoprotein, sondern eine Vielzahl vom Lectin retardiert werden. Auch ein Lectin, das D-Galactose bindet, kann nicht eingesetzt werden, da dieser Zucker in den Litchiproteinen nicht nachgewiesen werden konnte. Auffällig ist jedoch, dass nur vier Litchiproteine N-Acetylglucosamin-Strukturen beinhalten.

Da mit dem Lectin WGA, das spezifisch N-Acetylglucosamin bindet, die beste Selektion der Litchiproteine erreicht werden kann, wird es für die affinitätschromatographische Trennung eingesetzt. Das WGA liegt dabei festphasengebunden vor.

Da die Anwesenheit von Zuckern die AC stören kann, wird der Litchiextrakt zunächst mit Hilfe der GPC entsprechend 7.15.2 aufgetrennt. Dabei wird der Zeitraum, in dem die Proteine eluieren, aufgefangen und somit die Zucker, die auf Grund ihrer geringeren Molekülgröße später von der Säule eluieren, abgetrennt. Nach Dialyse und Konzentrierung durch Gefriertrocknung wird die erhaltene Lösung für die affinitätschromatographische Trennung eingesetzt. Die Elutionsfraktion der AC wird erneut dialysiert und weiter mittels IEC (Chromatographiebedingungen 7.15.4.1, Gradient I, Abb. 4-18) aufgetrennt. Dieser weitere Aufreinigungsschritt wird vorgenommen, da der Lectinblot gezeigt hat, dass jeweils zwei der vier Glycoproteine, die diese Zuckerstruktur aufweisen, ähnliche MG von ca. 40 und 43 sowie 65 und 70 kDa aufweisen und somit nach elektrophoretischer Trennung und Blotten auf eine PVDF-Membran nicht ohne Verunreinigung durch ein anderes Protein ausgeschnitten werden können, um sie z.B. für eine N-terminale Sequenzierung einzusetzen.

Das IEC-Chromatogramm ist in Abb. 4-18 dargestellt. Dabei kommt dem ersten Peak (Peak 1) die größte Bedeutung zu, da er den größten Teil der Proteine repräsentiert. Im weiteren Verlauf des Chromatogrammes sind keine diskret getrennten Proteine zu erkennen.

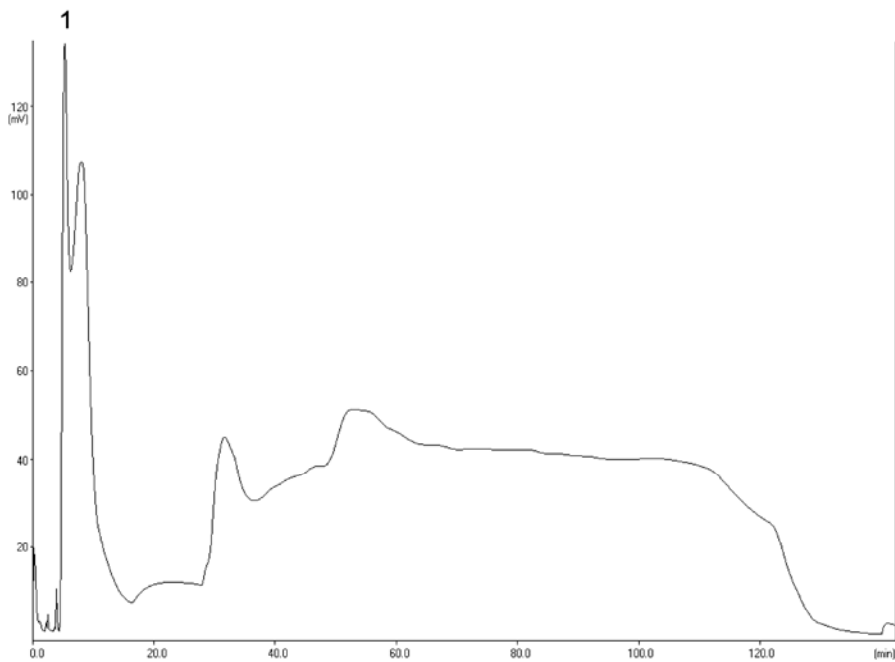
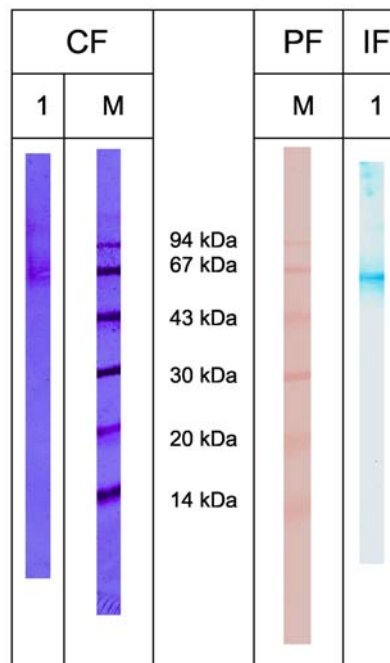


Abb. 4-18: IEC-Trennung der AC-Elutionsfraktion

Die IEC-Fraktion 1 wird nach elektrophoretischer Trennung auf eine PVDF-Membran geblottet und mit CBB angefärbt. Außerdem wird der Extrakt mit Hilfe des Immunoblots auf IgE-bindende Proteine untersucht. Abb. 4-19 stellt die Ergebnisse dar.



M: MG-Marker

1: Peak 1

Abb. 4-19: CBB gefärbter Blot und IB der IEC-Fractionen (SDS-PAGE: 10 %iges Bis-Tris Gel, MES-Puffer)

Peak 1 des Chromatogrammes repräsentiert ein 65 kDa Allergen. Es kann mittels IB eindeutig detektiert werden. Nach CBB-Färbung ist eine einzelne Proteinbande erkennbar.

Mit Hilfe dieser Kaskade verschiedener Trenn- und Aufreinigungsschritte ist es möglich, ein Allergen der Litchi mit einem MG von 65 kDa zu isolieren. Dieses wird einer N-terminalen Sequenzierung unterworfen.

4.7.3.4. RPC / IEC

Obwohl die Trennung an einer Anionenaustauschersäule gute Ergebnisse liefert, können einige Allergene nicht für eine Identifizierung eingesetzt werden, da Begleitproteine oder andere Allergene nicht hinreichend abgetrennt sind.

Deshalb wird die Proteinfraction B der IEC, die Allergene mit MG von 35, 43, 60 und 65 kDa enthält, dialysiert, um störende Salze zu entfernen und daraufhin mit Hilfe der RPC weiter gereinigt.

Die Aufreinigung wird mit dem Säulenmaterial Source™ 15 RPC und einem TFA/Acetonitril-Gradienten (s. Anhang 7.15.5) durchgeführt. Die Proteine werden UV-photometrisch bei 280 nm detektiert. Das Chromatogramm ist in Abb. 4-20 dargestellt.

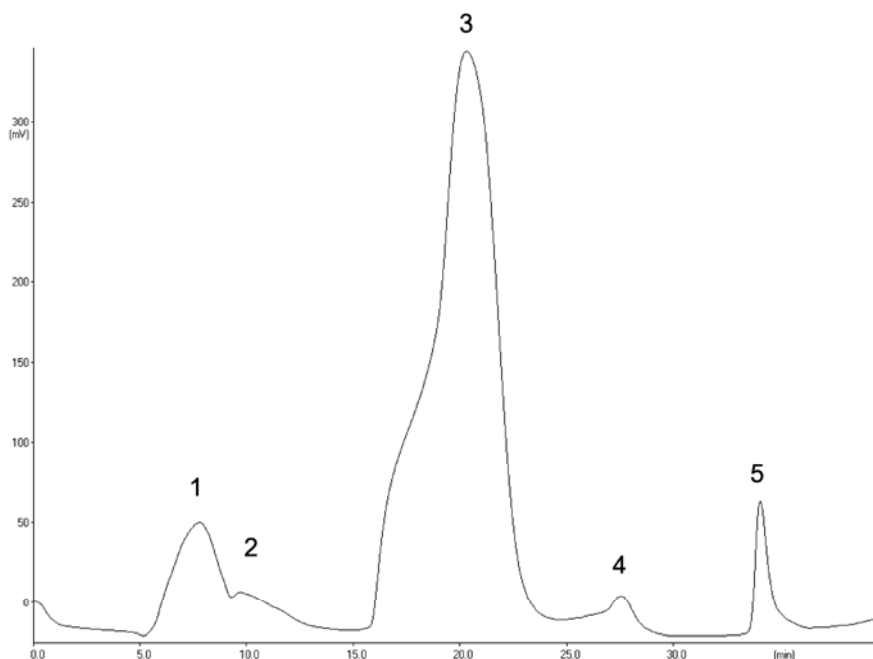
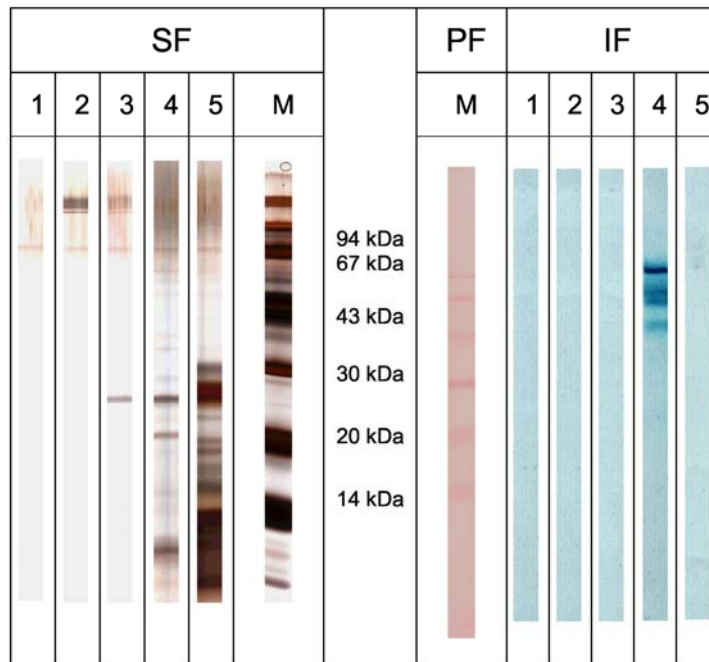


Abb. 4-20: Chromatogramm der RPC

Es ist zu erkennen, dass die meisten Proteine in Peak 3 von der Säule eluieren. Dieser Peak dominiert das Chromatogramm; die anderen vier Peaks sind deutlich kleiner.

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine werden silbergefärbt und auch mittels IB untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 4-21 festgehalten.



M: MG-Marker	1: Peak 1	3: Peak 3	5: Peak 5
	2: Peak 2	4: Peak 4	

Abb. 4-21: Silberfärbung und IB nach RPC-Trennung der IEC-Fraktion B (SDS-PAGE: 10 %iges Bis-Tris Gel, MES-Puffer)

Die Silberfärbung der entsprechend der Peaks fraktionierten Proteine zeigt eine deutliche Auftrennung. Die Fraktionen 1 bis 3 enthalten nur wenige Proteine. In den Fraktionen 4 und 5 dagegen sind Proteinbanden im MGB von ca. 5 bis 70 kDa erkennbar. Die Immunoblotanalyse zeigt, dass sich alle Allergene der Fraktion B in der vierten Fraktion der RPC befinden. Trotz der Abtrennung von zahlreichen nicht allergenen Proteinen liegen die Allergene der Fraktion 4 nicht rein genug vor, um eine Identifizierung durchzuführen. Auch Variationen des Gradientensystems führen nicht zu einer besseren Trennung. Die verwendete RPC eignet sich nicht für das vorliegende Trennproblem und wird nicht weiter eingesetzt.

4.8. Identifizierung von Allergenen

Die Identifizierung von Proteinen, in diesem Fall von Allergenen, kann z.B. durch Edman-Abbau erfolgen. Die dabei erhaltene N-terminale Sequenz kann mit Sequenzen bekannter Proteine verglichen werden. Eine andere Möglichkeit ist die Bestimmung des PMF. Dabei wird das zu untersuchende Allergen mit Enzymen spezifisch gespalten und die charakteristischen Fragmente mittels MALDI-TOF vermessen. Ein Datenbankvergleich ermöglicht eine Identifizierung. Mit einem MALDI-TOF/TOF können einzelne Peptide, die

durch enzymatische Spaltung entstanden sind, sequenziert werden, um für eine datenbankunterstützte Identifizierung eingesetzt zu werden.

4.8.1. N-terminale Sequenzierung

Durch IEC konnten einzelne Allergene von Begleitproteinen und anderen Allergenen isoliert werden, um nach elektrophoretischer Trennung, Blotten auf PVDF-Membran und Detektion mit CBB für die Bestimmung der N-terminalen Sequenz eingesetzt zu werden.

Für diese Untersuchung wurde eine Proteinmenge von 35 mg (ca. 42 g essbarer Anteil der Litchi) in Form von wässrigen Auszügen in 48 IEC-Chromatographieläufen (Gradient II) getrennt und Fraktion C gepoolt. Die vereinigten und entsalzten Fraktionen wurden ein weiteres mal aufgetrennt (Gradient III). Die IgE-bindenden Proteine mit MG von 25, 28 und 32 kDa wurden einem Edman-Abbau unterworfen. Dabei wurden verschiedene Fraktionen der zweiten IEC-Trennung verwendet. Proteinbanden im MGB von 25 kDa wurden aus den Fraktionen 1, 2 und 3 (pI: 7.37, 7.04 und 7.01) ausgeschnitten, das 28 kDa Allergen wurde aus den Fraktionen 1 und 3 (pI: 7.37 und 7.01) und das 32 kDa Allergen aus Fraktion 1 (pI: 7.37) extrahiert.

Für die Untersuchung des 55 kDa Allergens wurde die Proteinbande der Fraktion C eingesetzt (entspricht 23.6 mg Gesamtprotein).

Des Weiteren wird das mittels AC isolierte Allergen mit einem MG von 65 kDa analysiert.

Die erhaltenen N-terminalen Sequenzen sind in Tab. 4-3 dokumentiert. Die IgE-bindenden Proteine mit MG von 25 und 28 kDa sind in mehreren IEC-Fraktionen enthalten. Sie besitzen also dasselbe MG aber unterschiedlichen pI. Die Sequenzen sind bei allen Allergenen eines MG gleich. Diese Information weist darauf hin, dass es sich bei den verschiedenen Allergenen eines MG um Isoallergene handelt.

Die N-terminalen Sequenzen der Litchiallergene werden mit Sequenzen bekannter Proteine verglichen. Das 25 kDa Allergen zeigt eine starke Homologie (68 %) mit dem NtPRp27-like Protein der Kartoffel. Eine große Übereinstimmung des 28 kDa Allergens tritt bei Triosephosphat-Isomerasen verschiedener Herkunft, z.B. bei der cytosolischen Triosephosphat-Isomerase der Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.), auf. Auf Grundlage von 13 bestimmten Aminosäuren kann von einer 85 %igen Homologie ausgegangen werden. Das 32 kDa Allergen wurde nur in einer IEC-Fraktion nachgewiesen. Seine N-terminale Sequenz stimmt zu 67 % mit der eines Proteins aus der Acker-Schmalwand überein. Dabei handelt es sich um ein Quinon-Reduktase-Homolog.

Tab. 4-3: N-terminale Sequenzen

Allergen	Sequenz
25, IEC2-F1	¹ V D Y V ⁵ V T N Q A ¹⁰ E T T P
25, IEC2-F2	¹ V D Y V ⁵ V T N Q A ¹⁰ E T T P -- ²² I (Q/G) A ²⁵ G Y A Q Q ³⁰ T L (D/I) A
25, IEC2-F3	¹ V D Y V ⁵ V T N Q A ¹⁰ E
	NtPRp27-like Protein ²⁴ V D Y S V T N T A A N T P --- ⁴⁵ I G A Q Y S Q Q T L V A
28, IEC2-F1	¹ A R K F ⁵ F / I V G G N ¹⁰ W K X N
28, IEC2-F3	¹ A R K F ⁵ F / I V G G N ¹⁰ W K X N
	Triosephosphat-Isomerase ² A R K F F V G G N W K C N
32, IEC2-F1	¹ (M) K A V ⁵ V I M S P ¹⁰ G X P E V ¹⁵ L
	Quinon-Reduktase-Homolog ¹ M K A I V I S E P G K P E V L
55, IEC1-FC	keine Sequenz
65	keine Sequenz

Die Allergene mit MG von 55 und 65 kDa konnten nicht sequenziert werden. Dieser Umstand kann durch das eventuelle Vorliegen einer natürlichen Blockierung des Proteins erklärt werden. Eine Blockierung infolge der Aufarbeitung der Proteine für den Edman-Abbau ist sehr unwahrscheinlich, da alle Allergene gleich behandelt wurden. Da besonders das 55 kDa Allergen von großer Bedeutung ist, soll die Identifizierung mit einer weiteren Methode erfolgen.

4.8.2. Bestimmung des PMF mittels MALDI-TOF

Neben der N-terminalen Sequenzierung bietet die Bestimmung des PMF eine weitere Möglichkeit Proteine zu identifizieren. Bei dieser Methode wird das Allergen mit einem Enzym spezifisch gespalten und die Fragmente mittels MALDI-TOF vermessen. Der für jedes Protein charakteristische PMF ermöglicht die Identifizierung eines Allergens durch Datenbankvergleich mit Proteinen bekannter Struktur.

Aufgrund der Tatsache, dass in der Literatur eine Vielzahl verschiedener Aufreinigungsschritte und Verfahrensmöglichkeiten bei der Spaltung des Allergens sowie der Aufarbeitung der entstandenen Peptide dokumentiert sind, erfolgt eine Optimierung der Analysenbedingungen unter Verwendung von BSA. Nach gelungener Vermessung des Standardproteins wird das isolierte 28 kDa Allergen, das von 67 % der verwendeten Patientenserum detektiert wird, für die Bestimmung eingesetzt. So soll die durch Edman-Abbau ermittelte N-terminale Sequenz bestätigt werden.

Die in der Literatur beschriebenen Methoden zur Verdauung im Gel variieren stark. So werden verschiedene Färbemethoden und Enzyme eingesetzt. Auch die angegebenen Inkubationszeiten und der Salzgehalt der Verdauungspuffer sind unterschiedlich.

Aus diesem Grund wurden die Parameter der in-vitro Verdauung unter Verwendung von BSA als Standardsubstanz optimiert. Dazu wurde eine SDS-PAGE mit BSA durchgeführt und das Protein unspezifisch und reversibel angefärbt. Da das Protein vor dem Verdau entfärbt werden muss, werden zwei verschiedene Färbemethoden, die beide CBB beinhalten, eingesetzt, um ihre Eignung zu überprüfen.

Die CBB-Färbung nach ROSENFELD et al. (1992) sieht eine 20minütige Inkubation mit Färbelösung vor. Diese Zeit reichte aber nicht aus, um die Litchiproteine der IEC-Fraktion anzufärben. Da selbst eine Inkubation über Nacht nicht das gewünschte Ergebnis lieferte, wurde nach FLING und GREGERSON (1986) angefärbt, da diese Methode bereits in kurzer Zeit zu einer Detektion der Banden führte. Die Entfärbung der ausgeschnittenen Gelfragmente erfolgte aber nach ROSENFELD et al. (1992) mit 30 % Methanol.

Der Zeitraum zwischen SDS-PAGE und Verdau der Probe bzw. Gefriertrocknen wird so gering wie möglich gehalten um Proteinverluste zu vermeiden. Die entfärbte Proteinbande wird dann für den Verdau im Gel eingesetzt.

Als Verdauungsenzym wird Trypsin gewählt, weil diese Protease Proteine in kleine Fragmente spaltet, die gut massenspektrometrisch vermessen werden können. Der Verdau wurde nach SANDER et al. (2001) über Nacht durchgeführt, um eine vollständige Spaltung zu erreichen. Dabei wurden Salzgehalte von 50 und 200 mM Ammoniumcarbonat verwendet.

Der Einsatz von 200 mM Ammoniumcarbonat im Verdaupuffer ohne anschließende Entsalzung macht ein Vermessen der Probe unmöglich. Zu beobachten ist auch die Verfärbung der Probe nach Zusatz der Matrix α -4-Hydroxy-Cyano-Zimtsäure. Bei Puffern mit einem Ammoniumcarbonatgehalt von 50 mmol/l können die Peptide des BSA ohne Auftreten einer Verfärbung bei Zugabe der Matrix vermessen und eindeutig dem BSA zugeordnet werden.

Die ermittelten Methodenparameter wurden eingesetzt, um das 28 kDa Allergen zu untersuchen. Dazu wurde der Litchiextrakt wie beschrieben mittels Anionenaustauschchromatographie aufgetrennt. Es wurde eine Proteinmenge von 32.2 mg, was ca. 39 g essbarem Anteil der Litchi entspricht, in 46 Chromatographieläufen aufgetrennt. Eine zweite IEC-Trennung erfolgte nicht, da die Isolierung der Isoallergene für die Bestimmung des PMF nicht erforderlich ist. Die Proteine der Fraktion C wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mittels CBB angefärbt. Die Proteinbande wurde ausgeschnitten, entfärbt und im Gel mit Trypsin verdaut. Vor der Messung wurde die Probe zusätzlich mit ZipTips entsalzen, um Störungen durch Salze ausschließen zu können, mit der Matrix versetzt und das Gemisch auf das Target aufgetragen. Das Spektrum ist in Abb. 4-22 dargestellt.

Der Datenbankvergleich führte zu dem Ergebnis, dass es sich bei dem 28 kDa Allergen der Litchi um eine Triosephosphat-Isomerase handelt.

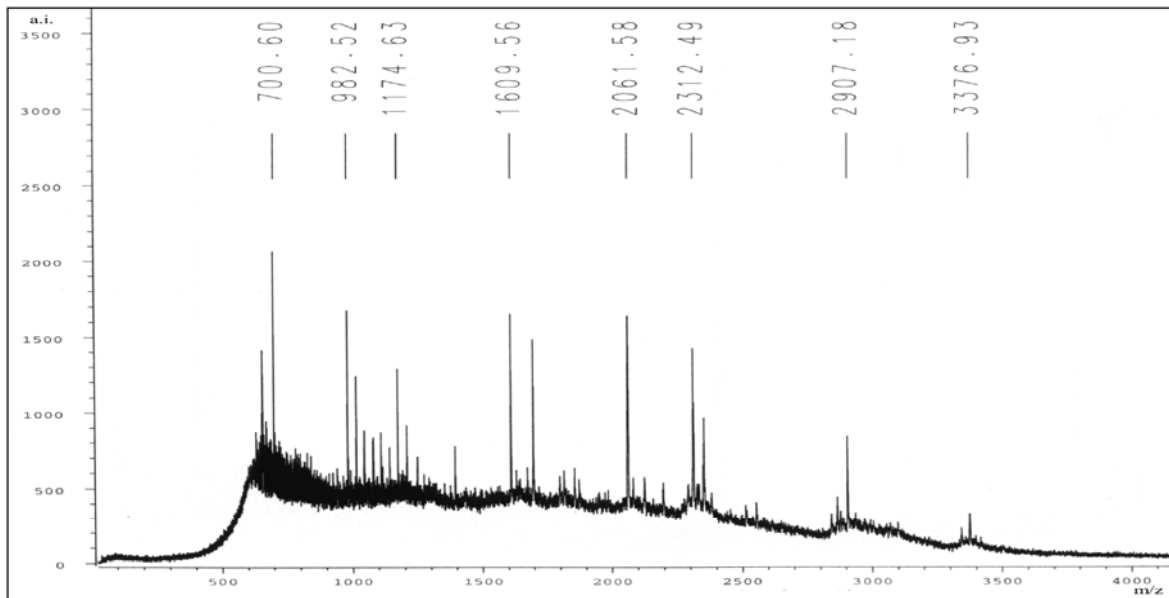


Abb. 4-22: MALDI-TOF-Spektrum des 28 kDa Allergens nach tryptischer Spaltung

4.8.3. MALDI-TOF/TOF

Da 92 % der Patientenseren das 55 kDa Allergen im IB detektieren, ist dessen Identifizierung von großem Interesse. Mit der Methode des Edman-Abbaus konnte dieses Allergen aber nicht untersucht werden. Deshalb wurde das Allergen tryptisch gespalten und die entstandenen Peptide mittels MALDI-TOF/TOF analysiert. Die Proteinmenge, die für die Messung eingesetzt wurde, entspricht einem Proteingehalt von ca. 100 µg (entspricht ca. 120 mg essbarem Anteil der Litchi) im wässrigen Auszug, der für die IEC-Trennung eingesetzt wurde. Mit dieser Methode war es möglich, zwei Peptide des 55 kDa Allergens zu sequenzieren. Die Ergebnisse sind in Tab. 4-4 dargestellt.

Die Sequenzen zeigen eine hohe Übereinstimmung mit Methioninsynthasen verschiedener Pflanzen.

Tab. 4-4: Peptidsequenzen

Peptid 1	Y G A G I G P G V Y D I H S P R
Cobalamin unabhängige Methioninsynthase (solenostemon scutellarioides)	Y G A G I G P G V Y D I H S P R
Cobalamin unabhängige Methioninsynthase (arabidopsis thaliana)	Y G A G I G P G V Y D I H S P R
Methioninsynthase Protein (sorghum bicolor)	Y G A G I G P G V Y D I H S P R
Methioninsynthase (hordeum vulgare subsp. vulgare)	Y G A G I G P G V Y D I H S P R
Methioninsynthase (zea mays)	Y G A G I G P G V Y D I H S P R
Methioninsynthase (solanum tuberosum)	Y G A G I G P G V Y D I H S P R
Peptid 2	L Q E E L D I D V L V H G E P E R
Cobalamin unabhängige Methioninsynthase (solenostemon scutellarioides)	L Q E E L D I D V L V H G E P E R
Cobalamin unabhängige Methioninsynthase (arabidopsis thaliana)	L Q E E L D I D V L V H G E P E R
Methioninsynthase Protein (sorghum bicolor)	Q E E L D I D V L V H G E P E R
Methioninsynthase (hordeum vulgare subsp. vulgare)	Q E E L D I D V L V H G E P E R
Methioninsynthase (zea mays)	L Q E E L D I D V L V H G E P E R
Methioninsynthase (solanum tuberosum)	L Q E E L D I D V L V H G E P E R

4.9. In-vitro Verdauung

Im Weiteren wird die Stabilität von Litchiallergenen gegenüber einer in-vitro Verdauung untersucht. Dabei wurde nicht die Gesamtheit der Proteine eingesetzt, sondern einzelne Allergene. Auf diese Weise ist es möglich, eventuell auftretende Spaltprodukte dem entsprechenden Allergen zuzuordnen.

Diese Stabilitätsuntersuchung wurde mit Allergenen der MG 25, 28, 55, 14 und 70 kDa vorgenommen.

Zu diesem Zweck wurde der wässrige Extrakt mittels Anionenaustauschchromatographie aufgetrennt und eine SDS-PAGE durchgeführt. Die Proteine wurden weiter mit CBB detektiert und für eine Verdauung im Gel eingesetzt. Die stabilen Proteine oder entstandenen Peptide wurden aus der Gelmatrix extrahiert und ihr allergenes Potenzial mit Immunfärbung nach Dot Blot bzw. Semidry Blot nachgewiesen. Spaltprodukte, die keine IgE-Bindungsaktivität aufweisen, wurden nach SDS-PAGE und Blotten auf eine NC-Membran unspezifisch goldgefärbt.

Der Litchiextrakt wurde mittels IEC aufgetrennt (Gradient II), Fraktion C gepoolt und die darin enthaltenen Allergene mit MG von 25, 28 und 55 kDa für die Untersuchungen eingesetzt. Um das Profilin und das IgE-bindende Protein mit einem MG von ca. 70 kDa zu analysieren, wurden die Chromatographiebedingungen erneut optimiert (Gradient IV, Abb. 4-23).

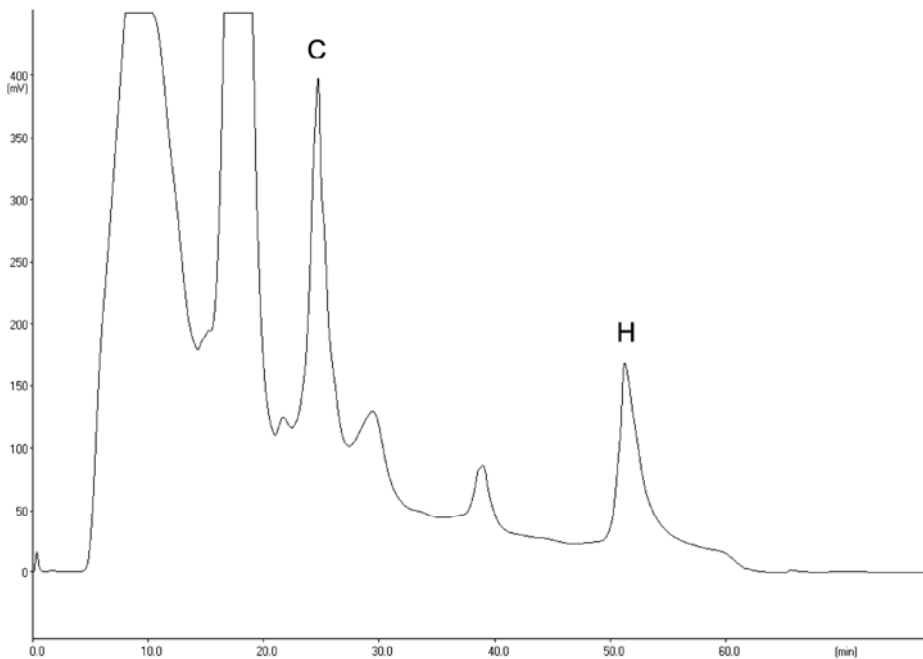
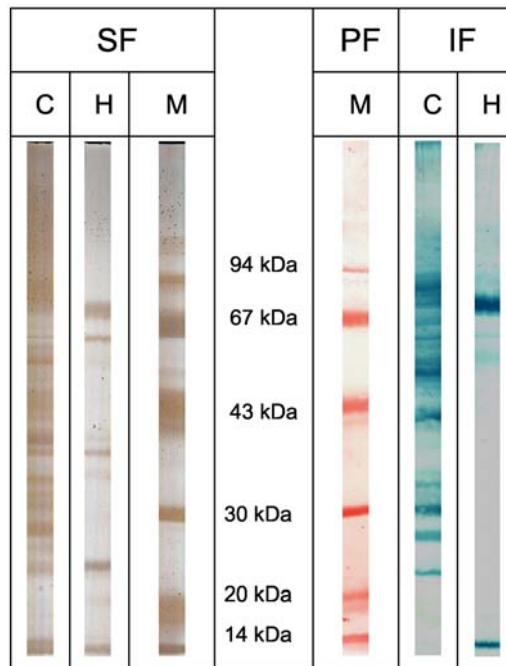


Abb. 4-23: IEC-Chromatogramm eines Litchiextraktes nach Modifikation des Gradienten (Gradient IV)

Unter diesen Bedingungen eluieren die beiden Isoformen des Profilins gemeinsam. Ihre Trennung ist nicht erforderlich, da davon ausgegangen werden kann, dass sie eine vergleichbare Stabilität besitzen. Die Allergene werden aus den Fraktionen C und H ausgeschnitten und in-vitro verdaut (Abb. 4-24).



M: MG-Marker

C: Peak C

H: Peak H

Abb. 4-24: Silberfärbung und IB der IEC-Fractionen C und H
(SDS-PAGE: 10 %iges Bis-Tris Gel, MOPS-Puffer)

Die Allergene wurden einer simulierten Magenverdauung unter Verwendung von Pepsin sowie einer Darmverdauung mit Trypsin und Chymotrypsin unterzogen. Der Einsatz der Darmenzyme erfolgte nach vorangegangener Magenverdauung und entspricht somit den humanen Bedingungen. Außerdem wurde der Einfluss des Enzyms Lys c [EC 3.4.21.50] auf das allergene Potenzial studiert. Dieses Enzym spaltet sehr spezifisch und es entstehen große Peptide. Um ein geeignetes Enzym/Substrat-Verhältnis einsetzen zu können, wurden die Proteinmengen der einzelnen Allergene abgeschätzt. Dies gelang durch Vergleich von BSA-Lösungen bekannter Konzentration, die ebenfalls elektrophoretisch behandelt und mit CBB angefärbt wurden. Der Proteingehalt einer Proteinbande des 14, 55 und 70 kDa Allergen wurde jeweils auf 0.2 µg und der Proteingehalt der Allergene mit MG von 25 und 28 kDa jeweils mit 1.3 µg geschätzt. Die Enzym-Substrat-Verhältnisse sind in Tabelle 3-1 dokumentiert.

Dot Blot-Untersuchungen

Mittels Dot Blot und nachfolgender Immunfärbung wurde untersucht, ob nach dem Verdau epitopräsentierende Fragmente vorliegen. Eine Aussage über das MG der entstandenen Fragmente oder die Persistenz der Allergene erfolgte mittels IB, während Spaltprodukte ohne IgE-Bindungskapazität nach SDS-PAGE und Blotten auf NC-Membran mittels Goldfärbung nachgewiesen wurden.

Ergebnisse

Die Dot Blot-Untersuchungen (Abb. 4-25) zeigen, dass das allergene Potenzial des Profilins durch die in-vitro Magenverdauung eliminiert wird. Auch der Einfluss aller weiteren Enzyme löscht die Immunfärbung des Allergens aus. Alle anderen Allergene zeigen nach der Pepsinspaltung allergene Aktivität.






















Enzym \ Allergen	14 kDa	25 kDa	28 kDa	55 kDa	70 kDa
Pepsin					
Lys C					
Pepsin + Chymotrypsin					
Pepsin + Trypsin					
Pepsin + Trypsin + Chymotrypsin					

Abb. 4-25: Dot Blot-Untersuchung nach in-vitro Verdau

Das 25 kDa Allergen weist eine Resistenz gegenüber Lys c auf. Der tryptische Verdau im Anschluss an die simulierte Magenverdauung führt zu keiner Veränderung der Detektion im Dot Blot. Die Behandlung mit Chymotrypsin resultiert in einer Schwächung, aber keiner Eliminierung der Detektion im Vergleich zu der in-vitro Magenverdauung. Der kombinierte Verdau mit Trypsin und Chymotrypsin führt zu einer weiteren Schwächung der Färbung. Allergenes Potenzial ist aber immer noch vorhanden. Die allergene Aktivität des 28 kDa Allergens kann durch Spaltung mit Lys c gemindert, aber nicht ausgelöscht werden. Sowohl gegenüber Trypsin- als auch Chymotrypsineinwirkung nach vorangegangener Magenverdauung zeigt sich das Allergen stabil. Erst die Kombination der Magenverdauung mit anschließender Fragmentierung durch Trypsin und Chymotrypsin zeigt eine Intensitätsschwächung der Immunfärbung.

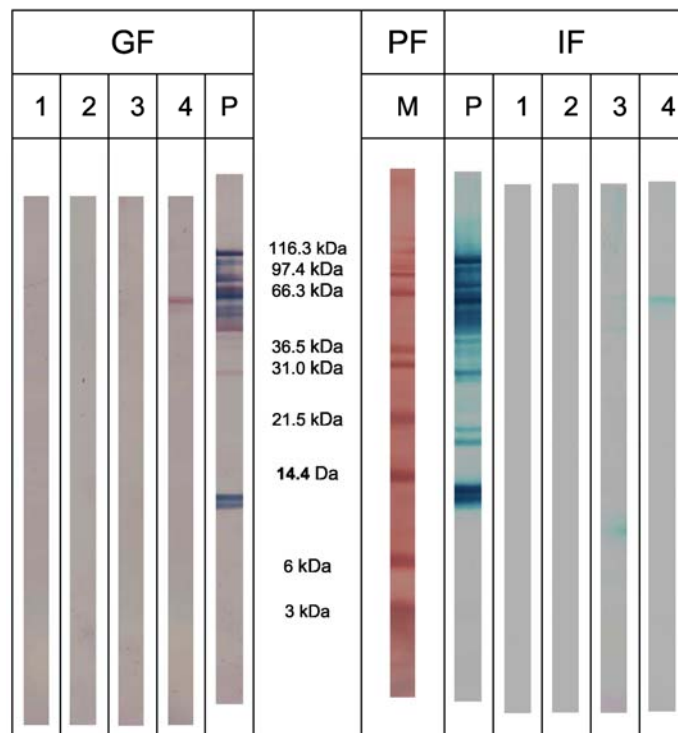
Auffällig ist die Stabilität des 55 kDa Allergens. Der Nachweis von allergenem Potenzial ist nach allen Verdauungsschritten möglich. Eine Minderung der IgE-Bindungsfähigkeit tritt nicht ein.

Das Allergen mit dem MG von 70 kDa wird nur nach Pepsineinwirkung untersucht. Die isolierte Allergenmenge reicht für weitere Studien nicht aus. Nach simulierter Magenverdauung ist ein allergenes Potenzial deutlich erkennbar.

Immunoblot-Untersuchungen

Ob die Allergene nach der Enzymbehandlung stabil sind oder ob Fragmente entstanden sind, die Epitope tragen, wurde mittels IB untersucht. Dafür wurden die Proteine bzw. Peptide elektrophoretisch getrennt, auf eine NC-Membran überführt und immungefärbt. Neben der Immunfärbung wurden die Proteine unspezifisch goldgefärbt. Auf diese Weise können Fragmente, die nicht in der Lage sind, IgE der Patientenseren zu binden, nachgewiesen werden.

Nach Pepsineinwirkung können die Allergene mit MG von 14 und 25 kDa weder mit der Immun- noch mit der Goldfärbung nachgewiesen werden (Abb. 4-26). Die mittels Immunfärbung nach Dot Blot festgestellte allergene Aktivität des 25 kDa Allergens wird vermutlich von epitoptragenden Peptiden hervorgerufen, deren MG zu klein ist, um mittels SDS-PAGE erfasst zu werden. Das 28 kDa Allergen ist auch nicht mehr nachweisbar.

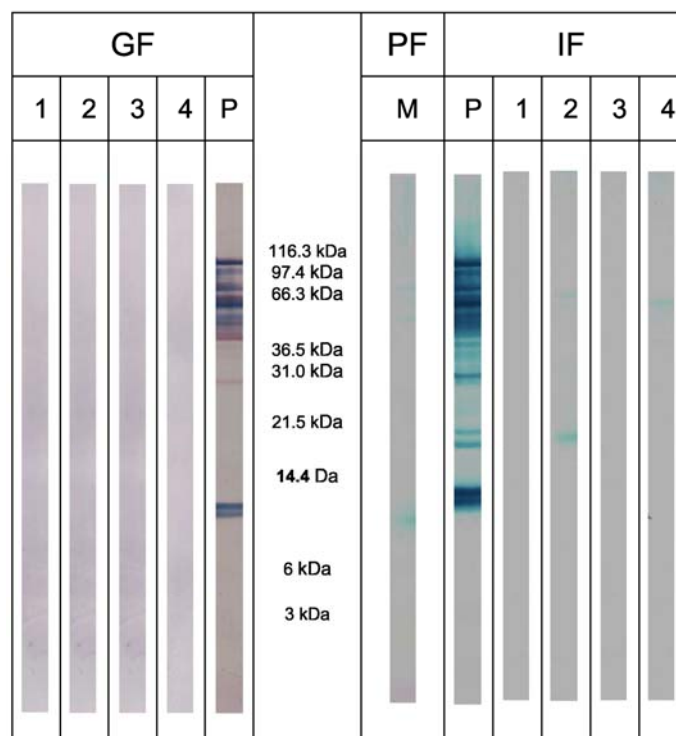


M: MG-Marker	1: 14 kDa	3: 28 kDa
P: Proteinextrakt	2: 25 kDa	4: 55 kDa
unspezifisch gefärbt		
mit Poolserum inkubiert		
GF: Goldfärbung		

Abb. 4-26: IB nach in-vitro Verdauung (SDS-PAGE: 12 %iges Bis-Tris Gel, MES-Puffer)

Auffällig ist aber ein IgE-bindendes Fragment mit einem MG von ca. 10 kDa. Dieses IgE-bindende Protein ist nicht im Extrakt der nativen Litchi enthalten, sondern durch die simulierte Magenverdauung entstanden. Das 55 kDa Allergen zeichnet sich durch große Stabilität aus. Es wird mit Gold- und Immunfärbung detektiert.

Die Spaltung mit Lys c resultiert in einer Auslöschung der Detektion der Allergene mit MG von 14 und 28 kDa. Eventuell vorliegende Spaltprodukte sind nicht erkennbar. Im Gegensatz dazu werden das 25 kDa und 55 kDa Allergen nicht von dem Enzym angegriffen, sondern als diskrete Banden nachgewiesen (Abb. 4-27).



M: MG-Marker	1: 14 kDa	3: 28 kDa
P: Proteinextrakt unspezifisch gefärbt mit Poolserum inkubiert	2: 25 kDa	4: 55 kDa

Abb. 4-27: IB nach Lys C Spaltung (SDS-PAGE: 12 %iges Bis-Tris Gel, MES-Puffer)

Die simulierte Darmverdauung unter Verwendung von Chymotrypsin und Trypsin führt zu einer Spaltung aller Allergene. Mittels IB und Goldfärbung auf NC-Membran können weder intakte Allergene noch Spaltprodukte nachgewiesen werden. Da die Dot Blot-Studie aber das Vorliegen von allergenem Potenzial dokumentiert, ist davon auszugehen, dass die IgE-bindenden Peptide, auf die die Immunfärbung des Dot Blots zurückzuführen ist, MG aufweisen, die so gering sind, dass sie nicht mit der Methode der SDS-PAGE erfasst und folglich nicht im IB nachgewiesen werden können.

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass alle betrachteten Litchiallergene, mit Ausnahme des Profilins, eine hohe Resistenz gegenüber enzymatischer Spaltung aufweisen. Besonders auffällig ist die Stabilität des 55 kDa Allergens, das von 92 % der Patientenserum detektiert wird. Das allergene Potenzial dieses Allergens wird trotz Spaltung des Moleküls von keinem der eingesetzten Enzyme gemindert.

5. Diskussion

Ziel der Arbeit war neben der Charakterisierung der Litchiallergene die Isolierung und Identifizierung ausgewählter Allergene. Darüber hinaus sollte die Stabilität einzelner Allergene gegenüber einer simulierten Magen- und Darmverdauung untersucht werden.

5.1. Charakterisierung von Allergenen

Um reproduzierbare und umfassende Untersuchungen der Litchiallergene vornehmen zu können, musste zuerst eine Extraktionsmethode ausgewählt werden, die es ermöglicht, die Proteine in unverändertem Zustand mit einer möglichst großen Ausbeute aus den Früchten zu isolieren. Zu diesem Zweck wurden die Allergene mit drei verschiedenen Verfahren extrahiert und die Proteinmenge sowie das Protein- und Allergenspektrum der gewonnenen Lösungen ermittelt.

Die Methode nach BJÖRKSTEN et al. (1980) erwies sich als ungeeignet, da zum einen die gewonnene Proteinmenge sehr viel geringer ausfiel als bei den anderen Methoden und zum anderen das Allergenspektrum im Vergleich zu den anderen eingesetzten Methoden eine geringere Anzahl IgE-bindender Proteine aufwies.

Die Tieftemperaturmethode ist geeignet, die Proteine aus den nativen Früchten zu extrahieren. Die Verwendung von PBS führt im Vergleich zu bidest. Wasser zu einer etwas größeren Proteinausbeute. Das Protein- und Allergenspektrum der Proteinlösungen sind jedoch gleich. Aufgrund der Tatsache, dass einige Trennmethode wie z.B. die IEC durch die Anwesenheit von Salzen gestört werden, können entweder dialysierte PBS-Extrakte oder wässrige Extrakte eingesetzt werden. Die Entsalzung von Proteinlösungen ist mit Substanzverlusten verbunden, die die auftretende Minderausbeute bei einer wässrigen Extraktion (21 %) überschreiten. Aus diesem Grund werden die Untersuchungen, bei denen Salz stört, mit wässrigen Extrakten und alle anderen Untersuchungen mit PBS-Extrakten aus Acetonpulver durchgeführt.

Die Tieftemperaturmethode wird in der Literatur häufig beschrieben (VIETHS et al., 1992 b) und auch die Allergene tropischer Früchte wie Kiwi, Banane und Avocado konnten bereits nach einer Isolierung mittels Tieftemperaturextraktion charakterisiert werden (MÖLLER, 1997; KINDER, 1999).

Das Allergenspektrum der Litchi wurde mittels IB unter Verwendung von 39 Patientenserum untersucht. Besonders auffällig sind dabei Allergene mit MG von 28, 35, 40, 43, 55 und 70 kDa, die von mehr als der Hälfte der Seren detektiert werden. Das 55 kDa Allergen wird sogar von 92 % der Seren detektiert. Allergene, die mit mindestens

50 % der verwendeten Patientenserum nachgewiesen werden können, werden nach DREBORG et al. (1994) als Hauptallergene bezeichnet. Da nach GEHA (1995) für eine eindeutige Klassifizierung der Allergene in Haupt- und Nebenallergene ein Kollektiv von mindestens 50 Patienten eingesetzt werden soll, belegen diese Untersuchungen zwar die große Bedeutung der Allergene, eine sichere Klassifizierung ist jedoch nicht möglich. Die Allergene mit MG von 14, 25, 32, 60 und 65 kDa wurden von weniger als 50 % der Seren detektiert. Das 14 kDa Allergen, bei dem es sich um ein Profilin handelt, wird von 36 % der Seren detektiert. Dieses Allergen und seine Kreuzreaktivität mit Allergenen anderen Ursprungs wird in der Literatur mehrfach beschrieben (VIEHTS et al., 1993; FÄH et al., 1995; ZUNKER, 2001).

Die ermittelten MG der IgE-bindenden Proteine sind mit denen von ZUNKER (2001) vergleichbar. Da ein anderes Patientenkollektiv vorlag, sind Unterschiede hinsichtlich der Bedeutung einzelner Allergene erklärbar. So wird z.B. das 55 kDa Allergen in der Studie von ZUNKER (2001) von 90 % und in dieser Arbeit von 92 % der verwendeten Patientenserum detektiert.

Neben dem MG stellt der pI ein wichtiges Charakteristikum von Allergenen dar. Mit Hilfe der IEF konnte festgestellt werden, dass die Litchiallergene pI von 9.5 - 4.0 besitzen. Dabei werden IgE-bindende Proteine mit sauren pI von ca. 4.0, 4.5, 4.7, 5.0, 5.2, 5.7 und 6.0 sowie mit neutralen bis basischen pI von ca. 6.4, 7.5, 7.8 und 9.5 detektiert. Die Mehrheit der Litchiallergene hat einen pI im sauren Bereich von 4.0 bis 5.2.

Diese Ergebnisse sind mit den Untersuchungen von ZUNKER (2001) vergleichbar. Sie gibt an, dass die Allergene der Litchi überwiegend einen pI unterhalb von 6.0 aufweisen. Andere exotische Früchte wie z.B. die Mango weisen pI von 4.6 - 5.0 auf (KINDER, 1999). MÖLLER (1997) untersuchte Kiwiallergene, deren pI er mit 3.5 - 4 angibt.

Die pI konnten mittels 2D-Elektrophorese den entsprechenden MG zugeordnet werden. Auffällig sind das 14 kDa Allergen mit einem pI von ca. 5.2, das 43 kDa Allergen mit einem pI ca. 5.2 sowie das 55 kDa Allergen mit einem pI von 3.8. Darüber hinaus werden zwei IgE-bindende Proteine mit einem MG von 94 kDa und pI von 3.7 und 8.8 detektiert. Bei dieser Untersuchung werden weniger Allergene als nach einer eindimensionalen Trennung detektiert, was auf die hohen Proteinverluste bei der Analyse zurückgeführt werden kann. Es werden jedoch alle Allergene nachgewiesen, die im IB nach eindimensionaler Trennung sehr stark detektiert werden. Eine größere Proteinmenge kann nicht eingesetzt werden, da dies in einer unzureichenden Auftrennung der Proteine resultiert. In der Literatur sind keine 2D-Elektrophorese-Untersuchungen von Litchiallergenen dokumentiert.

Da es sich bei Allergenen um Proteine oder Glycoproteine handelt, stellt sich die Frage, ob in der Litchi Glycoproteine vorhanden sind, welche Kohlenhydratreste vorliegen und ob

der Kohlenhydratanteil eines potenziellen Glycoproteins an der IgE-Bindungsfähigkeit eines Allergens beteiligt ist. Unter Verwendung des Schiffschens Reagenzes konnten im Proteinextrakt der Litchi zahlreiche Glycoproteine nachgewiesen werden. Die weitere Charakterisierung der Glycoproteine mittels Lectinblot zeigte, dass α -D-Mannose oder α -D-Glucose Teil der Zuckerreste einer Vielzahl von Glycoproteinen sind. Außerdem konnten im Lectinblot unter Verwendung von TPA Banden im MGB von 18, 20, 25, 35, 45, 50 und 67 kDa angefärbt werden, was das Vorliegen von α -L-Fucose dokumentiert. N-Acetylglucosamin konnte bei Glycoproteinen der MG 40, 43, 65 und 70 kDa nachgewiesen werden, während das Vorliegen von D-Galactose ausgeschlossen werden kann. Nach FÖTISCH und VIETHS (2001) sind komplexe pflanzliche N-Glycane, die α -1,3-Fucose und β -1,2-Xylose enthalten, am häufigsten an der Struktur von IgE-Epitopen beteiligt.

Auch in der Litchi liegt α -L-Fucose in zahlreichen Glycoproteinen vor. Ob dieser Kohlenhydratrest einen Einfluss auf die IgE-Bindung besitzt, ist unklar.

Die Bedeutung von Kohlenhydratstrukturen hinsichtlich der Allergenität von Glycoproteinen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. So berichten BROICHMANN et al. (1992) von Kreuzreaktionen zwischen Pollen und pflanzlichen Lebensmitteln, die sie auf Kohlenhydratepitope zurückführen. Nach FÖTISCH et al. (1999) spielen Kohlenhydratepitope eine Rolle bei Allergien gegen Sellerie. Im Gegensatz dazu konnten BESLER et al. (1997) zeigen, dass die Allergenität von Ovomuroid nicht von dem vorliegenden Kohlenhydratanteil abhängt.

Die eventuelle Beteiligung von Kohlenhydraten am Epitop der Litchiproteine wird mittels Immunoblot untersucht. Dabei findet vor der immunologischen Detektion eine Periodatbehandlung der Proteine statt, so dass potenzielle Epitope, die auf Kohlenhydratstrukturen basieren, zerstört und ihre Detektion verhindert wird. Die erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass eventuell Kohlenhydrate an Epitopen von Litchiallergenen im MGB \geq 40 kDa beteiligt sind. Die ausbleibende Detektion der Allergene kann jedoch auch durch eine Oxidation empfindlicher Aminosäuren verursacht werden.

Vielen Kohlenhydratepitopen werden kreuzreaktive Eigenschaften zugeschrieben (VIETHS et al. 2002) und deshalb als crossreactive carbohydrate determinants (CCD) bezeichnet.

Die klinische Relevanz der anti-CCD IgE-Antikörper wird in der Literatur aber kontrovers diskutiert und in vielen Studien wird angegeben, dass diese Antikörper nicht in der Lage sind, allergische Symptome hervorzurufen (Van DER VEEN et al., 1997; MARI et al., 1999). Der Hauptgrund für die schwache biologische Aktivität ist die Tatsache, dass viele Glycoproteine nur eine Kohlenhydratkette besitzen und somit nicht in der Lage sind, eine Histaminausschüttung durch Vernetzen von anti-Kohlenhydrat IgE-Antikörpern zu induzieren. Proteine mit mehrfacher Glycosylierung oder CCD und Proteinepitop auf einem Glycoprotein wären theoretisch in der Lage, allergische Symptome zu induzieren. Um diese Frage abschließend beantworten zu können, sind Experimente bezüglich der Mediatorausschüttung notwendig (VIETHS et al., 2002).

Neben den Glycoproteinen bzw. CCD werden Profiline als ubiquitäre kreuzreagierende Moleküle beschrieben. Sie wurden in einer Vielzahl von Pflanzen als Allergene nachgewiesen und ihr MG beträgt 10 - 16 kDa bei einer hohen Sequenzidentität (VALENTA et al., 1992 a, 1992b). Auch in der Litchi konnte die Anwesenheit von Profilinen unter Verwendung eines Antikörpers gegen rekombinantes Birnenprofilin nachgewiesen werden. Dies stimmt mit den Untersuchungen von FÄH et al. (1995), VIETHS et al. (1993) und ZUNKER (2001) überein. Dieses Allergen mit der Nomenclatur Lit c 1 (ALLALLERGY) hat ein MG von 14.030 kDa (SWISSPROT), was mit dem hier ermittelten MG von 14 kDa vergleichbar ist. Das MG wurde auf Grundlage der Retentionszeiten bei der GPC von Proben- und Standardsubstanzen geschätzt. Inhibitionsversuche zeigten, dass kein anderes Allergen der Litchi ein Epitop des Profilins trägt.

Darüber hinaus konnten in dieser Arbeit zwei Allergene mit gleichem MG und pI von ca. 4.0 und 3.6 als Profiline identifiziert werden. Wahrscheinlich handelt es sich um Isoallergene.

5.2. Isolierung von Allergenen

Neben der Charakterisierung des Allergenspektrums besteht ein weiteres Ziel in der Identifizierung von einzelnen Allergenen. Informationen über die Struktur oder Sequenz liegen derzeit nur für das Profilin und das 40 kDa Allergen vor. Kein weiteres Litchiallergen wurde bisher identifiziert. Des Weiteren sollen die Stabilität einzelner ausgewählter Allergene gegenüber einer in-vitro-Verdauung untersucht werden. Deshalb ist es erforderlich, Allergene von Begleitproteinen und anderen Allergenen abzutrennen.

Ein großes Problem stellt der geringe Anteil eines Allergens am Gesamtprotein dar. Aus diesem Grund muss für jede Isolierung eine große Menge Litchis aufgearbeitet und gewonnene Fraktionen gepoolt werden. Zu berücksichtigen sind außerdem Substanzverluste, die z.B. durch Dialysevorgänge auftreten. Eine weitere Schwierigkeit stellen die Begleitsubstanzen in der Lebensmittelmatrix dar (PASTORELLO und TRAMBAIOLI, 2001).

Für die Isolierung einzelner Proteine aus einer Probenmatrix stehen eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung. Zu nennen sind fraktionierte Fällungen, chromatographische und elektrophoretische Methoden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat sowie die chromatographische Trennung mittels GPC, AC, IEC und RPC auf ihre Eignung hinsichtlich des vorliegenden analytischen Problems untersucht. Zur Charakterisierung der erhaltenen Fraktion wurden die Protein- und Allergenmuster im Elektropherogramm und Immunoblot herangezogen.

Die Ammoniumsulfatfällung stellt eine schonende Methode zur Auftrennung eines Proteingemisches dar. Neben der Fraktionierung gelingt hierbei außerdem die

Abtrennung von Zuckern, die in der Frucht vorkommen und eventuell eine nachfolgende chromatographische Trennung stören.

Ein wässriger und ein PBS-Extrakt werden schrittweise mit einer Ammoniumsulfatlösung versetzt und der entstandene Niederschlag jeweils durch Zentrifugation abgetrennt. Dabei ist darauf zu achten, dass die Proteinkonzentration der Ausgangsextrakte ausreicht, um eine auftretende Fällung zu erkennen und die abgetrennte Proteinmenge eine elektrophoretische und immunologische Untersuchung ermöglicht. Die Ergebnisse zeigen, dass zwar die Proteine quantitativ gefällt werden, eine Auftrennung des Gemisches auf diese Weise aber nicht möglich ist. Da die Abtrennung der Zucker allein nicht diese arbeitsintensive Aufarbeitung rechtfertigt, wird im Weiteren auf ihren Einsatz verzichtet und die Isolierung mit chromatographischen Methoden ohne vorangestellte Fällung durchgeführt. Auch SEPPÄLÄ et al. (1999) verwendeten die Ammoniumsulfatfällung bei der Proteinextraktion. Sie setzten die Methode aber auch nur zur Fällung des Gesamtproteins und nicht zur Abtrennung bestimmter Proteine ein.

Für die GPC wird das Säulenmaterial Sephacryl™ S 100 eingesetzt, das eine Trennung von Substanzen mit MG von 1 bis 100 kDa ermöglicht. PASTORELLO und TRAMBAIOLI, 2001 verwenden die GPC um eine Fraktion der Anionenaustauschchromatographie weiter zu reinigen. Proteine können aber auch ohne vorangegangene Trennung mittels GPC aufgereinigt werden (PASTORELLO et al., 2001). In der Literatur wird die Isolierung eines Hauptallergens des Sesams (PASTORELLO et al., 2001) und des Caseins aus Kuhmilch (MENA et. al, 1992) mittels GPC beschrieben.

In dieser Arbeit gelang eine weitgehende Abtrennung des 14 kDa Allergens von den anderen Allergenen der Litchi. Dieses Allergen ist von großem Interesse, da es sich um das kreuzreaktive Profilin handelt. Nach GPC-Trennung konnten Inhibitionsversuche durchgeführt werden. Auf diese Weise sollte überprüft werden, ob Epitope des Profilins auch auf anderen Litchiallergenen vorliegen. Die Isolierung anderer Allergene mittels GPC ist wenig aussichtsreich, da sich die MG der anderen Allergene nicht hinreichend stark von einander unterscheiden. Auch MÖLLER (1997) beschreibt eine unbefriedigende Trennung von Kiwiallergenen an einer Sephacryl™ S 100-Säule. Zu dem stellt die GPC eine sehr zeitaufwändige Trenntechnik dar.

Eine spezifischere Trennmethode als die GPC ist die AC. In diesem Falle wird ein Lectin festphasengebunden und ermöglicht somit die Isolierung von Glykokonjugaten, die der Spezifität des Lectins entsprechen. Konkret wird das Lectin WGA eingesetzt. Da der Gesamtextrakt der Litchi die natürlich vorkommenden Zucker enthält, die die AC stören können, wird der Proteinanteil eines PBS-Extraktes mittels GPC von den später eluierenden Zuckern abgetrennt. Der Lectinblot unter Verwendung von WGA zeigt, dass vier Litchiproteine an dieses Lectin binden. Bei der Chromatographie ist davon auszugehen, dass diese vier Proteine aus der Matrix isoliert werden. Da jeweils zwei der vier Proteine ein ähnliches MG von 40 und 43 sowie 65 und 70 kDa aufweisen, können

sie nicht kontaminationsfrei für eine Identifizierung eingesetzt werden. Aus diesem Grund wird die Elutionsfraktion der AC mittels Anionenaustauschchromatographie weiter aufgetrennt. Auf diese Weise gelingt die Isolierung eines 65 kDa Allergens. Auch Midoro-Horiuti et al. (1999) isolierten Allergene aus Zedernpollen mit Hilfe der AC. Sie verwendeten CA als festphasengebundenes Lectin.

Eine N-terminale Sequenzierung des Litchiallergens liefert kein Ergebnis, was sehr wahrscheinlich auf eine natürliche Blockierung des Proteins zurückzuführen ist. Festgehalten werden kann aber, dass in der Litchi ein 65 kDa Allergen vorliegt, das eine N-Acetylglucosamin-Struktur trägt. Eine Aussage über eine mögliche Beteiligung des Kohlenhydratanteils an der IgE-Bindungsfähigkeit des Allergens kann aufgrund dieser Untersuchungen nicht gemacht werden. Die AC mit Lectinen ist eine probate Methode, entsprechende Glykokonjugate aus einer Matrix zu isolieren. Nachteil dieser hohen Spezifität ist die daraus folgende geringe Einsetzbarkeit bzw. Flexibilität.

Bei der IEC muss zwischen Anionenaustausch- und Kationenaustauschchromatographie entschieden werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden beide Trennsysteme verwendet. Da die Mehrzahl der Litchiallergene einen pI im sauren Bereich aufweist, verspricht die Anionentauschersäule größeren Erfolg. Die IEC bietet die Möglichkeit, eine größere Proteinmenge in kürzerer Zeit aufzutrennen als z.B. die GPC. Außerdem ist die Trennleistung deutlich höher.

Mit dieser Methode konnten die Allergene mit MG von 28, 32 und 55 kDa in soweit aufgereinigt werden, dass sie für eine Identifizierung eingesetzt werden konnten.

Auch MÖLLER (1997) gelang die Aufreinigung eines Kiwiallergens an einer Anionenaustauscher-Säule mit anschließender Elektroelution.

Außerdem wird die Eignung der Kationenaustauschchromatographie zur Isolierung von Litchiallergenen überprüft. Für die Isolierung wurden die Proteine eingesetzt, die nicht von der Anionentauschersäule retardiert werden. In der Literatur wird der Einsatz von Kationentauschersäulen z.B. für die Isolierung des Wespenallergens Ves v 5 (SUCK et al., 2000), eines Maisallergens (PASTORELLO et al., 2000), des Shrimpallergens Pen a 1 (NAGPAL et al., 1989), des Latexallergens Hev b 5 (AKASAWA et al, 1996) und eines Schlangenzymms (SILVA et al, 2003) beschrieben.

Die Trennbedingungen müssen so gewählt werden, dass bei einer anschließenden Elektrophorese diskrete Banden entstehen, die ohne Verunreinigungen extrahiert werden können, um für eine Identifizierung oder Stabilitätsuntersuchung zur Verfügung zu stehen. Obwohl für die Isolierung nicht das Gesamtprotein der Litchi, sondern eine Fraktion der Anionenaustauschchromatographie eingesetzt werden soll, wurden die Chromatographiebedingungen unter Verwendung eines wässrigen Extraktes der nativen Litchi optimiert. Grund dafür ist die geringe Verfügbarkeit der vorgereinigten Proteine. Für die Methodenentwicklung wurden insbesondere die Art der Pufferionen, die Ionenstärke und der pH-Wert verändert. Die beste Trennleistung wurde unter Verwendung eines

Citrat-Puffers erzielt. Auch PASTORELLO et al. (2000) und AKASAWA et al. (1996) beschrieben die Verwendung eines Natriumcitrat-Puffers mit pH-Werten von 6.0 und 3.8. Bei einem pH-Wert der Puffer von 3.0, der dem Pufferbereich von Natriumcitrat (pH 2.6-3.6) entspricht, wurden fünf Fraktionen erhalten. In einer Fraktion lag ein 70 kDa Allergen isoliert vor. Diese Allergenisolierung mit zwei unterschiedlichen Säulensystemen, an die jeweils eine Dialyse angeschlossen werden muss, bringt sehr hohe Substanzverluste mit sich und ist sehr zeitaufwändig. Die isolierte Menge reichte deshalb nicht aus, um eine erfolgreiche Identifizierung durchzuführen.

Obwohl die RPC bei der Isolierung von Allergenen eingesetzt werden kann (SCHUBERT, 2003), erwies sie sich nicht geeignet, ein Litchiallergen zu isolieren. Trotz Variation der Elutionsbedingungen war es nicht möglich, eine IEC-Fraktion mittels RPC weiter aufzureinigen.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die Anionenaustauschchromatographie für das vorliegende Trennproblem am besten geeignet ist.

5.3. Identifizierung von Allergenen

Um Strukturinformationen über die isolierten Allergene zu erhalten, bieten sich die N-terminale Sequenzierung und massenspektrometrische Methoden an.

Nach CONTI et al. (2001) ist die Bestimmung der Primärstruktur ein wichtiger Schritt bei der Charakterisierung von Allergenen, da sie es durch Sequenzvergleiche ermöglicht, Kreuzreaktionen zu erklären oder vorherzusagen.

Die Identifizierung von Allergenen durch die Bestimmung ihrer N-terminalen Sequenz mittels Edman-Abbau mit anschließender Datenbankrecherche erwies sich als geeignetes und schnelles Verfahren, Allergene zu identifizieren. Probleme treten auf, wenn ein Allergen N-terminal blockiert ist, so dass das Edman-Reagenz nicht an das Protein binden kann. Eine solche Blockierung kann natürlich bedingt oder Resultat einer Veränderung des Allergens in Folge von Extraktion, Isolierung und Anfärbung sein. Nach BAYARD und LOTTSPREICH (2001) sind ca. 50 % der natürlich vorkommenden Proteine N-terminal modifiziert. Dabei sind Acetyl-, Formyl oder Pyroglutaminsäure die häufigsten blockierenden Gruppen. Eine Blockierung kann aber auch durch pH-Wert-Absenkung während der Aufreinigung oder durch verunreinigte Chemikalien, die mit der N-terminalen Aminosäure reagieren, hervorgerufen werden. Das Auftreten einer systematischen Blockierung der Allergene in Folge der Aufarbeitung kann in diesem Fall ausgeschlossen werden, da alle Allergene gleich behandelt wurden und keine Blockierung aller Allergene vorliegt.

Für eine N-terminale Sequenzierung muss eine Mindestmenge von ca. 50 pmol eingesetzt werden. Dies stellt vor dem Hintergrund, dass der Proteingehalt von Litchis lediglich 0.9 % beträgt eine Herausforderung dar. Um dieses Problem zu lösen, müssen Fraktionen isolierter Allergene gepoolt werden.

Geringere Allergenmengen werden für eine massenspektrometrische Bestimmung benötigt. Es kann nach enzymatischem Verdau zu einen der charakteristische PMF eines Allergens mittels MALDI-TOF bestimmt oder an einem MALDI-TOF/TOF einzelne Peptide sequenziert werden.

Bei der Methode des PMF wird ein Allergen enzymatisch gespalten und die entstandenen Peptide mittels MALDI-TOF untersucht. Erhalten wird ein charakteristisches Massenspektrum mit dessen Hilfe das Allergen durch Datenbankvergleich identifiziert werden kann. Vor einer erfolgreichen MALDI-TOF-Messung werden die Parameter der in-vitro-Verdauung und Probenvorbereitung für die Messung anhand von BSA als Standardsubstanz optimiert.

Entscheidende Parameter sind hierbei z.B. eine schnelle Färbung mit CBB und Entfärbung der Proteine im Gel und die Salzkonzentration der Probe vor der Messung.

Für die CBB-Färbung wird eine Lösung nach FLING und GREGERSON (1986) eingesetzt, während die Entfärbung mit 30 %igem Methanol vorgenommen wird (ROSENFELD et al., 1992). Auf diese Weise ist eine schnelle An- und Entfärbung gewährleistet. Die Anfärbung nach ROSENFELD et al. (1992) nimmt deutlich mehr Zeit in Anspruch.

Die Salzkonzentration der Verdauungspuffer wird möglichst niedrig gewählt und die Proben vor der Messung mit ZipTips™ entsalzen, um Störungen bei der MALDI-TOF-Messung zu vermeiden.

Für den Verdau wird Trypsin eingesetzt, das Proteine vorzugsweise an den Aminosäuren Arginin und Lysin spaltet. Diese Behandlung generiert kleine Peptide, die gut massenspektrometrisch vermessen werden können.

In der Literatur werden verschiedene Inkubationszeiten beschrieben. ROSENFELD et al. (1992) inkubieren z.B. 4 h bei 30 °C. Im Rahmen dieser Arbeit wird entsprechend SANDER et al. (2001) und SHEVCHENKO et al. (1996) über Nacht bei 37 °C verdaut.

Die Bestimmung des PMF wird herangezogen, um das Ergebnis der vorangegangenen N-terminalen Sequenzierung des 28 kDa Allergens zu bestätigen.

Da das 55 kDa Allergen der Litchi von 92 % der Patientenseren detektiert wird, ist es von großem Interesse, Strukturinformationen über dieses Protein zu erhalten. Der Versuch, die N-terminale Sequenz zu bestimmen, ist gescheitert, was sehr wahrscheinlich auf eine natürliche Blockierung des Proteins zurückzuführen ist. Aus diesem Grund wurde das Allergen nach elektrophoretischer Auftrennung der entsprechenden IEC-Fraktion im Gel mit Trypsin verdaut und an einem MALDI-TOF/TOF vermessen. Im Gegensatz zum MALDI-TOF können mit einem MALDI-TOF/TOF einzelne Peptide sequenziert werden.

Auf diese Weise wurden zwei Peptide sequenziert, die für einen Datenbankvergleich herangezogen werden konnten.

Mittels Edman-Abbau konnte der N-Terminus des 25 kDa Allergens bestimmt werden. Es konnten 3 Isoallergene nachgewiesen werden, die pI von 7.37, 7.04 und 7.01 aufweisen. Die Sequenz zeigt eine starke Homologie (68 %) mit dem NtPRp27-like Protein der Kartoffel. Dieses Protein wurde bisher nicht als Allergen beschrieben.

Des Weiteren wurden zwei Litchiallergene mit MG von 28 kDa und pI von 7.37 und 7.01 untersucht. Das Allergen, das in zwei Isoformen in der Frucht vorzukommen scheint, zeigt eine große Homologie zu Triosephosphat-Isomerasen verschiedener pflanzlicher Herkunft.

Dieses Enzym wurde bereits als Allergen in Weizen und Latex beschrieben. SANDER et al. (2001) untersuchten Weizenallergene unter Verwendung der Seren von Bäckern, die Symptome des „Bäcker-Asthmas“ zeigen. Sie trennten einen Weizenmehlextrakt mittels 2D-Elektrophorese auf und setzten einzelne Proteinspots für PMF-Bestimmungen ein. Die Strukturinformationen stimmen mit denen der Triosephosphat-Isomerase aus Gerste überein. Außerdem identifizierten POSCH et al. (1997) ein IgE-bindendes Protein aus Latex als Triosephosphat-Isomerase.

Dies ist besonders vor dem Hintergrund von Kreuzreaktionen von großem Interesse. Das Vorliegen derselben Allergenstrukturen in unterschiedlichen Organismen kann Kreuzreaktionen ermöglichen. NIGGEMANN et al. (2002) berichten von einer 12-jährigen Patientin, die nach Verzehr frischer Litchi Symptome wie Anschwellen der Lippen, Juckreiz, Urtikaria und Atemnot zeigt. Sie konnten trotz eines positiven Skin Prick Tests keine IgE-Antikörper gegen Litchi nachweisen. Auffällig war aber das Vorliegen von IgE-Antikörpern gegen Latex. Außerdem konnten sie mit Inhibitionsversuchen eine Kreuzreaktivität zwischen Latex und Litchi nachweisen. Ob diese Kreuzreaktion auf dem Vorliegen von Triosephosphat-Isomerasen in beiden Allergenquellen zurückzuführen ist, bleibt zu klären.

Das 32 kDa Allergen mit einem pI von 7.37 zeigt eine auffällige Homologie zu einem Chinon-Reduktase-Homolog. Dieses Protein wurde noch nicht als Allergen beschrieben, und mögliche Kreuzreaktionen sind noch zu untersuchen.

Die IB-Untersuchungen haben gezeigt, dass 92 % der Seren das 55 kDa Allergen detektieren. Damit ist dieses Allergen das bedeutendste Litchiallergen. Nachdem es mittels IEC und anschließender Elektrophorese gereinigt wurde, konnten nach tryptischem Verdau mit einem MALDI-TOF/TOF zwei Peptide sequenziert werden. Sie weisen eine hohe Übereinstimmung mit Methioninsynthasen verschiedener Pflanzen auf. Das Litchiallergen hat ein MG von ca. 55 kDa während z.B. die Methioninsynthase der Hirse ein MG von 83.788 kDa aufweist. Dieser Unterschied kann auf die ungleiche pflanzliche Herkunft des Enzyms zurückgeführt werden. Die Möglichkeit, dass bei der Extraktion und Reinigung ein Teil des Proteins abgespalten wurde, ist unwahrscheinlich aber nicht gänzlich auszuschließen. Die Methioninsynthase wurde bereits im

Zusammenhang mit Allergien genannt. CHARDIN et al. (2001) entdeckten ein Allergen in Rapspollen, das eine große Übereinstimmung mit der Cobalamin-unabhängigen Methioninsynthase der Ackerschmalwand aufweist. Kreuzreaktionen zwischen Litchi und Rapspollen sind bisher nicht bekannt.

5.4. In-vitro Verdauung von Allergenen

Grundlage für die vorgenommene in-vitro Verdauung ist die Annahme, dass die Stabilität der Epitope von Lebensmittelallergenen gegenüber der Verdauung Voraussetzung für die Sensibilisierung des Immunsystems und die Auslösung von Symptomen einer Lebensmittelallergie (VIETHS et al. 1999) ist. Auch die Bildung von Allergenfragmenten ist zu untersuchen, da Allergien ebenfalls von Stoffwechselmetaboliten ausgelöst werden können (THIEL, 1991).

Im Rahmen dieser Arbeit soll nicht die Gesamtheit der Litchiproteine, sondern einzelne Allergene isoliert für die in-vitro Verdauung eingesetzt werden. Auf diese Weise kann beobachtet werden, ob epitoptragende Fragmente aus bestimmten Allergenen entstehen. Die Entscheidung für ein ein- oder zwei-phasiges System ist von großer Bedeutung und beeinflusst die Ergebnisse stark: So untersuchten z.B. WIGOTZKI et al. (2000) die Stabilität von Haselnussallergenen unter Bedingungen einer in-vitro Verdauung. Sie verwendeten u.a. Pepsin, Trypsin, Elastase und Pancreatin. Die Enzyme wurden einzeln eingesetzt und WIGOTZKI et al. (2000) kamen zu dem Schluss, dass die Behandlung zwar zu einer Reduzierung aber keiner vollständigen Zerstörung des allergenen Potenzials führt. VIETHS et al. (1999) dagegen untersuchten die Stabilität der Haselnussallergene in zwei Phasen, d.h. mit einer Magen- und anschließenden Darmverdauung. Sie berichten im Gegensatz zu WIGOTZKI et al. (2000) von einem starken Verlust der Allergenität und halten eine Sensibilisierung nach oraler Aufnahme daraus folgernd für unwahrscheinlich.

Im Rahmen dieser Arbeit soll die simulierte Verdauung den humanen Bedingungen angepasst sein und sie erfolgt deshalb in zwei Schritten. Erst wird eine Magenverdauung vorgenommen und darauf folgt die Darmverdauung. Die Enzyme des Darmtraktes werden nur nach vorangegangener Magenverdauung eingesetzt. Trotz der Verwendung eines zwei-phasigen Systems handelt es sich bei diesem Versuchsdesign lediglich um eine Annäherung an die Reaktionsbedingungen im menschlichen Verdauungstrakt.

Es werden Proben nach jeder einzelnen Verdauungsstufe entnommen, so dass auftretende Spaltprodukte der Wirkung des entsprechenden Enzyms zugeordnet werden können. Würde das gesamte enzymatische Spektrum auf ein Protein einwirken, könnte die Entstehung der Spaltprodukte nicht nachvollzogen werden oder die Peptide würden sofort weiter gespalten werden.

Die Magenverdauung unter Verwendung von Pepsin erfolgt in Anlehnung an ASSELIN et al. (1989), ASTWOOD et al. (1996), MATSUDA et al. (1983), ASERO et al. (2001) und VIETHS et al. (1999).

Bei der Darmverdauung werden die Peptide, die durch Pepsinspaltung entstanden sind, weiter verdaut. Dabei spielen Trypsin, Chymotrypsin, Elastase und Carboxypeptidasen eine Rolle. Da die Resorption der abgespaltenen Fragmente zu 90 % im Zwölffingerdarm erfolgt, sind die dort verlaufenden Spaltprozesse besonders wichtig zur Beurteilung der resultierenden Fragmente. Das Enzym Elastase spaltet spezifisch Elastin, weshalb sein Einfluss auf die Allergenität gering ist und es deshalb bei diesen Untersuchungen nicht eingesetzt wird. Außerdem wird bei der Simulation der Darmverdauung auf den Einsatz von Carboxypeptidasen verzichtet. Diese Exopeptidasen spalten Aminosäuren am Carboxylende ab, und die Wahrscheinlichkeit einer Epitopzerstörung durch Exopeptidasen ist daher geringer als bei Endopeptidasen.

Chymotrypsin und Trypsin dagegen sind Endopeptidasen und sie spalten die Peptide nach Pepsinverdau weiter. Sie spalten bei unterschiedlichen Aminosäuren, was die Kombination dieser beiden Enzyme effizient macht. Wie bei der menschlichen Verdauung werden Chymotrypsin und Trypsin auch bei der Simulation nur nach vorangegangener Magenverdauung eingesetzt. Um die Entstehung von Spaltprodukten aus den jeweiligen Enzymen beurteilen zu können, werden die beiden Enzyme einzeln und in Kombination eingesetzt.

Bei der Verdauung im Dickdarm sind keine Enzyme beteiligt, die von Körperzellen sezerniert werden, sondern nur Proteasen von Darmbakterien. In diesem Bereich werden in erster Linie Wasser und Elektrolyte resorbiert, so dass der Dickdarmverdauung hinsichtlich allergischer Reaktionen keine Bedeutung zukommt. Aus diesem Grund werden die Abläufe in diesem Darmabschnitt nicht berücksichtigt.

Zusätzlich zu den Endopeptidasen des menschlichen Verdauungstraktes wurde außerdem die Serin-Endoproteinase Lys C des *Lysobacter enzymogenes* eingesetzt. Dieses Enzym spaltet hoch spezifisch am Carboxylende von Lysin, so dass große Spaltprodukte zu erwarten sind, die gute Hinweise auf die Beschaffenheit der Epitope geben können.

Die Verdauung wird nach Isolierung der Allergene mittels IEC und SDS-PAGE im Gel in Anlehnung an ROSENFELD et al. (1992) vorgenommen, da bei dieser Methode nur geringe Proteinverluste zu erwarten sind. Die Enzyme werden dabei im Gegensatz zu den Arbeiten von BURKS et al. (1999), FERNANDEZ -CALDAS et al. (2001) und PORTER et al. (1984), die mit immobilisierten Enzymsystemen arbeiten, als Lösungen hinzugegeben. Auf diese Weise werden die pH-Optima der jeweiligen Enzyme eingestellt bzw. die Verdauungsschritte durch Zugabe einer Stopplösung beendet und die entstandenen Peptide extrahiert. Der pH-Wert von 2.0 für die Magensimulation entspricht einem pH-Optimum von Pepsin und steht in Einklang mit den Studien von MATUSA et al. (1983), ODANI et al. (1997), KOVACS-NOLAN et al. (2000), ASERO et al. (2001) und FERNÁNDEZ-

CALDAS et al. (2001). Im Gegensatz dazu wählten ASTWOOD et al. (1996) einen niedrigeren pH-Wert von 1.2. Die gewählte Pepsinaktivität ist vergleichbar mit der Studie von MURTAGH et al. (2003) bei einer Inkubationszeit von zwei Stunden, die sowohl den natürlichen Bedingungen als auch der Arbeit von VIETHS et al. (1999) entspricht. Eine deutlich längere Inkubationszeit könnte zu einer unerwünschten säurebedingten Spaltung der Allergene führen.

Nach der Magenverdauung setzt sich die Untersuchung mit einer zweiten Stufe, der simulierten Darmverdauung, wie es z.B. bei SATTERLEE et al. (1977), PORTER et al. (1984), ASSELIN et al. (1989), THRESNER et al. (1989), ODANI et al. (1997), BURKS et al. (1999) und VIETHS et al. (1999) beschrieben wird, fort. Dabei werden Trypsin und Chymotrypsin einzeln und in Kombination eingesetzt.

Die Chymotrypsinaktivität wird vergleichbar mit ASSELIN et al. (1989) und die Trypsinaktivität entsprechend der vorangegangenen Optimierung der Spaltbedingungen für die PMF-Bestimmung gewählt.

Die Darmverdauung erfolgt über Nacht (20-22 Stunden). Der pH-Wert entspricht dem pH-Optimum der verwendeten Enzyme. Ein Abbau der Allergene bei diesem pH-Wert ist nicht zu erwarten.

Der Abbruch der enzymatischen Reaktion wird durch Zugabe der TFA-beinhaltenden Extraktionslösung vorgenommen. Auch ROSENFELD et al. (1992) stoppen die Reaktion durch TFA-Zugabe. Eine Beendigung der Reaktion durch Erhitzen, wie es z.B. ZUNKER (2001) beschreibt, wird nicht herangezogen, um mögliche unerwünschte Denaturierungen zu vermeiden.

Für diese Untersuchung wurden die Allergene mit MG von 14, 25, 28, 55 und 70 kDa ausgewählt. Die ersten vier Allergene wurden verwendet, weil sie bereits identifiziert wurden und weiter charakterisiert werden sollen. Das 70 kDa Allergen wird von 77 % der Patientenseren detektiert und es wird auf Grund dieser hohen Detektionsfrequenz ebenfalls einer Magenverdauung unterworfen.

Durch Dot Blotting und nachfolgende Immunfärbung wurde untersucht, ob die IgE-Bindungskapazität durch den jeweiligen Verdauungsschritt eliminiert bzw. reduziert wird. Das MG der Fragmente bzw. die Persistenz der Allergene erfolgte mittels IB, während nicht allergene Spaltprodukte nach SDS-PAGE und Blotten auf NC-Membran mittels Goldfärbung nachgewiesen wurden.

Die Untersuchungen zeigen, dass das allergene Potenzial des Profilins bereits durch die in-vitro Magenverdauung eliminiert wird. Folglich ist eine Immunantwort nach Resorption im Dünndarm nicht möglich und es ist wahrscheinlich, dass die Sensibilisierung auf andere Weise z.B. durch Aufnahme über die Schleimhäute des Mundes erfolgt. Die Sensibilisierung mit Birkenpollen, dessen Hauptallergen eine hohe Sequenzhomologie mit dem untersuchten Litchiallergen aufweist, erfolgt über die Nasenschleimhaut. Auch

RODRIGUES-PEREZ et al. (2003) konnten bei ihren Untersuchungen hinsichtlich eines Profilins der Melone ebenfalls eine schnelle Aufhebung der Allergenität durch die Magenverdauung nachweisen. Das Melonenprofilin war gegenüber einer Speichelbehandlung stabil und es wurde deshalb vermutet, dass es lokale klinische Symptome im Mund auslöst.

Die anderen Litchiallergene zeigten sich deutlich persistenter. Die Allergene aus einer Allergenquelle zeigen somit nicht zwangsläufig dasselbe Stabilitätsverhalten. Diese Beobachtung machten auch ASSELIN et al. (1989). Sie berichten in ihrer Studie über die Veränderung von Molkeproteinen bei der Einwirkung von Pepsin, Chymotrypsin, Trypsin und Pancreatin. Sie untersuchten den Hydrolysegrad und die Allergenität mittels RAST-Inhibition und stellten fest, dass die Pepsinverdauung nur bei β -Lactoglobulin, nicht aber bei α -Lactalbumin zu einer Abnahme der Allergenität führt. Es zeigt sich also sogar ein Unterschied in der Stabilität verschiedener Molkeproteine.

Alle anderen untersuchten Litchiallergene zeigen nach der Magenverdauung allergene Aktivität. Auch ASTWOOD et al. (1996) konnten in ihren Studien über die Stabilität von Erdnuss-, Sojabohnen-, Senf-, Milch- und Eiallergenen die Persistenz der Allergene über einen Zeitraum von 60 min gegenüber einer Pepsinverdauung dokumentieren. Im Gegensatz dazu wurden nicht allergieauslösende Proteine bereits innerhalb von kurzer Zeit zerstört. Sie stellen die Hypothese auf, dass Allergene stabil gegenüber der Magenverdauung sein müssen, um von der Darmschleimhaut absorbiert zu werden. Diesem Ansatz kann hinsichtlich der untersuchten Litchiallergene, mit Ausnahme des Profilins, zugestimmt werden.

Eine Studie zur Stabilität von Erdnuss- und Haselnussproteinen gegenüber einer Pepsinspaltung liegt von VIETHS et al. (1999) vor. Sie belegten die Stabilität der Erdnuss- und die Zerstörung der Haselnussallergene. Es kann also nicht von einem einheitlichen Verhalten von Allergenen unter Magenbedingungen ausgegangen werden.

Das 25 kDa Allergen weist nach allen Verdauungsschritten der Magen-Darmverdauung allergenes Potenzial auf, wobei die kombinierte Behandlung mit Trypsin und Chymotrypsin die stärkste Schwächung verursacht. Im IB konnten keine allergenen Fragmente nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass die Spaltprodukte zu klein sind, um sie mit dieser Methode nachzuweisen.

Die allergene Aktivität des 28 kDa Allergens kann durch enzymatische Spaltung gemindert, aber nicht eliminiert werden. Auch in diesem Falle wird die größte Reduktion des allergenen Potenzials durch Trypsin und Chymotrypsin erzielt.

Im IB ist das 28 kDa Allergen bereits nach der Magenverdauung nicht mehr nachweisbar. Auffällig ist aber ein IgE-bindendes Fragment mit einem MG von ca. 10 kDa, das durch die simulierte Magenverdauung entstanden ist.

Die Möglichkeit der Bildung von Spaltprodukten mit intakten Epitopen nennen auch MAHMOUD et al. (1992). Sie untersuchten in-vitro verdautes Casein und quantifizierten das

allergene Potenzial mit einer ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) Methode. Sie weisen darauf hin, dass es für die Detektion nicht von Bedeutung ist, dass das ganze Molekül, das natürlicher Weise die Epitope trägt, intakt ist, sondern allein die Stabilität der Epitope, wenn auch aus dem gesamten Molekül herausgelöst, entscheidend ist.

Neben der Bildung von Spaltprodukten ist das Auftreten von Peptid-Peptidcrosslinks und die Plastein-Reaktion in Zusammenhang mit dem Anstieg der Allergenität in Folge einer enzymatischen Spaltung als mögliche Reaktionen zu nennen (ASSELIN et al., 1989). Wird ein Protein enzymatisch gespalten und das Hydrolysat anschließend mit bestimmten proteolytischen Enzymen unter geeigneten Bedingungen inkubiert, kann sich die Hydrolyse umkehren und eine proteinähnliche Substanz, Plastein, mit einem größeren MG und anderen Eigenschaften als das Ausgangsprodukt entstehen (ERIKSON und FAGERSON, 1976). Bei den Untersuchungen der Litchi hat kein Anstieg der Allergenität stattgefunden, und es sind keine Proteine mit höherem MG als das Ausgangsprotein entstanden, so dass die Möglichkeit des Vorliegens einer Plasteinreaktion oder eines crosslinks zu vernachlässigen ist. Wahrscheinlicher ist die Spaltung von Allergenen in epitoptragende kleinere Fragmente.

Von besonderem Interesse ist die Stabilität des 55 kDa Allergens, da es von 92 % der Seren detektiert wird. Der Nachweis von allergenem Potenzial ist nach allen Verdauungsschritten möglich, und eine Minderung der IgE-Bindungsfähigkeit ist nicht zu beobachten. Nach der simulierten Magenverdauung kann das intakte Allergen im IB sowie mit der Goldfärbung nachgewiesen werden. Es ist also möglich, dass das Protein in dieser ungespaltenen Form von der Darmschleimhaut aufgenommen wird, um eine Immunantwort auszulösen. Von den Darmenzymen wird es gespalten, wobei kleine epitoppräsentierende Fragmente entstehen, die ebenfalls zu einer Sensibilisierung bzw. allergischen Reaktionen führen können.

Das Allergen mit dem MG von 70 kDa wird nur nach Pepsineinwirkung untersucht. Die isolierte Allergenmenge reicht für weitere Studien nicht aus. Nach simulierter Magenverdauung ist ein allergenes Potenzial trotz Degradation des Moleküls deutlich erkennbar.

Nach TAYLOR et al. (1987) muss ein Allergen effizient von der Darmschleimhaut aufgenommen werden, um eine Immunantwort zu bewirken. Dies ist nur bei einer ausreichenden Permeabilität möglich. Diese Permeabilität ist vermutlich bei einem MG größer 70 kDa nicht mehr gegeben. Die untersuchten IgE-bindenden Proteine werden mit Ausnahme des 55 kDa Allergens bereits durch die Magenverdauung in kleine Allergenfragmente gespalten. Mit der Permeabilität der Allergene bzw. Allergenfragmente bezüglich der Darmschleimhaut ist also zu rechnen.

Im Gegensatz zu der hohen Stabilität des allergenen Potenzials der untersuchten Litchiallergene steht die Studie von YAMADA et al. (2000). Sie untersuchten Ovomucoïd nach Spaltung mit Pepsin, Chymotrypsin und Trypsin mittels RAST-Inhibition und zeigten

die Instabilität der Epitope nach dem Verdau auf. Daraus folgern sie, dass die ausgelöste Urtikaria der Allergiker nicht durch orale Aufnahme, sondern durch Hautkontakt ausgelöst wird.

Die Litchiallergene werden vor allem von den Darmenzymen gespalten und das allergene Potenzial reduziert. BURKS et al. (1999) verwenden bei der Untersuchung der Persistenz von Sojaprotein ebenfalls zwei Phasen, wobei erst Pepsin und dann Trypsin, Chymotrypsin und intestinale Mucosaenzyme eingesetzt werden. Mit Inhibitionsversuchen konnten sie, wie bei den Litchiallergenen, einen Rückgang der IgE-Bindungsfähigkeit vermerken.

Auch die Studie von KORTEKANGAS-SAVOLAINEN et al. (1993) über Hefe kommt zu einem abweichenden Ergebnis. Die Verdauung wird mit Pepsin, Cathepsin und Mucin und den Darmenzymen Pancreaslipase, Pancreasamylasen und Pancreasproteasen vorgenommen. Nach kombinierter Magen- und Darmverdauung sind die meisten Allergene zerstört und sie berichten von einer 90 %igen Spaltung der Allergene. Aufgrund dieser Tatsache halten sie eine Allergenexposition der Schleimhautoberfläche, der Speiseröhre, oral und mit lebenden Hefezellen für wahrscheinlich. Mit Ausnahme des Profilins sind die Litchiallergene bzw. deren Epitope stabil, so dass von einer Aufnahme über den Darm ausgegangen werden kann.

Abschließend kann festgehalten werden, dass alle untersuchten Litchiallergene mit Ausnahme des Profilins eine hohe Resistenz gegenüber der in-vitro Verdauung aufweisen. Besonders das 55 kDa Allergens ist stabil und das allergene Potenzial dieses Allergens wird trotz Spaltung des Moleküls von keinem der eingesetzten Enzyme gemindert. Die Allergene mit MG von 25, 28 und 70 kDa werden zwar gespalten, ein allergenes Potenzial ist aber dennoch vorhanden.

Ausblick

In Rahmen dieser Arbeit wurde das Allergenspektrum der Litchi auf Grundlage von 39 Patientenseren charakterisiert. Da auch in der Literatur keine Einteilung der Litchiallergene in Major- und Minorallergene dokumentiert ist, sollte diese anhand eines größeren Patientenkollektivs erfolgen.

Des Weiteren wurden einige vor allem chromatographische Verfahren eingesetzt, um Allergene aufzureinigen. Besonders die Trennung an einer Anionentauschersäule erwies sich als geeignet. Auch die Verwendung der 2D-Elektrophorese, der Hydrophoben-Interaktionschromatographie und der Elektroelution sind mögliche Trennsysteme, deren Eignung für dieses Trennproblem überprüft werden sollte.

Außerdem sollten weitere Allergene der Litchi für eine Identifizierung eingesetzt werden. Anhand der in-vitro Verdauungsversuche konnte gezeigt werden, dass die ausgewählten Allergene, mit Ausnahme des Profilins, bzw. deren Epitope stabil gegen proteolytische Enzyme sind oder epitoptragende Fragmente entstehen. Eine weitere Untersuchung der persistenten Epitope wäre von Interesse.

6. Zusammenfassung / Summary

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung des Allergenspektrums der Litchi sowie die Isolierung und Identifizierung ausgewählter Allergene. Außerdem sollte die Stabilität einzelner Litchiallergene gegenüber einer in-vitro Verdauung untersucht werden.

Am Anfang der Untersuchungen stand die Suche nach einer geeigneten Methode zur Proteinextraktion, um eine möglichst große Protein- bzw. Allergenmenge zu isolieren, im Vordergrund. Eine Tieftemperaturmethode erwies sich als geeignet, die Allergene in nativer und reproduzierbarer Form aus den Früchten zu extrahieren.

Die Charakterisierung des Allergenspektrums erfolgte mittels Immunoblot nach vorangestellter Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Isoelektrischer Fokussierung und zweidimensionaler Elektrophorese unter Verwendung von 39 Patientenseren.

Mehr als die Hälfte der Seren detektierte Allergene mit Molekulargewichten von 28, 35, 40, 43, 55 und 70 kDa. Sie sind somit potenzielle Hauptallergene der Frucht. Besonders das 55 kDa Allergen, das von 92 % der Seren detektiert wurde, ist von großer Bedeutung. Außerdem werden Allergene mit Molekulargewichten von 14, 25, 32, 60, 65 kDa und im Bereich größer 70 kDa nachgewiesen. Auffällig ist, dass die Mehrheit der Allergene einen isoelektrischen Punkt im sauren Bereich zwischen ca. 4.0 und 5.2 aufweist.

Des Weiteren sollte geklärt werden, ob in der Litchi Glycoproteine vorliegen und ob diese an der IgE-Bindungsfähigkeit der Allergene beteiligt sind. Im elektrophoretisch getrennten Proteinextrakt wurden nach Spaltung mit Periodat mit dem Schiffschens Reagenz Glycoproteine nachgewiesen. Als Zuckerreste liegen α -D-Mannose oder α -D-Glucose, α -L-Fucose und N-Acetylglucosamin nicht aber D-Galactose vor. Diese Reste konnten durch Bindung an Lectine entsprechender Spezifität im Lectinblot nachgewiesen werden. Weiterhin wurden die Allergene nach Periodatbehandlung auf einer Nitrocellulose-Membran immungefärbt. Die Untersuchungen führen zu dem Ergebnis, dass eine Beteiligung der Kohlenhydratreste an der Antikörperbindung einiger Allergene im Molekulargewichtsbereich größer 43 kDa möglich ist.

Außerdem konnte das kreuzreaktive Profilin nach Trennung mittels Ionenaustauschchromatographie in zwei Isoformen mit isoelektrischen Punkten von ca. 4.3 und 3.9 nachgewiesen werden. Kein anderes Allergen der Litchi trägt Epitope des Profilins, was durch Immunoblot-Inhibitionsversuche nach Trennung des Profilins von den anderen Litchiallergenen mittels Gelpermeationschromatographie gezeigt werden konnte.

Für die Isolierung der Litchiallergene wurden verschiedene chromatographische Methoden und eine fraktionierte Fällung eingesetzt. Die Methoden der Ammoniumsulfatfällung, Gelpermeations-, Affinitäts-, Ionenaustausch- und Umkehrphasenchromatographie wurden auf ihre Eignung, das vorliegende Gemisch aufzutrennen, untersucht. Es zeigte sich, dass mit Hilfe der Anionenaustauschchromatographie die besten Ergebnisse erzielt werden können. Die Allergene mit Molekulargewichten von 25, 28, 32, 55 und 70 kDa standen nach vorangegangener Aufreinigung mittels Ionenaustauschchromatographie für weitere Untersuchungen wie eine Identifizierung oder in-vitro Verdauung zur Verfügung.

Für die in-vitro Verdauung wurden die Allergene mit Molekulargewichten von 14, 25, 28, 55 und 70 kDa eingesetzt. Mit Ausnahme des Profilins zeigten alle Allergene bzw. deren Spaltprodukte nach der Magenverdauung allergenes Potenzial. Dabei lag lediglich das 55 kDa Allergen als intaktes Molekül nach der Magenverdauung vor. Alle anderen Allergene wurden in kleine Fragmente gespalten. Die in-vitro Darmverdauung resultierte in einer Spaltung aller nativen Allergene. Trotzdem konnte nach allen Verdauungsschritten allergenes Potenzial nachgewiesen werden.

Die Identifizierung der Allergene mit Molekulargewichten von 25, 28 und 32 kDa gelang mit der N-terminalen Sequenzierung. Die Identität des 28 kDa Allergens wurde zusätzlich durch die Bestimmung des Peptide Mass Fingerprint bestätigt. Das 55 kDa Allergen, dessen Sequenz aufgrund einer Blockierung nicht mittels Edman-Abbau bestimmt werden konnte, wurde mit einem MALDI-TOF/TOF nach tryptischem Verdau vermessen. Auf diese Weise konnten zwei Peptide sequenziert werden, die eine Identifizierung ermöglichten.

Die N-terminale Sequenz des 25 kDa Allergens zeigte eine hohe Übereinstimmung mit dem NtPRp27-like Protein der Kartoffel und liegt in der Litchi in Form von drei Isoallergenen mit isoelektrischen Punkten von 7.37, 7.04 und 7.01 vor. Dieses Protein wurde in der Literatur noch nicht als Allergen genannt.

Auch das 28 kDa Allergen konnte in zwei Isoformen in der Frucht nachgewiesen werden (pI: 7.37 und 7.01). Es zeigt eine große Homologie zu Triosephosphat-Isomerasen verschiedener pflanzlicher Herkunft. Dieses Protein wurde bereits in Weizen und Latex als Allergen identifiziert.

Das 32 kDa Allergen zeigt eine auffällige Homologie zu einem Chinon-Reduktase-Homolog, das noch nicht als Allergen beschrieben wurde.

Das nach MALDI-TOF/TOF identifizierte 55 kDa Allergen weist eine starke Übereinstimmung mit Methioninsynthasen verschiedener Pflanzen auf. Eine Methioninsynthase wurde im Zusammenhang von Allergien gegen Raps beschrieben.

Summary

Aim of this study was the characterisation of the allergen spectrum of the lychee as well as the isolation and identification of some of these allergens. Additionally the stability of the allergens during in-vitro digestion was investigated.

At the beginning the studies were focussed on a proper method for the extraction of the proteins to maximize the amount of extracted proteins, allergens respectively. A low temperature method proved to be suitable for extracting the allergens, native and reproducible.

The allergen spectrum was characterised by immuno blot after sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis, isoelectric focussing and two dimensional electrophoresis using sera of 39 patients suffering from lychee allergy. Due to the fact that more than 50 % of the sera detected the allergens with molecular weights of 28, 35, 40, 43, 55 and 70 kDa these allergens are potential main allergens of the fruit. Especially the 55 kDa allergen is very important as it was detected by 92 % of the sera. Additionally allergens with molecular weights of 14, 25, 32, 60, 65 and >70 kDa were evidenced. Noticable is the fact that the majority of the allergens has an acidic isoelectric point between 4.0 and 5.2.

Furthermore the occurrence of glycoproteins in the lychee and their contribution to the IgE-binding was investigated. For this purpose different methods were applied. In the electrophoretically separated protein extract a multitude of glycoproteins were detected using the Schiff's reagent which is based on decomposition with periodate. Residues in the form of α -D-mannose or α -D-glucose, α -L-fucose and n-acetylglucosamin, but not D-galactose were found. These carbohydrates were proven by means of lectin blot with suitable lectins.

Moreover the cross-reactive profilin was evidenced after purification by ion exchange chromatography in two isoforms with isoelectric points of 4.3 and 3.9. No other allergen of the lychee shows epitopes of the profilin which was proven by means of immunoblot inhibition after separation of the profilin from the other lychee allergens by gel permeation chromatography.

For the isolation of the lychee allergens different chromatographic methods and a fractionated precipitation were utilised. The ammoniumsulfate precipitation, gel permeation chromatography, affinity chromatography, ion exchange chromatography and the reversed phase chromatography were tested for their suitability to separate the complex mixture. The anion exchange chromatography showed the best results. The

allergens with molecular weights of 25, 28, 32, 55 and 70 kDa were purified by ion exchange chromatography and used for further investigation.

For in-vitro digestion the allergens with molecular weights of 14, 25, 28, 55 and 70 kDa were used. After the gastric digestion all allergens or the generated peptides showed allergenic potency, only the profilin did not. The 55 kDa allergen was the only persistent allergen after the gastric digestion, all other allergens were decomposed into smaller fragments. After the in-vitro intestinal digestion all allergens were fragmented, though after all steps of the digestion allergenic potency was still present.

The identification of the allergens with molecular weights of 25, 28 and 32 kDa were achieved by means of N-terminal sequencing. The identity of the 28 kDa allergen was confirmed by peptide mass fingerprint. The 55 kDa allergen could not be investigated by Edman degradation because of blocking of the N-terminus. For that reason the allergen was analysed by MALDI-TOF/TOF after tryptic digestion in gel. Thus two peptides could be sequenced which made an identification possible.

The N-terminal sequence of the 25 kDa allergen shows a high similarity to the NtPRp27-like protein of potato and three isoallergens with isoelectric point of 7.37, 7.04 and 7.01 were found in the lychee. This protein was not mentioned in the content of allergy in the literature so far.

The 28 kDa allergen was also proven in two isoforms with isoelectric point of 7.37 and 7.01. A high homology to triose phosphate isomerases from several plant origins was determined. This protein was already identified as an allergen in wheat and latex.

The 32 kDa allergen has a noticeable homology with a quinone reductase homolog that has not been described as an allergen until now.

The 55 kDa allergen that was identified by MALDI-TOF/TOF shows a high similarity with methionine synthases of various plants. A methionine synthase was described in regard to allergies against rape.

7. Anhang

7.1. Gewinnung der Patientenserum

- 10 ml Blut mittels Serumröhrchen abnehmen
- 30 min abkühlen lassen
- 10 min bei 4 °C und 1681 g zentrifugieren
- überstehendes Serum in Tubes überführen
- Serum bei - 80 °C lagern

7.2. Untersuchungsmaterial

Als Untersuchungsmaterial dienen Litchis aus Madagaskar. Sie werden vom Hamburger Großmarkt bezogen und bis zur Verwendung tiefgekühlt. Eingesetzt wird der essbare Anteil der Frucht.

7.3. Proteinextraktion aus Früchten

7.3.1. Tieftemperaturextraktion

Die Methode wird modifiziert nach VIETHS et al. (1992b) durchgeführt.

Chemikalien/Lösungen

Aceton		T= -80 °C
Diethylether		T= -80 °C
Aceton/Diethylether Gemisch 1:1		T= -80 °C
PBS (pH 7.4) 0.15 M NaCl 0.0027 M KCl 0.01 M K ₂ HPO ₄		1 Puffertablette in 200 ml bidest. Wasser lösen

Durchführung

- 400 ml Aceton in ein 800-ml-Becherglas geben und bei -80°C lagern
- 200 g zerkleinerte Frucht einwiegen
- in das Aceton geben
- mindestens 2 Stunden bei -80 °C lagern
- Fruchtstücke mit einem Ultra-Turrax zerkleinern
- Homogenat über Nacht bei -20 °C äquilibrieren lassen
- das Homogenat über Büchnertrichter absaugen

- 3x mit je 80 ml Aceton und 3 x mit je 50 ml Ether/Aceton-Gemisch waschen
- Rückstand trocken saugen
- in einen Rundkolben überführen
- 2 Stunden bei -80 °C durchfrieren lassen
- über Nacht lyophilisieren
- Lyophilisat vermahlen
- das erhaltene Acetonpulver bei -20 °C lagern

- 1.5 – 1.8 g Acetonpulver mit 30 ml PBS bzw. 3 g mit 30 ml bidest. Wasser versetzen
- pH-Wert auf 7.4 einstellen
- 1 Stunde unter Eiskühlung rühren
- 1 Stunde bei 4 °C und 10509 g zentrifugieren

- Rückstand absaugen
- Filtrat bei -80 °C durchfrieren lassen
- über Nacht lyophilisieren
- die erhaltenen PBS- bzw. Wasser-Extrakte bei -20 °C lagern

7.3.2. Extraktion nach BJÖRKSTEN et al. (1980)

Die Durchführung erfolgt nach BJÖRKSTEN et al. (1980)

Lösungen

PBS (pH 7.4) 0.15 M NaCl 0.0027 M KCl 0.01 M K ₂ HPO ₄		1 Puffertablette in 200 ml bidest. Wasser lösen
Extraktionslösung (pH 7.0) 2 % Polyvinylpolypyrrolidon 2 mM Dinatrium-EDTA 10 mM Natrium- diethyldithiocarbamat 3 mM Natriumazid in 10 mM Kaliumphosphatpuffer	20 g 0.7445 g 2.25 g 0.20 g	Polyvinylpolypyrrolidon Dinatrium-EDTA Natriumdiethyldithiocarbamat Natriumazid ad 1000 ml mit PBS, pH einstellen

Durchführung

- 250 g zerkleinerte Frucht einwiegen
- mit 100 ml Extraktionslösung versetzen
- Gemisch mit Ultra-Turrax homogenisieren
- 60 min bei 10509 g zentrifugieren
- Überstand filtrieren

- bei -80 °C gefrieren lassen und lyophilisieren
- Lyophilisat in 50 ml bidest. Wasser lösen und dialysieren

7.4. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wird nach BRADFORD (1976) durchgeführt.

Lösungen

Lösung 1	10 ml 20 ml 35 mg	Ethanol (96 %) Phosphorsäure (88 %) Coomassie Brilliant Blue G 250
Lösung 2:	3 ml 3 ml 1.5 ml 42.5 ml	Lösung 1 Phosphorsäure (88 %) Ethanol (96 %) dest. Wasser bei RT unter Lichtausschluss aufbewahren
Standardlösungen	400 µg 300 µg 200 µg 100 µg 50 µg 40 µg 20 µg 10 µg	BSA je ad 1 ml bidest. Wasser

Probelösungen: 50 µl der zu vermessenden Lösung werden direkt bzw. nach Verdünnung oder Konzentrierung zur Messung eingesetzt.

Durchführung

- 50 µl Standard- bzw. Probelösung in eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte geben (für den Blindwert 50 µl bidest. Wasser einsetzen)
- je mit 200 µl Lösung 2 versetzen
- im ELISA-Reader 10 s schütteln
- nach 5 min bei 590 nm gegen Blindwert vermessen

7.5. EAST

7.5.1. Bromcyanaktivierung der Scheiben

Die Bromcyanaktivierung und das Koppeln der Scheiben erfolgt nach der von MÖLLER et al. (1997) modifizierten Methode nach CESKA und LUNDKVIST (1972).

Lösungen

Bromcyan-Lsg.	15 g	Bromcyan in 450 ml bidest. Wasser unter Rühren lösen (Schutzmaske, Abzug!)
NaHCO ₃ -Lsg. 0.005 M	2.1 g	NaHCO ₃ ad 10 l bidest. Wasser
NaOH-Lsg. 10 %ig	10 g	NaOH ad 100 ml bidest. Wasser
NaOH-Lsg. 1 M	4 g	NaOH ad 100 ml bidest. Wasser

Durchführung

- 15 g Cellulosepapierscheiben (ca. 5000 Stück) in einem 1-l-Dreihalskolben mit Tropftrichter (250 ml) und Thermometer in 150 ml bidest. Wasser quellen lassen
- Bromcyanlösung zu der Papierscheiben-Suspension geben
- durch Zutropfen einer 1 M NaOH auf einen pH-Wert von 10-10.5 einstellen und so lange
- Einhalten bis 75 ml verbraucht sind. Der pH-Wert darf nicht über 11,5 steigen.
- Lösung über Büchnertrichter absaugen
- Scheiben 12 x mit je 375 ml 0.005 M NaHCO₃- Lösung waschen, je 2 min stehen lassen und absaugen
- anschließend nacheinander je 2 x mit 375 ml dest. Wasser, Aceton/Wasser (50:50, v:v), Aceton/Wasser (75:25, v:v) und Aceton waschen
- bromcyanaktivierte Scheiben lyophilisieren
- Scheiben bei -20 °C lagern

7.5.2. Entsorgung der Bromcyananfäll

- BrCN-Lsg. in 10 %iger NaOH 1 h stehen lassen
- bei einem pH-Wert von 10 - 11 einen 50 %igen Überschuss an Natriumhypochloritlg. zugeben
- über Nacht stehen lassen
- Lösung auf einen pH-Wert von 7 einstellen
- Überschuss an Hypochlorit mit Hydrogensulfit zerstören
- Lösung über das Abwasser entsorgen

7.5.3. Kopplung der Extrakte an die Scheiben

Lösungen

Inkubationspuffer I	15.6 g	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O ad 1 l mit dest. Wasser
Inkubationspuffer II	8.4 g	NaHCO ₃ ad 1 l mit dest. Wasser
Inkubationspuffer III	190 ml 803 ml	Inkubationspuffer I Inkubationspuffer II mit 4 mol/l HCl auf pH 7.4 einstellen
Inkubationspuffer IV	800 ml 3 g 37.22 g 2 g 2 ml	Inkubationspuffer III BSA EDTA NaN ₃ Tween™ 20 mit 4 M HCl auf pH 7.4 einstellen
NaHCO ₃ -Lsg. 0.5 mol/l	21 g	NaHCO ₃ ad 500 ml mit dest. H ₂ O auf pH 8.4 einstellen
NaHCO ₃ -Lsg. 0.1 mol/l	4.2 g	NaHCO ₃ ad 500 ml mit dest. Wasser auf pH 9.5 einstellen
Ethanolaminpuffer	5 ml	Ethanolamin ad 500 ml mit dest. Wasser mit 4 M HCl auf pH 9.2 einstellen
Natriumacetatpuffer 0.1 mol/l	4.2 g	Natriumacetat ad 500 ml mit dest. H ₂ O mit 4 M HCl auf pH 4.0 einstellen

Durchführung

- Extrakte in bidest. H₂O aufnehmen und auf einen Proteingehalt von 20 µg/ml verdünnen
- 100 ml Lösung in 250-ml-Iodzahlkolben füllen
- ca. 300 bromcyanaktivierte Papierscheiben (ca. 636 mg) zu der Lösung geben
- über Nacht bei 4 °C rühren
- Überstand absaugen (Wasserstrahlpumpe)
- 100 ml Ethanolaminpuffer dazugeben
- 2 h bei Raumtemperatur rühren
- absaugen und mit folgenden Lösungen waschen:
 1. 3 x mit 100 ml 0.1 mol/l NaHCO₃-Lösung
 2. 2 x mit 100 ml 0.1 mol/l Natriumacetatpuffer
 3. 2 x mit 100 ml 0.5 mol/l NaHCO₃-Lösung
- letzte Waschlösung absaugen
- mit 100 ml dest. Wasser spülen
- Scheiben mit dest. Wasser in einen 250-ml-Rundkolben überführen
- Wasser absaugen
- 2 h bei -80 °C einfrieren

- über Nacht lyophilisieren
- Scheiben bei -20 ° C lagern

7.5.4. EAST-Bestimmung

Die EAST-Bestimmung wird entsprechend der Herstellerangaben zum verwendeten Testkit „Spez. IgE ELISA TR (RV)“ der Firma Allergopharma (Reinbek, Deutschland) durchgeführt.

Lösungen

PBS (pH 7.4) 0.15 M NaCl 0.0027 M KCl 0.01 M K ₂ HPO ₄		1 Puffertablette in 200 ml bidest. Wasser lösen
Allergenverdünnungslsg.	300 mg 100 µl 50 mg	BSA Tween™ 20 NaN ₃ ad 100 ml PBS
Waschlösung entsprechend Testkit		enthält Tween™ 20, PBS
Konjugatlösung entsprechend Testkit		enthält anti-Human IgE, konjugiert mit alkalischer Phosphatase
Substratlösung entsprechend Testkit		enthält MgCl ₂
Färbetabletten entsprechend Testkit		enthält p-Nitrophenylphosphat
Färbelösung entsprechend Testkit		1 Färbetablette in 5 ml Substratlösung lösen
Stopplösung entsprechend Testkit		1 M NaOH
Referenzlösungen Kalibrierreihe Standard 1 Standard 2 Standard 3 Standard 4	0.35 U/ml 0.7 U/ml 3.5 U/ml 17.5 U/ml	Serum mit spez. IgE gegen Lieschgrass

EAST-Klasse 1: 0.35 – 0.70 U/ml

EAST-Klasse 2: 0.70 – 3.50 U/ml

EAST-Klasse 3: 3.50 – 17.50 U/ml

EAST-Klasse 4: > 17.50 U/ml

Durchführung

- je eine Allergenscheibe in eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte geben
- mit Inkubationspuffer befeuchten (Referenzscheiben nicht mit Inkubationspuffer befeuchten)
- je 50 µl Patientenserum bzw. Kontrollserum auf die Allergenscheiben geben
- je 50 µl Referenzserum auf die Referenzscheiben pipettieren
- Mikrotiterplatte mit Parafilm abdecken
- 1 h bei 37 °C unter Lichtausschluss inkubieren
- Serum absaugen
- 250 µl Waschlösung zu pipettieren und nach 10 min absaugen (3x)
- 50 µl Konjugatlösung in jede Kavität pipettieren
- Mikrotiterplatte mit Parafilm abdecken
- über Nacht bei RT unter Lichtausschluss inkubieren
- 250 µl Waschlösung zu pipettieren und nach 10 min absaugen (3x)
- 200 µl Färbelösung in jede Kavität geben
- 200 µl Färbelösung in 2 leere Vertiefungen pipettieren (Reagenzienblindwert)
- Mikrotiterplatte mit Parafilm abdecken
- 1 h bei 37 °C unter Lichtausschluss inkubieren
- 100 µl Stopplösung zupipettieren
- 10 s schütteln
- 250 µl aus jeder Kavität analog in eine leere Mikrotiterplatte überführen
- bei 405 nm photometrisch vermessen (ELISA-Reader)

7.6. Elektrophorese

7.6.1. SDS-PAGE

Die Aufarbeitung der Proben erfolgt nach VIETHS et al. (1992a). Die SDS-PAGE wird mit dem NuPAGE™ Elektrophoresesystem sowie Fertigpuffer und -lösungen der Firma Novex™ (San Diego, CA, USA) entsprechend den angegebenen Vorschriften durchgeführt.

Lösungen

Probenpuffer (pH 6.8)	3.03 g 2.5 ml 5.0 ml 2.0 g 0.01 g 150 µl	Tris β-Mercaptoethanol Glycerin SDS Bromphenolblau Pyronin Y-Lösung (1 %ig) mit 40 ml bidest. Wasser versetzen mit 4 M HCl auf pH 6.8 einstellen und mit bidest. Wasser ad 50 ml
-----------------------	---	--

Molekulargewichtsmarker

Protein	MG [kDa]
α-Lactalbumin	14.4
Trypsininhibitor	20.1
Carboanhydrase	30.0
Ovalbumin	43.0
Rinderserumalbumin	67.0
Phosphorylase	94.0

Protein	MG [kDa]
Insulin A	2.5
Insulin B	3.5
Aprotinin	6.0
Lysozym	14.4
Trypsininhibitor	21.5
Carbonanhydrase	31.0
Lactatdehydrogenase	36.5
Glutamindehydrogenase	55.4
BSA	66.3
Phosphorylase B	97.4
β-Galactosidase	116.3
Myosin	200

Ein Vial des MG-Markers wird in 1 ml Probenpuffer aufgenommen und reduziert.

Durchführung

- Proteinextrakt 1:1 mit Probenpuffer versetzen
- Lösung 3 min bei 90 °C im Wasserbad reduzieren

Bis-Tris gepufferte NuPAGE™*Lösungen*

Elektrodenpuffer (x 20) Fertiglsg. NuPAGE™ MES-SDS Running Buffer	97.6 g 60.6 g 10.0 g 3.0 g	MES (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure) Tris Base SDS EDTA ad 500 ml mit bidest. Wasser
Elektrodenpuffer (x 20) Fertiglsg. NuPAGE™ MOPS-SDS Running Buffer	104.6 g 60.6 g 10.0 g 3.0 g	MOPS (3-(N-Morpholino)propansulfonsäure) Tris Base SDS EDTA ad 500 ml mit bidest. Wasser vor Gebrauch mit bidest. Wasser verdünnen

Gele

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

- NuPAGE™ 12 % Bis-Tris Gel
Totalamidkonzentration: 12 %
Puffer: Bis-Tris
Maße: 8 cm x 8 cm x 1 mm
Typ: 12 well

Durchführung

- Gel aus der Verpackung entnehmen
- Klebestreifen von der Unterseite abziehen
- Kamm aus der Gelkassette entfernen
- Gelkassette entsprechend der Vorschrift in der Elektrophoresekammer (Xcell II Mini Cell) platzieren
- Elektrodenpufferkammern mit Elektrodenpuffer befüllen
- Probenlots mit den Proben (10 - 20 µl) beladen (HPLC-Spritze)
- Elektrophoresekammer schließen
- Spannung (200 V) anlegen
- Lauf beenden, wenn die Farbstoffe des Probenpuffers an der Anode angelangt sind
- Strom ausschalten, Elektrophoresekammer öffnen und die Gelkassette entnehmen
- Gelkassette aufbrechen und das Gel vom Kunststoffträger lösen

- Gel färben oder zum Semidry Blotting einsetzen

7.6.2. IEF

Für die IEF werden wässrige Extrakte eingesetzt. Es wird mit dem NuPAGE™ Elektrophoresesystem sowie Fertiggele und -lösungen der Firma Novex™ (San Diego, CA, USA) entsprechend den angegebenen Vorschriften gearbeitet.

pI-Marker

Protein	pI
Cytochrom C	10.7
Ribonuclease A	9.5
Lectin	8.3 8.0 7.8
Myoglobin	7.4 6.9
Carbonic anhydrase	6.0
β-Lactoglobulin	5.3 5.2
Trypsininhibitor	4.5
Glucoseoxidase	4.2
Amyloglucosidase	3.5

Lösungen

Anodenpuffer (x50) Fertiglg. NuPAGE™ (pH 2.4)	2.4 ml	Phosphorsäure 85 % ad 100 ml bidest. Wasser vor Gebrauch mit bidest. Wasser verdünnen
Kathodenpuffer (x10) Fertiglg. NuPAGE™ (pH 3 - 7, pH 10.1)	5.8 g	Lysin (freie Base) ad 100 ml bidest. Wasser vor Gebrauch mit bidest. Wasser verdünnen mit Helium entgasen

Gele

pI: 3 - 10

Dicke: 1 mm

Größe: 8 cm x 8 cm

Typ: 12 well

Probenvolumen: max. 40 µl

Durchführung

- Gelkassette aus der Verpackung entnehmen
- Klebestreifen entfernen
- Kamm aus der Gelkassette herausziehen
- Gelkassette in die Elektrophoresekammer (Xcell II Mini Cell) stellen
- Elektrodenpuffer einfüllen
- Wells mit 20 µl Probe beladen
- Elektrophoresekammer schließen
- Strom anlegen (s. Tabelle 7-1)
- nach erfolgter Trennung Strom abstellen
- Gel entnehmen
- Gel färben, für Semidry Blotting oder 2D-Elektrophorese einsetzen

Tab. 7-1: Bedingungen der IEF

Spannung [V]	Laufzeit [min]
100	90
200	90
500	20

7.6.3. 2D-Elektrophorese

Die 2D-Elektrophorese wird nach GÖRG et al. (1988) mit IEF und SDS Fertiggelele und –lösungen der Firma Novex™ (san Diego, CA, USA) durchgeführt

Lösungen

Tris-HCl-Puffer (pH 6.8) 0.5 M Tris 0.4 % SDS	6.06 g 0.4 g	Tris SDS mit 80 ml bidest. Wasser versetzen mit 4 M HCl ad pH 6.8 ad 100 ml mit bidest. Wasser auffüllen
Dithiothreitol (DTT)-Lösung 2.6 M DTT	250 mg	DTT in 0.5 ml bidest. Wasser lösen Lösung direkt vor Gebrauch ansetzen
Äquilibrierlösung 2 % SDS 6 M Harnstoff 0.1 mM EDTA 0.01 % Bromphenolblau 0.01 % Pyronin-Y 50 mM Tris-HCl 30 % Glycerin	2.0 g 36 g 3 mg 10 mg 10 mg 10 ml 35 ml	SDS Harnstoff EDTA Bromphenolblau Pyronin Y Tris-HCl-Puffer (pH 6.8) Glycerin (87 %ig) ad 100 ml mit bidest. Wasser

Durchführung

- IEF durchführen
- pI-Marker ausschneiden und unspezifisch färben
- einen ca. 5 mm breiten Streifen aus der fokussierten Probe schneiden
- Gelstreifen in ein Pyrexglas überführen
- mit 15 ml Äquilibratorlösung und 200 µl DTT-Lösung versetzen
- 3 min bei 90 °C reduzieren
- Gelstreifen auf das SDS-Gel legen und Luftblasen entfernen
- MG-Marker auftragen
- elektrophoretische Trennung durchführen (s. 7.6.1)
- nach vollständigem Eintritt der Probe in das Sammelgel Gelstreifen entfernen
- nach beendeter Trennung Gel färben oder für Semidry Blotting einsetzen

7.7. Dot Blot

Durchführung

- Lyophilisate der Protein- und Peptidlösungen nach enzymatischer Verdauung in 5 µl bidest. Wasser lösen
- je 2 µl des Extraktes auf eine NC-Membran auftragen
- Membran bei Raumtemperatur trocknen
- immunfärben (s. 7.9)

7.8. Semidry Blot

7.8.1. Semidry Blot auf NC-Membranen

Der Semidry Blot auf NC-Membranen erfolgt modifiziert nach KHYSE-ANDERSEN (1984).

Lösungen

Anodenpuffer I (pH 10.4) 0.3 M Tris 20 % Ethanol	7.27 g 40 ml	Tris Ethanol (96 %ig) mit bidest. Wasser ad 200 ml
Anodenpuffer II (pH 10.4) 0.025 M Tris 20 % Ethanol	0.61 g 40 ml	Tris Ethanol (96 %ig) mit bidest. Wasser ad 200 ml
Kathodenpuffer (pH 7.6) 0.040 M EACA 20 % Ethanol	1.05 g 40 ml	6-Aminohexansäure (EACA) Ethanol mit bidest. Wasser ad 200 ml

Durchführung

- Blotmembran zuschneiden
 - Graphitkathode mit bidest. Wasser befeuchten
 - 4 Lagen Haushaltstücher mit Kathodenpuffer tränken und auf die Kathode legen
 - das aus der Elektrophoresekammer entnommene Gel auf die Tücher legen
 - Blotmembran in Anodenpuffer II tränken und auf das Gel legen
 - Bereiche, an denen kein Transport erfolgen soll, mit Kunststoffstreifen abdecken
 - 2 Lagen Haushaltstücher mit Anodenpuffer II tränken und auf die Blotmembran legen
 - 4 Lagen Haushaltstücher in Anodenpuffer I tränken und auf den beschriebenen Stapel legen
 - Luftblasen aus den Stapel rollen
 - mit bidest. Wasser angefeuchtete Graphitanode auflegen
 - Semidry Blot durchführen
- SDS-PAGE: 30 V, 0.8 mA/cm², 80 min
IEF : 15 V, 0.5 mA/cm², 120 min

7.8.2. Semidry Blot auf PVDF-Membranen

Die Durchführung wird nach WARD et al. (1990) vorgenommen.

Lösungen

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

Lösungen

- nach erfolgter SDS-PAGE
- PVDF-Blotmembran zuschneiden
- 5 min in Methanol, 5 min in dest. Wasser und 15 min in Elektrodenpuffer inkubieren
- Gel 30 min in Elektrodenpuffer inkubieren
- Graphitkathode mit bidest. Wasser befeuchten
- Haushaltstücher (6 Lagen) mit Elektrodenpuffer durchfeuchten
- Tücher auf die Kathode lege
- Gel auf den Tüchern platzieren
- Membran luftblasenfrei auf das Gel legen
- freie Stellen mit Kunststoffstreifen versehen
- Haushaltstücher (6 Lagen) mit Elektrodenpuffer befeuchten
- Tücher auf Membran legen
- Luftblasen aus dem Stapel drücken
- Graphitanode mit bidest. Wasser befeuchten
- Anode auflegen
- blotten: 30 V, 0.8 mA/cm², 70 min
- Membran bei RT (Raumtemperatur) trocknen und zur Färbung einsetzen

7.9. Immunfärbung

Bei der Immunfärbung wird ein Verstärkersystem nach VIETHS et al. (1992b) eingesetzt.

Lösungen

PBS (pH 7.4) 0.15 M NaCl 0.0027 M KCl 0.01 M K ₂ HPO ₄		1 Puffertablette in 200 ml bidest. Wasser lösen
Blockierlösung (pH 7.4) 5 % Magermilchpulver 0.1 % Tween™ 20 0.01 M Phosphatpuffer	5 g 100 µl	Magermilchpulver Tween™ 20 mit PBS ad 100 ml
Inkubationspuffer (pH 7.4) 0.1 % BSA 0.05 % Tween™ 20 0.01 M Phosphatpuffer	100 mg 50 µl	BSA Tween™ 20 mit PBS ad 100 ml
Waschpuffer (pH 7.4) 0.05 % Tween™ 20 0.01 M Phosphatpuffer	50 µL	Tween™ 20 mit PBS ad 100 ml
Patientenserum		100 ml Serum mit 1400 µl Inkubationspuffer versetzen
Anti-Human-IgE vom Kaninchen		1:4000 mit Inkubationspuffer verdünnen
Anti-Kaninchen-IgG Von der Ziege, biotinyliert		1:6000 mit Inkubationspuffer verdünnen
Streptavidin-HRP		1:20000 mit Inkubationspuffer verdünnen
Umpufferungslösung (pH 6.0) 0.01 M Tris	121.2 mg	Tris in 80 ml bidest. Wasser lösen mit 4 molarer HCl pH 6.0 einstellen mit bidest. Wasser auf 100 ml auffüllen
Färbelösung I (frisch ansetzen)	24 mg 80 mg	TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) DONS ad 10 ml mit 96 %igem Ethanol
Färbelösung II (pH 5.0) 0.15 M Citrat-Phosphatpuffer	9.4 g 18.2 g	Citronensäure Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O ad 1000 ml mit dest. Wasser
Färbelösung		Färbelösung I und II im Verhältnis 1:3 mischen je 40 ml Lösung 20 µl H ₂ O ₂ (30 %ig) hinzugeben

Durchführung

Pro Blotstreifen werden 1.5 ml der jeweiligen Lösung eingesetzt. Die Färbung erfolgt auf einer Schüttelmaschine.

- nach SDS-PAGE und Semidry Blot die getrocknete Membran in ca. 0.4 cm breite Streifen schneiden und in Färbekammern legen
- unspezifische Bindungen 2 x 15 min mit Blockierlösung verhindern
- über Nacht mit 1.4 ml Inkubationspuffer und 100 µl Patientenseren je Streifen inkubieren
- 3 x 5 min mit Waschpuffer waschen
- 1 h mit Anti-Human-IgE inkubieren
- 3 x 5 min mit Waschpuffer waschen
- 1 h mit Anti-Kaninchen-IgG inkubieren
- 3 x 5 min mit Waschpuffer waschen
- 20 min mit Streptavidin-HRP inkubieren
- 3 x 5 min mit Waschpuffer waschen
- 1 min mit Umpufferungslösung umpuffern
- mit Färbelösung färben
- mit Wasser spülen

7.10. Immunoblot-Inhibition

Immunoblot-Inhibitionen werden nach VIETHS et al. (1995a) vorgenommen.

Lösungen

s. Immunfärbung

Durchführung

- 100 µl Poolserum mit 200 µl Inhibitorextrakt und 1.2 ml Inkubationspuffer versetzen
- 1 h bei Raumtemperatur inkubieren
- unspezifische Inhibition: 100 µl Poolserum mit 200 µl Ovalbumin-Lösung (1 mg/ml in Inkubationspuffer) als Inhibitor und 1.2 ml Inkubationspuffer versetzen und 1 h bei Raumtemperatur inkubieren
- Immunfärbung wie beschrieben bis zur Blockierung durchführen
- einen Blotstreifen mit 100 µl Kontrollserum und 1.4 ml Inkubationspuffer über Nacht inkubieren
- alle anderen Blotstreifen mit den zuvor mit Inhibitorlösungen inkubiertem Poolserum über Nacht inkubieren
- Membranen wie beschrieben immunfärben

7.11. Profilinblot

Die Durchführung erfolgt in Anlehnung an VIETHS et al. (1994b) und FÄH (1995).

Durchführung

- nach Semidry Blotting Membran trocknen
- Membran in Streifen schneiden
- unspezifische Bindungsstellen wie beschrieben mit Blockierlösung blockieren
- Streifen über Nacht mit 1.5 ml Anti-Birnenprofilin-Antikörpern (1:10000 mit Inkubationspuffer verdünnt) inkubieren
- Streifen immunfärben

7.12. Unspezifische Färbung von Proteinen im Gel

7.12.1. Silberfärbung

Die Silberfärbung wird nach HEUCKESHOVEN und DERNICK (1986) durchgeführt.

Lösungen

Fixierlösung (frisch ansetzen)	30 ml 10 ml	Ethanol (96 %ig) Eisessig ad 100 ml mit bidest. Wasser
Inkubationslösung	17 g 75 ml	Natriumacetat Ethanol (96 %ig) ad 250 ml mit bidest. Wasser
kurz vor Gebrauch zugeben:	1.25 ml 0.50 g	Glutaraldehyd (25 % g/v) Na ₂ S ₂ O ₃ · 5 H ₂ O
Silberlösung	0.5 g	AgNO ₃ ad 250 ml mit bidest. Wasser
kurz vor Gebrauch zugeben:	50 µl	Formaldehyd (37 % g/v)
Entwicklerlösung	25 g	Na ₂ CO ₃ ad 1000 ml mit bidest. Wasser
kurz vor Gebrauch zugeben:	100 µl	mit NaHCO ₃ auf pH 11.8 einstellen Formaldehyd (37 % g/v)
Stopplösung	18.6 g	EDTA ad 1000 ml mit bidest. Wasser

Durchführung

- Gel nach vorangegangener SDS-PAGE aus der Elektrophoresekammer entnehmen und in eine Kunststoffwanne überführen
- mindestens 30 min mit 100 ml Fixierlösung inkubieren
- mindestens 30 min mit 100 ml Inkubationslösung behandeln
- 5 x 5 min mit je 100 ml bidest. Wasser waschen

- 20 min mit 100 ml Versilberungslösung behandeln
- 1 min mit bidest. Wasser waschen
- 1 min mit 50 ml Entwicklungslösung inkubieren
- 3 - 7 min mit 100 ml Entwicklerlösung behandeln
- 15 min mit 100 ml Stopplösung behandeln um die Färbung zu stoppen

7.12.2. Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung

Die Färbung erfolgt in Anlehnung an FLING und GREGERSON (1986) sowie ROSENFELD et al. (1992).

Lösungen

Färbelösung 0.1 % CBB 50 % Methanol 12 % Essigsäure	0.5 g 250 ml 60 ml	CBB R 250 Methanol Eisessig ad 500 ml mit bidest. Wasser
Entfärbelösung 30 % Methanol	30 ml	Methanol ad 100 ml mit bidest. Wasser

Durchführung

- nach SDS-PAGE Gel 2 h in Färbelösung inkubieren
- Hintergrund mit Entfärbelösung entfärben

7.13. Unspezifische Färbung von Proteinen auf Membranen

7.13.1. Ponceau-Färbung auf NC-Membranen

Lösungen

Färbelösung 2 % Ponceau S in 3 %iger Trichloressigsäure	2 g	Ponceau S ad 100 ml mit 3 %iger Trichloressigsäure
Entfärbelösung		3 %ige Essigsäure

Durchführung

- nach SDS-PAGE und anschließendem Semidry Blotting Membran 30 min mit Färbelösung inkubieren
- Hintergrund mit Entfärbelösung entfärben

7.13.2. Kolloidale Goldfärbung

Die kolloidale Goldfärbung wird für Proteine auf NC-Membranen eingesetzt (modifiziert nach DANSCHER und NOORGARD, 1983).

Lösungen

Tween-Tris-Buffered-Saline (TTBS)-Lösung 20 mmol/l Tris 500 mmol/l NaCl 0.3 % Tween™ 20	1.21 g 14.61 g	Tris NaCl 400 ml bidest. Wasser mit 4 M HCl auf pH 7.5 einstellen 1.5 ml Tween™ 20 ad. 500 ml mit bidest. Wasser
“Colloidal Gold Total Protein Stain”		Fertiglösung (BioRad, München, Deutschland)

Durchführung

- Membran 3 x 20 min mit je 100 ml TTBS-Lösung waschen
- 3 x 20 min mit je 100 ml bidest. Wasser waschen
- Proteine mit 50 ml “Colloidal Gold Total Protein Stain“ färben

7.13.3. Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung auf PVDF Membranen

Die Färbung wird nach WARD et al. (1990) angefertigt.

Lösungen

Färbelösung 50 % Methanol 10 % Essigsäure 0.1 % CBB R 250	50 ml 10 ml 0.1 g	Methanol Eisessig CBB R 250 mit bidest Wasser ad 100 ml
Entfärbelösung 50 % Methanol 10 % Essigsäure	50 ml 10 ml	Methanol Eisessig ad 100 ml mit bidest. Wasser

Durchführung

- nach SDS-PAGE und Blotten PVDF-Membran 5 - 10 min mit Färbelösung inkubieren
- Hintergrund mit Entfärbelösung entfärben
- Membran mit bidest. Wasser waschen
- Membran trocknen

7.14. Nachweis von Glycoproteinen

7.14.1. Periodsäure-Schiffsche-Färbung

Der Nachweis erfolgt nach FOCKE et al. (1998).

Lösungen

Fixierlösung 70 % Methanol 10 % Eisessig	70 ml 10 ml	Methanol Eisessig ad 100 ml mit bidest. Wasser
Inkubationslösung 1 % Periodsäure 30 % Eisessig	1 g 30 ml	Periodsäure Eisessig mit bidest. Wasser ad 100 ml
Schiffsches Reagenz		Fertiglösung

Durchführung

- nach SDS-PAGE Gel in Kunststoffwanne überführen
- Gel 30 min mit Fixierlösung inkubieren
- 5 min mit bidest. Wasser waschen
- 30 min mit Inkubationslösung behandeln
- 24 h mit Schiffischem Reagenz behandeln
- mit bidest. Wasser waschen bis der Hintergrund farblos ist

7.14.2. Periodatspaltung

Der Nachweis erfolgt nach VIETHS et al. (1995b)

Lösungen

Periodatlösung, pH 5.0 0.1 M NaIO ₄ 0.01 M Natriumacetat	2.13 g 0.08	NaIO ₄ Natriumacetat ad 100 ml mit bidest. Wasser
desaktivierte Periodatlösung 0.1 M NaIO ₄ 0.01 M Natriumacetat 0.05 M Sorbit	2.13 g 0.08 g 0.91 g	NaIO ₄ Natriumacetat Sorbit ad 100 ml mit bidest. Wasser
Sorbitlösung 0.5 M Sorbit	0.91 g	Sorbit ad 100 ml mit bidest. Wasser
Inkubationspuffer		s. Immunfärbung

Durchführung

- nach SDS-PAGE und Semidry Blotting Membran in Streifen schneiden und unspezifische Bindungsstellen blockieren (s. Immunfärbung)
- Blotstreifen mit 1.5 ml Periodatlösung bzw. desaktivierter Periodatlösung (Kontrolle) 2 h unter Lichtausschluss inkubieren
- Reaktion durch Zugabe von 1.5 ml Sorbitlösung stoppen
- 3 x 5 min mit Inkubationspuffer waschen
- Streifen analog zur Immunfärbung mit Seren versetzen und immunfärben

7.14.3. Lectinblot

Für den Nachweis werden biotinylierte Lectine eingesetzt und in Anlehnung an VIETHS et al. (1994c) verfahren.

Lösungen

Lectinlösungen 1 µg/ml	1 mg	Lectin ad 1 l PBS
---------------------------	------	----------------------

Durchführung

- IB bis zur Blockierung der freien Bindungsstellen durchführen
- Blotstreifen 1 h mit Lectinlösung inkubieren
- analog zur Immunfärbung färben

7.15. Methoden zur Allergenisolierung

7.15.1. Ammoniumsulfatfällung

Lösungen

Ammoniumsulfatlösung, gesättigt	90 g	Ammoniumsulfat ad 100 ml mit bidest. Wasser
------------------------------------	------	--

Durchführung

- Proteinlösungen mit Ammoniumsulfatlösung versetzen, so dass der Anteil der Ammoniumsulfatlösung 40 % entspricht
- über Nacht bei 4 °C stehen lassen
- Niederschlag abzentrifugieren (10509 g, 4 °C, 60 min)
- Filtrat erneut mit Ammoniumsulfatlösung versetzen und analog verfahren.
- Niederschläge in bidest. Wasser aufnehmen oder gefriertrocknen.

7.15.2. GPC

Die GPC wird in Anlehnung an MÖLLER (1997) durchgeführt.

Pumpe	MERCK Hitachi L-6000 A
Detektor	MERCK Hitachi L-4000
Messwellenlänge	280 nm
Auswerteeinheit	Merck Hitachi D-2000 Chromato-Integrator
Probe	PBS-Extrakte aus Acetonpulver
Probenaufgabevolumen	1 ml
Trennsäule	Sephacryl TM S-100 Länge: 58 cm Durchmesser: 0.26 cm
Eluent	0.03 M NaCl + 0.01 M Na ₂ HPO ₄ (pH 7.0)
Flow	0.5 ml/min

Elution der Standardproteine

Protein	MG [kDa]	Konzentration [mg/ml]	Retentionszeit [min]
Rinderserumalbumin	67.0	0.2	252.13
Ovalbumin	43.0	0.2	277.57
Chymotrypsinogen A	25.0	0.2	357.37
Ribonuclease A	13.7	0.2	391.14

7.15.3. AC

Die AC wurde unter Verwendung des Lectins WGA nach CARTELLIERI (2002) in Zusammenarbeit mit dem GKSS-Forschungszentrum in Geesthacht durchgeführt

Pumpe	MERCK Hitachi Pump L-7100
Detektor	MERCK Hitachi DA-Detector L-7450
Messwellenlänge	214 nm
Auswerteeinheit	Auswertesoftware HSM (HPLC System Manager) Merck Hitachi
Probe	PBS-Extrakt nach Abtrennung der Zucker mittels GPC und Dialyse
Probenaufgabevolumen	500 µl
Trennsäule	WGA Toyopearl
Eluent I (Adsorptionspuffer)	0.01 M Phosphatpuffer, pH 7.4
Eluent II (Elutionspuffer)	0.01 M Phosphatpuffer, pH 7.4 + 0.2 M N-Acetylglucosamin

7.15.4. IEC**7.15.4.1. Anionenaustauschchromatographie**

Die Anionenaustauschchromatographie wird in Anlehnung an MÖLLER (1997) durchgeführt.

Pumpe	MERCK Hitachi Pump L-7100
Detektor	MERCK Hitachi UV-Detector L-7400
Messwellenlänge	280 nm
Auswerteeinheit	PC, ChromStar Version 4.14
Probe	wässrige Extrakte aus Acetonpulver
Probenaufgabevolumen	3.5 ml
Trennsäule	Resource™ Q, 6 ml
Eluent I	0.02 M Tris-HCl, pH 8.0
Eluent II	0.02 M Tris-HCl, pH 8.0 + 0.5 M NaCl

Gradient I

Zeit [min]	Anteil Eluent I [%]	Anteil Eluent II [%]	Flow [ml/min]
0	100	0	0.3
0.3	100	0	1
5	100	0	1
105	0	100	1
113	0	100	1
125	100	0	1
140	100	0	1

Elution der Standardproteine

Anhang

Protein	pI	Konzentration [mg/100 ml]	Retentionszeit [min]
Myoglobin	7.4	11.9	6.917
Conalbumin	6.1	11.7	27.258
Ovalbumin	4.6	25.3	45.836
Amyloglucosidase	3.5	34.3	72.350

$$y = -0.0608x + 7.7157 \quad R^2 = 0.98$$

Gradient II

Zeit [min]	Anteil Eluent I [%]	Anteil Eluent II [%]	Flow [ml/min]
0	100	0	0.3
0.3	100	0	1
5	100	0	1
40	65	35	1
41	0	100	1
50	0	100	1
51	100	0	1
65	100	0	1

Gradient III

Zeit [min]	Anteil Eluent I [%]	Anteil Eluent II [%]	Flow [ml/min]
0	100	0	0.3
0.3	100	0	1
5	100	0	1
160	65	35	1
170	0	100	1
180	0	100	1
185	100	0	1
205	100	0	1

Protein	pI	Konzentration [mg/100 ml]	Retentionszeit [min]
Myoglobin	7.4	11.9	7.021
Conalbumin	6.1	11.7	103.541

Gradient IV

Zeit [min]	Anteil Eluent I [%]	Anteil Eluent II [%]	Flow [ml/min]
0	100	0	0.3
0.3	100	0	1
5	100	0	1
55	50	50	1
65	0	0	1
70	0	0	1
80	100	100	1
100	100	100	1

7.15.4.2. Kationenaustauschchromatographie

Die Elution der Proteine erfolgt in Anlehnung an AKASAVA et al. (1996) mit einem Citrat-Puffer.

Pumpe	MERCK Hitachi Pump L-7100
Detektor	MERCK Hitachi UV-Detector L-7400
Messwellenlänge	280 nm
Auswerteeinheit	PC, ChromStar Version 4.14
Probe	wässrige Extrakte aus Acetonpulver Proteine aus Peak A der Anionenaustauschchromatographie (dialysiert)
Probenaufgabevolumen	3.5 ml
Trennsäule	Resource™ S, 6 ml
Eluent I	0.01 M Natriumcitrat, pH 3.0
Eluent II	0.01 M Natriumcitrat, pH 3.0 + 0.5 M NaCl

Gradient

Zeit [min]	Anteil Eluent I [%]	Anteil Eluent II [%]	Flow [ml/min]
0	100	0	0.3
0.5	100	0	1
15	100	0	1
60	30	70	1
65	0	100	1
70	100	0	1
75	100	0	1

7.15.5. RPC

Pumpe	MERCK Hitachi Pump L-7100
Detektor	MERCK Hitachi UV-Detector L-7400
Messwellenlänge	280 nm
Auswerteeinheit	PC, ChromStar Version 4.14
Probe	Proteine aus Peak C der Anionenaustauschchromatographie (dialysiert)
Probenaufgabevolumen	1 ml
Trennsäule	Source™ 15RPC, Höhe: 10 cm, Durchmesser: 1.0 cm
Eluent I	0.1 % TFA
Eluent II	Acetonitril

Zeit [min]	Anteil Eluent I [%]	Anteil Eluent II [%]	Flow [ml/min]
0	100	0	0.3
0.5	100	0	1
2	100	0	1
40	40	60	1
45	20	80	1

7.16. Verdau im Gel

Der Verdau im Gel wird modifiziert nach ROSENFELD et al. (1992) vorgenommen. Die verwendeten Enzyme sowie die Enzym-Substratverhältnisse sind unter 3.15.2 dokumentiert.

Lösungen

Waschpuffer 50% Acetonitril 50 mM Ammoniumcarbonat pH 8.9	250 ml 3.93 g	Acetonitril Ammoniumcarbonat mit bidest. Wasser ad 500 ml
Rehydrationspuffer <i>Pepsin</i> 10 mM HCl 0.03 M NaCl	100 µl 175 µg	konz. HCl NaCl mit bidest. Wasser ad 100 ml
Rehydrationspuffer <i>Trypsin, Chymotrypsin, Lys C</i> 50 mM Ammoniumcarbonat (pH 8.9)	1.57 g	Ammoniumcarbonat mit bidest. Wasser ad 200 ml
Verdauungspuffer 35 µg/ml Pepsin 0.25 µg/ml Trypsin 10 µg/ml Chymotrypsin 3.3 µg/ml Lys C	1.79 mg 100 µg 100 µg 0.5 µg	Pepsin in 50 ml Rehydrationspuffer lösen Trypsin mit 400 ml Rehydrationspuffer versetzen Chymotrypsin mit 10 ml Rehydrationspuffer versetzen Lys C mit 150 ml Rehydrationspuffer versetzen
Extraktionslösung 60 % Acetonitril 0.1 % TFA	60 ml 0.01 ml	Acetonitril TFA mit bidest. Wasser ad 100 ml

Durchführung

- Banden mit einem Skalpell ausschneiden
- Banden in Tubes überführen
- 3x 20 min mit 250 µl Waschpuffer waschen
- Gelfragmente im Vakuumtrockenschrank trocknen

weitere Durchführung: *Pepsin, Trypsin, Lys C*

- mit 5 µl Rehydrationspuffer versetzen
- Verdauungspuffer dazugeben:
Pepsin: 2 µl für 25 und 28 kDa Allergen, 2 µl (1:6.5 verdünnt für 14, 55 und 70 kDa Allergen), Trypsin 2 µl, Lys C 2 µl
- mit Rehydrationspuffer versetzen bis die Gelfragmente Originalgröße erreicht

haben (5 µl)

- mit weiteren 50 µl Rehydrationspuffer versetzen, Gelstücke sind bedeckt
- 37° C inkubieren (Pepsin 2 h, alle anderen Enzyme über Nacht)
- 3x 20 min mit 100 µl Extraktionslösung auf Kombischüttler extrahieren
- vereinigte Extrakte gefriertrocknen

weitere Durchführung: Chymotrypsin- und Trypsin nach Magenverdauung

- Pepsinverdau durchführen (ohne Extraktion)
- 40 µl Rehydrationspuffer zugeben
- mit 2 µl Verdaupuffer I und/oder II versetzen
- über Nacht bei 37° C inkubieren
- 3x 20 min mit 100 µl Extraktionslösung auf Schüttelgerät extrahieren
- vereinigte Extrakte gefriertrocknen

7.17. Entsalzen

7.17.1. Entsalzen von Proteinlösungen

- Proteinlösungen in Slide-A-Lyzer™ Dialyse-Kammer (Pierce, Rockford, USA) einfüllen
- mindestens 4 h gegen bidest. Wasser dialysieren

7.17.2. Entsalzen von Peptidlösungen

Das Entsalzen der Peptidlösungen erfolgt mit Hilfe von ZipTips™ der Firma Eppendorf (Hamburg, Deutschland) nach Herstelleranleitung.

Lösungen

Pre-Wet-Lösung 50 % Acetonitril	50 ml	Acetonitril mit bidest. Wasser ad 100 ml
Äquilibrierlösung 0.1 % TFA	0.1 ml	TFA mit bidest. Wasser ad 100 ml
Waschlösung 0.1 % TFA	0.1 ml	TFA mit bidest. Wasser ad 100 ml
Elutionslösung I 50 % Acetonitril 0.1 % TFA	50 ml 0.1 ml	Acetonitril TFA mit bidest Wasser ad. 100 ml
Elutionslösung II Acetonitril		Acetonitril

Durchführung

- Probe in 4 µl 0.1 % TFA aufnehmen
- ZipTip™ auf 10 µl-Pipette aufsetzen
- 1 x mit Pre-Wet-Lösung spülen
- 1 x mit Äquibrierlösung spülen
- Probe in 4 µl 0.1% TFA aufnehmen
- 10 x Probe aufnehmen und ausspülen
- 6 x mit 4 µl Elutionslösung I spülen
- 2 x mit 10 µl Elutionslösung II spülen
- vereinigte Extrakte gefriertrocknen und für Messung einsetzen

7.18. N-terminale Sequenzierung

Durchführung

- Proteine auf PVDF-Membran unspezifisch mit CBB anfärben
- Proteinbande mit Skalpell ausschneiden
- direkt zur Sequenzierung einsetzen

7.19. MALDI-TOF und MALDI-TOF/TOF-Messungen

Für die MALDI-TOF und MALDI-TOF/TOF Messungen werden Peptide eingesetzt, die durch tryptischen Verdau aus einem Allergen entstanden sind.

- gefriergetrocknete Extrakte mit 2 µl 60 % Acetonitril/ 0.1 % TFA versetzen
- mit Matrix (α -4-Hydroxy-Cyano-Zimtsäure) versetzen

7.20. Charakterisierung der Patientenseren

Nr.	Patient	Geburtsjahr/ Geschlecht	klinische Symptome	EAST- Klasse/ spez. IgE [U/ml]	Allergenbanden im IB [kDa]
1	EA	54 - w	KM	2/ 1.06	25, 28, 32, 35, 40
2	RD	65 - m	KM, RH	3/ 3.93	14, 25, 35, 40, 55, 70
3	MF	76 - m	KM	2/ 0.98	14, 35, 40, 55, 60, 65, 70
4	RF	46 - w	KM, SL	2/ 1.84	35, 55, 60, 65
5	CF	60 - w	KA	2/ 0.93	25, 35, 55, 60, 65, >70
6	KH	54 - m	RH, D, E	4/ > 17.5	25, 28, 32, 40, 43, 55, 70, >70
7	PK	66 - m	KM	2/ 1.03	35, 55, 60, 65
8	RK	85 - m	BS, Ü	3/ 5.72	14, 28, 32, 35, 40, 55, 60, 70, >70
9	SK	50 - w	SR, AN	3/ 10.1	14, 25, 28, 32, 35, 40, 43, 55, 60, 70, >70
10	CL	65 - w	SL, KM	2/ 0.69	32, 43, 55, 70, >70
11	HM	44 - m	KM	2/ 1.03	25, 28, 32, 35, 40, 43, 55, 70, >70
12	FR	53 - m	KM, SL	4/ > 17.5	25, 28, 32, 35, 40, 43, 55, 70, >70
13	HR	64 - m	KM, SL	2/ 1.34	14, 25, 28, 32, 35, 43, 55, 65, 70, >70
14	CS	67 - w	D, KM, SL	3/ 3,78	14, 25, 28, 32, 35, 43, 55, 70, >70
15	FS	67 - m	SL,SR, KM	3/ 4.27	35, 40, 55, 70, >70
16	IS	39 - w	KM	2/ 1.04	32, 35, 43, 55, 70, >70
17	LS	72 - m	KA	3/ 4.27	14, 35, 55, 65
18	MS	86 - m	KM, SR	2/ 1.72	14, 28, 32, 35, 40
19	JW	44 - m	KM, SL	3/ 3.89	14, 25, 28, 32, 35, 40, 43, 55, 70, >70
20	SW	65 - m	KA	2/ 3.30	40, 55, 70, > 70
21	UW	41 - w	KM	3/ 9.50	25, 28, 32, 40, 43, 55, 70, >70

Anhang

Nr.	Patient	EAST-Klasse/ spez. IgE [U/ml]	Allergenbanden im IB [kDa]
22	HA	3/ 8.87	14, 40, 55, 70, >70
23	HB	3/ 3.56	25, 32, 40, 43, 55, 70, >70
24	StB	2/ 1.40	14, 28, 43, 55, 65
25	SuB	3/ 7.84	35, 40, 55, 70, >70
26	DD	2/ 2.76	28, 40, 43, 55, 65
27	DH	2/ 0.74	28, 40, 43, 70
28	IH	2/ 1.63	14, 28, 35, 43, 55
29	KH	3/ 3.71	28, 35, 40, 43, 55, 70, >70
30	AL	2/ 0.91	25, 28, 35, 40, 43, 55, 70, >70
31	JM	3/ 11.78	14, 28, 40, 43, 55, 70, >70
32	MR	2/ 1.04	28, 40, 43, 55, 70, >70
33	KS	2/ 1.09	28, 35, 40, 43, 55, 70, >70
34	Nu - 3	4/ > 17.5	28, 32, 35, 40, 43, 55, 70, >70
35	Nu - 8	4/ > 17.5	25, 28, 32, 35, 40, 43, 55, 70, >70
36	Nu - 36	2/ 1.23	25, 28, 40, 43, 55, 70, >70
37	Nu - 37	4/ > 17.5	28, 40, 43, 55, 70, >70
38	Nu - 41	3/ 3.84	25, 28, 40, 43, 55, 70, >70
39	Nu - 42	2/ 0.82	14, 25, 28, 35, 40, 43, 55, 70, >70

AN: Atemnot	KA: keine Angabe	SR: Schwellen des Rachenraumes
BS: Bauchschmerzen	KM: Kratzen im Mund	RH: Rhinitis
D: Dermatitis	Nu: Name unbekannt	Ü: Übelkeit
E: Ekzema	SL: Schwellen der Lippen	

7.21. Chemikalien, Geräte, Verbrauchsmaterial und Zubehör

7.21.1. Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Gefahrensymbol	R-Sätze	S-Sätze
Aceton	Merck	F	11	9-16-23,2-33
Acetonitril	Merck	F,T	11-23/24/25	16-27-45
6-Aminohexansäure	Merck			
Ammoniumcarbonat	Merck	Xn	22	
Amyloglucosidase	Fluka			
Anti-Human-IgE (Kaninchen)	DAKO			
Anti-Kaninchen-IgG, biotinyliert (Ziege)	DAKO			
Bovine Serum Albumin pH 7, reinst (BSA)	Serva			
Bromcyan	Merck	T+/C	26/27/28-34	9/26/45
Bromphenolblau	Merck			
Chymotrypsin (350 U/ mg)	Merck			
Chymotrypsinogen A	Amersham Pharmacia Biotech			
Citronensäure	Merck			
“Colloidal Gold Total Protein Stain”	BioRad			
Coomassie Brilliant Blue G/R 250	Serva			
Conalbumin	Fluka			
(3-Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure (CAPS)	Serva			
Diethylether	Merck	F+	12-19	9-16-29-33
Diocetylatriumsulfosuccinat (DONS)	Fluka	Xn	10-35	2-23,2-26
Dithiothreitol (DTT)	Sigma	Xn	36/37/38	26-36
EAST-Testkit “Spez. IgE ELISA TR (RV)”	Allergopharma			
Essigsäure, 99 -100 %ig	Merck	C	10-35	2-23,2-26
Ethanol, 96 %ig	Merck	F	11	7-16
Ethanolamin	Merck	Xi	20-36/37/38	
Formaldehyd, 37 %ig	Merck	T	23/24/25-40-43	26-36/37-44-51
Glutardialdehyd, 25 %ig	Merck	T	25-36/37/38-42/43	36-44
Glycerin, 87 %ig	Fluka			
Goldfärbelösung	Biorad			
Harnstoff	Merck			
IEF-Anodenpuffer	Novex			
IEF-Marker, pH 3.5 – 10.7	Serva			
IEF-Kathodenpuffer, pH 3 – 7	Novex			
Kurmolke Natur	Spinnrad			

Anhang

Chemikalie	Hersteller	Gefahrensymbol	R-Sätze	S-Sätze
α -Lactalbumin	Sigma			
Lectin <i>Abrus precatorius</i> Agglutinin	Sigma	T ⁺	26/27/28	45-36/37/39-23
Lectin Concanavalin A	Sigma	Xn	20/21/22-42/43-40	36
Lectin <i>Triticum vulgare</i> Agglutinin	Sigma			
Lectin <i>Tetragonolobus purpureus</i> Agglutinin	Sigma			
Lys C	Sigma			
Magermilchpulver	Glücksklee			
2-Mercaptoethanol	Serva	T	22-24-36/37/38	26-36/37-45
MES SDS Running Buffer (Fertiglösung)	Novex			
Methanol	Merck	T, F	11-23/25	2-7-16-24
MG-Marker (2.5 – 200 kDa)	Novex			
MG-Marker (14 – 94 kDa)	Amersham Pharmacia Biotech			
MOPS SDS Running Buffer (Fertiglösung)	Novex			
Myoglobin	Sigma			
Natriumacetat	Merck			
Natriumazid	Merck	T ⁺	28-32	28.1
Natriumcarbonat, wasserfrei	Merck	Xi	22	26
Natriumchlorid	Merck			
Natriumcitrat	Merck			
Natriumdiethyldithiocarbamat	Sigma	Xi	17-26	2-26
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck			
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva	Xn	20/22-36/38	26-28
Natriumhydrogencarbonat	Merck			
Natriumhydrogensulfid	Merck	C	31-34	2-24/25-26
Natriumhydrogenphosphat wasserfrei / Dihydrat	Merck			
Natriumhydroxid	Merck	C	35	2-26-37/39
di-Natriumhypochlorit-Dihydrat	Merck			
Natriumperodat	Merck	O	8	
Natriumthiosulfat · 5 H ₂ O	Merck			
Ovalbumin	Fluka			
PBS-Tabletten	Serva			
Pepsin (3200 – 4500 U/ mg)	Sigma			
Periodsäure	Merck	O,C	8-34	26-36/37/39-45
pI-Marker (3.5 – 10.7)	Serva			
Phosphorsäure, 88 %ig	Merck	C	34	26-36/37/39-45
Polyvinylpyrrolidon	Sigma			

Anhang

Chemikalie	Hersteller	Gefahrensymbol	R-Sätze	S-Sätze
Ponceau S	Merck			
Pufferlösung pH 4	Merck			
Pufferlösung pH 7	Merck			
Pyronin Y	Fluka			
Salzsäure, 37 %ig	Merck	C	34-37	26-36/37/39-45
Schiffssches Reagenz	Merck			
Sephacryl TM S 100 Säulenmaterial	Amersham Pharmacia Biotech	F		
Silbernitrat	Merck	C	34	26-45
Sorbit	Merck			
Source TM RP 15	Amersham Pharmacia Biotech			
Streptavidin-HRP-Konjugat	Medac			
Superdex TM 75 prep grade Säulenmaterial	Amersham Pharmacia Biotech	F		
3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	Fluka			
Titriplex TM II (EDTA)	Merck	Xi, U	36-52/52	61
Titriplex TM III (EDTA-di-Natriumsalz)	Merck	Xn	22	
Trichloressigsäure	Merck	C	35	24/25-26-45
Trizma TM Base (Tris)	Sigma	Xi	36/37/38	26-36
Trizma TM Hydrochlorid (Tris-HCl)	Sigma	Xi	36/37/38	26-36
Trifluoressigsäure				
Trypsin (8570 U/ mg)	Sigma			
Tween TM 20	Serva			
Wasserstoffperoxid, 30 %ig	Merck	C	34	28-36/39

7.21.2. Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Blot-Einheit	Nova Blot 2117-250	Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)
Elektrophoresekammer	EI-9001-Xcell II Mini Cell	Novex (San Diego. CA. USA)
ELISA-Reader	Microplate Reader MRX	Dynex Technologies (Frankfurt. Deutschland)
Integrator	D-2000 Chromato-Integrator	Merck Hitachi
Kombischüttler	KL 2	Johanna Otto GmbH (Hechingen, Deutschland)
Kühlschrank		Eisfink (Asperg. Deutschland)
Kühltruhe (-20 °C)		
Kühltruhe (-80 °C)	KLS 3085-1	Kryotec (Hamburg. Deutschland)
Gefriertrocknungsanlage	Gamma A 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	L-7100	Merck-Hitachi (Darmstadt. Deutschland)
HPLC-Pumpe	L-6000A	Merck-Hitachi (Darmstadt. Deutschland)
Schüttler	Typ 3016	GFL (Hannover. Deutschland)
Stromversorger I	Power Ease 500	Novex (San Diego. CA. USA)
Stromversorger II	Multidrive XL	Pharmacia LKB
Trockenschrank		Heraeus Instruments (Hanau. Deutschland)
Ultra-Turrax	T 25	Jahnke und Kunkel (Staufen i. Br.. Deutschland)
UV-Detektor	L-7400	Merck-Hitachi (Darmstadt. Deutschland)
UV-Detektor	L-4000	Merck-Hitachi (Darmstadt. Deutschland)
Vakuumtrockenschrank	Typ RVT 360	Heraeus Instruments (Hanau. Deutschland)
Vortex	Reax Top	Heidolph (Schwabach. Deutschland)
Waage (fein)	1202 MP	Sartorius (Göttingen. Deutschland)
Waage (grob)	1602 004	Sartorius (Göttingen. Deutschland)
Wasserbad/ Thermostat	FS 2	Haake (Karlsruhe. Deutschland)
Zentrifuge	3 K 15	Sigma (Osterode. Deutschland)

7.21.3. Verbrauchsmaterial

	Bezeichnung	Hersteller
Blotmembranen	Nitrocellulose. 0.2 µm	Schleicher & Schüll (Dassel. Deutschland)
	PVDF	Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala. Schweden)
Dialyse-Kassette	Slide-A-Lyzer	Pierce (Rockford, USA)
Kunststoffschalen	8 Kammern	Bio Rad (Herkules. CA. USA)
Filterpapier	Rundfilter 6 mm	Schleicher & Schüll (Dassel. Deutschland)
Kolbenhubpipetten	0.5 µL – 5 mL	Eppendorf (Hamburg. Deutschland)
Probengefäße	Glas. 4 ml	Eppendorf (Hamburg. Deutschland)
Reaktionsgefäße (Tubes)	Safe Lock. 2 ml	Eppendorf (Hamburg. Deutschland)
Pipettenspitzen		Eppendorf (Hamburg. Deutschland)
Membranfilter	45 µm	Schleicher & Schuell (Dassel. Deutschland)
NuPAGE™ Gele	1 mm; 10. 12 & 2D well	Novex (San Diego, CA, USA)
Parafilm		American National Can (Neenah. WI. USA)
Mikrotiterplatten	Minisorb. 96 Kavitäten	Nunc (Roskilde. Dänemark)
Zentrifugeneinsätze		

8. Literaturverzeichnis

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, 130-37.

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, 167-73.

AKASAVA A, HSIEH L, MARTIN BM, LIU T, LIN Y (1996): A novel acetic allergen, Hev b 5, in latex. *J Bio Chem* 271, 25389-25393.

ALLALLERGY (30.11.04), www.allallergy.net

ANDRE F, ANDRE 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.

ASERO R, MISTRELLO G, RONCAROLO D, DE VRIES SC, GAUTIER MF, CIURANA CLF, VERBEEK E, MOHAMMADI T, KNUL-BRETTLOVA V, AKKERDAAS JH, BULDER I, AALBERSE RC (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.

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.

AULEPP H, VIETHS S (1992): Probleme der Nahrungsmittelallergie. *Dtsch Lebensm Rundsch* 88, 171-179.

BAUER L, EBNER C, HIRSCHWEHR R, WÜTHRICH B, PICHLER C, FRITSCH R, SCHREINER 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.

BAYARD C, LOTTSPREICH F (2001): Bioanalytical characterization of proteins. *J Chromatogr B* 756, 113-122.

BESLER M, STEINHART H, PASCHKE A (1997): Allergenicity of hen's egg-white proteins: IgE-binding of native and deglycosylated ovomucoid. *Food Agric Immunol* 9, 277-288.

BLASER K (1993): Die Rolle der T-Lymphozyten in Allergie und Asthma. *Allergologie* 16, 39-42.

BJÖRKSTEN F, HALMEPURO L, HANNUKSELA M, LAHTI A (1980): Extraction and properties of apple allergens. *Allergy* 35, 671-677.

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.

BREITENEDER H, HOFFMANN-SOMMERGRUBER K, O'RIORDAIN G, SUSANI M, AHORN H, EBNER C, KRAFT D, SCHEINER O (1989): Molecular characterization of Api g 1, the major allergen of celery (*Apium graveolens*), and its immunological and structural relationships to a group of 17 kDa tree pollen allergens. *Eur J Biochem* 233, 484-489.

BROICHMANN PW, KÄSTNER H, KALVERAM K J (1992): Pseudopolyvalente Soforttypsensibilisierung im Sinne einer Kreuzallergie zwischen pflanzlichen Nahrungsmitteln, Pollen, Insektengiften und Schalentieren. *Allergologie* 15, 295-299.

BROSTOFF J, CHALLACOMBE ST J (1987): Food allergy and intolerance. Baillière Tindall, London.

BRIJNZEEL-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.

BURKS AW, WILLIAMS LW, HELM RM, TRESCHER W, BROOKS JR, SAMPSON HA (1999): Identification of soy protein allergens in patients with atopic dermatitis and positive soy challenges; determination of change in allergenicity after heating or enzyme digestion. *Adv Exp Med Biol* 289, 295-305.

CARTELLIERI SM (2002): Entwicklung eines biospezifischen Trennverfahrens für die Fraktionierung und Aufreinigung von Glycokonjugaten, Dissertation Universität Hamburg.

CESKA M, LUNDKVIST U (1972): A new and simple radioimmunoassay method for the determination of IgE. *Immunochem* 87, 1021-1030.

CHARDIN H, MAYER C, SÉNÉCHAL H, TEPFER M, DESVAUY F-X, PELTRE G (2001): Characterization of high-molecular-mass allergens in oilseed rape pollen. *Int Arch Allergy Immunol* 125, 128-134.

CLEMENTS RL (1965): Fruit proteins: extraction and electrophoresis. *Anal Biochem* 13, 390-401.

COOMBS RRA, GELL PGH (1963): The classification of allergic reactions underlying disease. In: Coombs (Herausgeber): *Clinical aspects of immunology*, Davis, Philadelphia 317.

CONTI A, FORTUNATO D, ORTOLANI C, GIUFFRIDA MG, PRAVETTONI V, (2001): Determination of the primary structure of two lipid transfer proteins from apricot (*Prunus armeniaca*). *J Chromatogr B* 756, 123-129.

DANSCHER G, NOORGARD JOR (1983): Light microscopic visualization of colloidal gold on resin-embedded tissue. *J Histochem Cytochem* 31, 1394.

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, HIRSCHWEHR R, BAUER L, BREITENEDER H, VALENTA R, EBNER H, KRAFT D, SCHREINER O (1995): Identification of allergens in fruit and vegetables: IgE cross-reactivities with the important birch allergens Bet v 1 und Bet v 2 (birch profilin). *J Allergy Clin Immunol* 95, 962-969.

EDMAN P, BEGG G (1967): A protein sequenator. *Eur J Biochem* 1, 80-91.

Egger D, Bienz K (1987): Colloidal gold staining and immunoprobng of proteins on the same nitrocellulose blot. *Anal Biochem* 166, 413-417.

ENGELHARD VH (1994): Die Antigen-Prozessierung. *Spektrum der Wissenschaft* 10, 48-56.

ERIKSON S, FAGERSON IS (1976): The plastein reaction and ist application: A review. *J Food Sci* 41, 490.

ERIKSSON NE, FORMGREN H, SVENONIUS E (1982): Food hypersensitivity in patients with birch pollen allergy. *Allergy* 37, 437-443.

ESSER C (1990): Immunoglobulin class switching: molecular and cellular analysis. *Annu Rev Immunol* 8, 717-753.

FÄH J, WÜTHRICH B, VIETHS S (1995): Anaphylactic reaction to lychee fruit: evidence for sensitization to profilin. *Clin Exp Allergy* 25, 1018-1023.

FERNÁNDEZ-CALDAS E, GONZÁLEZ Romano L, GALLEGO M, CASANOVAS M, GUERRA F, FERRER A, BERRENS L (2001): Immunochemical characterization of antigenic fragments of *olea europaea* and *phleum pratense*. *Int Arch Allergy Immunol* 124, 73-76.

FLING PS, GREGERSON DS (1986): Peptide and protein molecular weight determination by using a highmolarity tris-buffered system without urea. *Anal Biochem* 155, 83-88.

FOCKE M, HEMMER W, HAYEK B, GÖTZ M, JARISCH R (1998): Identification of allergens in oilseed rape (*Brassica napus*) pollen. *Int Arch Allergy Immunol* 117, 105-112.

FÖTISCH K, ALTMANN D, HAUSTEIN D, VIETHS S (1999): Involvement of carbohydrate epitopes in the IgE response of celery-allergic patients. *Int Arch Allergy Immunol* 120, 30-42.

FÖTISCH K, VIETHS S (2001): N- and O-linked oligosaccharides of allergenic glycoproteins. *Glycoconjugate J* 18, 373-390.

FRANKE W (1997): *Nutzpflanzenkunde*. 6, neubearbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

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.

GALLIN J, GOLDSTEIN J, SNYDERMAN R (1987): *Inflammation: Basic principles and clinical correlates*. Raven Press, New York.

GEHA R (1995): Immunreaktion in Abwesenheit einer Infektion. in: Janeway C & Travers P (Hrsg.) *Immunologie*, Spektrum Akademischer Verlag-Heidelberg, 489-538.

GIANNATTASIO M, SERAFINI M, GUARRERA P, CANNISTRACI C, CRISTAUDO A, SANTUCCI B (1995): Contact urticaria from litchi fruit (*Litchi chinensis* Sonn.) *Contact Dermatitis* 33, 67.

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. *Electrophoresis* 9, 531-46.

GUTTMAN A (1996): Capillar sodium dodecyl-sulfate gel electrophoresis of proteins. *Elektrophoresis* 17, 1333-1341.

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.

HELBING A (1994): Nahrungsmittelallergie. *Therapeutische Umschau* 51, 31-37.

HELBING A (1997): Wichtige kreuzreaktive Allergene. *Schweiz Med Wochenschr* 127, 382-389.

HEUCKESHOVEN J, DERNICK R (1986): Neue Ergebnisse zum Mechanismus der Silberfärbung. in: RADOLA BJ (ed.), *Elektrophorese Forum*, TU München, 22-27.

HOLGATE S, CHURCH M (1993): *Allergy*. Gower Medical Publishing, New York.

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.

JANEWAY JR CA (1993): Das molekulare Arsenal des Immunsystems. in: *Spektrum der Wissenschaft: Immunabwehr*; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 22-29.

JANEWAY CA, TRAVERS P, WALPORT M, SHLOMCHIK M (2002): *Immunologie*, 5. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

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.

KARAMLOO F, WANGORSCH A, KASAHARA H, DAVIN LB, HAUSTEIN D, LEWIS NG, VIETHS S (2001): Phenylcoumaran benzylic ether and isoflavonoid reductases are a new class of cross-reactive allergens in birch pollen, fruits and vegetables. *Eur J Biochem* 268, 5310-5320.

KINDER H (1999): Die Typ I Allergie gegen Mangofrüchte unter Berücksichtigung von Kreuzreaktionen. Dissertation, Universität Hamburg.

KING TP, THOMAS W (1994): Allergen nomenclature. *Int Arch Allergy Immunol* 105, 224-233.

KLEIN J (1991): *Immunologie*. 2. Auflage, Verlag Chemie, Weinheim.

KORTEKANGAS-SAVOLAINEN O, SAVOLAINEN J, EINARSSON R (1993): Gastrointestinal stability of baker's yeast allergens: an in vitro study. *Clin Exp Allergy* 23, 587-590.

KOVACS-NOLAN J, Wei Zhang J, HAYAKAWA S, MINE Y (2000): Immunochemical and structural analysis of pepsin-digested egg white ovomucoid. *J Agric Food Chem* 48, 6261-6266.

KREFT D, BAUER R, GOERLICH R (1995): *Nahrungsmittelallergene, Charakteristika und Wirkungsweise*. de Gruyter, Berlin, New York .

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.

LEPP U, UHLEMANN L, BECK WM, SCHLAAK M (1992): Litchi, ein neues Nahrungsmittelallergen. *Allergologie* 15, 56 A.

LI KW, GERAERTS WP, VAN ELK R, JOOSE J (1989): Quantification of proteins in the subnanogram and nanogram range: comparison of the AuroDye, FerriDye and India Ink staining method. *Anal Biochem* 182, 44-47.

LICHTENSTEIN L (1993): Allergy and the immune system. *Sci Am* 9, 85-93.

LOOMIS WD (1974): Overcoming problems of phenolic and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. *Methods Enzymol* 31, 528-544.

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, LUNDEL N (1992): Characterisation of the influence of displacing salts on retention in gradient elution ion exchange chromatography of proteins and peptides. *J Chromatogr* 627, 107-124.

MARI A, IACOVACCI P, AFFERNI C, BARLETTA B, TINGHINO R, DI FELICE G, PINI C (1999): Specific IgE to cross-reactive carbohydrate determinants strongly affect the in vitro diagnosis of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 103, 1005-1011.

MATSUDA T, WATANABE K, NAKAMURA R (1983): Immunochemical and physical properties of peptic-digested ovomucoid. J Agric Food Chem 31, 942-946.

MAZIAK W, BEHRENS T, BRASKY TM, DUHME H, RZEHAK P, WEILAND SK, KEIL U (2003): Are asthma and allergies in children and adolescents increasing? Results from ISAAC phase I and phase III surveys in Münster, Germany. Allergy 58, 572-579.

MCEVILY AJ, IYENGAR R, OTWELL WS (1992): Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. Criti Rev Food Sci Nutr 32, 253-273.

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.

MIDORO-HORIUTI T, GOLDBLUM RM, KUROSKY A, GOETZ DW, BROOKS EG (1999): Isolation and characterization of the mountain cedar (*Juniperus ashei*) pollen major allergen, Jun a 1, J Allergy Clin Immunol 104, 608-12.

MOEREMANS M, DANEELS G, DE MEY J (1985): Sensitive colloidal metal (gold or silver) staining of protein blot on nitrocellulose membranes. Anal Biochem 145, 315-321.

MÖLLER M (1997): Charakterisierung von Allergenen tropischer Früchte unter Berücksichtigung von Kreuzreaktionen. Dissertation, Universität Hamburg.

MÖLLER M, PASCHKE A, VIELUF D, KAYMA M, VIETHS S, STEINHART H (1997): 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.

MONTAG G, KALVERAM CM, GALL H (1996): Pollenassoziierte Nahrungsmittelallergie auf Lychee. Allergo 5, 139-142.

MURTAGH GJ, ARCHER DB, DUMOULIN M, RIDOUT S, MATTHEWS S, ARSHAD SH, ALCOGER MJC (2003): In vitro stability and immunoreactivity of the native and recombinant plant food 2S albumin Ber e 1 and SFA-8. Clin Exp Allergy 33, 1147-1152.

NAGPAL S, RAJAPPA L, METCALFE DD, SUBBA RAO PV (1989): Isolation and characterization of heat-stable allergens from shrimp. J Allergy Clin Immunol 83, 26-36.

NIGGEMANN B, REIBEL S, HIPLER C, WAHN U (2002): Anaphylactic reactions to lychee in a 12-year-old girl: Cross reactivity to latex? Pediatr Allergy Immunol 13, 64-67.

NILSEN BM, SLETTEN K, O'NEILL M, SMESTEAD PAULSEN B, VAN HALBEEK H (1991): Structural analysis of the glycoprotein allergen Art v II from pollen of mugwort. J Biol Chem 266, 2660-68.

ODANI S, AWATUHARA H, KATO Y (1997): Antigenic change of native and heat-denatured ovalbumin digested with pepsin, trypsin or chymotrypsin. J Home Econ Jpn 8, 717-722.

PASTORELLO EA, CONTI A, PRAVETTONI V, FARIOLI L, RIVOLTA F, ANSALONI R, ISPANO M, INCORVAIA C, GIUFFRIDA MG, ORTOLANI C (1998): Identification of actinidin as the major allergen of kiwi fruit. J Allergy Clin Immunol 101, 531-537.

PASTORELLO EA, FARIOLI L, PRAVETTONI V, ISPANO M, SCIBOLA E, TRAMBAIOLI C, GIUFFRIDA MG, ANSALONI R, GODOVAV-ZIMMERMANN J, CONTI A, FORTUNATO D, ORTOLANI C (2000): The maize major allergen, which is responsible for food-induced allergic reactions, is a lipid transfer protein. J Allergy Clin Immunol 106, 744-51.

PASTORELLO EA, TRAMBAIOLI C (2001): Isolation of food allergens. J Chromatogr B 756, 71-84.

PASTORELLO EA, VARIN E, FARIOLI L, PRAVETTONI V, ORTOLANI C, TRAMBAIOLI C, FORTUNATO D, GIUFFRIDA MG, RIVOLTA F, ROBINO A, CALAMARI AM, LACAVA L, CONTI A (2001): The major allergen of sesame seeds (*Sesamum indicum*) is a 2S albumin. J Chromatogr B 756, 1-2, 85-93.

PETERSEN A, VIETHS S, AULEPP H, SCHLAAK 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.

PORTER DH, SWAISGOOD HE, CATIGNANI GL (1984): Characterization of an immobilized digestive enzyme system for determination of protein digestibility. J Agric Food Chem 32, 334-339.

POSCH A, CHEN Z, DUNN MJ, WHEELER CH, PETERSEN A, LEUBNER-METZGER G, BAUR X (1997): Latex allergen database. Electrophoresis 18, 2803-2810.

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.

REICH S (1993): Nahrungsmittelallergien - Allergische und pseudoallergische Reaktionen. AID-Verbraucherdienst 38, 51-56.

RING J (1988): Klinik und Einteilung allergischer Erkrankungen. In: Angewandte Allergologie. Medizin Verlag GmbH, München.

RING J, BROCKOW K, BEHRENDT H (2001): Adverse reactions to foods. J Chromatogr B 756, 3-10.

RODRIGUES-PEREZ R, CRESPO JF, RODRIGUEZ J, SALCEDO G (2003): Profilin is a relevant melon allergen susceptible to pepsin digestion in patients with oral allergy syndrome. J Allergy Clin Immunol 111, 634-639.

ROITT IM (1993): Leitfaden der Immunologie. 4. Auflage, Blackwell Wissenschaft, Berlin.

ROITT IM, BROSTOFF J, MALE DK (1995): Kurzes Lehrbuch der Immunologie. 3. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart.

ROSENFELD J, CAPDEVIELLE J, GUILLEMOT JC, FERRARA P (1992): In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one-or two-dimensional gel electrophoresis, Anal Biochem 203, 173-179.

SAMPSON HA (1991): Immunologic mechanisms in adverse reaction to foods. Immunol Allergy Clin North Am 11, 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.

SANDER I, FLAGGE A, MERGET R, HALDER TM, MEYER HE, BAUR X (2001): Identification of wheat flour allergens by means of 2-dimensional immunoblotting. J Allergy Clin Immunol 107, 907-913.

SATTERLEE LD, KENDRICK JG, MILLER GA (1977): Rapid in-vitro assays for estimating protein quality. Food Technol, 78-81.

SCHUBERT S (2003): Charakterisierung und Isolierung von Allergenen der Tomate (*Lycopersicon lycopersicum* (L.) Karst. Ex Farw). Dissertation, Universität Hamburg.

SEPPÄLÄ U, ALENIUS H, TURJANMAA KI, REUNALA T, PALOSUO T, KALKKINEN 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, 165-71.

SHEVCHENKO A, WIL M, VORM O, MANN M (1996): Mass spectromic sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamid gels. *Anal Chem* 68, 850-858.

SILVA MB, SCHATTNER M, RAMOS CRR, JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO ILM, GUARNIERI MC, LAZZARI MA, SAMPAIO CAM, POZNER RG, VENTURA JS, HO PL, CHUDZINSKI-TAVASSI AM (2003): A prothombin activator from *Bothrops erythromelas* (jararaca-da-seca) snake venom: characterization and molecular cloning. *Biochem J* 369, 129-139.

SOMAN KV, MIDORO-HORIUTI T, FERREON JC, GOLDBLUM RM, BROOKS EG, KUROSKY A, BRAUN W, SCHEIN CH (2000): Homology modeling and characterization of IgE binding epitopes of mountain cedar allergen Jun a 3. *Biophys J* 79, 1601-1609.

SOUCI SW, FACHMANN W, KRAUT H (2000): Die Zusammensetzung der Lebensmittel, Nährwerttabellen, Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie. 6. Auflage. Medharm Scientific Publisher, Stuttgart.

SPREITZER H (1996): Nahrungsmittelallergene. *ÄAZ* 6, 248-253.

STOTT DI (1989): Immunoblotting and dot blotting. *J Immunol Meth* 119, 153-187.

SUCK R, WEBER B, KAHLERT H, HAGEN S, CROMWELL O, FIEBIG H (2000): Purification and immunobiochemical characterization of folding variants of the recombinant major wasp allergen Ves v 5. *Int Arch Allergy Immunol* 121, 284-291.

SWISSPROT, www.swissprot.net

TAYLOR SL, LEMANSKE RF JR, BUSH RK, BUSSE WW (1987): Food allergens: structure and immunologic properties. *Ann Allergy* 59, 93-99.

THIEL C (1991): Lebensmittelallergien und -intoleranzreaktionen. *Z Ernährungswiss* 30, 158-173.

TOBWIN H, GORDON J (1984): Immunoblotting and dot blotting - current status and outlook. *J Immunol Meth* 72, 3131-340.

TRESHNER WC, SWAISGOOD HE, CATIGNANI GL (1989): Digestibilities of the protein in various food as determined in vitro by an immobilized enzyme assay (IDEA). *Plant Food Hum Nutr* 39, 59-65.

VALENTA R, DUCHENE M, PETTENBURGER K, SILLABER C, VALENTA P, BETTELHEIM P, BREITENBACH M, RUMPOLD H, KRAFT D, SCHREINER O (1991): Identification of profilin as a novel pollen allergen: IgE-autoradioactivity in sensitized individuals. *Science* 253, 557-560.

VALENTA R, DUCHENE M, EBNER C, VALENTA P, SILLABER C, DEVILLER P, FERREIRA F, TEJKL M, EDELMANN H, KRAFT D, SCHREINER O (1992a): Profilins constitute a novel family of functional plant pan allergens. *J Exp Med* 175, 377-385.

VALENTA R, DUCHENE M, VRTALA S, VALENTA P, SILLABER C, FERREIRA F, TEJKL M, HIRSCHWEHR R, EBNER C, KRAFT D, SCHREINER O (1992b): Profilin, a novel plant allergen. *Int Arch Allergy Immunol* 99, 271-273.

VAN REE R, VOITENKO V, VAN LEEUVEN WA, AALBERSE RC (1992): Profilin is a cross-reactive allergen in pollen and vegetable foods. *Int Arch Allergy Immunol* 98, 97-104.

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, BROCKMANN S, SCHÖNING B (1992a): Nahrungsmittelallergie gegen Obst und Gemüse: Eine aktuelle serologische Untersuchung zur Sensibilisierung von Pollenallergikern. *Allergologie* 15, 367-379.

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, SCHÖNING B, BROCKMANN S, AULEPP H (1992c): 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, AULEPP H, BALTES W (1993): Identifizierung kreuzreagierender Allergene in Pollen und pflanzlichen Lebensmitteln. *Lebensmittelchemie* 47, 49-53.

VIETHS S, FISCHER K, DEHNE LI, AULEPP H, WOLLENBERG H, BÖGL KW (1994a): Versteckte Allergene in Lebensmitteln. *Bundesgesundhbl* 2, 51-60.

VIETHS S, JANKIEWICZ A, SCHÖNING B, AULEPP H (1994b): 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, BAUMGART M (1994c): Food allergy: Specific binding of IgE-antibodies from plant food sensitized individuals to carbohydrate epitopes. Food Agric Immunol 6, 453-463.

VIETHS S, JANCK K, AULEPP H, PETERSEN A (1995a): 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, WÜTHRICH B, BALTES W (1995b): Immunoblot study of IgE binding allergens in celery. Ann Allergy Asthma Immunol 75, 48-55.

VIETHS S, REINDL J, MÜLLER U, HOFFMANN A, HAUSTEIN D (1999): Digestibility of peanut and hazelnut allergens investigated by a simple in vitro procedure. Eur Food Res Technol 209, 379-388.

VIETHS S, SCHEURER S, BALLMER-WEBER B (2002): Current Understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. Ann NY Acad Sci 964, 47-68.

VAN DER VEEN MJ, VAN REE R, AALBERSE RC, AKKERDAAS J, KOPPELMANN SJ, JANSEN HM, VAN DER ZEE JS (1997): Poor biologic activity of cross-reactive IgE directed to carbohydrate determinants of glycoproteins. J Allergy Clin Immunol 100, 327-334.

VON PIRQUET C (1906): Allergie. Münch Med Wschr 30, 1457-1458.

WAFFENSCHMIDT S, JAENICKE L (1991): Glycoproteine und Pflanzenzellkommunikation. Chemie in unserer Zeit 25, 29-43.

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.

WELLHAUSEN A, SCHÖNING B, PETERSEN A, VIETHS S (1996): IgE binding to a new cross-reactive structure: a 35 kDa protein in birch pollen, exotic fruit and other plant foods. Z Ernährungswiss 35, 348-355.

WIGOTZKI M, SCHUBERT S, STEINHART H, PASCHKE A (2000): Effects of in vitro digestion on the IgE-binding activity of proteins from hazelnuts (*Corylus avellana*). Internet Symposium on Food Allergens 2, 1-8.

WÜTHRICH B (1986): Nahrungsmittelallergien. Internist, 27, 362-371.

WÜTHRICH B (1996): Diagnostik - Häufigkeit der Symptome und der allergieauslösenden Nahrungsmittel bei Erwachsenen. in: WÜTHRICH B (ed.): Nahrungsmittel und Allergie. Düstri-Verlag, München.

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.

YAMAGUCHI K, ASAKAWA H (1988): Preparation of colloidal gold for staining proteins electrotransferred onto nitrocellulose membranes. *Anal Biochem*, 172, 104-107.

YU C-J, CHEN Y-M, SU S-N, FOROUHAR F, LEE S-H, CHOW L-P (2002): Molecular and immunological characterisation and IgE epitope mapping of Pen n 18, a major allergen of *Penicillium notatum*. *Biochem J*, 363, 707-715.

ZUNKER K (2001): Untersuchungen zur Allergenität von Mango und Litchi. Dissertation, Universität Hamburg.

Lebenslauf

Name: Sonja Carmen Hoppe
Geburtstag: 23.3.1977
Geburtsort: Hamburg

Schulbildung

1983 – 1987 Grundschule Appen
1987 – 1996 Theodor-Heuss-Gymnasium Pinneberg
5/1996 Abitur

Hochschulstudium

1996 – 2001 Studium der Lebensmittelchemie, Universität Hamburg
9/2001 Erste Lebensmittelchemische Staatsprüfung,
Diplom in Lebensmittelchemie

Promotion

10/2001 Beginn der Promotion
Themengebiet Lebensmittelallergien,
Universität Hamburg
10/2004 Ende der praktischen Arbeiten
2006 Prüfung

Arbeitsverhältnis

10/2001 – 10/2004 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Biochemie
und Lebensmittelchemie, Universität Hamburg
11/2004 – 4/2005 Praktikum im Rahmen der Zweiten Lebensmittel-
chemischen Staatsprüfung im Institut für Hygiene und
Umwelt
7/2005 Zweite Lebensmittelchemische Staatsprüfung
9/2005 Hertz Flavors GmbH & Co. KG, Reinbek
Produktentwicklung von Aromen

Vorträge, Poster und Veröffentlichungen

- Poster 9/2003: Euro Food Chem XII in Brugge, Belgien:
Influence of Food Processing on Allergenicity
- Poster 10/2003: 32. Deutscher Lebensmittelchemikertag der GDCh in München:
Einfluss technologischer Verarbeitung auf die Allergenität von Äpfeln
und Mango
- Vortrag 9/2004: 33. Deutscher Lebensmittelchemikertag der GDCh in Bonn:
Identifizierung von Allergenen der Litchi (*Litchi chinensis* SONN.)
- Veröffentlichung: HOPPE S, NEIDHART S, ZUNKER K, HUTASINGH P, CARLE R, STEINHART
H, PASCHKE A (2006): The influences of cultivar and thermal
processing on the allergenic potency of lychees (*Litchi chinensis*
SONN.). Food Chem 96, 209-219.
- Veröffentlichung: HOPPE S, STEINHART H, PASCHKE A (2006): Identification of a 28 kDa
lychee allergen as a triose-phosphate isomerase. Food Agric
Immunol 17, 9-19.
- Veröffentlichung: HOPPE S, KRATZIN HD, STEINHART H, PASCHKE A (in preparation):
Identification of a new lychee allergen.
-