

Aus dem Ordinariat für Arbeitsmedizin der Universität Hamburg
und dem
Zentralinstitut für Arbeitsmedizin und Maritime Medizin (ZfAM)
der Freien und Hansestadt Hamburg

Direktor: Prof. Dr. med. X. Baur

**Verbesserung der Latex-Allergie-Diagnostik
mittels rekombinanter Allergene**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich der Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Joanna Przewozna

aus Kattowitz

Hamburg, im Jahr 2008

Ausgenommen von dem Fachbereich der Medizin
der Universität Hamburg am: 18.08.2008

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, die/der Vorsitzende/r: Prof. Dr. X. Baur

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. M. Bullinger

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. I. M. Moll

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	8
1.1 Was ist eine Allergie?	8
1.2 Klinisches Bild der Latex-Allergie	9
1.3 Herkunft der Latex-Allergene	11
1.4 Häufigkeit der Latex-Allergie	12
1.5 Bisher bekannte Latex-Allergene und ihre rekombinante Herstellung	14
2. ZIELSETZUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT	17
3. MATERIAL UND METHODEN	18
3.1 Patienten und Probenmaterial	18
3.2 Materialien	21
3.2.1 Chemikalien	21
3.2.2 Enzyme und Primer	23
3.2.3 Reaktionspuffer	23
3.2.4 Bakterien und Plasmide	23
3.2.5 Antibiotika und Medien für Bakterienkultur	24
3.2.6 Lösungen und Puffer	24
3.2.7 Verbrauchsmaterialien	27
3.2.8 Geräte	28
3.3 Methoden	29
3.3.1 Molekularbiologische Methoden	29
3.3.1.1 Vorbereitung von Lösungen und Arbeitsgeräten	29
3.3.1.2 Ansetzen von Übernachtskulturen	29
3.3.1.3 Anlegen von Dauerkulturen	30
3.3.1.4 Ligation von DNA-Fragmenten	30
3.3.1.5 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien	31
3.3.1.6 Transformation komponenter <i>E. coli</i> -Zellen durch Elektroporation	31

3.3.1.7	Vereinzelung der <i>E. coli</i> - Bakterien	32
3.3.1.8	Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen	32
3.3.1.9	Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Extraktion	33
3.3.1.10	Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Mini- Prep)	34
3.3.1.11	Präparation von Plasmid-DNA im großen Maßstab (Maxi- Prep)	35
3.3.1.12	DNA- Konzentrationsbestimmung	36
3.3.1.13	Sequenzierung von DNA	36
3.3.1.14	Durchmusterungen der Bakterienkolonien	38
3.3.1.15	Polymerasekettenreaktion (PCR)	38
3.3.2	Proteinchemische Methoden	40
3.3.2.1	Proteinexpression	40
3.3.2.2	Aufreinigung rekombinanter His-Taq-Proteine mit Ni-NTA- Säulen unter denaturierenden Bedingungen	40
3.3.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	41
3.3.2.4	Coomassie-Färbung	42
3.3.2.5	Proteinbestimmung	43
3.3.3.	Immunologische Methoden	43
3.3.3.1	ELISA	43
3.3.3.2	In-vitro-Biotinylierung	45
3.3.3.3	CAP-Kopplung	46
3.3.3.4	CAP-Assay	47
4.	ERGEBNISSE	48
4.1	Klonierung, Expression und Reinigung der Latex-Allergene (rHev b 1, b 3, b 5, b 6, b7, b8)	48
4.2	IgE-Antikörperscreening verschiedener Patientenkollektive mittels ELISA (rHev b 1, b 3, b 5, b 6, b 7, b 8)	52
4.3	Klonierung, Expression und Reinigung des Hev b 13	54
4.4	IgE-Antikörperscreening des rekombinanten Latex-Allergens Hev b 13 mittels ELISA	56
4.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	58

5. DISKUSSION	62
6. ZUSAMMENFASSUNG	71
7. LITERATURVERZEICHNIS	73
8. ANHANG	85
8.1 Abkürzungen	85
8.2 Danksagungen	89
8.3 Lebenslauf	90
8.4 Veröffentlichungen	91
8.5 Erklärungen	92

Abbildungen:

1. Kontakturtikaria, hervorgerufen durch das Tragen von Latex-Handschuhen
2. Gewinnung der Latexmilch aus *Hevea brasiliensis*-Bäumen
3. Referenz-DNA-Fragmente als Größenstandard (in bp)
4. Darstellung einer Sequenz in Form eines Vier-Farben-Elektropherogramms
5. Referenzproteine als Größenstandard
6. PCR-Durchmusterung von pQ5-rHev b 5
7. Klonierungsprodukte von rHev b 6 und rHev b 3
8. Überprüfung der Klonierung von pQE-Hev b 3 durch Restriktionsverdau
9. Proteinexpression von rHev b 3 und rHev b 8
10. Proteinreinigung von rHev b 6
11. Sensibilisierung auf verschiedene Latex-Allergene im Gesamtkollektiv und aufgeschlüsselt in die drei Kollektive A-C (Angaben in %)
12. Vergleich der ELISA- und CAP-Ergebnisse anhand der rHev b 6-positiven Patienten
13. Proteinexpression von rHev b 13 (der zwei Fragmente und des vollständigen Proteins)
14. ELISA-Extinktionswerte auf natives Hev b 13 der 62 Patientenseren des Kollektivs A (48 wurden positiv, 14 negativ gemessen)
15. ELISA-Extinktionswerte auf rekombinantes Hev b 13 der 62 Patientenseren des Kollektivs A (11 wurden positiv, 51 negativ gemessen)
16. Vergleich der Allergenität des nativen und des rekombinanten Hev b 13 in einem Kollektiv latexexponierter HCW (n=62)
17. Pflanzenstammbaum von *Hevea brasiliensis* und eine Auswahl der Nahrungsmittel mit kreuzreagierenden Eigenschaften

Tabellen:

1. Pathogene Immunreaktionen nach Coombs und Gell (1963)
2. Kontakturtikaria-Syndrom (nach Krogh und Maibach)
3. Prävalenz der Sensibilisierung gegen Naturlatex (M. Raulf-Heimsoth et al. 2004)
4. Übersicht der bisher beschriebenen *Hevea-brasiliensis*-Allergene
5. Teilkollektiv A aus der Poliklinik des ZfAM mit Latex-bezogenen Symptomen (62 HCW)
6. Teilkollektiv B mit bekannten Gesamt-IgE- und Latex-spezifischen IgE-Werten speziell gegen Hevein und rHevb 1 (43 HCW)
7. Teilkollektiv B mit bekannten Gesamt-IgE- und Latex-spezifischen IgE-Werten (15 HCW)
8. Restriktionsenzyme und Puffer für DNA-Spaltung
9. Temperaturprogramm der DNA-Sequenzierung
10. Eigenschaften verschiedener, für die Sequenzierung eingesetzter Fluoreszenzfarbstoffe
11. PCR-Temperaturprogramm
12. Normwerte der CAP-Klassen
13. Übersicht der ELISA-Ergebnisse von rHev b 5 und rHev b 6 unter Verwendung eines IgE-positiven (Patient 1) und eines IgE-negativen (Patient 2) Patienten auf rekombinante Latex-Allergene (Rohdaten)
14. Tabellarische Darstellung der Sensibilisierung gegen Latexallergene in den untersuchten Kollektiven und Teilkollektiven
15. Erwartete und beobachtete Größen der zwei rHev b 13-Teilfragmente sowie des rHev b 13-full-length (aa entspricht etwa 0,11kDa)
16. ELISA-Extinktionen (OD) der zwei rHev b 13-Fragmente und des rHev b 13-full-length von 10 HCW-Patientenseren
17. Zusammenstellung unserer ELISA-Ergebnisse auf die getesteten Allergene (rHev b 1, 3, 5, 6, 7, 8, 13 und natives rHev b 13)
18. Tabellarische Übersicht der bisher in klinischen Untersuchungen überprüften nativen Latex-Allergene
19. Tabellarische Übersicht der bisher in klinischen Untersuchungen überprüften rekombinanten Latex-Allergene

1 EINLEITUNG

1.1 Was ist eine Allergie?

Der Begriff „**ALLERGIE**“ wurde 1906 von dem Wiener Pädiater Clemens von Pirquet geprägt. Man versteht darunter eine erworbene, spezifisch gesteigerte Reaktionsfähigkeit des Organismus gegenüber potentiell apatogenen Fremdstoffen (Allergenen) infolge einer gestörten immunologischen Reaktionslage. Die Allergene gelangen über Schleimhäute durch Einatmen oder Schlucken, durch direkten Hautkontakt oder durch Injektion in den menschlichen Körper. Als Allergene können einerseits hochmolekulare Proteine wie beispielsweise Backmittelenzyme, Schimmelpilzproteine oder Latexproteine wirken. Andererseits sind niedermolekulare Substanzen wie Säureanhydride oder Isocyanate in der Lage, sich als Haptene an körpereigene Substanzen zu binden oder neue Antigen-determinanten zu bilden, so dass auch hierauf eine überschießende Immunreaktion des allergischen Organismus resultieren kann. Coombs und Gell haben 1963 die allergischen Immunreaktionen in 4 Typen eingeteilt und damit eine Klassifikation geschaffen, die sich bis heute behauptet hat (Tab. 1).

Typ der Immunreaktion	vermittelt durch	allergische Reaktionen
I: anaphylaktisch	IgE-Antikörper	allergische Rhinitis, allergisches Asthma bronchiale, Urtikaria, Nahrungsmittelallergie, Insektengiftallergie, anaphylaktischer Schock (Maximalvariante)
II: zytotoxisch	IgG-, IgM-Antikörper	Agranulozytose, thrombopenische Purpura, hämolytische Anämie
III: Immunkomplexe	IgG-, IgM-Antikörper	Vasculitis allergica, Serumkrankheit, allergische Alveolitis
IV: zellvermittelt	T-Lymphozyten	allergisches Kontaktekzem, makulopapulöses Arzneiexanthem

Tabelle 1: Pathogene Immunreaktionen nach Coombs und Gell (1963)

Im Folgenden wird lediglich die IgE-vermittelte Typ I-Allergie behandelt, da dieser Pathomechanismus Grundlage der in dieser Arbeit beschriebenen Latex-Allergie ist. Die Typ I-Allergie wird als Soforttyp-Allergie bezeichnet, weil die klinischen Symptome üblicherweise unmittelbar nach Allergenkontakt auftreten und sich in der Regel innerhalb von Minuten nach Allergenkarenz wieder zurückbilden.

Die diagnostischen Möglichkeiten zur Erkennung der Typ I-Allergien auf serologischer Grundlage sind in den letzten Jahren immer genauer geworden, in vielen Fällen kann man inzwischen schnell und reproduzierbar quantitative Aussagen über den Grad der Sensibilisierung und die Konzentration körpereigener IgE-Antikörper machen. Doch in zahlreichen anderen Fällen sind immer noch die diagnostischen Tests ungenau und es ist schwierig, eine eindeutige Diagnose zu stellen. Dies gilt insbesondere auch für viele berufsbedingte Allergien. Insbesondere bei diesen ist zu berücksichtigen, dass falsch negative Befunde für den Betroffenen neben gesundheitlichen Problemen auch mit schwerwiegenden wirtschaftlichen Nachteilen einhergehen. Dies spielt nach wie vor für latexsensibilisierte Beschäftigte im Gesundheitswesen eine bedeutende Rolle, weswegen sich die vorliegende Arbeit mit der Verbesserung der Diagnostik der Latex-Allergie beschäftigt.

1.2 Klinisches Bild der Latex-Allergie

Die Latex-Allergie ist eine IgE-vermittelte Typ I-Überempfindlichkeitsreaktion des menschlichen Immunsystems auf naturlatexhaltige Produkte. Die IgE-Antikörper richten sich gegen die in den Produkten erhaltenen Latexproteine (s. 1.3, 1.4).

Typ I-Allergien gegen Naturlatex können ausgelöst werden:

- durch direkten Hautkontakt (dermal), z.B. beim Tragen von Latexhandschuhen
- durch Schleimhautkontakt, z.B. mit Latexhandschuhen bei gynäkologischen Untersuchungen
- durch Inhalation, z.B. beim Wechseln von gepuderten Latexhandschuhen (die Latex-Allergene werden von dem ursprünglich inerten Puder gebunden und beim Handschuhwechsel verwirbelt)
- parenteral, z.B. bei Verwendung von latexhaltigen Infusionssystemen.

Die dermale Allergenaufnahme führt zu dem sogenannten Kontakturtikaria-Syndrom, das entsprechend seiner Reaktionsstärke in 4 Stadien eingeteilt wird. Diese Stadien können sich bei unterlassener Allergenkarenz stufenweise entwickeln (Tab. 2):

Stadium	Klinisches Bild
1	Lokalisierte Urtikaria (Abb. 1)
2	Generalisierte Urtikaria, Lippenschwellung, Lidödem
3	Urtikaria mit Rhinokonjunktivitis, Asthma bronchiale, orolaryngeale und/oder gastrointerstinale Symptome
4	Urtikaria mit anaphylaktischem Schock

Tabelle 2: Kontakturtikaria-Syndrom (nach von Krogh und Maibach)

Bei der inhalativen Allergenaufnahme reicht das klinische Spektrum von Schleimhautsymptomen (allergische Rhinitis und Konjunktivitis, allergisches Asthma bronchiale) bis hin zum anaphylaktischen Schock. Diese Reaktionen finden durch Einatmung von Latexproteinen statt, die an Handschuhpulverpartikel gebunden sind und in die Raumluft gelangen.



Abbildung 1: Kontakturtikaria, hervorgerufen durch das Tragen von Latex-Handschuhen

1.3 Herkunft der Latex-Allergene

Als Naturlatex wird der milchige Pflanzensaft des tropischen Parakautschukbaumes *Hevea brasiliensis* bezeichnet, der ursprünglich nur im südlichen Amazonasgebiet heimisch war und aktuell einen Anteil von über 90% der Welternte an Naturkautschuk liefert. Die Latexgewinnung erfolgt nach Einschneiden der Borke des 20-30 m hohen Baumes durch parallel geführte, nach unten spitz zulaufende Schnitte. Daraufhin austretender Milchsaft wird in kleinen Gefäßen aufgefangen (Abb. 2). Diesen Milchsaft nannten die Indianer im Amazonasgebiet "cahuchu" (weinender Baum). Rohe Latexmilch ist eine kolloidale Dispersion von Kautschuk (30-35%) und Wasser (65-70%). Mittels Zentrifugation lässt sich die Latexmilch in drei Fraktionen auftrennen: auf der Oberfläche schwimmen die Kautschukpartikel, der Bodensatz besteht überwiegend aus Nichtkautschukbestandteilen wie Zellfragmenten und Harzen, und dazwischen befindet sich eine wässrige Phase, das sogenannte C-Serum. 25-30% der Gesamtproteine sind an die Kautschukpartikel gebunden, der Hauptanteil der Pflanzenproteine ist im C-Serum und im Bodensatz enthalten.



Abbildung 2: Gewinnung der Latexmilch aus *Hevea brasiliensis*-Bäumen

Durch Zusatz schwacher organischer Säuren kann man die Isopren-Moleküle der Latexmilch zum Koagulieren (Ausfällen) bringen, wodurch relativ weicher Rohkautschuk entsteht. Dieser kann durch Erhitzen auf 140°C und Zusatz fein verteilten Schwefels (Vulkanisieren) zu Gummi von fester, zäher und elastischer Konsistenz (Naturkautschuk) verarbeitet werden.

Häufig wird der frischen Latexmilch der Stabilisator Ammoniak zugesetzt, so dass die Gerinnung der Latexmilch verhindert wird und diese auch noch zu späteren Zeitpunkten im Tauchverfahren (z.B. für Latexhandschuhe) verarbeitet werden kann. Die Nachteile des Ammoniakzusatzes liegen in der hautirritativen Komponente. Aus diesem Grund verwenden viele Hersteller niedrig ammonisierte Kombinationen, die allerdings andere Konservierungsmittel enthalten. Bei Fertigung von Artikeln, die nicht im Tauchverfahren hergestellt werden (z.B. Stopfen von Infusionsflaschen), dient Essigsäure als Koagulator der Latexmilch, so dass diese verklumpt transportiert und weiterverarbeitet werden kann.

Polymerisierter Naturkautschuk ist ein elastischer Werkstoff, der häufig in der Produktion von Gummihandschuhen, Kathetern, Kondomen, Luftballons, Babynuckeln, Sportartikeln etc. Verwendung findet. Latex-Produkte sind demzufolge weit verbreitet. Die Proteine aus Naturlatex, die sich größtenteils auch in den Produkten wiederfinden, stellen für den Menschen potentielle Allergene dar.

1.4 Häufigkeit der Latex-Allergie

Die Latex-Allergie stellt eine bedeutende berufsbedingte Erkrankung für Beschäftigte im Gesundheitswesen dar. Ihre Prävalenz hat in den letzten 15 Jahren durch vermehrtes Tragen insbesondere von gepuderten Latexhandschuhen stark zugenommen und beträgt in manchen Krankenhausbereichen bis zu 17% (M. Raulf-Heimsoth et al. 2003). Bei ca. 2,5% der Mitarbeiter im Gesundheitsdienst entsteht ein Latex-induziertes Berufsasthma. Neben medizinischem Personal (Ärzte, Krankenpflegeberufe, Zahnärzte, Hilfspersonal) sind noch weitere Berufsgruppen wie Bauarbeiter, Friseure, Arbeiter in der Lebensmittel- und Gummiwarenherstellung betroffen. Allergien gegen Latexproteine manifestieren sich neben der Haut

(Berufskrankheit Nummer 5101: „Schwere oder wiederholt rückfällige Hauterkrankungen, die zur Unterlassung aller Tätigkeiten gezwungen haben, die für die Entstehung, die Verschlimmerung oder das Wiederaufleben der Krankheit ursächlich waren oder sein können“) auch an den oberen und unteren Atemwege. In letzteren Fällen handelt es sich um die Berufskrankheit Nummer 4301: „Durch allergisierende Stoffe verursachte obstruktive Atemwegserkrankungen (einschließlich Rhinopathien), die zur Unterlassung aller Tätigkeiten gezwungen haben, die für die Entstehung, die Verschlimmerung oder das Wiederaufleben der Krankheit ursächlich waren oder sein können“. Mitte der 1990er Jahre wurden allein im deutschen nicht-öffentlichen Gesundheitswesen jährlich bis zu rund 1260 latexbedingte Haut- und Atemwegserkrankungen gemeldet. Die damals gestartete Präventionskampagne und das in der TRGS 540 ausgesprochene Verbot, gepuderte proteinreiche Handschuhe im medizinischen Bereich einzusetzen, hat inzwischen zu einem Rückgang der latexbedingten Erkrankungen auf ca. 200 BK-Meldungen/Jahr geführt.

Neben der beruflichen Exposition stellen häufige chirurgische Eingriffe bei Patienten bezüglich einer Latex-Allergie ein weiteres Risiko dar. So beträgt die Prävalenz der Latex-Sensibilisierung im Jahre 1999 bei häufig operierten Kindern mit *Spina bifida* oder urogenitalen Anomalien bis zu 72% (M. Raulf-Heimsoth et al. 2004). Einen weiteren klinisch und diagnostisch wichtigen Aspekt stellen Kreuzallergien zwischen Latex-Allergenen und Bestandteilen subtropischer Früchte wie Bananen und Avocado („latex fruit syndrom“), z.T. auch gegen pflanzliche Proteine, verschiedene Ficusarten, Guttapercha, Kartoffeln, Tomaten u.a. dar (Tab. 3).

Spezifische IgE-Antikörper gegen Latex-Allergene werden *in vitro* mittels ELISA, RAST, EAST und CAP nachgewiesen. *In vivo* wird die Latex-Allergie mittels Pricktests und Provokationstests diagnostiziert. In diesen Verfahren werden üblicherweise native Latex-Extrakte eingesetzt. Allerdings sind die Qualität und Quantität solcher Extrakte nicht konstant. So fehlen z.B. in vielen kommerziellen Latex-Extrakten Proteolyse-sensitive Allergene (z.B. Hev b 5) oder bestimmte Minorallergene, wodurch es zu falsch negativen Befunden in der Diagnostik kommen kann.

<i>Spina-bifida</i> -Patienten	bis 72%
Medizinische Berufe	bis 17%
Personen mit beruflicher Naturlatexexposition außerhalb des medizinischen Bereichs	bis 11%
Atopische Individuen mit Naturlatexexposition	bis 36%
Allgemeinbevölkerung: a.) Bei atopischer Veranlagung b.) Ohne atopische Veranlagung	bis 8,6% bis 2,3%

Tabelle 3: Prävalenz der Sensibilisierung gegen Naturlatex (M. Raulf-Heimsoth et al. 2004)

1.5 Bisher bekannte Latex-Allergene und ihre rekombinante Herstellung

Der Rohstoff Naturgummilatex besteht aus *cis*-1,4-Polyisopreneinheiten und einer komplexen Mischung von über 200 Proteinen und Polypeptiden. Im Immunoblot mit Latex-Proteinen werden zahlreiche IgE-Antikörper aus Seren von Latex-Allergikern über verschiedene Spots erkannt. Das weist auf eine hohe Anzahl von Einzelallergenen im Latex hin. Zurzeit sind 13 Naturlatex-Allergene (zusätzlich eine Isoform des Hev b 7 und zwei Hev b 6 Fragmente) nach der International Union of Immunological Societies (IUIS) Allergennomenklatur als Hev b 1 bis Hev b 13 (Hev b leitet sich von *Hevea brasiliensis* ab) bezeichnet worden (www.allergen.org/List.htm). Diese Proteine besitzen Molekulargewichte zwischen 4,7 und 60 kDa und werden in Majorallergene (>50% der Sensibilisierten sind hierauf sensibilisiert), Intermediärallergene (20-50%) und Minorallergene (<20%) unterschieden (Tab. 4).

IUIS Name	Beschreibung	MW (kDa)	Vorkommen im Latex	<i>Spina bifida</i>	HCW
Hev b 1	Rubber elongation factor (REF)	14,6	Gummipartikel	Majorallergen	Minorallergen
Hev b 2	B-1,3-Gluconase	34-36	B-Serum		Majorallergen
Hev b 3	Small rubber particle protein (SRPP) (Prenyltransferase)	24-27	Gummipartikel	Majorallergen	Minorallergen
Hev b 4	Mikrohelix	50-57	B-Serum	Minorallergen	Majorallergen
Hev b 5	Saures Protein	16-24	C-Serum	Minorallergen	Majorallergen
Hev b 6.01	Prohevein	20	B-Serum	Minorallergen	Majorallergen
Hev b 6.02	Hevein	4,7	B-Serum	Minorallergen	Majorallergen
Hev b 6.03	C-Domain des Prohevein	14	B-Serum	Minorallergen	Majorallergen
Hev b 7.01	Patatin Homolog	42	B-Serum	Minorallergen	Minorallergen
Hev b 7.02	Patatin Homolog	44	C-Serum	Minorallergen	Minorallergen
Hev b 8	Profilin	14	C-Serum	Minorallergen	Minorallergen
Hev b 9	Enolase	51	C-Serum	Minorallergen	Minorallergen
Hev b 10	Mn-Superoxiddismutase	26	B-Serum	Minorallergen	Minorallergen
Hev b 11	Class I-Chitinase (PR3)	32	B-Serum	Minorallergen	Minorallergen
Hev b 12	Lipidtransferprotein	9	?	Minorallergen	Minorallergen
Hev b 13	Esterase (ENSP)	42	B-Serum	Minorallergen	Majorallergen

Tabelle 4: Übersicht der bisher beschriebenen *Hevea brasiliensis*-Allergene

Die cDNA-Sequenzen von einem Großteil dieser 13 Allergene sind inzwischen bekannt und ermöglichen die Herstellung rekombinanter Allergene, was folgende Vorteile mit sich bringt:

1. leichte Standardisierbarkeit durch biologische Verfahren und Unabhängigkeit von der wechselnden Qualität der Naturextrakte;
2. Unabhängigkeit von den derzeit eingesetzten komplizierten Reinigungsverfahren der Naturextrakte;
3. Erstellen und Kontrolle des individuellen Allergenprofils (Allergogramm) des Patienten, d.h. komponentenspezifische Diagnostik in Form von Haut- und Bluttests sowie
4. potentieller Einsatz von allergogrammabhängigen spezifischen Immuntherapien (SIT).

Rekombinante Allergene haben aber auch Nachteile. Die Herstellung ist teuer und für die Zulassung für den diagnostischen bzw. therapeutischen Einsatz sind einschlägige Vorschriften zu beachten. Ein weiterer Nachteil von rekombinanten Allergenen – insbesondere aus *E. coli* – ist, dass sie posttranslational nicht modifiziert werden, d.h. beispielweise mit Kohlenhydratresten versehen werden, die

für die Bildung einer dreidimensionalen Raumstruktur verantwortlich sein können. Sofern die für die Allergie relevanten Epitope von den posttranslational modifizierten 3-D-Strukturen abhängen, weisen sie nur noch eine geringere oder keine Allergenitäten auf und sind somit für die Diagnostik wertlos.

Wie wir weiter zeigen werden, ist die Allergenität der meisten bislang bekannten Latex-Allergene auch in ihrer rekombinanten Form enthalten. Ausnahmen stellen Hev b 2 (Breiteneder 2003) und – wie diese Arbeit zeigt – Hev b 13 dar.

2. ZIELSETZUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT

Konventionell werden bei der Diagnostik der Latex-Allergie Extrakte der Latexmilch eingesetzt. Allerdings führen Schwankungen hinsichtlich der Qualität und der Quantität der Allergene in den Extrakten infolge der Chargen-Unterschiede der Naturprodukte und der wenig standardisierten Extraktionsverfahren nicht selten zu falsch negativen Befunden. Mit dem Ziel, die Diagnostik der Latex-Allergie zu standardisieren, sollten im Rahmen dieser Promotion rekombinante Latex-Allergene hergestellt und auf ihre Anwendbarkeit für eine verbesserte Diagnostik der Latex-Allergie geprüft werden. Hierfür wurde auch angestrebt, die zu Beginn dieser Arbeit in der Literatur noch nicht beschriebene Latex-Allergen-cDNA des Hev b 13 zu isolieren, Hev b 13 rekombinant herzustellen und eine Validierung der IgE-Antikörper-Bindung mittels ELISA durchzuführen.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Patienten und Probenmaterial

Es wurden Seren von 120 Beschäftigten aus dem Gesundheitswesen (Health care workers [HCW]) mit anamnestischen Hinweisen auf eine Latex-Allergie eingesetzt. Die Seren stammen aus folgenden drei Kollektiven:

1. HCW-Teilkollektiv A aus der Poliklinik des ZfAM mit latexbezogenen Symptomen; n=62 (Tab. 5);
2. HCW-Teilkollektiv B mit bekannten Gesamt-IgE- und latexspezifischen IgE-Werten, speziell gegen Hevein und rHev b 1 (Zusendungen von Seren zur Diagnostik); n=43 (Tab. 6);
3. HCW-Teilkollektiv C mit bekannten Gesamt-IgE-Werten und latexspezifischen IgE-Antikörpern (Zusendungen von Seren zur Diagnostik); n=15 (Tab. 7).

Als Negativkontrolle diente ein Poolserum, welches von 20 Patienten stammte, die keinen beruflichen Kontakt zu Latex hatten und bei denen keine Hinweise auf eine Latex-Allergie vorlagen.

Nr. (n=62)	Geburtsdatum	Geschlecht	Asthma	Rhinitis	Konjunktivitis	Urtikaria	Gesamt-IgE (CAP)	Latex-IgE (CAP)
1	20.04.1970	w	nur beruflich	nur beruflich	nur beruflich	nur beruflich	1,69	60,00
2	21.12.1973	w	beruflich und privat	nicht aufgetreten	nur beruflich	nur beruflich	905,00	11,50
3	12.03.1961	w	beruflich und privat	beruflich und privat	beruflich und privat	nur beruflich	538,00	5,74
4	15.02.1942	w	nicht aufgetreten	nur beruflich	nicht aufgetreten	nur beruflich	ND	<0,35
5	02.12.1968	w	beruflich und privat	beruflich und privat	beruflich und privat	nicht aufgetreten	165,00	6,33
6	07.03.1973	w	nur beruflich	nur beruflich	nur beruflich	nicht aufgetreten	24,30	1,33
7	19.02.1973	w	nur beruflich	nur beruflich	nur beruflich	nur beruflich	48,80	3,07
8	06.05.1964	w	nicht aufgetreten	nur beruflich	nur beruflich	nur beruflich	ND	5,71
9	19.07.1967	w	nicht aufgetreten	nur beruflich	nicht aufgetreten	nicht aufgetreten	207,00	0,57
10	24.01.1967	m	nur beruflich	nicht aufgetreten	nicht aufgetreten	nicht aufgetreten	ND	0,85
11	18.09.1969	w	nicht aufgetreten	nur beruflich	nicht aufgetreten	nur beruflich	ND	3,57
12	25.05.1963	w	nicht aufgetreten	nicht aufgetreten	nicht aufgetreten	nicht aufgetreten	ND	<0,35
13	18.02.1964	w	nur beruflich	nur beruflich	nur beruflich	nur beruflich	46,00	2,99
14	08.04.1966	w	nur beruflich	nur beruflich	nur beruflich	nur beruflich	177,00	1,29
15	23.10.1973	w	nicht aufgetreten	beruflich und privat	beruflich und privat	nicht aufgetreten	63,50	5,23
16	02.01.1965	w	nur beruflich	nicht aufgetreten	nur beruflich	nur beruflich	ND	32,00
17	13.01.1959	w	nicht aufgetreten	nicht aufgetreten	nicht aufgetreten	nicht aufgetreten	17,90	<0,35
18	18.04.1973	m	nur beruflich	nur beruflich	nur beruflich	nur beruflich	ND	6,80
19	27.06.1962	w	nur beruflich	nicht aufgetreten	nur beruflich	nur beruflich	188,00	12,30

Nr. (n=62)	Geburtsdatum	Geschlecht	Asthma	Rhinitis	Konjunktivitis	Urtikaria	Gesamt-IgE (CAP)	Latex-IgE (CAP)
20	27.12.1971	w	nur beruflich	nur beruflich	nicht aufgetreten	beruflich und privat	ND	11,80
21	14.11.1965	m	beruflich und privat	nur beruflich	privat	nur beruflich	147,00	6,39
22	23.05.1957	w	nur beruflich	nur beruflich	nur beruflich	nicht aufgetreten	375,00	0,81
23	30.06.1967	w	nicht aufgetreten	nur beruflich	nicht aufgetreten	nur beruflich	264,00	20,40
24	30.06.1967	w	nicht aufgetreten	nur beruflich	nicht aufgetreten	nur beruflich	264,00	20,40
25	23.04.1968	w	nicht aufgetreten	nur beruflich	nur beruflich	nur beruflich	75,80	3,35
26	09.05.1957	w	nur beruflich	nur beruflich	nur beruflich	nur beruflich	103,00	1,22
27	29.06.1949	w	nur beruflich	nur beruflich	nur beruflich	nicht aufgetreten	174,00	4,94
28	15.08.1964	w	nur beruflich	nur beruflich	nur beruflich	nur beruflich	132,00	1,45
29	17.04.1962	w	nicht aufgetreten	nur beruflich	nicht aufgetreten	nur beruflich	ND	0,78
30	16.07.1961	w	nicht aufgetreten	nur beruflich	nur beruflich	nur beruflich	344,00	7,27
31	18.08.1960	m	nicht aufgetreten	nur beruflich	nur beruflich	nicht aufgetreten	496,00	0,56
32	19.07.1966	w	nur beruflich	nur beruflich	nur beruflich	beruflich und privat	22,90	0,55
33	19.07.1966	w	nur beruflich	nur beruflich	nur beruflich	beruflich und privat	22,90	0,55
34	11.08.1965	w	nicht aufgetreten	privat	nur beruflich	nur beruflich	ND	4,64
35	14.05.1944	w	nur beruflich	nur beruflich	nicht aufgetreten	nur beruflich	277,00	17,00
36	16.08.1969	w	nicht aufgetreten	nur beruflich	nur beruflich	nur beruflich	2000,00	28,60
37	18.04.1959	m	nicht aufgetreten	beruflich und privat	beruflich und privat	privat	ND	7,67
38	28.05.1968	w	nicht aufgetreten	nur beruflich	nur beruflich	nur beruflich	52,50	<0,35
39	08.03.1967	m	nur beruflich	nicht aufgetreten	nicht aufgetreten	nicht aufgetreten	642,00	8,65
40	08.07.1964	w	beruflich und privat	beruflich und privat	beruflich und privat	nur beruflich	ND	<0,35
41	15.08.1960	w	nur beruflich	nur beruflich	Auftreten unklar	beruflich und privat	572,00	0,57
42	25.11.1960	w	nur beruflich	nur beruflich	nur beruflich	nur beruflich	ND	5,18
43	05.06.1971	w	nicht aufgetreten	nur beruflich	nicht aufgetreten	nur beruflich	ND	<0,35
44	30.06.1965	w	nicht aufgetreten	nur beruflich	nur beruflich	nur beruflich	26,40	<0,35
45	08.10.1940	w	nicht aufgetreten	beruflich und privat	beruflich und privat	beruflich und privat	ND	3,56
46	13.01.1964	w	nur beruflich	nur beruflich	nur beruflich	nur beruflich	ND	5,99
47	19.01.1963	w	nur beruflich	nur beruflich	nicht aufgetreten	nur beruflich	75,70	11,60
48	20.10.1950	m	privat	nicht aufgetreten	nicht aufgetreten	nicht aufgetreten	9,58	<0,35
49	01.01.1975	w	nur beruflich	nur beruflich	nur beruflich	nur beruflich	235	5,35
50	29.08.1967	m	beruflich und privat	beruflich und privat	beruflich und privat	nur beruflich	195,00	8,35
51	26.05.1966	w	nur beruflich	nur beruflich	nur beruflich	nur beruflich	22,10	1,64
52	02.03.1934	w	beruflich und privat	beruflich und privat	nur beruflich	nur beruflich	143,00	<0,35
53	01.02.1953	m	nur beruflich	nur beruflich	nur beruflich	nur beruflich	202,00	7,17
54	08.08.1972	w	nicht aufgetreten	privat	privat	privat	25,40	2,84
55	30.12.1971	w	nicht aufgetreten	nicht aufgetreten	nicht aufgetreten	nicht aufgetreten	23,80	<0,35
56	28.02.1969	w	nicht aufgetreten	nicht aufgetreten	nur beruflich	nur beruflich	ND	<0,35
57	08.07.1962	w	nicht aufgetreten	nur beruflich	nur beruflich	nicht aufgetreten	589	2,72
58	22.04.1955	w	nicht aufgetreten	nicht aufgetreten	nicht aufgetreten	nicht aufgetreten	2,00	<0,35
59	05.08.1960	m	nur beruflich	nur beruflich	nur beruflich	nur beruflich	71,70	1,93
60	27.11.1968	m	nur beruflich	nur beruflich	nur beruflich	nur beruflich	46,70	5,76
61	11.03.1955	m	nicht aufgetreten	beruflich und privat	nur beruflich	nur beruflich	ND	3,04
62	12.06.1971	w	nur beruflich	nur beruflich	nur beruflich	nur beruflich	24,80	3,24

Tabelle 5: Teilkollektiv A aus der Poliklinik des ZfAM mit latexbezogenen Symptomen (62 HCW);

w= weiblich, m= männlich, ND= nicht untersucht

Nr. (n=43)	Geburtsdatum	Geschlecht	Gesamt-IgE (CAP)	Latex-IgE (CAP)	Hevein-IgE (CAP)	Hev b 1-IgE (CAP)
63	09.06.1969	w	121,00	<0,35	ND	ND
64	11.04.1968	w	183,00	1,06	ND	ND
65	13.07.1971	w	748,00	>100	20,03	3,40
66	06.12.1968	w	>2000	96,90	ND	0,41
67	10.02.1936	m	75,40	<0,35	ND	ND
68	08.03.1955	m	193,00	44,60	16,53	<0,35
69	17.03.1967	w	151,00	<0,35	ND	ND
70	23.06.1957	w	464,00	3,79	ND	<0,35
71	01.03.1971	w	88,30	1,52	ND	<0,35
72	14.06.1974	w	44,00	8,70	2,46	<0,35
73	03.01.1973	w	ND	1,49	ND	<0,35
74	03.05.1959	w	7,00	<0,35	ND	ND
75	19.11.1959	m	55,10	<0,35	ND	ND
76	08.04.1948	m	48,00	<0,35	ND	ND
77	11.04.1961	m	615,00	14,30	ND	0,90
78	28.03.1952	w	57,20	<0,35	ND	ND
79	29.04.1969	w	144,00	5,55	ND	<0,35
80	22.07.1965	w	46,20	<0,35	ND	ND
81	29.04.1969	w	144,00	5,55	ND	<0,35
82	18.08.1937	w	183,00	1,06	ND	ND
83	14.07.1971	w	35,30	4,27	1,97	<0,35
84	23.10.1948	m	130,00	<0,35	ND	ND
85	06.06.1965	w	30,20	<0,35	ND	ND
86	21.03.1937	w	10,10	<0,35	ND	ND
87	15.08.1952	w	416,00	3,31	ND	<0,35
88	24.12.1967	w	141,00	7,66	ND	<0,35
89	22.01.1963	w	20,00	4,56	ND	<0,35
90	15.02.1960	w	122,00	0,47	ND	ND
91	30.12.1944	w	165,00	6,33	4,02	ND
92	20.08.1967	w	379,00	0,37	ND	<0,35
93	29.08.1961	w	62,60	3,03	1,1	<0,35
94	20.11.1954	w	48,40	16,40	0,82	0,52
95	01.09.1922	w	160,00	14,80	5,59	ND
96	01.02.1971	w	29,30	1,14	0,58	<0,35
97	01.04.1968	w	43,80	0,79	ND	<0,35
98	24.08.1957	w	905,00	73,10	2,66	4,73
99	16.04.1963	w	103,00	14,24	ND	0,64
100	07.08.1937	m	772,00	<0,35	ND	ND
101	19.08.1971	w	14,90	<0,35	ND	ND
102	19.08.1971	w	14,90	<0,35	ND	ND
103	10.07.1960	m	252,00	0,99	<0,35	<0,35
104	10.07.1960	m	252,00	0,99	<0,35	<0,35
105	19.08.1971	w	27,10	10,7	3,27	0,45

Tabelle 6: Teilkollektiv B mit bekannten Gesamt-IgE- und latexspezifischen IgE-Werten, speziell gegen Hevein und rHev b 1 (43 HCW); w= weiblich, m= männlich, ND= nicht untersucht

Nr. (n=15)	Geburts- datum	Geschlecht	Latex-IgE (CAP)	Latex-IgE (EAST)	Gesamt-IgE (CAP)
106	07.01.1968	w	12,40	13,00	93,00
107	06.10.1964	w	ND	0,05	42,00
108	25.12.1964	w	0,75	ND	>2000,00
109	09.12.1958	m	ND	0,13	96,00
110	18.08.1964	w	ND	2,81	173,00
111	05.01.1966	w	ND	0,08	6,00
112	09.05.1965	w	12,10	8,48	18,00
113	09.05.1965	w	5,47	ND	34,20
114	13.02.1973	w	0,85	ND	73,00
115	09.12.1967	m	ND	0,12	58,00
116	27.08.1965	w	2,61	ND	71,50
117	06.03.1965	w	ND	0,44	18,00
118	20.11.1954	w	16,40	ND	48,40
119	11.01.1969	w	<0,35	ND	11,10
120	06.03.1952	w	33,70	ND	379,00

Tabelle 7: Teilkollektiv C mit bekannten Gesamt-IgE- und latexspezifischen IgE-Werten (15 HCW); w= weiblich, m= männlich, ND= nicht untersucht

3.2 Materialien

3.2.1 Chemikalien

In dieser Arbeit wurden Chemikalien der Firma Fluka (Buchs), Merck (Darmstadt) und Serva (Heidelberg und Deisenhofen) in Analysenqualität verwendet. Außerdem wurden Feinchemikalien und Materialien von folgenden Herstellern bezogen:

Aceton	C_3H_6O	Merck, Darmstadt
Agarose		Sigma, München
Albumin, Bovine (98%)		Serva, Heidelberg
Ampicillin	$C_{16}H_{18}N_3O_4SNa$	Roth, Karlsruhe
Anti-Human-IgE (Maus IgG) [11001]		Progen, Heidelberg
AP-konjugierte anti-Maus-IgG [DO314]		Dako, Hamburg
Bio-Rad DC Protein assay Reagent A		Bio Rad, München
6-(Biotinamidocaprylamid) caproic acid N-Hydroxysuccinyl		Roche, Wyhlen
Coomassie		Bio Rad, München
Di-Natriumhydrogenphosphat	Na_2HPO_4	Roth, Karlsruhe
DMSO	C_2H_6OS	Merck, Darmstadt

DNA-Ladder Mix		Fermentas, St Leon-Rot
dNTP		Invitrogen, Karlsruhe
Ethidiumbromid	$C_{21}H_{20}ON_3Br$	Sigma, München
Ethanol	C_2H_5OH	Merck, Darmstadt
Essigsäure	CH_3COOH	Merck, Darmstadt
Elektrophoresis Temed		Bio Rad, München
IPTG	$C_9H_{18}O_5S$	Roth, Karlsruhe
Imidazol	$C_3H_4N_2$	Merck, Darmstadt
HABA/ Avidin-Reagenz		Sigma, München
Harnstoff	CH_4N_2O	Merck, Darmstadt
Kanamycin Monosulfat	$C_{18}H_{36}N_4O_{11} \cdot H_2SO_4$	Sigma, München
LB-Medium		BIO 101, Carlsbad
LB-Agar-Medium		BIO 101, Carlsbad
Natriumchlorid	$NaCl$	Merck, Darmstadt
Natronlauge (1N)	$NaOH$	Merck, Darmstadt
Ni-NTA-Agarose		Qiagen, Hilden
Nupage MOPS SDS Running Puffer 20*		Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure (1N)	HCl	Merck, Darmstadt
N,N,N,N-Tetramethylethylenediamine	$C_6H_{16}N_2$	Sigma, München
Magnesiumsulfat	$MgSO_4$	Merck, Darmstadt
Maxipräparations-Kit zur DNA-Analyse		Qiagen, Hilden
Methanol	CH_3OH	Merck, Darmstadt
Minipräparations-Kit zur DNA-Analyse		Qiagen, Hilden
MOPS	$C_7H_{15}NO_4S$	Sigma, München
Phenol	C_6H_5OH	Merck, Darmstadt
Roti-Load 4*-Konz		Roth, Karlsruhe
Propanol	C_3H_7OH	Merck, Darmstadt
Temed	$C_6H_{16}N_2$	Sigma, München
Tetracyclin	$C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot HCl$	Sigma, München
Tris	$C_4H_{11}NO_3$	Serva, Deisenhofen
Tween 20		Merck, Darmstadt

3.2.2 Enzyme und Primer

Alkalische Phosphatase (10 U/μl)

New England Biolabs,
Schwalbach

BamH I (10 U/μl)

Fermentas, St Leon-Rot

Bgl II (10 U/μl)

Fermentas, St Leon-Rot

EcoR I (10 U/μl)

Fermentas, St Leon-Rot

Hind III (10 U/μl)

Fermentas, St Leon-Rot

Kpn I (10 U/μl)

Fermentas, St Leon-Rot

Primer: 5,10,Q3,QE,TS

Invitrogen, Karlsruhe

T4 DNA Ligase (5 U/μl)

Fermentas, St. Leon-Rot

Taq DNA Polymerase (2 U/μl)

Invitrogen, Karlsruhe

Thermal Ace DNA Polymerase (5 U/μl)

Invitrogen, Karlsruhe

XhoI I (10 U/μl)

Fermentas, St Leon-Rot

3.2.3 Reaktionspuffer

MgCl₂

Invitrogen, Karlsruhe

PCR-Puffer minus Mg

Invitrogen, Karlsruhe

Puffer G+ mit BSA (10x)

Fermentas, St Leon-Rot

Puffer O+ mit BSA

Fermentas, St Leon-Rot

Puffer R+ (10x)

Fermentas, St Leon-Rot

Puffer Y*/ Tango mit BSA (2x)

Fermentas, St Leon-Rot

T4 DNA Ligase-Puffer (10x)

Fermentas, St Leon-Rot

3.2.4 Bakterien und Plasmide

E. coli-Stamm

XL1Blue

M15

pET 100/D-TOPO

Invitrogen, Karlsruhe

pQE-30 UA

Qiagen, Hilden

3.2.5 Antibiotika und Medien für Bakterienkultur

Ampicillin (100 mg/ml)	1 g Ampicillin 10 ml H ₂ O mit 0,2 µm Filter sterilfiltriert
Amp-Platten	LB-Platten 100 µg/ml Ampicillin
Bakterielle Selektionsmedien	100 µg/ml Ampicillin 12,5 µg/ml Tetracyclin 25 µg/ml Kanamycin
Kanamycin (25 µg/ml)	25 µg Kanamycin 10 ml H ₂ O mit 0,2 µm Filter sterilfiltriert
LB-Medium	13 Kapseln Bio 101 500 ml Aqua dest. autoklaviert bei 121°C
LB-Platten	20 Kapseln Bio 101 500 ml Aqua dest. autoklaviert bei 121°C
Tetracyclin (12,5 µg/ml) (in Ethanol/H ₂ O 50% v/v)	12,5 µg Tetracyclin 5 ml H ₂ O 5 ml Ethanol

3.2.6 Lösungen und Puffer

ATP-Labeling-Mix	0,25 mM dATP 50 mM MgCl ₂
BSA-Stammlösung	10 mg/ml

Coomassie-Entfärbelösung	40% (v/v) Ethanol 10% (v/v) Essigsäure
Coomassie-Färbelösung	0,1% Coomassie-Blau 40% (v/v) Ethanol 10% (v/v) Essigsäure
dNTP-Mix	je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
Glycerinlösung	65% (w/v) Glycerin 0,1 M MgSO ₄ 25 mM Tris HCl pH 8.0
Elektrophorese-Puffer (Proteine) 10x	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS
Ethidiumbromid-Stammlösung	10 mg/ml in ddH ₂ O
IPTG (0,5 M)	1g IPTG (238,3 g/ml) in 8,4 ml H ₂ O lösen mit 0,2 µm Filter sterilfiltrieren
Ladepuffer (Proteinelektrophorese)	50 mM Tris-HCl (pH 6,8) 5,0% (w/v) Mercaptoethanol 2,0% (w/v) SDS 0,01% (w/v) Bromphenolblau 10% (w/v) Glycerol

Ladepuffer (DNA-Gelelektrophorese)	0,04% (w/v) Bromphenolblau 0,04% (w/v) Xylencyanol FF 2,5% (w/v) Ficoll (400) in TAE-Puffer
Lyse-Puffer	155 mM Ammoniumchlorid 10mM Kaliumhydrogencarbonat 0,1 mM EDTA
MOPS-Puffer	1, 25 M NaCl 50 mM MOPS 15% (v/v) Ethanol pH 8.2
PBS	10 mM Na ₂ HPO ₄ 10 mM NaH ₂ PO ₄ 150 mM NaCl
Puffer B	100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris-Cl 8 M Harnstoff pH 8.0
Puffer C	100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris-Cl 8 M Harnstoff pH 6.3
Puffer E	100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris-Cl 8 M Harnstoff pH 4.5

TAE-Puffer	40 mM Tris-Cl 1 mM EDTA pH 8.0
TBS-Puffer	20 mM Tris-HCL 137 mM NaCl pH 7.6
TBS-T (Waschpuffer)	TBS mit 0,2%(w/v) Tween 20
TE-Puffer	10 mM Tris- HCl 1 mM EDTA pH 8.0

3.2.7 Verbrauchsmaterialien

CAP-Zubehör	Phadia, Freiburg
Cryoröhrchen	Roth, Karlsruhe
ELISA-Platten	MaxiSorp, Nunc
Eppendorf-Tubes	Eppendorf, Hamburg
Falcon-Röhrchen	Falcon, Lübeck
Nap-5-Säule	Phadia, Uppsala, Schweden
Küvetten	Eppendorf, Hamburg
Parafilm	American National CanNeenah
PCR-Tubes	Eppendorf, Hamburg
Petrischalen	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
Elektroporationsküvetten	Eppendorf, Hamburg

3.2.8 Geräte

Analysewaage Type 1801	Sartorius, Göttingen
Assay Washer 96	Phadia, Uppsala Schweden
Autoklav 2540 ELW	Tuttnauer Systec, München
Bildschirm	Fujitsu Siemens, München
Brutschrank	Memmert, München
CAP-Reader	Phadia, Uppsala Schweden
Diffusions-Entfärber-Apparatur	Desaga, Wiesloch
Drucker Mitsubishi CP770DW	Herolab, Heidelberg
Eisschrank	Queue System Inc, Merckham
Elektrophoresekammer Horizon 58	Life Technologies, Bochum
Elektrophoresekammer Horizon 59	Life Technologies, Bochum
ELISA-Reader MR 5000	Dynatech, Offenburg
Geldoku MP4+Model 44-16 Inst Camera System	Polaroid, Dreieich-Sprendlingen
Gene Amp PCR System 2400	Perkin Elmer, R. Jügesheim
Hp bussiness inkjet 1100	hewlett packard (hp), München
Hp Laserjet 1299	hewlett packard (hp), München
Kamera Easy 440 KC	Herolab, Wiesloch
Kühlschrank	Bosch, Stuttgart
Kühlzentrifuge 3 K 30	Sigma, München
Kühlzentrifuge Rotina 48 R	Hettich, Tettang
Magnetrührer	Ikamag RCT, Basel
Mikro Pulser	Bio-Rad, München
Mikrowelle Micro-Chef FM 3515	Moulinex, Paris
Mini Cyclor MJ Research	Biozym, Hameln
Netzgerät Power Pac 1000	Bio-Rad, München
Orbital Shaker	Forma Scientific, Naarden
Oberschalenwaage PC 4400	Mettler, Giessen
PH-Meter 761 Calimatic	Knick, Berlin
Photometer Smart Spec 3000	Bio-Rad, München
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Roto Shaker Genie	Scientific Industries Inc Si
Sterilwerkbank Mikroflow	Stolco Mackley
Tiefkühler	Liebherr, Bieberach a.d. Riss

Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Trockenschrank	Heraeus Instruments
UniCAP 100	Pharmacia, Freiburg
Vortexer Reax 2000	Heidolph, Kelheim
Wasserbad	Köttermann, Uetze Hänigsen
Water jacketed incubator	Forma Scientific, Naarden
Wärmebad Typ 1003	GFL, Furtwangen
Zellinkubator	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg

3.3 Methoden

3.3.1 Molekularbiologische Methoden

3.3.1.1 Vorbereitung von Lösungen und Arbeitsgeräten

Gentechnologische Arbeiten der Sicherheitsstufe 1 wurden unter Beachtung der entsprechenden Sicherheitsvorschriften durchgeführt. Der Umgang mit gentechnisch veränderten Organismen (GVO) erfolgte ausschließlich in den dafür ausgewiesenen Räumlichkeiten.

Hitzestabile Geräte und Lösungen wurden durch Erhitzen für 20 Minuten auf 121°C autoklaviert. In der Hitze nicht beständige Geräte wurden mit 70% (v/v) Ethanol gereinigt und getrocknet. Hitzeinstabile Bestandteile von Lösungen wurden als konzentrierte Stammlösungen hergestellt und vor der Zugabe zu bereits sterilen Lösungen durch Membranfilter der Porengröße von 0,2 µm sterilfiltriert.

3.3.1.2 Ansetzen von Übernachtskulturen

Alle *E. coli*-Kulturen wurden, soweit nicht anders vermerkt, bei 37°C unter Gewährleistung von ausreichender Belüftung in LB-Medien angezogen. Im Falle von plasmidcodierender Resistenz sind die Medien mit entsprechenden Antibiotika, meist Ampicillin, in der Endkonzentration von 100 µg/ml komplettiert worden. Als

Anzuchtgefäße dienten für Kulturen unter 5 ml Glasröhrchen, die durch Rollen oder Schütteln inkubiert wurden. Kulturvolumina von 20 ml bis 50 ml wurden in Erlenmeyerkolben durch Schütteln bei 225 rpm inkubiert. Das Beimpfen der Medien erfolgte durch Einzelkolonien oder Plattenabstriche aus Glycerin- oder Mediumkulturen (Sambrook *et al.* 1989, Ausubel *et al.* 1995).

An Lösungen wurden LB-Medium und Ampicillin-Standardlösung (100 µg/ml) benötigt. 3 ml LB-Selektivmedium (300 µg/ml Ampicillin) ist mit einer Kolonie des entsprechenden *E. coli*-Klons inokuliert und bei 37°C und 225 rpm inkubiert worden. Die Übernachtskulturen verwendeten wir am folgenden Tag für Plasmidpräparationen oder zum Animpfen großer Kulturansätze ab 100 ml.

3.3.1.3 Anlegen von Dauerkulturen

Hierfür setzten wir LB-Medium, Ampicillin-Standardlösung (100 µg/ml) und 65%ige Glycerol-Lösung ein. Zur längerfristigen Aufbewahrung der verwendeten *E. coli*-Bakterienstämme erfolgte die Lagerung als Glycerinkulturen bei –80°C. Bakterienstämme, die häufiger verwendet wurden, lagerten wir auf LB-Platten mehrere Wochen bei 4°C im Kühlschrank. 3 ml LB-Selektivmedium (100 µg/ml Ampicillin) wurden mit dem entsprechenden Bakterienklon angeimpft und über Nacht bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Am folgenden Tag sind 500 µl der Bakterienkultur mit 500 µl 65%iger (w/v) Glycerol-Lösung versetzt, in 2 ml Kryo-Röhrchen aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C gelagert worden (Sambrook *et al.* 1989).

3.3.1.4 Ligation von DNA-Fragmenten

An Lösungen und Materialien verwendeten wir 5 x T4-DNA- Ligase-Puffer, T4-DNA-Ligase, DNA-Vektor und DNA-Insert. Zur Ligation von einem PCR-amplifizierten Gen mit Plasmid-DNA wurde mit kompatiblen Restriktionsendonukleasen geschnittene DNA eingesetzt, wobei die geschnittene Insert-DNA gegenüber dem geschnittenen Plasmid in einem mehrfachen Überschuss vorhanden sein sollte. Die Ligationen wurden mit der T4-Ligase in einem Volumen von 20 µl durchgeführt. Das Enzym verknüpft kovalent sowohl doppelsträngige DNA mit komplementären Einzelsträngen

(„sticky ends“) als auch glatte doppelsträngige Enden („blunt ends“). Das molare Verhältnis der zu ligierenden Fragmente betrug in der Regel 1:5 (Vektor/Fragment).

Der Ligase-Ansatz setzte sich zusammen aus:

1 µl linearisierter Vektor (100 ng),
x µl Fragment (entsprechend Vektor/Fragment 1:3, 1:5, 1:10),
4 µl 5 x Ligase-Puffer,
1 µl T4-Ligase,
y µl ddH₂O ad 20 µl.

Die Inkubation erfolgte 1-2 h bei RT oder bei 16°C über Nacht. Der Ligationsansatz konnte anschließend entweder direkt für die Transformation verwendet oder bei -20°C aufbewahrt werden (Sambrook *et al.* 1989, Ausubel *et al.* 1995).

3.3.1.5 Herstellung kompetenter *E. coli*-Bakterien

Hierfür wurden die Lösungen bzw. Materialien: kompetente *E. coli*-Zellen (XL1-Blue / M15), LB-Medium und LB-Agarplatten (12,5 µg/ml Tetracyclin / 25 µg/ml Kanamycin) verwendet. 7 ml LB-Selektivmedium (12,5 µg/ml Tetracyclin / 25 µg/ml Kanamycin) wurden mit dem entsprechenden Bakterienklon angeimpft und über Nacht bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Am folgenden Tag sind 4,5 ml der Vorkultur in 300 ml frisches LB-Medium mit dem geeigneten Antibiotikum verdünnt und zu einer Zelldichte von 4–7 x 10⁷ Zellen/ml bei 37°C aufgezogen worden (entspricht OD 600 nm= 0,6). Danach erfolgte eine Zentrifugation mit 6000 rpm über 15 min bei 4°C. Das Bakterienpellet wurde in 50 ml kaltem Aqua bidest vorsichtig resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift erfolgte insgesamt vier Mal. Anschließend ist das Bakterienpellet in 3,5 ml kalter 10% Glycerin-Lösung aufgenommen, in 1000 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert worden (Hanahan *et al.* 1983).

3.3.1.6 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen durch Elektroporation

Für die Transformation setzten wir kompetente *E. coli*-Zellen (XL1-Blue / M15), LB-Medium und LB-Agarplatten (12,5 µg/ml Tetracyclin / 25 µg/ml Kanamycin) ein. Die

Transformation von Plasmid-DNA nach der Klonierung erfolgte in Form von Elektroporation. Hierfür mussten die *E. coli*-Zellen in einen besonderen kompetenten Zustand versetzt werden, der ihnen eine effektive Aufnahme von DNA ermöglichte (3.3.1.5). Ein Aliquot der kompetenten *E. coli*-Zellen wurde langsam auf Eis aufgetaut und vorsichtig zu 1 µl DNA Ligationsansatz hinzugefügt. Die Suspension ist in eine Elektroporationsküvette (Lagerung bei –20°C) überführt und im Elektroporationsgerät (BioRad) behandelt worden (Programm Ec2). Der Transformationsansatz wurde sofort mit 0,5 bis 1 ml LB-Medium mittels Pasteur-Pipette versetzt und auf eine LB-Agarplatte mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert. Die Platte inkubierten wir entweder 16 h über Nacht bei 37°C oder übers Wochenende bei Raumtemperatur. Diese Vorschrift ergab ca. 10⁷ Transformanten pro µg Plasmid-DNA. Als Negativkontrolle dienten kompetente Zellen ohne Plasmid-DNA (Ausubel *et al* 1995).

3.3.1.7 Vereinzlung der *E. coli*-Bakterien

Die Vereinzlung einer Kultur gestaltete sich nach der Dreistrich-Methode. Aus einer hochgewachsener Flüssigkultur wurde ein steriler Glasstab benetzt und mit drei Strichen eine Agarplatte beimpft. Ein zweiter steriler Glasstab führte drei weitere Striche auf der Agarplatte durch, die die ersten Striche kreuzten. Nach einer dritten Prozedur sollten nach Anwachsen der Kultur über Nacht bei 37°C im Brutschrank im Bereich der dritten Strichführung Einzelkolonien angewachsen sein.

3.3.1.8 Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Hierzu fanden die in der Tab. 8 aufgelisteten Restriktionsenzyme und Puffer Verwendung:

Restriktionsenzyme (Fermentas):		Puffer (Fermentas):
BamH I	(10 U/µl)	10 x G + with BSA
EcoR I	(10 U/µl)	O + with BSA
Hind III	(10 U/µl)	10 x R
Kpn I	(10 U/µl)	2 x Y/Tango with BSA
XhoI I	(10 U/µl)	

Tabelle 8: Restriktionsenzyme und Puffer für DNA-Spaltung

Der typische Verdauungsansatz sah folgendermaßen aus: x µl zu verdauende DNA, 1 µl des entsprechenden Reaktionspuffers, 1 µl Restriktionsendonuklease (10 U/µl) und y µl ddH₂O ad 10 µl.

Restriktionsendonukleasen sind in der Lage, doppelsträngige DNA an für sie spezifischen Sequenzen zu schneiden. Die Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen erfolgte unter den von den Herstellern empfohlenen Bedingungen (Dauer, Temperatur, Enzymmenge und Puffer). Die zu restringierende DNA ist mit 1- 2 U des entsprechenden Restriktionsenzym pro µg DNA 1–2 h bei 37°C inkubiert worden. Um unspezifische DNA-Hydrolysen zu vermeiden, betrug das Volumen der eingesetzten Restriktionsendonukleasen maximal 1/10 des Gesamtvolumens. Bei einem Doppelverdau wurde der Reaktionspuffer gewählt, in dem beide Enzyme mindesten 50% ihrer maximalen Aktivitäten aufwiesen. Der Verdau wurde anschließend im Agarosegel überprüft (3.3.1.9) und die geschnittene DNA gereinigt (Sambrook *et al.* 1989, Ausubel *et al.* 1995).

3.3.1.9 Agarose-Gelelektrophorese und die DNA-Extraktion

An Lösungen wurden 1 x TAE-Puffer, Agarose und 6 x DNA-Ladepuffer eingesetzt. Zur Auftrennung von restriktionsverdauten DNA-Fragmenten oder PCR-Produkten fand die horizontale Gelelektrophorese Verwendung. Dazu stellten wir eine 1%-ige (w/v) Agarosegele her. Die Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer durch Kochen gelöst, auf 60°C abgekühlt, zum Anfärben mit 1 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) versetzt und dann in die vorgefertigte Gelkammer gegossen. Entsprechende Kämme sorgten für verschiedene Taschengröße. Nach Erkalten des Gels ist der Kamm gezogen und die Gelkammer zur Elektrophorese in einer Pufferkammer mit 1 x TAE arretiert worden. Die zu untersuchende DNA-Probe wurde mit 6x DNA-Ladepuffer vermischt. Nach vollständiger Polymerisierung und anschließender Beladung des Gels ist die Elektrophorese bei konstanter Spannung (6-8 V/cm) 40 min durchgeführt worden. Anschließend wurden die aufgetrennten DNA-Fragmente durch Fluoreszenz im UV-Licht bei 302 nm Wellenlänge sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert (Geldokumentation MP4 + Modell 44-16 Inst Camera System Polaroid). Eine Größenabschätzung von DNA-Fragmenten ermöglichte das gleichzeitige Auftragen

eines DNA-Markers mit bekannten Fragmentgrößen (Abb. 3) (GeneRule 100bp DNA Ladder Plus, Fermentas) (Sambrook *et al.* 1989, Ausubel *et al.* 1995).

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten bot das Nucleo-Spin-Kit (Qiagen) die Möglichkeit, DNA-Fragmente nach Auftrennung und Isolierung aus Agarosegelen aufzureinigen. Um eine UV-verursachte Bildung von Thimidindimeren der DNA zu vermeiden, wurde die zu isolierende Bande unter möglichst kurzer UV-Exposition mit einem Skalpell ausgeschnitten. Agaroseblöckchen mit den DNA-Banden sind bei 56°C gelöst, die DNA an der Ionenaustauschermatrix gebunden und mit dem Puffer entsprechend der Herstellerangaben (NucleoSpin) eluiert worden.

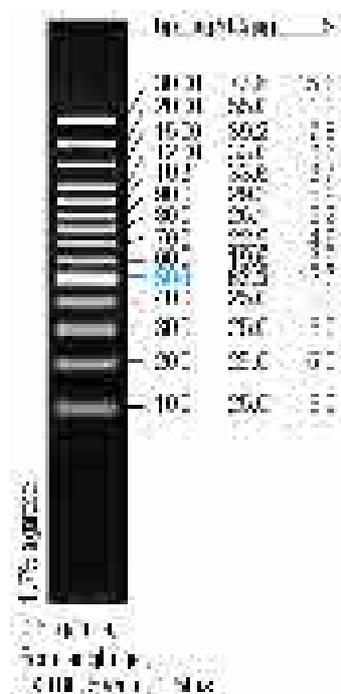


Abbildung 3: Referenz-DNA-Fragmente als Größenstandard (in bp)

3.3.1.10 Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab („Mini-Prep“)

5 ml LB-Medium (mit dem geeigneten Antibiotikum versetzt) wurden mit einer *E. coli*-Kolonie von der Transformationsplatte angeimpft und über Nacht bei 37°C und 225 rpm in Kulturröhrchen geschüttelt. Von dieser Übernachtskultur sind 1,5 ml in ein Eppendorfgefäß überführt und 2 min in der Eppendorf-Zentrifuge (5415C) mit 7000 rpm zentrifugiert worden. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 300 µl Puffer P1 (Qiagen) resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl Puffer P2 (Qiagen) ist das Eppendorfgefäß 4-6 Mal invertiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert

worden. Anschließend haben wir 300 µl Puffer P3 (Qiagen) zugegeben, durch Invertieren gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation in der Eppendorf-Zentrifuge (5415C) bei 14000 rpm für 10 min führten wir den Überstand in eine zuvor mit 1 ml Puffer QBT(Qiagen) äquilibrierte Qiagen-tip-20-Säule über. Nachdem die Probe durch die Säule durchgesickert war, wurde die Säule 4 Mal mit 1 ml Puffer QC (Qiagen) gewaschen. Die an die Säule gebundene DNA ist mit 800 µl Puffer QF (Qiagen) eluiert worden. Die DNA im Eluat wurde durch Zugabe von 560 µl Isopropanol und einer 30-minütigen Zentrifugation bei 14000 rpm gefällt und pelletiert. Das DNA-Pellet ist mit kaltem 70%-igem Ethanol gewaschen, für 10 min zentrifugiert und dann bei 37°C getrocknet worden. Die auf diese Weise gewonnene reine DNA wurde in 50 µl H₂O aufgenommen. Anschließend haben wir die DNA-Konzentration bestimmt (Protokoll des Qiagen Plasmid Mini Handbook) (3.3.1.12).

3.3.1.11 Präparation von Plasmid-DNA im großen Maßstab („Maxi-Prep“)

Die entsprechende Vorkultur wurde mit 500 ml LB-Selektivmedium (500 µg/ml des entsprechenden Antibiotikums) angeimpft und über Nacht bei 37°C und 225 rpm kultiviert. Das Pellet aus der Übernachtskultur haben wir in 10 ml Puffer P1 (Qiagen) vollständig resuspendiert. Nach dem Zusatz von 10 ml Puffer P2 (Qiagen) haben wir den Ansatz vorsichtig gemischt und bei Raumtemperatur 5 min inkubiert. Danach sind 10 ml kalter Puffer P3 (Qiagen) zugegeben worden und es folgte erneut eine vorsichtige Durchmischung und 20 min Inkubation auf Eis. Danach wurde der Ansatz mit der maximalen Geschwindigkeit (14000 rpm) der Eppendorfer Zentrifuge (5415C) 45 min zentrifugiert. Das geklärte Lysat überführten wir auf eine zuvor mit 10 ml Puffer QBT (Qiagen) äquilibrierte Qiagen-tip-500-Säule, wo es mittels der Schwerkraft durchfloss. Die Säule wurde 2 Mal mit je 30 ml Puffer QC (Qiagen) gewaschen, bevor die Plasmid-DNA mit 15 ml Puffer QF (Qiagen) eluiert werden konnte. Die DNA im Eluat ist mit 10,5 ml Isopropanol gefällt und bei der maximalen Drehzahl (14000 rpm) der Eppendorf-Zentrifuge (5415C) für 30 min pelletiert worden. Das Pellet wurde mit 5 ml kaltem 70%-igem Ethanol gewaschen und für 10 min zentrifugiert. Die gereinigte DNA haben wir bei 37°C für 5 min trocknen lassen, anschließend in 200 µl H₂O aufgenommen und für die DNA-Sequenzierung eingesetzt (Protokoll des Qiagen Plasmid Purification Handbook).

3.3.1.12 DNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen, insbesondere nach Plasmid-Präparationen, bedienen wir uns der UV-Spektrophotometrie (Photometer Smart spec 3000, Bio-Rad). Dabei wird die Absorption bei 260 und 280 nm gemessen, wobei die Absorption bei 280 nm eine eventuelle Proteinkontamination angibt. Saubere, nicht mit Proteinen verunreinigte DNA hat einen OD_{260nm}/OD_{280nm}-Quotienten von 1,9 bis 2,2. Es wurde in der Regel eine 100-fache Verdünnung der Lösung in einem Endvolumen von 100 µl hergestellt und photometrisch in einer Photometerküvette vermessen. Ein Referenzansatz, der nur Wasser enthält, ist für den Nullabgleich bei 260 nm gemessen worden.

3.3.1.13 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung mit Big Dye-Terminatoren basiert auf einer modifizierten Form der enzymatischen Didesoxynukleotid-Methode. Jede DNA-Probe wird nur einer einzigen Sequenzierungsreaktion mit unmarkierten dNTPs unterworfen. Der Abbruch der enzymatischen Synthese erfolgt durch Einbau von jeweils einem der vier Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTPs), die unterschiedlich fluoreszenzmarkiert sind. Alle so entstandenen Einzelstrang-DNAs können anhand ihrer Fluoreszenz-Farben in einem Sequenzierungsgel identifiziert werden und die DNA-Sequenz kann direkt abgelesen werden. 500 ng Plasmid-DNA oder 100 ng gereinigtes PCR-Produkt und 15 pmol Sequenzier-Primer wurden mit 4 µl Big Dye-Reagenz mit Aqua dest auf 20 µl Endvolumen aufgefüllt. Die Sequenzierungsreaktion erfolgte in einem PCR-Thermocycler (Biozym) mit folgendem Temperaturprogramm (Tab. 9):

Schritt	Temperatur	Zeit	Anmerkung
1	95°C	1 min	} 25 Zyklen
2	96°C	30 s	
3	50°C	15 s	
4	60°C	4 min	
5	4	∞	

Tabelle 9: Temperaturprogramm der DNA-Sequenzierung

Danach wurde der Reaktionsansatz mit 0,3 M Natriumacetat (pH 5,2) auf 100 µl aufgefüllt, mit 250 µl kaltem Ethanol (96%) gemischt und 30 min per Zentrifugation präzipitiert. Das Pellet ist an der Luft getrocknet und dem Servicelabor im Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie (UKE, Hamburg) zur Analyse weitergegeben worden. Die Detektion der vier unterschiedlich markierten Dye-Terminatoren erfolgte dort auf einem Applied Biosystem 377 DNA Sequencer. Auf diese Weise konnte eine Länge von bis zu 600 bp sequenziert werden. Die ermittelten Sequenzdaten wurden im Textformat in Form eines Vier-Farben-Elektropherogramms gespeichert und für die durch Computer unterstützte Alignments unter der Internet-Adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast> verwendet (Protokoll Kits des BigDye Terminator (ABI), Sanger et al. 1977) (Tab. 10 und Abb. 4)

Nukleotid	Fluoreszenzfarbstoff	E _{max}	Farbe
ddATP	6-FAM (6-Carboxyfluoreszein)	518 nm	Blau
ddCTP	HEX (6-Carboxy-2',4',7',2,4,7-hexachlorofluoreszein)	556 nm	Grün
ddGTP	TAMRA (N,N,N,N-Tetramethyl-6-Carboxyrhodamin)	580 nm	Gelb
ddTTP	Rox (6-Carboxy-X-rhodamin)	605 nm	Rot

Tabelle 10: Eigenschaften verschiedener, für die Sequenzierung eingesetzter Fluoreszenzfarbstoffe

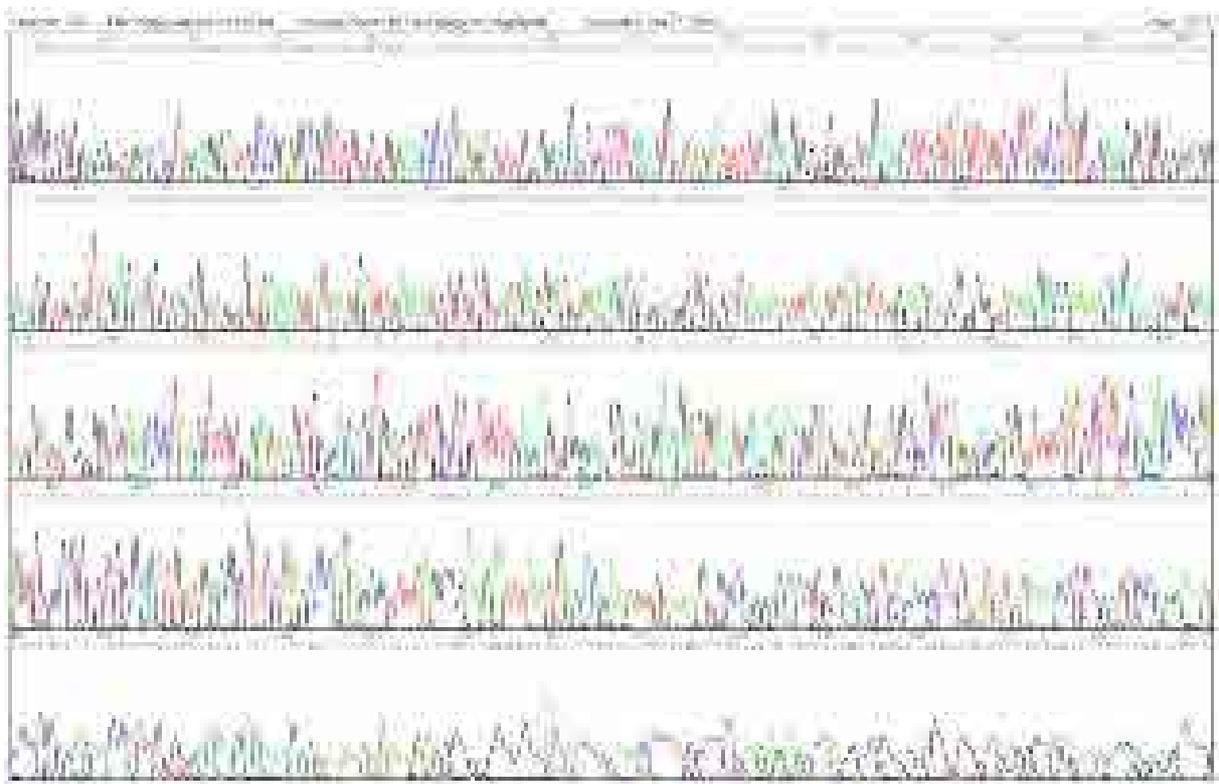


Abbildung 4: Darstellung einer Sequenz in Form eines Vier-Farben-Elektropherogramms

3.3.1.14 Durchmusterung der Bakterienkolonien

Jede zu untersuchende Bakterienkolonie wurde mit einer sterilen 10 µl-Pipettenspitze gepickt und in 10 µl sterilem H₂O in einem PCR-Tube resuspendiert. Für eventuelle spätere Untersuchungen ist eine Replikplatte angelegt worden, in dem die Pipettenspitze auf einer entsprechenden Platte ausgestrichen wurde.

Das zyklische Temperaturprogramm variierte entsprechend der Primerkombination und unterschied sich nur in der Annealingtemperatur und der Elongationszeit (n= 40 - 60 Nukleotide/s). Der Master-Mix für die PCR-Durchmusterung setzte sich zusammen aus: 10 µl 10xPCR-Puffer ohne Magnesium (Invitrogen), 6 µl MgCl₂ (25 mM), 2 µl dNTPs (10 mM), 10 µl Vorwärtsprimer (5 pmol/µl), 10 µl Rückwärtsprimer (5 pmol/µl), 61,5 µl H₂O und 0,5 µl Taq-Polymerase (5 U/µl) (Invitrogen).

Die Amplifikation des Fragments erfolgte mit folgendem Programm:

1 x {96°C 2 min},

40 x {96°C 10 s, 50°C 30 s, 72°C n s} (n= (40-60 Nukleotide)/s),

1 x {72°C 5 min} .

Wenn man die Einbaustelle des das Insert flankierenden Primers einsetzte, bestätigte ein positives PCR-Signal die Existenz des Inserts im Plasmid. Über den kombinierten Einsatz eines flankierenden Primers mit einem Insert-internen Primer wurde die Orientierung des Inserts bestimmt.

3.3.1.15 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht, ausgehend von geringen Mengen an genetischem Material (DNA, RNA), innerhalb kurzer Zeit große Mengen einer gesuchten Zielsequenz zu erhalten. Hierzu sind neben dem Ausgangsmaterial Oligonukleotide, sog. Primer, notwendig. Diese binden als Startsequenzen spezifisch an die Enden der zu amplifizierenden Sequenz und bilden damit das für die Bindung der eingesetzten DNA-Polymerase (sog. Taq-Polymerase) notwendige 3'-OH-Ende. Außerdem benötigt man die vier Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und eine Pufferlösung, die das Reaktionsmilieu für das verwendete Enzym herstellt. Das Gemisch dieser Substrate wird in einem Thermocycler (Biozym, Hameln) einer periodischen Wiederholung von Denaturierung (Trennen der Doppelstrang-DNA),

Annealing (Anlagern der Startsequenz (welches mit folgender Formel berechnet werden kann: $[(A + T) \times 2] + [(G + C) \times 4]$) und Polymerisierung (Anlagerung der komplementären Basen an die Einzelstränge) durch die DNA-Polymerase unterworfen.

Die PCR-Reaktionen erfolgten in einem Gesamtvolumen von 100 µl. Zu den 10 pg Template-DNA wurde folgender Standard-PCR-Mix gegeben:

10 µl PCR-Puffer 10 x,

6 µl MgCl₂,

2 µl dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP),

5 µl der zwei entsprechenden Primer [5'-Primer (sense), 3'-Primer (antisense)],

0,5 µl Taq-DNA-Polymerase,

71,5 µl H₂O.

Es wurden 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße verwendet und eine sogenannte „Hot-Start-PCR“ in einem Thermocycler (Biozym, Hameln) nach folgendem Schema durchgeführt (Tab. 11):

Schritt	Temperatur	Zeit	Anmerkung
1	96°C	2 min	} 40 Zyklen
2	96°C	10 s	
3	59°C	30 s	
4	72°C	20 s	
5	72°C	7 min	

Tabelle 11: PCR-Temperaturprogramm

Die Spezifität und Ausbeute jeder PCR wurde durch 1%-ige (w/v) Agarosegelelektrophorese kontrolliert. Das PCR-Produkt der erwarteten Größe ist aus dem Gel herausgeschnitten und mit dem NucleoSpin Extract (Qiagen) isoliert worden. Das gereinigte DNA-Fragment wurde für den Restriktionsverdau eingesetzt und mit dem entsprechend vorbereiteten Vektor ligiert. Alternativ erfolgte auch eine direkte Klonierung (Ausubel *et al.* 1995, Powell 1990).

3.3.2 Proteinchemische Methoden

3.3.2.1 Proteinexpression

Eine Übernacht-Kultur von *E. coli*-Bakterien, die das zu exprimierende Plasmid enthielten, wurde 1:20 in LB-Selektivmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum verdünnt und in einem Schüttler (Orbital Shaker Genie, Scientific Industries Inc Si) bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Nach einer Stunde erfolgte die Induktion durch Zugabe von 1 mM IPTG (Endkonzentration). Anschließend ist die Bakterienkultur für weitere 4 h inkubiert und danach bei 4°C und 14000 g für 15 min zentrifugiert worden. Das Pellet haben wir für die Proteinreinigung (3.3.2.2) eingesetzt oder bei -20°C aufbewahrt. Um den Verlauf des Bakterienwachstums beobachten und graphisch darstellen zu können, wurde jede Stunde der OD-Wert bei 600 nm gemessen. Ein Referenzansatz, der reines LB-Medium enthielt, diente als Nullabgleich.

3.3.2.2 Aufreinigung rekombinanter His-Taq-Proteine mit Ni-NTA-Säulen unter denaturierender Bedingung

Die Aufreinigung rekombinanter Proteine erfolgte aus einer 1000 ml Bakterienkultur. Das entsprechende Bakterienpellet wurde in 50 ml Puffer B (Qiagen) resuspendiert. Das Gemisch ist 2 h bei RT rotierend inkubiert worden (Orbital Shaker, Forma Scientific). Der Ansatz wurde anschließend bei 4°C und 14000 g für 5 min zentrifugiert. Das geklärte Lysat haben wir mit 1000 µl Ni-NTA-Suspension (Qiagen) versetzt und ebenfalls 2 h bei RT rotierend inkubiert. Der Bindungsansatz wurde bei 4°C und 14000 g 4 min zentrifugiert. Das Sediment ist in 50 ml Puffer B (Qiagen) resuspendiert und 10 min rotiert worden. Dieser Schritt erfolgte zwei Mal. Der Bindungsansatz wurde bei den oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift ist das Sediment in 1 ml Puffer B (Qiagen) vorsichtig resuspendiert und in ein 2-ml Eppendorf-Gefäß transferiert worden. Der Bindungsansatz wurde dann 2 min bei maximaler Geschwindigkeit in der Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. Das gewonnene Pellet haben wir in 500 µl Puffer B (Qiagen) + 500 mM Imidazol resuspendiert und bei RT 1 h rotierend inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt erhält man im Überstand das Eluat. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt. Nach der Zentrifugation wurde das Sediment in 500 µl Puffer B

(Qiagen) resuspendiert. Das Ergebnis der Aufreinigung ist anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und dokumentiert worden (3.3.2.3).

3.3.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen nach dem Molekulargewicht eignete sich die SDS-PAGE. Die Proteine wurden mit 4 x Probepuffer versetzt, 10 min bei 70°C denaturiert und dann auf das SDS-Gel (Invitrogen) aufgetragen. Als Marker wurden 20 µl Protein-Marker II Nu PAGE MES (Invitrogen) eingesetzt. Die Gelelektrophorese ist 45 min bei 200 V in einer Elektrophoresekammer Horizon 59 (Life Technologies) durchgeführt worden.

Nach dem Färben und Entfärben der SDS-Gele (3.3.2.4) erfolgte die Dokumentation mittels eines Geldokumentationssystems Geldoku MP4 + Modell 44-16 Inst Camera System (Polaroid). Die Größe der einzelnen Protein-Banden konnte durch den Vergleich mit verschiedenen Protein-Molekulargewichtsmarkern abgeschätzt oder berechnet werden (NuPAGE MES/Invitrogen) (Abb. 5).

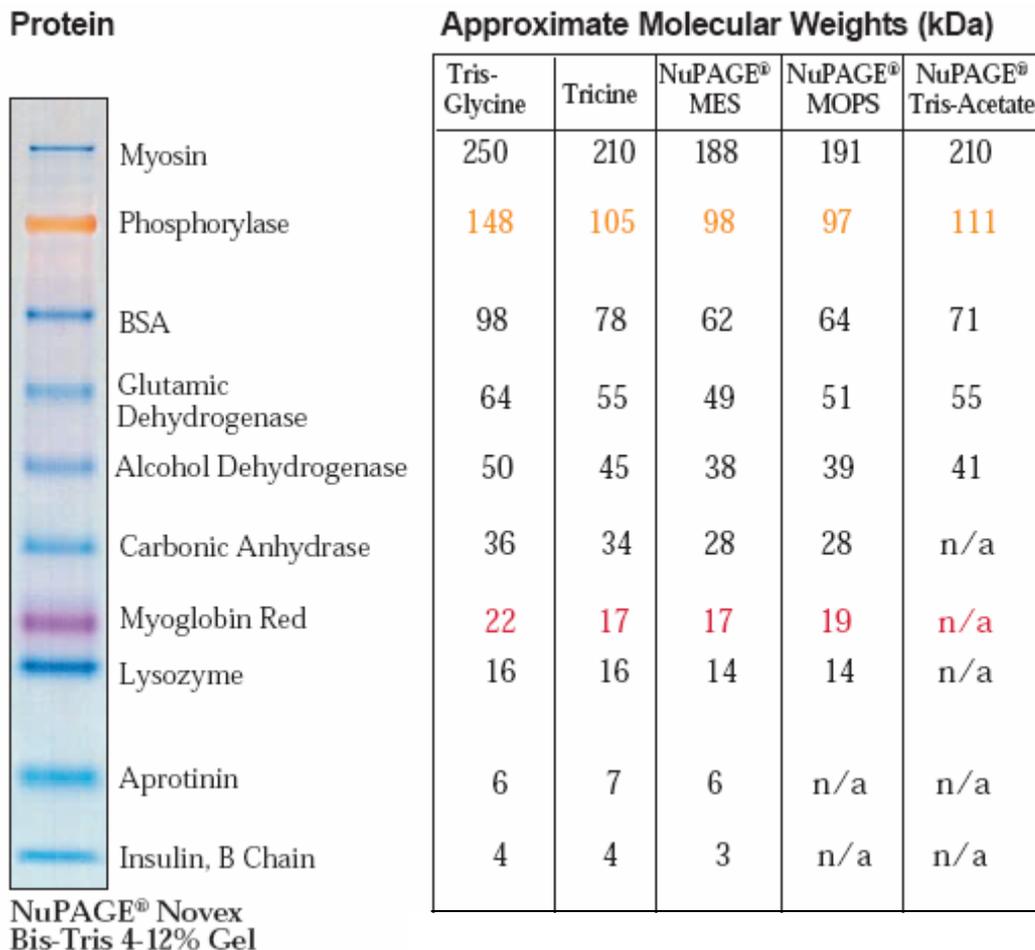


Abbildung 5: Referenzproteine als Größenstandard

Für die vorliegende Arbeit wurde der NuPAGE MES-Marker mit folgenden Proteinen verwendet: Myosin, Phosphorylase, BSA, Glutamatdehydrogenase, Alkoholdehydrogenase, Carboanhydrase, Myoglobin rot, Lysozym, Aprotinin, Insulin (B-Kette).

3.3.2.4 Coomassie-Färbung

Die in einem Polyacrylamidgel separierten Proteine konnten mittels Coomassie-Brillant-Blau angefärbt werden. Hierbei wurde in einem Färbeschnitt zunächst das gesamte Gel angefärbt und in den nachfolgenden Entfärbeschritten die Bereiche des Gels wieder entfärbt, die kein Protein enthielten.

Diese Färbung ermöglicht eine Detektion ab 300-1000 ng Protein pro Bande. Das zu färbende Gel wurde je 1 h in einer Coomassie-Färbe- und dann Entfärbelösung auf der Diffusions-Entfärber-Apparatur (Desaga) unter leichten Schwenken inkubiert. Die Visualisierung spezifischer Proteinbanden erfolgte erst nach Entfärben. Überschüssige Farbe wurde bis zum Sichtbarwerden der Banden mit Aqua dest entfernt.

3.3.2.5 Proteinbestimmung

Der Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau reagiert mit basischen Aminosäuren. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum nach 595 nm. Durch die Messung der Absorption bei dieser Wellenlänge kann die Konzentration einer unbekannter Proteinlösung einfach bestimmt werden, vorausgesetzt das für die Eichung verwendete und das unbekannte Protein haben einen annähernd gleichen Gehalt an basischen Aminosäuren. Rinder-Serum-Albumin (BSA) hat sich als international anerkannter Standard für die Eichung durchgesetzt.

Das Farbreagenz setzte sich aus BioRad Protein Assay Dye Reagent Concentrate 1:5 mit Aqua dest verdünnt, Standardstammlösung: BSA $c = 1,4 \text{ mg/ml}$ und 7 Standardverdünnungen mit den Konzentrationen $0,2 \text{ mg/ml} - 1,4 \text{ mg/ml}$ zusammen. Je $20 \mu\text{l}$ Aliquot des Gesamtzellextraktes wurden mit $1000 \mu\text{l}$ Farbreagenz in Halbmikroplastikküvetten verdünnt und invertiert. Nach 5- bis max. 60-minütiger Inkubationszeit bei RT ist die Extinktion bei 595 nm gegen eine Referenz, die kein Zellextrakt enthielt und 7 Standardverdünnungen, gemessen worden (Bradford 1976).

3.3.3 Immunologische Methoden

3.3.3.1 ELISA

Der „enzyme linked immunosorbent assay“ (ELISA) gehört zu einer weitverbreiteten Bestimmungsmethode zur Untersuchung der humoralen Immunantwort. Das Messprinzip entspricht weitgehend dem Festphasen-Radioimmunoassay (RIA), wobei die radioaktive Markierung durch ein Enzym ersetzt wird.

Das Wirkprinzip des indirekten ELISAs beruht auf der Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen. Auf diese Weise kann das Vorhandensein spezifischer Antikörper gegen bestimmte Antigene nachgewiesen werden. Die Antigene werden auf einem Träger, z.B. auf einer 96-Well-Mikrotiterplatte (Nunc), befestigt. Auf diese sog. Feste-Phase wird das zu untersuchende Serum gegeben. Wenn im Serum Antikörper (Primärantikörper) gegen das an der 96-Well-Mikrotiterplatte haftende Antigen vorhanden sind, kommt es zur Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen. Da die Primärantikörper ebenfalls antigene Eigenschaften haben, kann ein weiterer spezifischer Antikörper (Sekundärantikörper; spezifisch gegen den Primärantikörper

gerichtet) an diese binden. An einen gegen den Sekundärantikörper gerichteten Tertiärantikörper ist ein Enzym gekoppelt, welches die Umsetzung eines in einem weiteren Schritt zugegebenen Substrates beschleunigt, was wiederum über einen Farbumschlag sichtbar wird. Das Ausmaß der Farbreaktion lässt sich quantitativ mit dem Photometer bestimmen. Die Berechnung des relativen Antikörpergehalts im Serum erfolgt mittels vorher festgelegter Standards und wird in erdachten Einheiten, den sogenannten ELISA-Units (EU), ausgedrückt.

An Lösungen stellten wir für den ELISA einen Verdünnungspuffer aus:

1 x PBS, Waschpuffer (PBST) aus 1 x PBS + 0,05% Tween 20,

Blocking-Puffer aus 1 x PBS + 0,05% Tween 20 + 2% BSA

und Substrat-Puffer aus 52,6 g Diethanolamin + 250 µl 1M MgCl₂, ad 500 ml Aqua dest (pH 9.8) her.

Bei der Testdurchführung wurden vorbereitend ELISA-Platten (Fa. Nunc, Maxi Sorp) mit 100 µl einer Lösung des ELISA-Antigens in Verdünnungspuffer pro Vertiefung beschichtet. Die Endkonzentration des ELISA-Antigens betrug 15 µg/µl. Die Platte ist versiegelt über Nacht bei 4°C inkubiert worden. Am nächsten Tag waren die Antigene fest an die Platte gebunden. Nach der Verwerfung der Beschichtungslösung (durch Ausklopfen auf Zellstoff) und dreifachem Waschen mit PBST erfolgte die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit einem Blocking-Puffer für 2 h bei 37°C (200 µl/Well). Nach der Entfernung des Blocking-Puffers wurden 100 µl/Well der verdünnten Serumproben (1:2, 1:4, 1:8, 1:16) pipettiert. Positiv- und Negativkontrollen dienten als Vergleich für die jeweiligen Testbedingungen. Nach der Inkubation von 1 h bei RT wurden alle Wells drei Mal mit Waschpuffer (PBST) gewaschen, dadurch sind alle ungebundenen Antikörper entfernt worden. Zum Nachweis von gebundenen Serumantikörpern wurde in jedes Well 100 µl eines Sekundärantikörpers (Maus anti-human-IgE; Progen 11001) in einer 1:500er-Verdünnung eingebracht. Nach 1 h wuschen wir die Mikrotiterplatte wiederum drei Mal mit Waschpuffer (PBST). Als tertiärer Antikörper diente ein AP (alkalische Phosphatase)-konjugierter anti-Maus-Immunoglobulin-Antikörper (Dako DO314), der 1:1500 in PBST verdünnt wurde.

Nach einem Inkubationsschritt von 1 h bei RT und dem darauffolgenden dreifachen Waschschrift mit PBST erfolgte die Zugabe von 100 µl/Well des Substratpuffers.

Dieser wurde enzymatisch durch die alkalische Phosphatase umgesetzt und ein gelber Farbton, mit dem die Antikörper-positiven Serumproben angezeigt wurden, entstand. 10 min nach Substratzugabe ist die optische Dichte mit dem ELISA-Reader bei 405 nm gemessen worden. Je höher der Antikörper-Titer in den Serumproben war, desto mehr AP-Moleküle befanden sich in einem Well und desto mehr Substrat wurde umgesetzt. Antikörper-negative Serumproben zeigten nach 10 min Reaktionszeit noch keinen optisch sichtbaren Farbumschlag (Engwall und Perlman 1971, Richardson *et al.*).

ELISA-Befunde wurden als positiv eingestuft wenn:

1. in einer Serumverdünnungsreihe die Steigung von $> 0,1$ betrug und/oder
2. der Messwert mit dem Latex-Einzelallergenen mehr als das Dreifache des Hintergrunds betrug und
3. der Messwert außerhalb des Streuungsbereiches der Negativkontrolle lag.

3.3.3.2 *In vitro*-Biotinylierung

Die Biotinylierung stellt die gängigste Methode der Modifikation der Plasmaproteinmembran dar. In dieser Arbeit erfolgte die Modifikation der Aminogruppen mittels Biotin-Hydroxysuccinimid-Ester.

An Reagenzien setzten wir ein: 1 x PBS, Blocking-Puffer: 1x PBS + 1% BSA, HABA/Avidin Reagenz (Lagerung bei 4°C), Biotin-X-X-NHS-Lösung: 10 mg 6-(Biotinamidocaproylamido) Caproic acid N-Hydroxysuccinimide Ester (Biotin-X-X-NHS, MW: 567,7 g/mol) in 500 µl DMSO (Endkonzentration 20 mg/ml) (Lagerung bei -20°C). Zuerst wurde der Proteingehalt der zu biotinylierenden Probe nach Bradford (3.3.2.5) gemessen. Zu der Probe, welche auf ein Endvolumen von 2,5 ml mit 1 x PBS aufgelöst wurde, ist Biotin-X-X-NHS hinzugefügt worden bis sich ein Verhältnis von ca. 5:1 Mol aktiviertes Biotin zu Mol Protein ergibt. Hierfür ist bei Verwendung von Biotin-X-X-NHS folgende Gleichung zu verwenden:

$$\frac{[(\text{Konzentration von Protein in mg/ml}) \times (\text{Volumen von Protein in ml}) / (\text{Molekulargewicht vom Protein in Dalton})] \times 5 \times 567,7 \text{ (mg/mmol)} / 20 \text{ (mg/ml)} \times 1000 \text{ (}\mu\text{l/ml)}}{1} = \text{Volumen von Biotin-X-X-NHS [}\mu\text{l]}.$$

Hierbei lag die eingesetzte Konzentration von Biotin-X-X-NHS (Molekulargewicht: 567,7 mg/mol) bei 20 mg/ml, das molare Verhältnis von Biotin-X-X-NHS und Protein lag bei 5:1.

Nach 2 h Inkubation wurde der Biotinylierungsansatz auf eine zuvor mit 1% BSA-Lösung geblockte und dann 6 Mal mit 3 ml 1 x PBS äquilibrierte Sephadex-Säule überführt. Der Durchfluss à 1 ml Aliquots wurde in die Eppendorf-Gefäße fraktioniert. Das an die Säule gebundene, biotinylierte Protein ist danach 2 Mal mit 3,5 ml 1 x PBS eluiert worden, die Fraktionen wurden ebenfalls à 1 ml aufgefangen. Insgesamt wurden 9 Fraktionen gesammelt. Der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen wurde mittels Bradford-Assay (3.3.2.5) bestimmt. Sollte die Proteinkonzentration über 1,4 mg/ml liegen, musste die Probe 1:10 in 1 x PBS verdünnt und erneut gemessen werden. Die ersten 3 proteinenthaltenden Fraktionen wurden vereinigt. Dann sind in einer 1 ml Photometerküvette 900µl der HABA/Avidin-Reagenz gegeben und die OD 500 (Blank gegen Aqua deion.) gemessen worden (Range 0,9-1,3). Daraufhin wurden 100 µl der zu testenden Probe hinzugefügt, invertiert und erneut die OD 500 bestimmt. Wenn der gemessene Wert größer als 0,3 war, dann musste die Messung mit einer 1:10 mit 1 x PBS verdünnten Probe wiederholt werden.

Der Biotinylierungsgrad ergibt sich aus der folgenden Formel:

Biotinylierungsgrad =

$$\text{Verdünnungsfaktor} \cdot 10 \cdot [0,9 \cdot (\text{OD}_{500/\text{HABA/Avidin}}) - \text{OD}_{500/\text{HABA/Avidin/Probe}}] / 34 / [(\text{Mittlere Protein-Konzentration der drei Fraktionen in mg/ml}) / (\text{Molekulargewicht des Proteins})] / 1000.$$

Um die gleiche Sephadex-Säule für die nächste Biotinylierung verwenden zu können, wurde sie 5 Mal mit 3,5 ml 1 x PBS gewaschen, mit wenig Überstand benetzt verschlossen und beschriftet bei 4°C aufrecht gelagert.

3.3.3.3 CAP-Kopplung

Die Streptavidin-CAPs wurden in eine ELISA-Platte eingesetzt und mit Phadia-Waschlösung im CAP-Washer gewaschen. Danach erfolgte die Befüllung der CAP-Gefäße mit der Proteinlösung. Das eingesetzte Volumen der Proteinlösung ergab sich aus der mittels Bradford-Assays ermittelten Proteinkonzentration (3.3.2.5) und betrug zwischen 20 und 50 µg Protein pro well. Nach 30 min Inkubation wurden die

CAP-Schwämme erneut gewaschen und bei 4°C bis zum Zeitpunkt der Messung gelagert (3.3.3.4).

3.3.3.4. CAP-Assay

Auf den schwammartigen CAP-Scheiben gebundenes Allergen (isoliertes Protein, gereinigtes Epitop oder rekombinantes Allergen) wurde mit Serum inkubiert und mittels enzymmarkierten Antikörpern das am Allergen gebundene IgE nachgewiesen. Der Nachweis erfolgte halbautomatisch im Unicap 100-Gerät (Phadia, Freiburg) (Tab.12).

CAP-Klasse	Allergen spezifische IgE-Konzentration (kU/l)
0	< 0,35
1	0,35 - 0,69
2	0,70 - 3,49
3	3,5 - 17,49
4	17,5 - 49,99
5	50 - 99,99
6	≥100

Tabelle 12: Normwerte der CAP-Klassen

4. ERGEBNISSE

4.1 Klonierung, Expression und Reinigung der Latex-Allergene Hev b 1, 3, 5, 6, 7, 8

In Zusammenarbeit mit dem Institut für allgemeine Botanik der Universität Hamburg wurde bereits im Vorwege aus den Blättern tropischer Gummibäume *Hevea brasiliensis* des Gewächshauses des Biozentrums Klein Flottbek Latex-Gesamt-RNA hergestellt. Mittels spezifischer Primer konnten die cDNAs bekannter Latex-Allergene über RT-PCR amplifiziert und in den bakteriellen Expressionsvektor pQE30UA (Qiagen, Hilden) kloniert werden. Die Identität der Inserts wurde anhand der Sequenzen überprüft.

Das so gewonnenen RT-PCR Produkt ist exemplarisch für pQE-rHev b 5 562 bp lang und läuft im 1%-igen Agarosegel zwischen den Banden 500 bp und 600 bp des GeneRule 100bp DNA Ladder Plus-Markers (Abb. 6).



Abbildung 6: PCR-Durchmusterung von pQE-rHev b 5

Für pQE-rHev b 5 charakteristisch ist eine Größe von 562 bp

Spur 1: DNA-Marker

Spuren 2-10: PCR-Durchmusterungsproben

Spur 11: rHev b 5 -DNA-Eluat

Voraussetzung für die Herstellung der verschiedenen Allergene war die Klonierung der allergencodierenden cDNA in einen Expressionsvektor. Hierzu diente das 3504 bp große Plasmid pQE-30UA (Qiagen, Hilden). Zunächst waren sowohl das Plasmid als auch das PCR-Produkt mit Bam H I und Hind III zu schneiden und anschließend miteinander zu ligieren. Die Ligationsprodukte wurden in die kompetenten *E. coli*-Zellen des Stammes XL1-Blue transformiert. Um die Bakterienkolonien zu identifizieren, in denen der Inserteinbau erfolgt war, wurde auf einem 1%-igen Agarosegel ein Kolonie-Screening durchgeführt. Die Bakterien, die das Ligationsprodukt als Insert enthalten, sind in Abbildung 7 zu erkennen.

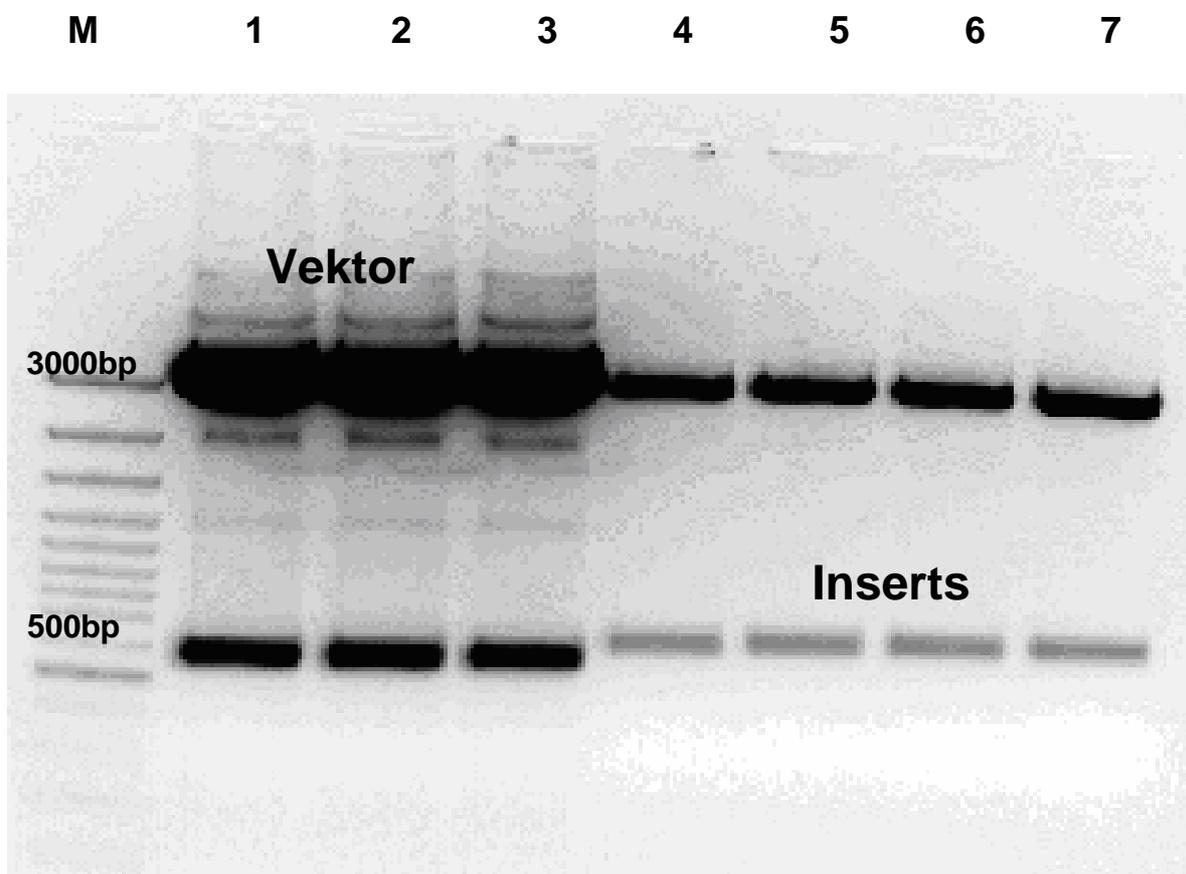


Abbildung 7: Klonierungsprodukte von rHev b 6 und rHev b 3

M: DNA-Marker

1 - 3: pQE30-Hev b 6

4 - 7: pGTE-Hev b 3

Die Ergebnisse des Verdauers der Plasmid-DNA aus den entsprechenden Kolonien sind in Abbildung 8 zu sehen:

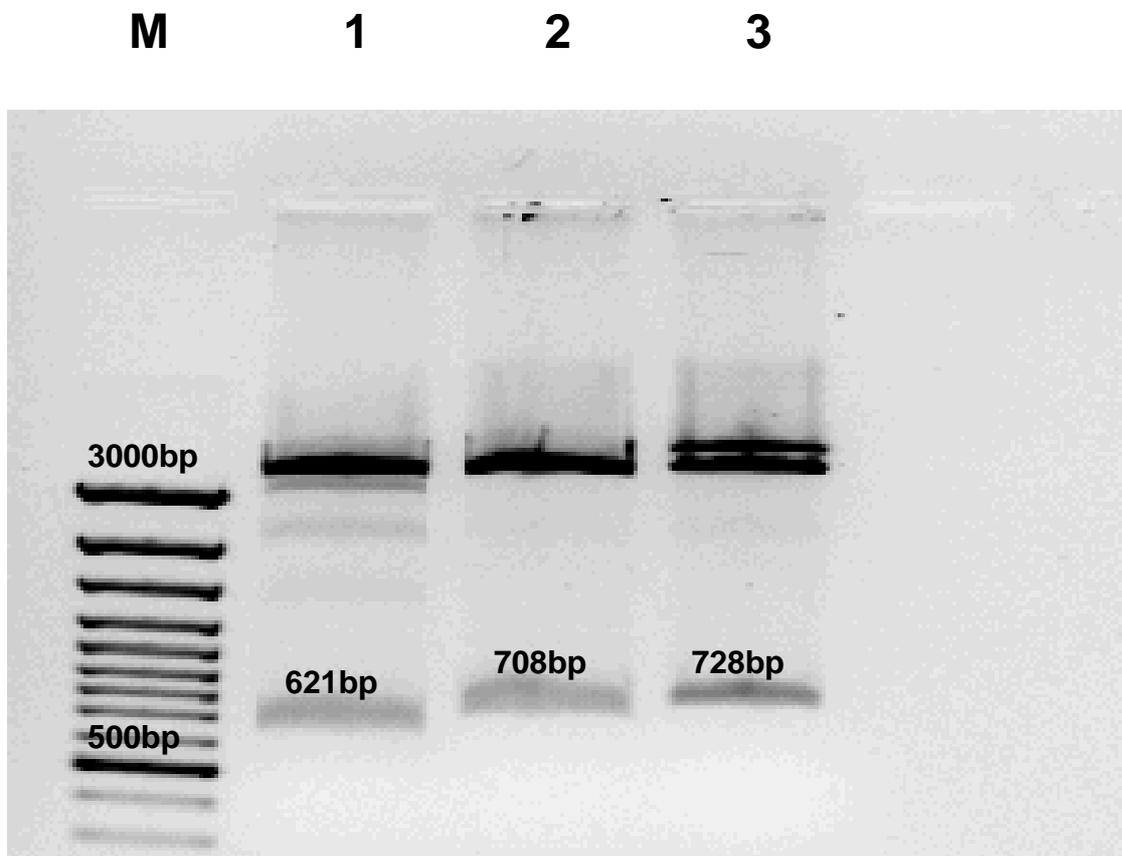


Abbildung 8: Überprüfung der Klonierung von pQE-Hev b 3 durch Restriktionsverdau

M: DNA-Marker

1: Verdau 1 mit Hind III und Bam H I

2: Verdau 2 mit EcoR I und Hind III

3: Verdau 3 mit EcoR I und Bgl II

Bei erfolgreichem Inserteinbau in das Plasmid sind folgende Fragmente zu erwarten:

bei Verdau mit Hind III und Bam H I - **621 bp**;

bei Verdau mit EcoR I und Hind II - **708 bp**;

bei Verdau mit EcoR I und Bgl II - **728 bp**.

Da die erwarteten Fragmentgrößen zu erkennen sind, ist von einer erfolgreichen Klonierung auszugehen.

Die Proteinexpression erfolgte durch Induktion mit IPTG. Die folgenden Abbildungen (Abb. 9, 10) zeigen zum einen die Bakterienlysate und zum anderen die über eine Ni-NTA-Säule aufgereinigten Eluate.

Die aufgereinigten Expressionsprodukte laufen in den folgenden Höhen:

rHev b 3 bei **22 kDa**, rHev b 8 bei **15 kDa**, rHev b 6 bei **21 kDa**

und stimmen somit gut mit den erwarteten Molekulargewichten überein (Tabelle 4).

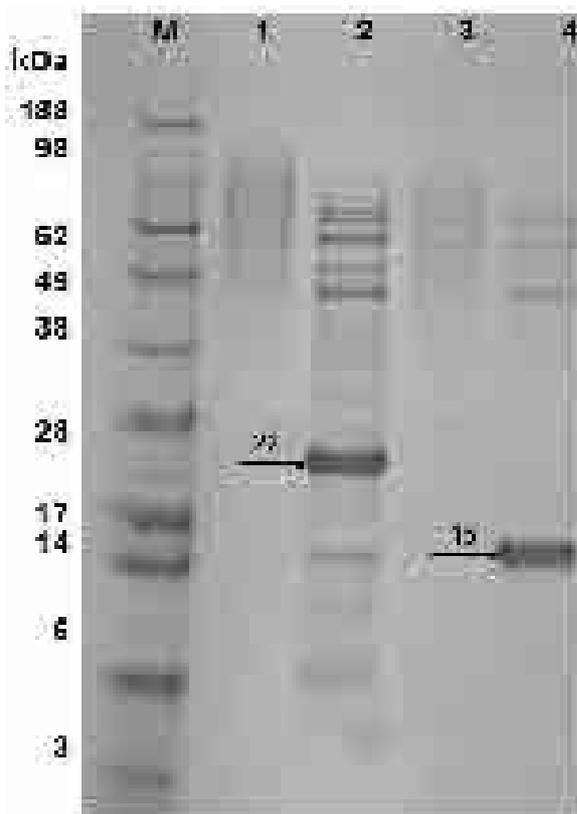


Abbildung 9: Proteinexpression von rHev b 3 und rHev b 8

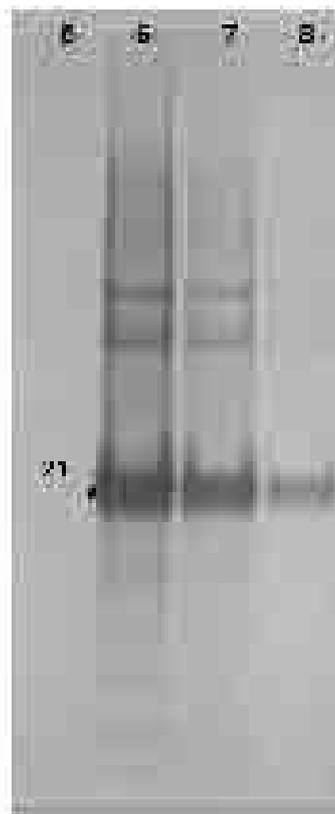


Abbildung 10: Proteinreinigung von rHev b 6

M: Protein-Marker

1: rHev b 3 vor der Induktion (0h)

2: rHev b 3 4h nach der Induktion

3: rHev b 8 vor der Induktion (0h)

4: rHev b 8 4h nach der Induktion

5: Überstand des Sedimentes, welches in Qiagen-Puffer B gelagert wurde

6: 1. Eluat der Ni-NTA-Proteinreinigung mit Qiagen Puffer B

7: 2. Eluat der Ni-NTA-Proteinreinigung mit Qiagen Puffer B

8: Sediment-Suspension der Ni-NTA-Proteinreinigung nach Eluierung mit Qiagen-Puffer B mit 500 mM Imidazol

4.2 IgE-Antikörper-Screening von rHev b 1, 3, 5, 6, 7, 8 mittels ELISA

Die gereinigten Lysate bzw. Eluate der rekombinanten Latex-Allergene exprimierenden Bakterien wurden im weiteren Verlauf der Arbeit für den ELISA direkt zur Beschichtung der Wells verwendet. Die Lysate der GPDH-exprimierende Bakterien dienten zur Hintergrund-Erfassung. Für die CAP-Analytik wurden die rekombinanten Latex-Allergene über Ni-NTA-Agarose gereinigt, biotinyliert und an Streptavidin-CAPs gekoppelt. Die Kollektive wurden mit den rekombinanten Allergenen mittels ELISA und CAP gescreent, wobei geklärt werden konnte, ob die neu identifizierten Latex-Allergene für die Patientengruppe Minor- oder Major-Allergene darstellen.

Exemplarisch werden im Folgenden die ELISA-Ergebnisse für rHev b 5 und rHev b 6 von zwei Patientenseren dargestellt. Es wurden Serumverdünnungsreihen zweier Patientenseren miteinander verglichen. Bei Patient 1 war für rHev b 5 und rHev b 6 in der Serumverdünnungsreihe eine Steigung von $> 0,1$ feststellbar, der Messwert betrug mehr als das Dreifache des Leerwerts und lag außerhalb des Streubereiches der Negativkontrollen, so dass von einem relevanten Antikörpern gegen rHev b 5 und rHev b 6 auszugehen ist. Bei Patient 2 ist keine Veränderung des Messwerts zu erkennen und somit das Ergebnis als negativ zu bewerten (Tab. 13).

Patient 1

Verdünnung	rHev b 5	rHev b 6	BH6
1:2	1,113	1,03	0,093
1:4	0,911	0,837	0,089
1:8	0,695	0,631	0,088
1:16	0,45	0,434	0,08

Patient 2

Verdünnung	rHev b 5	rHev b 6	BH6
1:2	0,092	0,089	0,082
1:4	0,084	0,089	0,079
1:8	0,081	0,88	0,081
1:16	0,084	0,094	0,082

Tabelle 13: ELISA-Ergebnisse von rHev b 5 und 6 unter Verwendung eines IgE-positiven (Patient 1) und eines IgE-negativen (Patient 2) Patienten auf rekombinante Latex-Allergene (Rohdaten).
BH 6 Hintergrunderfassung.

Die Untersuchungen des Gesamtkollektivs mit den rekombinanten Allergenen ergaben eine Sensibilisierung gegen rHev b 1 in 21% der insgesamt 120 Fälle, gegen rHev b 3 in 16 %, gegen rHev b 5 in 57%, gegen rHev b 6 in 58%, gegen rHev b 7 in 31% und gegen rHev b 8 in 15% (Tabelle 14). Aus diesen Sensibilisierungsdaten lässt sich erkennen, dass zu den Majorallergenen (>50%) rHev b 5 und rHev b 6 zählen. Intermediärallergene (20 - 50%) sind die beiden Allergene rHev b 1 und rHev b 7. rHev b 3 und rHev b 8 stellen Minorallergene (<20%) dar (Tab.14, Abb. 11).

Kollektiv	rHev b 1	rHev b 3	rHev b 5	rHev b 6	rHev b 7	rHev b 8
Gesamtkollektiv HCW (120)	21%	16%	57%	58%	31%	15%
davon:						
A=HCW (62)	26%	24%	60%	63%	35%	14%
B=HCW (43)	14%	7%	49%	47%	26%	19%
C=HCW (15)	20%	7%	67%	73%	27%	7%

Tabelle 14: Tabellarische Darstellung der Sensibilisierung gegen Latex-Allergene in den untersuchten Kollektiven und Teilkollektiven

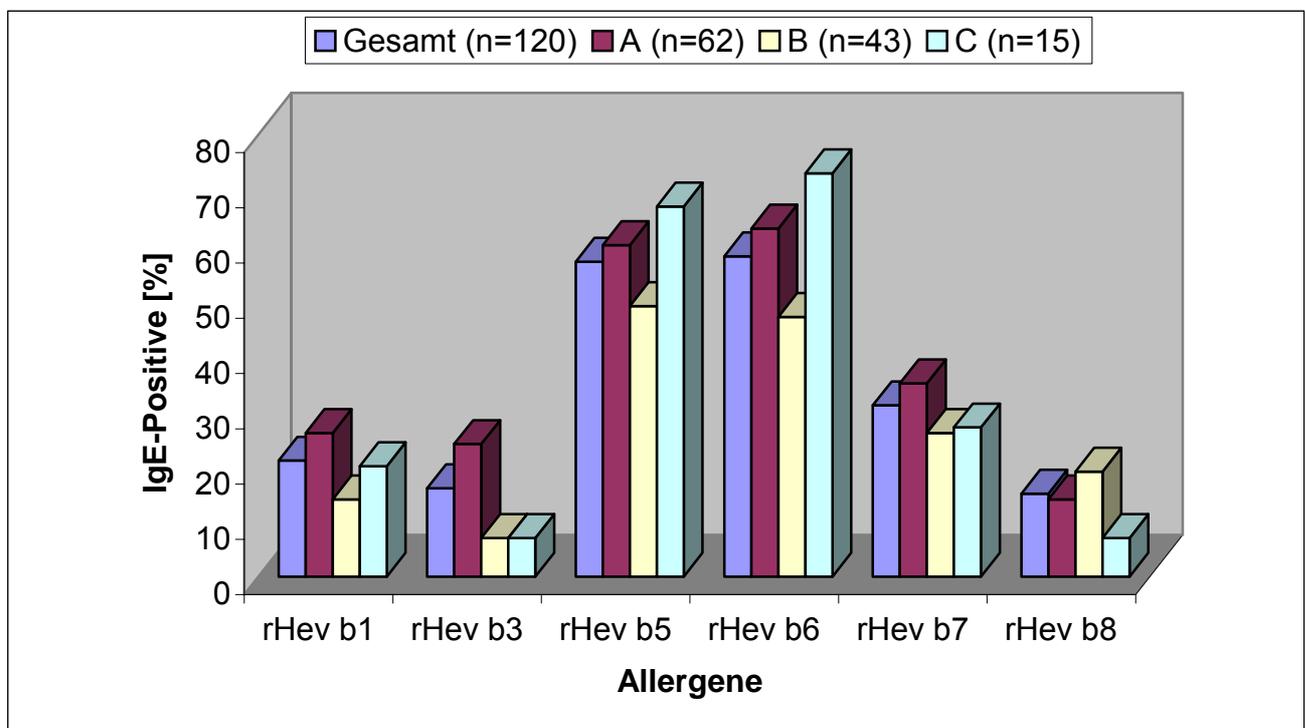


Abbildung 11: Sensibilisierung auf verschiedene Latex-Allergene im Gesamtkollektiv und aufgeschlüsselt in die drei Teilkollektive A-C (Angaben in %)

Das im Gesamtkollektiv als Major-Allergen identifizierte rHev b 6 sollte zusätzlich im CAP-System gescreent werden. Die Quantifizierung der IgE-Antikörper wurde bezüglich rHev b 6 ergänzend zum ELISA mittels CAP-System (Phadia, Freiburg) durchgeführt. Das rekombinant hergestellte Hev b 6 wurde an CAP-Schwämme als Festphase-Antigen gekoppelt und im UniCAP gemessen. Der Vergleich der ELISA- und CAP-Ergebnisse zeigte eine gute Übereinstimmung (Abb.12).

ELISA-Positive n=45

CAP-Positive n=46

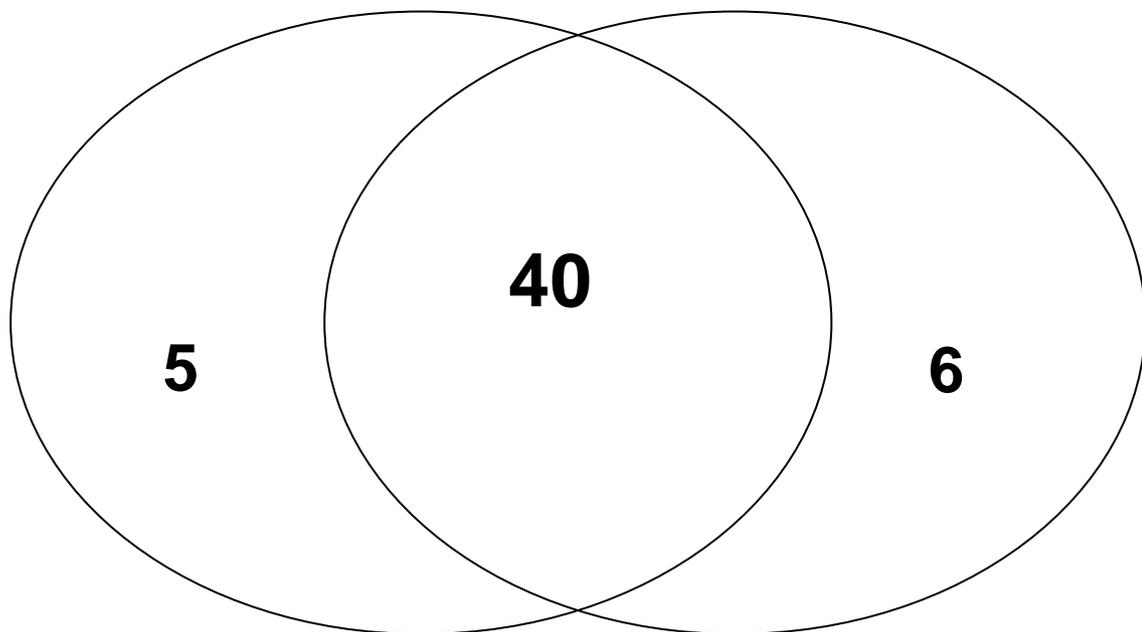


Abbildung 12: Vergleich der ELISA- und CAP-Ergebnisse anhand der rHev b 6-positiven Patienten

4.3 Klonierung, Expression und Reinigung von rHev b 13

Ein großer Anteil der vorgelegten Arbeit bestand in der Herstellung des rekombinanten Hev b 13, welches in seiner rekombinanten Form in der Literatur damals noch nicht beschrieben worden war.

Die Seren der 62 latexallergischen Beschäftigten im Gesundheitswesen (Kollektiv A) wurden mittels ELISA auf spezifische IgE-Antikörper gegen Latex getestet. Die folgenden Ergebnisse wurden mit den gleichen Methoden, die bei dem oben beschriebenen Teil der Arbeit angewendet wurden, erzielt. Im Einzelnen: Isolierung

der RNA aus Latex, Synthese der cDNA, PCR-Amplifikation der allergencodierenden cDNA, Klonierung, Sequenzierung, bakterielle Expression und Reinigung des rekombinanten Allergens (rHev b 13).

Neben dem full length (aa27-391) wurden die zwei Fragmente pQE-Hev b 13 (aa1-180) und pET-Hev b 13 (aa181-391) hergestellt um testen zu können, ob die allergenen Epitope vorwiegend in einem bestimmten Molekülabschnitt zu finden sind.

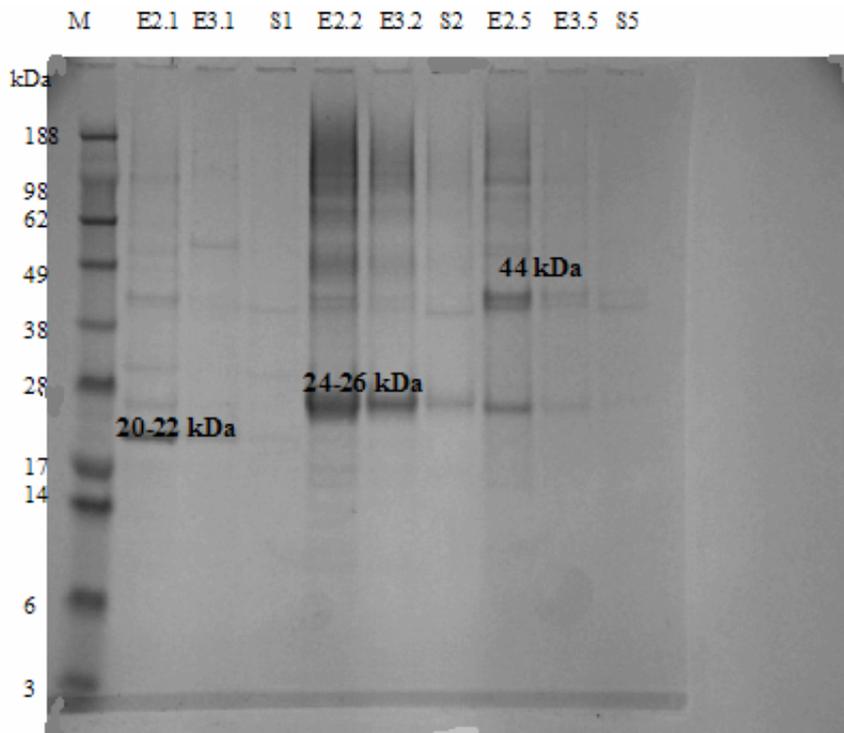


Abbildung 13: Proteinexpression von rHev b 13 (der zwei Fragmente und des vollständigen Proteins)

M: Protein-Marker

E2: 1. Eluat der Ni-NTA-Proteinreinigung mit Qiagen-Puffer B/ Imidazol

E3: 2. Eluat der Ni-NTA-Proteinreinigung mit Qiagen-Puffer B/ Imidazol

S: Sediment der Ni-NTA-Proteinreinigung

1: pQEb13 (aa 1-180) (1.Fragment)

2: pETb13 (aa 181-397) (2. Fragment)

5:pETb13 (aa 27-391) (full-length)

Da die Fragmente des rHev b 13 und das „full-lenght“-Protein in etwa der erwarteten Größen entsprachen, ist davon auszugehen, dass die entsprechenden Proteine exprimiert wurden (Tab. 15).

Hev b 13	Erwartung	Beobachtung
pQEb13 (aa 1-180)	19,8 kDa	20-22 kDa
pETb13 (aa 181-397)	23,76 kDa	24-26 kDa
pETb13 (aa 27-391)	40,04 kDa	44 kDa

Tabelle 15: Erwartete und beobachtete Größen der zwei rHev b 13-Fragmente sowie des rHev b 13-full-length (aa entspricht etwa 0,11 kDa)

4.4 IgE-Antikörper-Screening des rekombinanten Latex-Allergens Hev b 13 mittels ELISA

In ersten Vorversuchen an 10 HCW-Patientenseren mit dem rekombinant hergestellten rHev b 13 wurden zwei Fragmente und das vollständige rekombinante (aa27-391) Protein verglichen. Eine Bindung konnte an das 2. Fragment und an das vollständige Protein festgestellt werden (Tab. 16).

Patientenseren										
Molekülabschnitte	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
rHev b 13 (aa1-180)	0,08	0,02	0,04	0,12	0,01	0,02	0,02	0,03	0,02	0,03
rHev b 13 (aa181-391)	0,45	0,16	0,16	0,56	0,15	0,15	0,16	0,24	0,23	0,17
rHev b 13 (aa27-391)	0,18	0,14	0,17	0,48	0,17	0,14	0,18	0,18	0,18	0,21

Tabelle 16: ELISA-Extinktionen (OD) der zwei rHev b 13-Fragmente und des rHev b 13-full-length von 10 HCW-Patientenseren

Die grau hinterlegten Extinktionswerte entsprechen positiven Befunden. Es ist daher anzunehmen, dass ein wesentliches, für die IgE-Antikörperbindung mit Hev b 13 verantwortliches Epitop in dem Bereich des zweiten Fragments liegt.

Um zu untersuchen, welche Rolle Hev b 13 im Rahmen der Latex-Allergie spielt, wurden in dem Kollektiv A (62 HCW) IgE-Antikörper gegen natives und rekombinantes Hev b 13 mittels ELISA bestimmt. Das native Hev b 13 wurde uns freundlicherweise vom Rubber Research Institute of Malaysia, Malaysian Rubber Board, MALAISIE zur Verfügung gestellt. Unter den 62 getesteten Seren wiesen 48 (78%) IgE-Antikörper gegen natives Hev b 13, hingegen nur 11 (18%) gegen das rekombinante Hev b 13 auf (Abb. 14, Abb. 15).

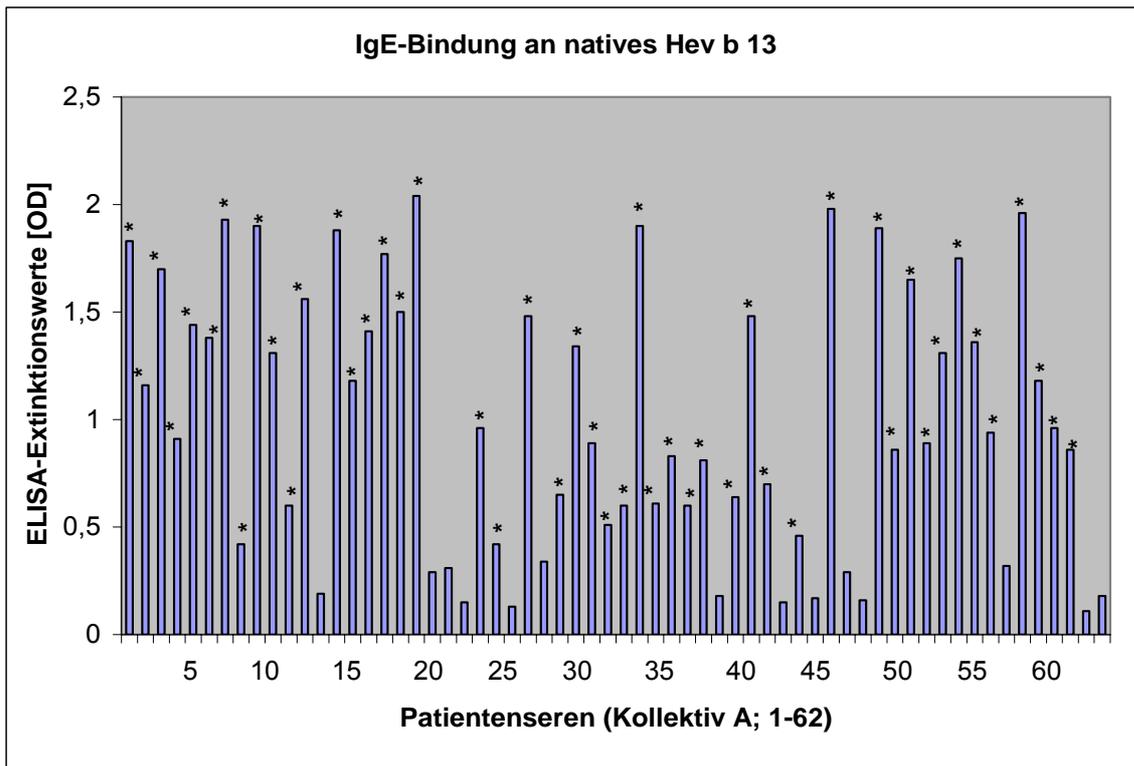


Abbildung 14: ELISA-Extinktionswerte auf natives Hev b 13 der 62 Patientenseren des Kollektivs A (48 wurden positiv, 14 negativ gemessen); mit * sind die 48 objektivierten Latex-Sensibilisierungen gekennzeichnet. Der Cut-off (mehr als das Dreifache des Hintergrunds und außerhalb des Steuerungsbereichs der Negativkontrolle) lag bei einer OD von 0,39.

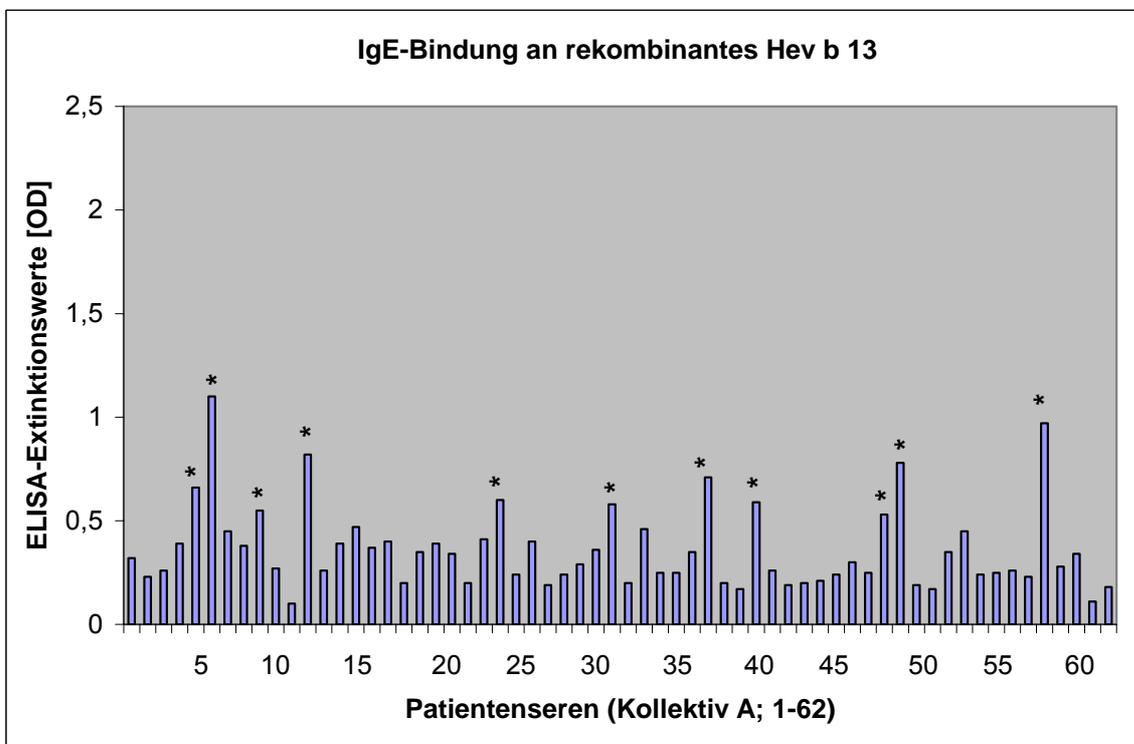


Abbildung 15: ELISA-Extinktionswerte auf rekombinantes Hev b 13 der 62 Patientenseren des Kollektivs A (11 wurden positiv, 51 negativ gemessen); mit * sind die 11 nachgewiesenen Sensibilisierungen gekennzeichnet. Der Cut-off (mehr als das Dreifache des Hintergrunds und außerhalb des Streubereichs der Negativkontrolle) lag bei einer OD von 0,504.

Folglich zeigte die serologische Untersuchung von 62 latexexponierten Beschäftigten, dass rekombinantes Hev b 13 ein deutlich geringeres allergenes Potential besitzt als die native Form (Abb. 16).

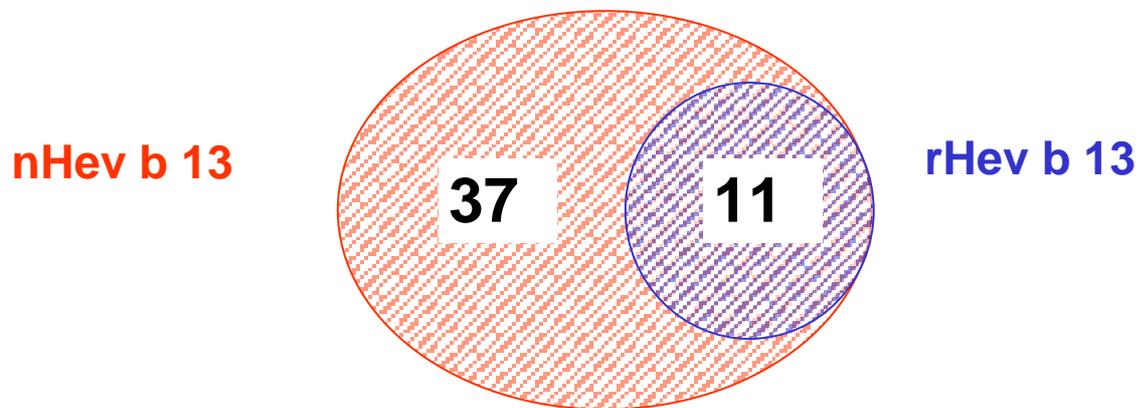


Abbildung 16: Vergleich der Allergenität des nativen und des rekombinanten Hev b 13 in einem Kollektiv latexexponierter HCW (n= 62)

4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der folgenden Tabelle werden alle in Rahmen dieser Doktorarbeit erzielten Ergebnisse bezüglich der Sensibilisierung gegen die verschiedenen Latex-Allergene dargestellt:

Patienten-nummer	rHev b	rHev b3	rHev b5	rHev b6	rHev b7	rHev b8	rHev b13	nHev b13
1		+		+			+	+
2			+	+	+			+
3	+							+
4					+			
5								+
6	+	+		+				+
7	+	+	+	+				+
8	+	+		+				+
9			+				+	+
10			+	+				
11	+			+				+
12								

Patienten- nummer	rHev b	rHev b3	rHev b5	rHev b6	rHev b7	rHev b8	rHev b13	nHev b13
13		+		+				+
14	+	+	+	+	+	+		+
15		+	+		+			+
16			+	+			+	+
17								+
18	+		+	+		+		+
19			+	+	+	+		+
20								+
21	+	+	+		+			+
22			+	+	+		+	+
23			+	+	+			+
24	+		+	+				+
25			+		+			+
26			+					+
27	+	+	+	+	+	+		+
28								+
29								+
30			+	+	+			+
31			+	+			+	+
32			+	+	+			
33			+	+				
34			+	+				+
35		+	+	+	+	+		+
36		+	+	+				+
37			+	+				+
38		+					+	+
39						+		
40								
41				+	+			
42			+	+	+			+
43			+				+	+
44	+			+	+			+
45		+	+					
46			+	+	+			+
47	+		+	+	+		+	+
48								
49			+	+			+	+
50	+		+	+				+
51			+	+	+			+
52	+					+		
53			+	+	+			+
54	+	+		+				+
55							+	+
56								
57			+					
58	+	+		+		+		+
59			+	+	+	+		+

Patienten- nummer	rHev b	rHev b3	rHev b5	rHev b6	rHev b7	rHev b8	rHev b13	nHev b13
60			+		+			
61			+	+				+
62							+	+
63						+	ND	ND
64							ND	ND
65			+	+	+		ND	ND
66				+			ND	ND
67				+			ND	ND
68			+	+			ND	ND
69							ND	ND
70			+	+			ND	ND
71			+	+			ND	ND
72	+		+	+			ND	ND
73				+			ND	ND
74			+				ND	ND
75							ND	ND
76							ND	ND
77			+	+	+		ND	ND
78	+			+			ND	ND
79		+	+	+			ND	ND
80			+				ND	ND
81		+	+	+			ND	ND
82						+	ND	ND
83				+	+	+	ND	ND
84	+						ND	ND
85			+			+	ND	ND
86		+				+	ND	ND
87							ND	ND
88	+		+	+		+	ND	ND
89			+	+	+		ND	ND
90			+				ND	ND
91							ND	ND
92	+				+	+	ND	ND
93			+	+			ND	ND
94				+			ND	ND
95			+	+			ND	ND
96			+				ND	ND
97			+				ND	ND
98	+	+	+	+	+		ND	ND
99			+	+	+		ND	ND
100					+		ND	ND
101			+				ND	ND
102			+				ND	ND
103	+		+	+	+	+	ND	ND
104					+		ND	ND
105			+	+	+		ND	ND
106			+	+	+		ND	ND

Patienten- nummer	rHev b	rHev b3	rHev b5	rHev b6	rHev b7	rHev b8	rHev b13	nHev b13
107							ND	ND
108				+			ND	ND
109						+	ND	ND
110				+			ND	ND
111	+						ND	ND
112			+	+	+		ND	ND
113			+				ND	ND
114			+	+			ND	ND
115	+		+	+	+		ND	ND
116			+	+	+		ND	ND
117			+	+			ND	ND
118				+			ND	ND
119							ND	ND
120			+	+			ND	ND

Tabelle 17: Zusammenstellung unserer ELISA-Ergebnisse auf die getesteten Allergene (rHev b 1, 3, 5, 6, 7, 8, 13 und natives Hev b 13)
 + = Nachweis einer Sensibilisierung, leeres Feld =kein Nachweis einer Sensibilisierung,
 ND-nicht untersucht

Die Einzelallergene zeigten in folgender Häufigkeit IgE-Antikörperbindungen:

rHev b 1: 25 von 120 (21%); **rHev b 3:** 19 von 120 (16%); **rHev b 5:** 69 von 120 (57%); **rHev b 6:** 70 von 120 (58%); **rHev b 7:** 37 von 120 (31%); **rHev b 8:** 18 von 120 (15%); **rHev b 13:** 11 von 62 (18%); **nHev b 13:** 48 von 62 (78%).

Demzufolge stellen rHev b 5, rHev b 6, und nHev b 13 für HCW Majorallergene dar.

5. DISKUSSION

Naturlatex ist aufgrund seiner enormen gesundheitlichen und volkswirtschaftlichen Bedeutung eine der meist untersuchten Allergenquellen geworden. Kreuzreaktionen zu Nahrungsmitteln (Naturlatex-Frucht-Syndrom) und anderen Pflanzen erweiterten den Problemkreis. Daher wurde weltweit angestrebt, die Ursachen und Auslöser zu identifizieren, eine entsprechende Diagnostik zu optimieren sowie präventive Maßnahmen zu etablieren.

Die Diagnostik IgE-vermittelter Latex-Allergien basiert in der Praxis auf dem klinischen Bild und der Hauttestung. Der Pricktest mit kommerziell erhältlichen Extrakten ist hierfür die gebräuchlichste Technik. Trotz der hohen Sensitivität bei Verwendung von Naturlatexextrakten sind Hauttests nur begrenzt reproduzierbar. Dies liegt daran, dass es schwierig ist, aus den natürlichen Ausgangsmaterialien gleichermaßen standardisierte Extrakte herzustellen.

Die Qualität eines Allergenextraktes, d.h. seine Zusammensetzung, allergene Potenz und Stabilität, wird von zahlreichen Faktoren beeinflusst, angefangen von der Qualität des Rohmaterials über die Art des Extraktionsverfahrens, den Protease-Anteil, Kontaminationen mit artfremden Proteinen bis hin zu den Lagerungsbedingungen. Diese Faktoren beeinflussen Testergebnisse. Ziel vieler Bemühungen ist es deshalb, Allergenextrakte herzustellen, die von Hersteller zu Hersteller sowie Charge zu Charge vergleichbar sind und eine hohe Reliabilität aufweisen. Der rasche Fortschritt auf den Gebieten der Proteinanalytik und der Klonierung rekombinanter Allergene eröffnet neue Möglichkeiten bei der Herstellung qualitativ verbesserter und standardisierter Allergen-Präparationen. Rekombinante Allergene, die in verschiedenen Systemen wie Bakterien oder Hefen hergestellt werden, zeigen oft allergene Eigenschaften, die mit den biochemisch gewonnenen natürlichen Allergenen vergleichbar sind. Rekombinante Allergene bieten den Vorteil, dass die entsprechenden Einzelallergen identisch sind, sie in hochgereinigter Form vorliegen und die Allergenmengen genauestens definiert werden können. Somit sollten – sofern der Einsatz rekombinanter Allergene möglich ist – Probleme aufgrund möglicher Kontaminierungen der Extrakte, der Abhängigkeit von Extraktionsmethoden demzufolge der Vergangenheit angehören.

In den letzten Jahren wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen 13 Latex-Allergene identifiziert, auf molekularer Ebene charakterisiert und zum Teil rekombinant hergestellt. Im Folgenden werden der derzeitige Kenntnisstand bezüglich der identifizierten Latex-Allergene sowie aktuelle Ergebnisse aus eigener Forschung diskutiert.

Wie in Tabelle 18 dargestellt, wurden *Spina-bifida*-Patienten und HCW mit nativen Latex-Allergenen untersucht. Bei *Spina-bifida*-Patienten stellten sich Hev b 1, Hev b 3 und Hev b 5 als Majorallergene dar. Hingegen wurden bei den HCW Hev b 2, Hev b 5, Hev b 6 und Hev b 13 eindeutig als Majorallergene nachgewiesen worden (Tab. 18).

Kollektiv (G n)	Methoden	Literatur- stelle	Anteile der IgE-Positiven in % (natives Hev b)												
			b1	b2	b3	b4	b5	b6	b7	b8	b9	b10	b11	b12	b13
SB (9)	CAP	49													
SB (6)	ELISA	14													
SB (62)	ELISA	14													
SB (70)	EAST	42						29							
SB (75)	EAST	42	81												
SB (57)	RAST	42					56								
SB (17)	ELISA	42													
SB (58)	CAP	59	100												
SB (149)	EAST	18	81												
SB (17)	CAP	57													
SB (38)	IMMBLO	76	82		79				39,5						
HCW (40)	CAP	49													
HCW (62)	SPT,CAP	10	50	81	50	50		97	81						60
HCW (39)	ELISA	14													
HCW (103)	ELISA	14													
HCW (142)	EAST	42						74							
HCW (178)	EAST	42	42												
HCW (13)	RAST	42					93								
HCW (5)	ELISA	42													
HCW (71)	CAP	59													
HCW (105)	EAST	18	52												
HCW (25)	CAP	57													
HCW (36)	IMMBLO	70							11						
HCW (52)	CAP	46													66

Tabelle 18: Tabellarische Übersicht der bisher in klinischen Untersuchungen überprüften nativen Latex-Allergene
 SB-*Spina bifida*-Patienten
 HCW-Beschäftigte im Gesundheitswesen

Wie der Tabelle 19 zu entnehmen ist, wurden *Spina-bifida*-Patienten und HCW bereits mit einigen rekombinanten Latex-Allergenen untersucht. Für die *Spina-bifida*-Kollektive konnten Hev b 1 und 3 als Majorallergene bestätigt werden, Hev b 5 und 6 stellten sich auch in der rekombinanten Form für die HCW als Majorallergene dar.

Kollektiv (G n)	Methoden	Literatur- stelle	Anteile der IgE-Positiven in % (rHev b)												
			b1	b2	b3	b4	b5	b6	b7	b8	b9	b10	b11	b12	b13
SB (9)	CAP	49	100		78		33	44		0		0			
SB (6)	ELISA	14	67												
SB (62)	ELISA	14	81												
SB (70)	EAST	42													
SB (75)	EAST	42													
SB (57)	RAST	42													
SB (17)	ELISA	42			77										
SB (58)	CAP	59	93												
SB (140)	EAST	18													
SB (17)	CAP	57								12					
HCW (38)	IMMBLOT	76							40						
HCW (40)	CAP	49	23		13		68	75		10		2,5			
HCW (62)	SPT,CAP	10													
HCW (39)	ELISA	14	10												
HCW (103)	ELISA	14	50												
HCW (142)	EAST	42													
HCW (178)	EAST	42													
HCW (13)	RAST	42													
HCW (5)	ELISA	42			20										
HCW (71)	CAP	59	23												
HCW (105)	EAST	18													
HCW (25)	CAP	57								20					
HCW (36)	IMMBLOT	70							11						
HCW (52)	CAP	46	13		6		68	53		10	1	1	18		

Tabelle19: Tabellarische Übersicht der bisher in klinischen Untersuchungen überprüften rekombinanten Latex-Allergene
 SB-*Spina bifida*-Patienten
 HCW-Beschäftigte im Gesundheitswesen

Czuppon *et al.* konnten 1993 aus den Latexhandschuhen den „rubber elongation factor“ (REF) als erstes Naturlatexallergen identifizieren und gemäß der internationalen Allergenomenklatur als **Hev b 1** einführen. Hev b 1 mit einem Molekulargewicht von 14,6 kDa ist ein partikelgebundenes Protein, das an der Gummisynthese wesentlich beteiligt ist. Darüber hinaus stellt Hev b 1 ein naturlatextypisches Protein dar, da es mit keinem bekannten Protein aus anderen Pflanzenarten homolog ist. Die Bedeutung von Hev b 1 als Allergen konnten

zahlreiche Untersuchungen belegen. Darin wurde gezeigt, dass Hev b 1 nicht nur ein allergenes Potenzial für Patienten mit *Spina bifida* besitzt (je nach Studie haben 67% bis 81% der *Spina bifida*-Patienten Hev b 1 spezifisches IgE), sondern auch bei Beschäftigten im Gesundheitswesen Bedeutung hat. Für *Spina bifida*-Patienten stellt Hev b 1 ein Hauptallergen (>50%) dar, während es für HCW nur ein intermediäres (20-50%) Allergen ist. In Hev b 1 konnten sowohl B- als auch T-Zell-Epitope identifiziert werden. Meine Ergebnisse konnten ebenfalls zeigen, dass Hev b 1 für die HCWs ein Minorallergen darstellt, da von den 120 Patienten hierauf lediglich 21% sensibilisiert waren.

Hev b 3 (23 kDa) gehört ebenso wie Hev b 1 zu den partikelgebundenen Proteinen. Seine sensibilisierende Wirkung wurde erstmal von Alenius *et al.* (1993) beschrieben. Es wird ebenso wie Hev b 1 vornehmlich von naturlatexsensibilisierten *Spina bifida*-Patienten erkannt (67-83%). Dies beruht auf homologen Aminosäureabschnitten in Hev b 1 und Hev b 3. Nur in einzelnen Fällen besitzen sensibilisierte Personen aus dem Gesundheitsbereich spezifische IgE-Antikörper, die gegen Hev b 3 gerichtet sind, so dass Hev b 3 für die HCW ein Minorallergen (<20%) ist. In dieser Studie waren von 120 Patienten 19 sensibilisiert (15%).

Hev b 7 ist ein Naturlatexallergen, das Sequenzhomologien zu den Patatinen aus Nachtschattengewächsen (*Solanaceae*) aufweist, zu denen u.a. Tomate und Kartoffel gehören. Hev b 7 ist ein Minorallergen. Dies stimmt mit den eigenen Ergebnissen überein: 37 von 120 HCW (31%) waren sensibilisiert. Die Ursache der Kreuzreaktivität mit Naturlatex, Kartoffel und Tomate dürfte auf die Strukturverwandschaft mit Patatin zurückzuführen. Hev b 7 und Patatin gehören zu einer Multigenfamilie und werden in Isoformen exprimiert. Hev b 7-Isoformen kommen sowohl im C-Serum als auch in der B („bottom“)-Fraktion der Naturlatexmilch vor. Einige von ihnen sind auch posttranslational modifiziert (Kostyal *et al.* 1998, Schmidt *et al.* 2002, Seppala *et al.* 2000).

Profilin (Actinbindendes Protein) konnte ebenfalls als eine IgE-bindende Komponente im Latex von *Hevea brasiliensis* identifiziert werden (**Hev b 8**). Obwohl Profiline in sehr vielen Pflanzen als kreuzreagierende Allergene auftreten, scheinen sie nur von untergeordneter Bedeutung für die Naturlatex-Frucht-Kreuzreaktivität zu sein

(kreuzreaktive Determinante zwischen Banane und Naturlatex bzw. *Ambrosia artemisiifolia* und Naturlatex) (Vallier *et al.* 1995). Für Beschäftigte im Gesundheitswesen stellen sie ein Minorallergen dar (Raulf-Heimsoth *et al.* 2001). In meinen Untersuchungen waren 18 von 120 Patienten sensibilisiert (15%). Bei den *Spina bifida*-Patienten spielen sie keine Rolle (*Spina bifida* 0%, HCW 10% Raulf-Heimsoth *et al.* 2001).

Hev b 5 wurde unabhängig von zwei Arbeitsgruppen isoliert und umfassend charakterisiert (Akasawa *et al.* 1996, Slater *et al.* 1996). Es ist ein saures (pH ca. 3,5), prolinreiches Protein mit 46% Homologie zu einem sauren Protein aus der Kiwifrucht (pKIWI 501). Das Protein konnte als Fusionsprotein rekombinant hergestellt werden. In serologischen IgE-Tests reagierten 92% der erwachsenen Naturlatexallergiker aus dem Gesundheitswesen und 56% der *Spina bifida*-Patienten mit dem rekombinanten Hev b 5 (Slater *et al.* 1996). Mehrere Arbeitsgruppen hatten dieses Allergen getestet und belegt, dass mehr als 80% der getesteten Latexallergiker aus dem Gesundheitswesen ($n > 50$) eine hohe Konzentration an Hev b 5-spezifischem IgE zeigten. Es stellt somit ein Naturlatexhauptallergen dar. Unsere Ergebnisse bestätigten dies. In dem aus 120 bestehenden HCW-Kollektiv waren 69 Patienten (57%) gegen rHev b 5 sensibilisiert.

Ein ebenfalls wichtiges Allergen ist **Hev b 6**. Das Vorläuferprotein Prohevein (Hev b 6.01) wird posttranslational in eine N-terminale, Hevein genannte (4,7 kDa; Hev b 6.02), und in eine C-terminale (14 kDa; Hev b 6.03) Untereinheit gespalten. Sequenzvergleiche zeigen für das Hevein Ähnlichkeiten zu bekannten Pflanzen-Proteinen (Broekaert *et al.* 1990), wobei homologe Strukturen einerseits zu Lektinen und andererseits zu einigen Endochitinasen vorliegen. Das häufige Vorkommen Hev-b-6.01-spezifischer IgE-Antikörper in Seren von naturlatexsensibilisierten Personen deutet darauf hin, dass Prohevein ein Hauptallergen darstellt, wobei Hevein die dominierenden IgE-Epitope enthält (Allenius *et al.* 1995, Chen *et al.* 1997 und 1998). Die Hevein-Domäne scheint eine wichtige Bedeutung für die Kreuzreaktivität mit Naturlatex und Nahrungsmittel (Früchten), wie beispielsweise Avocado (Chen *et al.* 1998) und Banane (Mikkola *et al.* 1998), zu haben. Wie Untersuchungen von Rihs *et al.* (2002) zeigten, ist die Überempfindlichkeit auf Hev b 6.02 unter den Naturallergikern aus dem Gesundheitswesen signifikant mit dem HLA-Haplotyp

(DR4) assoziiert. Im Gegensatz zu der Dominanz der IgE-Bindung an Hevein scheint die Prohevein-C-Domäne (Hev b 6.03) – in Abhängigkeit von der Untersuchungsmethode – nur für 15% bzw. 21% der Prohevein-Sensibilisierten eine IgE-bindende Kapazität zu besitzen. In 60-75% der HCW-Seren ließen sich spezifische IgE-Antikörper gegen Hev b 6 nachweisen (Rozynek *et al.* 2001, Raulf-Heimsoth *et al.* 2001). In meiner Studie wiesen 70 der 120 HCW (58%) Hev b 6-spezifische IgE-Antikörper auf. Für *Spina bifida*-Patienten gehört Hev b 6 zu den Minorallergenen (in 44% konnte rHev b 6-spezifisches IgE bestimmt werden) (Raulf-Heimsoth *et al.* 2001).

Das neu entdeckte **Hev b 13** stellt eine Esterase aus dem B-Serum dar, die ein homologes Protein zum frühen nodusspezifischen Protein der Leguminosen ist. Testungen mit nativem Hev b 13 wurden von Kurup *et al.* (2005) und Arif *et al.* (2004) durchgeführt. Bei Kurup wurde eine Kombination aller Allergene (rHev b 1 bis rHev b 12, nHev b 13) sowohl im ELISA als auch im ImmunoCAP eingesetzt, in einem Kollektiv von 36 HCWs waren 88,9% gegen Hev b 13 sensibilisiert Arif *et al.* zeigte 78% von 78 HCWs im ELISA Sensibilisierung auf das native Hev b 13. In einem Kollektiv von 68 HCW stellten Raulf-Heimsoth *et al.* (2004) im ImmunoCAP in 66% positive Befunde auf das native Hev b 13 dar. Das rekombinant hergestellte Hev b 13 wies in keinem Fall eine IgE-Bindung auf. In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, das rekombinante Hev b 13 herzustellen und seine Allergenität im Vergleich zu nativem Hev b 13 in einem gut definierten Kollektiv von 62 Beschäftigten im Gesundheitswesen mit Verdacht auf eine Latex-Allergie zu screenen. Unter den 62 getesteten Seren wiesen 48 (78%) IgE-Antikörper gegen natives Hev b 13, hingegen nur 11 (18%) gegen das rekombinante Hev b 13 auf. Somit konnte bestätigt werden, dass Hev b 13 ein Majorallergen darstellt. In seiner rekombinanten Form aus *E. coli* hat es hingegen nur eine geringere Allergenität.

Es ist bekannt, dass etwa 30-40% der Latexallergiker spezifische IgE-Antikörper gegen kreuzreagierende Nahrungsmittel aufweisen (Nатурal latex-Frucht-Syndrom). Ursache hierfür sind kreuzreagierende IgE-Antikörper, die mit homolog strukturierten Epitopen auf unterschiedliche Allergene reagieren. Eine solche Kreuzreaktivität konnte mit Natur latex und Avocado, Banane, Pfirsich, Papaya, Mango, Tomate, Paprika, Kartoffel, Kiwi, Esskastanie und zahlreichen anderen Nahrungsmitteln

beobachtet werden. Klinisch relevant ist allerdings nur ein Teil dieser assoziierten Sensibilisierungen. Der Pflanzenstammbaum in der Abbildung 17 zeigt, dass eine taxonomische Verwandtschaft zwischen *Hevea brasiliensis* und den genannten Pflanzen nicht vorliegt. Allergene Proteine, die für eine weit verbreitete Kreuzreaktivität verantwortlich gemacht werden können, werden als Panallergene bezeichnet (Raulf-Heimsoth *et al.* 2003). Zu diesen Panallergenen gehören das Latexprofilin (Hev b 8), eine Klasse-I-Endochitinase mit Hevein-Domänen (Hev b 11 bzw. Hev b 6.02 selbst), Hev b 2 (z.B. homolog zu Pr2 aus der Banane), Hev b 7 (Homologie zum Majorallergen Kartoffelapatatin Sol t 1) und das Lipidtransferprotein (LTP, Hev b 12). Dagegen besitzen die NRL-Allergene Hev b 9 (Enolase) und Hev b 10 (Mangansuperoxiddismutase) Homologien zu entsprechenden Schimmelpilzproteinen und könnten für Kreuzreaktivitäten verantwortlich sein.

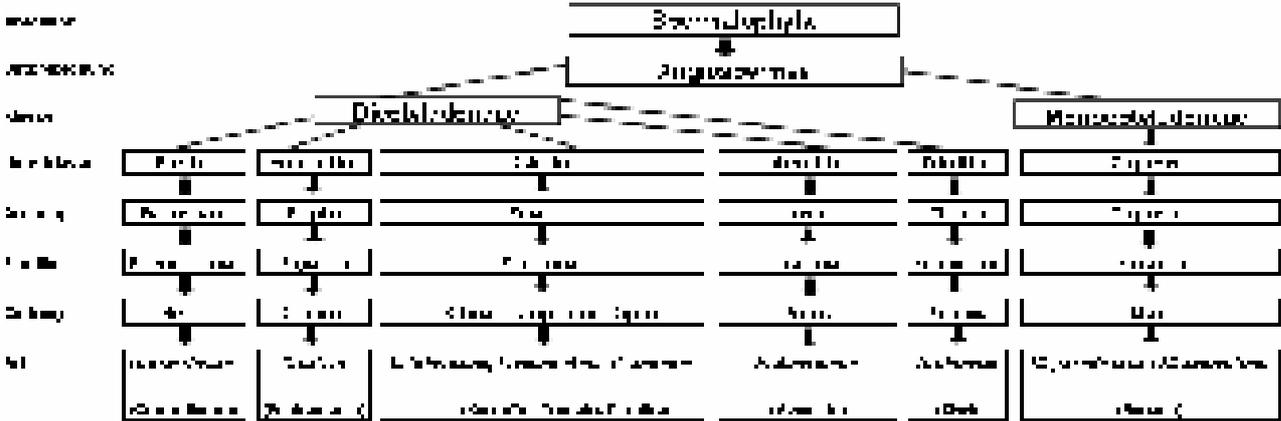


Abbildung 17: Pflanzenstammbaum von *Hevea brasiliensis* und eine Auswahl der Nahrungsmittel mit kreuzreagierenden Eigenschaften

Zusammenfassend sind Hev b 5, Hev b 6 und Hev b 13 Majorallergene für die Beschäftigten im Gesundheitswesen und können als Marker für die Ermittlung des allergisierenden Potentials von Latexhandschuhen dienen, daher sollten diese Allergene in ausreichender Konzentration in diagnostisch eingesetzten Allergenextrakten vorhanden sein.

Mehr als ein Dutzend der rekombinant hergestellten Latex-Allergene könnten in der Diagnostik und ggf. auch in der Therapie Verwendung finden, da sie keine für die

IgE-Reaktivität bedeutenden posttranslationalen Modifikationen aufweisen (Raulf-Heimsoth *et al.* 2005).

Neben dem rekombinanten rHev b 2 stellt rHev b 13 eine Ausnahme dar, wie die hier durchgeführte Studie zeigt. In dem Kollektiv von 62 HCW besitzt das rekombinant hergestellte Hev b 13 im Vergleich zur nativen Form ein stark eingeschränktes IgE-bindendes Potential (18% versus 78%). Es ist anzunehmen, dass die Allergenität von Hev b 13 auf der in *E. coli* fehlenden posttranslationalen Modifikation und der damit verbundenen dreidimensionalen Strukturabweichung beruht. Offensichtlich ist die Epitopwirkung in diesem Latexallergen (wie auch für Hev b 2 bekannt) von der durch die Glykolisierung modifizierten Raumstruktur des Proteins abhängig. Ein Einsatz von rHev b 13 aus *E. coli* ist für die Diagnostik daher nicht sinnvoll (Bittner *et al.* 2006). Insgesamt ist über die Glykosylierungsstruktur für die Latex-Allergie bislang wenig bekannt geworden. Für die Zukunft wäre denkbar, Latex-Allergene, die auf die posttranslationalen Modifikationen angewiesen sind, rekombinant in Systemen herzustellen, die dies gewährleisten, zu denken wäre an eine Expression in Tabakpflanzen.

Die bekannten NRL-Allergene zeichnen sich durch ein unterschiedliches Sensibilisierungspotenzial in den einzelnen Expositionsgruppen aus. Während die beiden partikelgebundenen NRL-Allergene Hev b 1 und Hev b 3 ein ausgeprägtes allergenes Potential bei *Spina bifida*-Patienten aufweisen, spielen sie bei latexallergischen Beschäftigten aus dem Gesundheitswesen nur eine untergeordnete Rolle. Zu den wichtigsten Allergenen für latexallergische Patienten aus dem Gesundheitswesen gehören Hev b 5 und das Hev b 6.01 (Prohevein) bzw. dessen N-terminale Domäne Hevein (Hev b 6.02) sowie die beiden glykolisierten Allergene Hev b 2 und Hev b 13.

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass es sinnvoll ist, einzelne Latex-Allergene sowohl in rekombinanter als auch in nativer Form einzusetzen, um individuelle Sensibilisierungsprofile zu bestimmen. Anhand unseres großen Kollektivs von 120 Beschäftigten aus dem Gesundheitswesen konnten die Ergebnisse aus früheren Studien bestätigt werden. Die Verbesserung der diagnostischen Werkzeuge ist sowohl für die Prävention als auch für die Diagnostik bedeutsam und erfordert einerseits eine fundierte Kenntnis des Allergenspektrums und andererseits die

Sicherstellung, dass alle relevanten Allergene sowohl in den Hauttestextrakten als auch in den Allergenmischungen zur serologischen Diagnostik vorhanden sind. Dies kann nur mit Hilfe rekombinanter Latex-Allergene ermittelt werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In Deutschland werden derzeit pro Jahr ca. 200 Anzeigen wegen des Verdachts auf eine latexbedingte Berufskrankheit der Haut oder der Atemwege erstattet. Die Hauttestdiagnostik erfolgt mit nativen Extrakten der Latex-Milch. Für die serologische Diagnostik, z.B. mittels CAP, werden bisher natürliche Allergene – z.T. bereits ergänzt durch rekombinantes Hev b 5 – eingesetzt. Schwankungen hinsichtlich der Qualität und der Quantität der einzelnen Allergene in den Extrakten und der wenig standardisierten Extraktionsverfahren können zu falsch positiven oder falsch negativen Befunden führen. Ziel dieser Studie war daher die Etablierung eines sensitiven und spezifischen, auf rekombinanten Latex-Allergenen basierenden Assays, der eine leichte Standardisierbarkeit und eine Unabhängigkeit von den Naturextrakten ermöglicht.

In der vorliegenden Arbeit haben wir aus Blättern des Gummibaums *Hevea brasiliensis* die Gesamt-RNA isoliert. Mittels spezifischer Primer wurde anschließend cDNA bekannter Latex-Allergene über RT-PCR amplifiziert und in den bakteriellen Expressionsvektor pQE30UA kloniert. Die Überprüfung der Identität der Inserts erfolgte anhand von Sequenzierungen. Die Lysate der rekombinanten Latex-Allergen-exprimierenden Bakterien wurden im ELISA direkt zur Beschichtung der ELISA-Platten eingesetzt. Lysate der GPDH-exprimierenden Bakterien dienen zur Hintergrunduntersuchung. Für die CAP-Analytik wurde das rekombinante Latex-Allergen Hev b 6 über Ni-NTA-Agarose gereinigt, biotinyliert und an Streptavidin-CAPs gekoppelt.

Das vorhandene, gut definierte Kollektiv aus 120 Beschäftigten im Gesundheitswesen mit anamnestischen Hinweisen auf eine Latex-Allergie wurde mittels ELISA und teilweise mittels CAP-Analytik auf spezifische Antikörper (IgE) gegen Latex untersucht. Die Ergebnisse dieser Studie mit den rekombinanten Allergenen bestätigten in verschiedenen Teilkollektiven aus dem Gesundheitswesen im Wesentlichen die bisherigen Ergebnisse in der Literatur, die überwiegend mit nativen Latex-Allergenen durchgeführt wurden.

Als Minor-Allergene (< 50% der Patienten sensibilisiert) wurden rHev b 1, 3, 7 und 8 identifiziert. Dagegen stellen rHev b 5 und 6 Majorallergene dar. Auch das kürzlich bekannt gewordene Hev b 13 konnte in seiner nativen Form als Major-Allergen

identifiziert werden. Im Gegensatz hierzu zeigte das rekombinante Hev b 13 eine wesentlich geringere Allergenität.

Der Einsatz rekombinanter Allergene als Basis für eine verbesserte Diagnostik der Latex-Allergie vereinfacht die Standardisierung, gewährleistet Unabhängigkeit von den Naturextrakten und macht komplizierte Reinigungsverfahren hinfällig. Rekombinante Allergene ermöglichen darüber hinaus die Durchführung einer am individuellen Sensibilisierungsmuster orientierten spezifischen Immuntherapie. Voraussetzung für derartige Anwendungen ist jedoch, dass die rekombinante Form der Allergene sich immunologisch gleichartig wie die native Form verhält und auch die IgE-Antikörper der Latexallergiker binde. Dies lies sich in den vorliegenden Untersuchungen für Hev b 1, 3, 5, 6, 7 und 8, nicht jedoch für Hev b 13 belegen.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Akasawa A, Hsieh LS, Martin BM, Liu T, Lin Y (1997)

A novel acidic allergen, Hev b 5, in latex. Purification, cloning and characterization. J Biol Chem 1996; 271: 389-93

2. Akashi K, Akashi M, Narita M, Suda T, Nomura I, Ohya Y, Akasawa A (2004)

Prevalence of latex-specific IgE antibody among the children with/without allergic disease in Japan. J Allerg Clinical Immunology 2004 Feb, 76 (Abstract 210)

3. Alenius H, Kalkkinen N, Lukka M, Reunala T, Turjanmaa K, Mäkinen-Kiljunen S, Yips E, Palosuo T (1995)

Prohevein from the rubber tree (*Hevea brasiliensis*) is a major latex allergen. Clin Exp Allergy 1995; 24: 659-665

4. Alenius H, Palosuo T, Kelly K, Kurup V, Reunala T, Mäkinen-Kiljunen S, Turjanmaa K, Fink J (1996)

IgE reactivity to 14-kD and 27kD natural rubber proteins in latex-allergic children with spina bifida and other congenital anomalies. Int Arch Allergy Immunol 1993; 102: 61-66

5. Alenius H, Turjanmaa K, Palosuo T (2002)

Natural rubber latex allergy. Occup Environ Med 2002; 59:4419-424

6. Allmers H, Schmengler J, Skudlik C (2003)

Primary prevention of natural rubber latex allergy in health care workers. J Allergy Clinical Immunology 2003; 3:94 (Abstract)

7. Arif SAM, Hamilton RG, Yusof F, Chew NP, Loke YH, Nimkar S, Beintema JJ, Yeang HY (2004)

Isolation and characterization of the early nodule-specific protein homologue (Hev b 13), an allergenic lipolytic esterase from *Hevea brasiliensis* latex. The Journal of Biological Chemistry 2004; 4:933-941

8. Arnoux B, Hemery M, Rongier M, Dhivert-Donnadieu H, Barbotte E, Vardier R, Demoly P (2004)

Diagnosis of natural rubber latex allergy by the basotest method. J Allerg Clinical Immunology 2004 Feb S76 (Abstract 212)

9. Ausubel FM, Brend R, Kingston RR, Moore OD, Smith JA, Seidmann JD, Struhl K (1995)

Current Protokols in Moloecular Biology. John Wiley & Sons: New York

10. Bernstein DI, Biagini RE, Karnani R, Hamilton R, Murphy K, Bernstein C, Arif SAM, Berendts B, Yeang HY (2003)

In vivo sensitization to purified *Hevea brasiliensis* proteins in health care workers sensitized to natural rubber latex. J Allergy Clinical Immunology 2003 Mar; 111(3):610-616

11. Bittner C, Grassau B, Frenzel K, Przewozna J, Baur X (2006)

Vergleich der Allergenität von nativem und rekombinantem Hev b 13 für die Diagnostik der Latex-Allergie. Arbeitsmed Sozialmed Umweltmed 2006;41(3):135

12. Bittner C, Grassau B, Frenzel K, Przewozna J, Baur X (2006)

Kann rekombinantes Hev b 13 in der Diagnostik der Latex-Allergie eingesetzt werden? Pneumologie 2006; 60

13. Bradford MM (1976)

A rapid and sensitive method for quantification of microgram of protein utilising the principle of proteine-dye-binding. Anal Biochem. 1976; 248-256

14. Breiteneder H (2003)

The allergens of *Hevea brasiliensis*. Clinical Trends 2003; 101-109

15. Broekaert I, Lee HI, Kush A, Chua NH, Raikhel N (1990)

Woundinduced accumulation of mRNA containing a hevein sequence in laticifers of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). Proc Natl Acad Sci U S A 1990; 87: 7633-7637

16. Chardin H, Raulf-Heimsoth M, Chen Z, Rihs HP, Mayer C, Desvaux FX, Senechal H, Peltre G (2002)

Interest of two-dimensional electrophoretic analysis for the characterization of the individual sensitization to latex allergens. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002;128:195-203

17. Chen Z, Baur X (1999)

Naturlatexallergengehalt in Gummipartikeln und in der Raumluft von Krankenhäusern und Arztpraxen. *Allergology*, 1999; 10:598-605

18. Chen Z, Cremer R, Posch A, Raulf-Heimsoth M, Rihs HP, Baur X (1997)

On the allergenicity of Hev b 1 among health care workers and patients with spina bifida allergic to natural rubber latex. *J Allergy Clinical Immunology* 1997 Nov; 100(5):684-93

19. Chen Z, Posch A, Cremer R, Raulf-Heimsoth M, Baur X (1998)

Identifikation of hevein (Hev b 6.02) in *Hevea latex* as a major cross-reacting allergen with avocado fruit in patients with latex allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 476-481

20. Chen Z, Posch A, Lohaus C, Raulf-Heimsoth M, Meyer HE, Baur X (1997)

Isolation and identification of hevein as a major IgE-binding polypeptide in *Hevea latex*. *J Allergy Clinical Immunology* 1997; 99: 402-409

21. Conde-Salazar L, Gatica M E, Barco L, Iglesias C, Cuevas M, Valks R (2002)

Latex allergy among construction workers. *Contact dermatitis* 2002; 47:154-156

22. Cramer R (2001)

Rekombinante Allergene steigern die diagnostische Aussagekraft. *Interne Klinikzeitung der Aleksanderhausklinik Davos.* 2001;1:22-23

23. Cullinan P, Brown R, Field A, Hourihane J, Jones M, Kekwick R, Rycroft R, Stenz R, Williams S, Woodhouse C (2003)

Latex allergy. A position paper of the British Society of Allergy and clinical immunology. Clin Exp allergy 2003, 33:1484-1499

24. Czuppon AB, Chen Z, Rennert S, Engelke T, Meyer HE, Heber M, Baur X (1989)

The rubber elongation factor protein associated with rubber particles in *Hevea* latex. J Biol Chem 1989; 264: 18618-18626

25. Denise M. Korniewicz, Laurel Garzon, Stacey Plitcha (2003)

Health care workers: risk factors for nonlatex gloves during surgery. AIHA Journal (64) Nov/Dez 2003:851-855

26. de Silva HD, Gardner LM, Drew AC, Beezhold DH, Rolland JM, O'Hehir RE (2004)

The hevein domain of the major latex-glove allergen Hev b 6.01 contains dominant T cell reactive sites. Clin Exp Allergy. 2004; 34:611-618

27. Dudek W, Walusiak J, Wittczak T, Krakowiak A, Marciniak-Bielak D, Raulf-Heimsoth M, Palczynski C (2005)

Natural rubber latex allergy: antigen specific IgE in Polish blood donors, prevalence and risk factors - preliminary data. Int J Occup Med Environ Health. 2005; 18(1):35-42

28. Engwall E, Perlman P (1971)

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry. 1971 Sep;8(9):871-4

29. Fuchs T (2002)

Naturgummilatexallergie. Allergologie 2002; 25(4):230-231

- 30. Ganglberger E, Radauer C, Wagner S, Riordain G, Beezhold DH, Brehler R, Niggemann B, Scheiner O, Jensen-Jarolim E, Breiteneder H (2001)**
Hev b 8, the *Hevea brasiliensis* latex profilin, is a cross-reactive allergen of latex, plant food and pollen. *Int Arch Allergy Immunol.* 2001 Jul; 125(3):216-227
- 31. Hanahan D (1983)**
Studies on transformation of *Escherichia Coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 1983; 166, 557-580
- 32. Hemmer W, Focke M, Götz M, Jarisch R (2004)**
The Ficus-Fruit-Syndrome is a Distinct Entity not Related to Natural Rubber Latex Allergy. *J Allerg Clinical Immunology* 2004 Feb S76 (Abstract 213)
- 33. Jäger L (2001)**
Rekombinante Allergene – Möglichkeit und Grenzen ihrer Anwendung. *Allergologie* 2001/12; 24:563-568
- 34. Koch P, Raulf-Heimsoth M (2004)**
Elastic encasing material for mattresses may be a hidden source of occupational latex exposure in health care facilities. *Allergy* 2004
- 35. Kostyal DA, Hickey VL, Noti JD, Sussman GL, Beezhold DH (1998)**
Cloning and characterization of a latex allergen (Hev b 7): homology to patatin, a plant PLA2. *Clin Exp Immunol* 1998; 112: 355-362
- 36. Kujala V, Alenius H, Palosuo T, Karvonen J, Pfäffli P, Reijula K (2002)**
Extractable latex allergens in airborne glove powder and in cut glove pieces. *Clin Exp Allergy* 2002, 32:1077-1081
- 37. Kurup V P, Fink J N (2001)**
The spectrum of immunologic sensitization in latex allergy. *Allergy* 2001; 56:2-12

- 38. Kurup VP, Sussman GL, Yeang HY, Elms N, Breteneder H, Arif SAM, KJ, Bansal NK, Fink JN (2005)**
Specific IgE response to purified and recombinant allergens in latex allergy. Clin Mol Allergy. 2005 Aug 10; 3:11
- 39. Mikkola JH, Alenius H, Kalkkinen N, Turjanmaa K, Palosuo T, Reunala T (1998)**
Hevein-like protein domains as a possible cause for allergen cross-reactivity between latex and banana. J Allergy Clinical Immunology 1998; 102:1005-1012
- 40. Nettis E, Dambara P, Soccio A L, Ferrannini A, Tursi A (2003)**
Latex hypersensitivity: relationship with positive prick test and patch test response among hairdressers. Allergy 2003; 58:57-61
- 41. Palosuo T, Lehto M, Kotovuori A, Kalkkinen N, Alenius H, Reunala T, Turjanmaa K (2004)**
Prevalence of IgE antibodies to extensively purified Hev b 13 and Hev b 2 in natural rubber latex (NRL) allergic patients. J Allerg Clinical Immunology 2004 Feb: 76 (Abstract 209)
- 42. Posch A, Chen Z, Raulf-Heimsoth M, Baur X (1997)**
Latex-Allergene: Übersicht zum gegenwärtigen Kenntnisstand. Pneumologie 1997; 51, 1058-1062
- 43. Powell W, Wilde J, Waugh R (1992)**
Genetic fingerprinting of *Theobroma* clones using randomly amplified polymorphic DNA markers TAG Theoretical and Applied Genetics, 1992 – Springer Verlag
- 44. Przewozna J, Yu F, Bittner C, Baur X (2004)**
Diagnostik arbeitsbedingter Latex-Allergie mittels rekombinanter Allergene. Arbeitsmed Sozialmed Umweltmed 2004; 39(4):211

45. Przewozna J, Yu F, Bittner C, Baur X (2004)

Diagnostics of work-caused latex allergy using recombinant allergens.

Abstract book. Amsterdam, 2004: 346

46. Raulf-Heimsoth M, Lundberg M, Yeang H Y, Fleischer C, Meurer U, Brüning T, Rihs H P (2004)

Verbesserung der *in vitro*-Diagnostik der Naturlatexsensibilisierung durch den Einsatz rekombinanter Einzelallergene. *Allergo J* 2004;13:31 (Abstract)

47. Raulf-Heimsoth M, Rihs H P, Brüning T (2005)

Latex-Allergie. Molekulare Grundlagen. *Allergo J* 2005; 14:473 (Abstract)

48. Raulf-Heimsoth M, Rozynek P, Brüning T, Rihs HP (2004)

Characterization of B- and T-cell responses and HLA-DR4 binding motifs of the latex allergen Hev b 6.01 (prohevein) and its post-transcriptionally formed proteins Hev b 6.02 and Hev b 6.03. *Allergy*. 2004 Jul, 59:724-733

49. Raulf-Heimsoth M, Rozynek P, Lundberg M, Cremer R, Brüning T, Rihs HP (2004)

Use of recombinant latex allergens to determine the individual latex allergen sensitization profile in health care workers and children with *Spina Bifida*. *Allergy Clinical Immunology* 2001; 1:249-251

50. Raulf-Heimsoth M, Rozynek P, Sander I, Brüning T, Rihs HP (2004)

Naturlatexallergie. Molekulare Grundlagen und Kreuzreaktivitäten. *Allergo J* 2004;13:328-336

51. Raulf-Heimsoth M, Sander I, Chen Z, Borowitzki G, Diewald K, van Kampen V, Baur X (2000)

Development of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for detection of the latex allergen Hev b 1. *Allergy Immunol* 2000; 123:236-241

52. Raulf-Heimsoth M, Sander I, Merget R, Brüning T (2001)

Aktuelle allergologische Probleme in der Arbeitsmedizin. Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz 2001; 44:654-665

53. Raulf-Heimsoth M, Sander I, Rihs HP, Merget R, Brüning T (2003)

Latexallergie: Aktuelle Bestandsaufnahme. Akt Dermatol 2003; 29: 176-184

54. Raulf-Heimsoth M, Yeang HY, Sander I, Rozynek P, Arif SAM, Fleischer C, Cremer R, Brüning T, Rihs H (2003)

Is ENSP (Hev b 13) the missing latex allergen to fill the gap in the repertoire of isolated allergens for the determination of sensitization profiles? J Allergy Clinical Immunology 2003; 2:94 (Abstract)

55. Reunala T, Alenius H, Turjanmaa K, Palosuo T (2004)

Latex allergy and skin. Department of Dermatology, University and University Hospital of Tampere, Tampere, Finland, Allergy and Clinical Immunology 2004; 5 (4):397-401

56. Richardson MD, Turner A, Warnock DW, Llewellyn PA (1983)

Computer-assisted rapid enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the serological diagnosis of aspergillosis. J Immunol Methods. 1983 Jan 28; 56(2):201-207

57. Rihs HP, Chen Z, Rozynek P, Baur X, Lundberg M, Cremer R (2000)

PCR-based cloning, isolation and IgE-binding properties of recombinant latex profilin (rHev b 8). Allergy. 2000 Aug; 55(8):712-717

58. Rihs HP, Chen Z, Rueff F, Cremer R, Raulf-Heimsoth M, Baur X, Moneret Vautrin DA, Brüning T (2002)

HLA-DQ8 and the HLA-DQ8-Dr4 haplotype are positively associated with the hevein specific IgE immune response in health care workers with latex allergy. J Allergy Clinical Immunology 2002; 110: 507-514

- 59. Rihs HP, Chen Z, Schumacher S, Rozynek P, Cremer R, Lundberg M, Raulf-Heimsoth M, Petersen A, Baur X (2000)**
Recombinant Hev b 1, large scale production and immunological characterization. Allergy, 2000; 30:1285-1292
- 60. Rihs H P, Rueff F, Lundberg M, Rozynek P, Garcia-Selles J, Barber D, Scheurer S, Alonso R, Cistero-Bahima A, Brüning T, Raulf-Heimsoth M (2004)**
Nur Seren von Patienten mit einer Allergie gegen Früchte erkennen das rekombinante Lipid-Transfer-Protein aus *Hevea brasiliensis* (rHev b 12) als relevantes Allergen. Allergo J 2004; 13:47 (Abstract 61)
- 61. Rihs H P, Rueff F, Lundberg M, Rozynek P, Garcia-Selles J, Barber D, Scheurer S, Alonso R, Cistero Bahima A, Brüning T, Raulf-Heimsoth M. (2004)**
Specific IgE-Binding of rHev b 12 is restricted to Fruit-Allergic Patients. J Allergy Clinical Immunology,. 2004; 113:S76
- 62. Rueff F, Schöpf P, Przybilla B (2005)**
Naturlatex-Allergie in der Praxis. Allergo J 2005; 14:473 (Abstract)
- 63. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T(1989)**
Molecular Cloning: A laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor)
- 64. Sanger F, Nickeln S, Coulson AR (1977)**
DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. National Academy of Sciences; Proc Natl Acad Sci U S A. 1977 December; 74(12): 5463–5467.
- 65. Sastre J, Raulf-Heimsoth M, Fernandez-Nieto M, Barber D, Martin S, Quirce S (2004)**
Profile of sensitization to individual latex allergens among health care workers allergic to natural rubber latex. J Allergy Clinical Immunology, 2004 Feb S76 (Abstract 207)

66. Schmidt MH, Raulf-Heimsoth M, Posch A (2002)

Evaluation of patatin as a major cross-reactive allergen in latex-induced potato allergy. *Allergy Asthma Immunol* 2002; 89:613-618

67. Schröder CM, Ott H, Mahler V, Schröder A, Erdmann S, Merk HF, Baron JM (2004)

Rekombinante Allergenkomponenten in der Diagnostik der Latexallergie. *Allergo J* 2004; 13:32 (Abstract)

68. Seppala U, Palosuo T, Seppala U, Kalkkinen N, Ylitalo L, Reunala T, Turjanmaa K, Reunala T (2000)

IgE reactivity to patatin-like latex allergen, Hev b 7, and to patatin of a potato tuber, Sol t 1, in adults and children allergic to natural rubber latex. *Allergo* 2000; 55: 266-273

69. Slater JE, Vedvick T, Arthur-Smith A, Trybul DE, Kekwick RGO (1996)

Identification, cloning, and sequence of a major allergen (Hev b 5) from natural rubber latex (*Hevea brasiliensis*). *J Biol Chem* 1996; 271: 25394-25399

70. Sowka S, Wagner S, Krebitz M, Arif SAM, Yosof F, Kinaciyani T, Brehler R, Scheiner O (1998)

cDNA cloning of the 43-kDa latex allergen Hev b 7 with sequence similarity to patatins and its expression in the yeast *Pichia pastoris*. 1998 Jul 1; 255(1):213-9

71. Sunderasan E, Bahari A, Arif SAM, Zainal Z, Hamilton RG, Yeang HY (2005)

Molecular cloning and immunoglobulin E reactivity of a natural rubber latex lecithinase homologue, the major allergenic component of Hev b 4. *Clin Exp Allergy* 2005; 35:1490-1495

72. Tomazic-Jezic VJ, Beezhold DH, Hashim H, Palosuo T, Raulf-Heimsoth M, Swanson M, Hamilton RG, (2004)

Performance of methods for the measurement of natural rubber latex (NRL) Proteins, antigens and allergens. *J Allerg Clinical Immunology* 2004 Feb S76 (Abstract 211)

73. Tomazic-Jezic VJ, Sanchez BA (2005)

Allergen profiles of natural rubber latex (NRL) proteins on gloves and glove powders. *J Long Term Eff Med Implants*. 2005, 15(2):115-124

74. Valenta R (2002)

Recombinant allergen-based concepts for diagnosis and therapy of Type I allergy. *Allergy* 2002; 71:66-67

75. Vallier P, Balland S, Harf R, Valenta R, Deviller P (1995)

Identification of profilin as an IgE-binding component in latex from *Hevea brasiliensis*: clinical implications. *Clin Exp Allergy* 1995; 25: 332-339

76. Wagner B, Buck D, Hafner C, Sowka S, Niggemann B, Scheiner O, Breiteneder H (2001)

Hev b 7 is a *Hevea brasiliensis* protein associated with latex allergy in children with spina bifida. *J Allergy Clinical Immunology* 2001 Oct;108(4):621-7

77. Wagner S, Radauer C, Hafner C, Fuchs H, Jensen-Jarolim E, Wuthrich B, Scheiner O, Breiteneder H (2004)

Characterization of cross-reactive bell pepper allergens involved in the latex-fruit syndrome. *Clin Exp Allergy*. 2004 Nov, 34(11):1739-1746

78. Yeang HY, Hamilton RG, Bernstein DI, Arif SAM, Chow KS, Loke YH, Raulf-Heimsoth M, Wagner S (2006)

Allergen concentration in natural rubber latex. *Clinical and Experimental Allergy*, 2006; 36:1078-1086

79. Yeang HY (2004)

Natural rubber latex allergens: new developments. *Allergy and Clinical Immunology* 2004; 4:99-104

80. Yeang HY, Arif SAM, Raulf-Heimsoth M, Loke YH, Sander I, Sulong SH, Lau CH (2004)

Hev b 5 and Hev b 13 as allergen markers to estimate the allergenic potency of latex gloves. *J Allergy Clinical Immunology* 2004; 114:593-598

81. Yip L, Hickey V, Wagner B, Liss G, Slater J, Breiteneder H, Sussman G, Beezhold D (2000)

Skin prick test reactivity to recombinant latex allergens. *Int Arch Allergy Immunol.* 2000 Apr; 12184:292-299

82. Yoon K, Halsey JF, Kim KT (2004)

Antigenic latex protein from rubber bands. *J Allerg Clinical Immunology* 2004 Feb S76 (Abstract 208)

83. Zucker-Pinchoff B, Gray J. Stadtmauer (2002)

Latex allergy. *The Mountsinai Journal of Medizin*, 2002 Jan/Feb; 62:88-95

8. ANHANG

8.1 Abkürzungen

Grundsätzlich wurden die international üblichen chemischen Symbole und Abkürzungen der SI- Einheiten (Systeme International d'Unites) benutzt. Die in dieser Arbeit verwendeten physikalischen Größen entsprechen der Konvention der „International Union for Biochemistry“.

A	Adenin
A	Ampère
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BGFA	Berufsgenossenschaftliches Forschungsinstitut für Arbeitsmedizin
bidest.	Doppelt destilliert
bp	Basenpaare (engl.: <i>base pairs</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: <i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CAP	Capacity
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid

Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>desoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
DNTPs	Mischung aus dATP, dCTP, dGTP, dTTP
DR	Wiederholungssequenz (engl.: <i>direct repeat</i>)
ds	doppelsträngig (engl.: <i>double stranded</i>)
E280	Extinktion bei 280 nm
E260	Extinktion bei 260 nm
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDV	elektronische Datenverarbeitung
ELISA	Enzymgekoppelter Immuntest (engl.: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
<i>et al.</i>	und andere (lat. <i>et alii</i>)
EtBr	Ethidiumbromid
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
g	Gramm
ggf.	gegebenfalls
h	Stunde(n)
HCW	health care worker
His	Histidin
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Ig	Immunglobuline
IgC- Domäne	konstante Immunglobulin- Domäne
IgV- Domäne	variable Immunglobulin- Domäne
IgE	Immunglobuline der Klasse E

IgG	Immunglobuline der Klasse G
IPTG	Isopropyl-Thio-β-D-Galactopyranosid
k	Kilo
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria- Bertani- Medium
μ	mikro
m	milli
m	Meter
M	Molar
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
mol	6,23*10 ²³ Teilchen
MOPS	3-(N- Morpholino)- Propansulfonsäure
MW	Molekulargewicht
n	nano
NAOH	Natriumhydroxid
NH ₄ AC	Ammoniumacetat
OD	optische Dichte
p	piko
PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese
PBS	Phosphat- gepufferte Salzlösung (engl.: <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase- Kettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i>)
pH	negativer dakadischer Logarithmus der Oxoniumionen- Konzentration
POD	Peroxidase
Pol	Polymerase
Pu	Purinbase
Py	Pyrimidinbase
RAST	Radio-Allergo-Sorbent-Test
RNA	Ribonukläeinsure (engl.: <i>ribonucleid acid</i>)

RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>rounds per minute</i>)
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: <i>sodiumdodecylsulfate</i>)
ss	einzelsträngig (engl.: <i>single stranded</i>)
suppl.	supplementiert
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TAE	Tris- Acetat- EDTA- Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N',N' -Tetraethylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Unit (Enzymeinheit)
u.a.	unter anderem
üN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
V.a.	Verdacht auf
Vol.	Volumenanteil
v/v	Volumen pro Volumen
vs	versus
z.B.	zum Beispiel
w/v	Gewicht pro Volumen (engl.: <i>weight</i>)
ZfAM	Zentralinstitut für Arbeitsmedizin und Maritime Medizin

8.2 Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom November 2002 bis Dezember 2006 am Ordinariat für Arbeitsmedizin der Universität Hamburg und dem Zentralinstitut für Arbeitsmedizin und Maritime Medizin (ZfAM) der Freien und Hansestadt Hamburg unter Leitung von meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. X. Baur, angefertigt.

Mein Dank gilt:

Herrn **Prof. Dr. med. X. Baur** für die Ermöglichung, Förderung und stets lehrreiche und kritische Begleitung meiner Arbeit.

Dem Institut für allgemeine Botanik für den Anbau der tropischen Gummibäume *Hevea brasiliensis* im Gewächshaus im Biozentrum Klein Flottbek, was den Zugang zu frischem Pflanzenmaterial geschaffen und die Herstellung der Latex-Gesamt-RNA ermöglicht hat. Besonders danke ich diesbezüglich **Dr. rer. nat. Karsten Frenzel**.

Herrn **Dr. rer. nat. Fang Yu** für die Hilfe bei der Herstellung der Latex-cDNA mittels RT-PCR und die Einführung in das Arbeitsthema und seine Beratung auf dem molekularbiologischen Gebiet.

Frau **Dr. med. Cordula Bittner** für ihre ständige Gesprächsbereitschaft und ihre wertvolle Unterstützung in wissenschaftlichen Fragen bezüglich der Allergologie.

Allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für das gute Arbeitsklima, die Unterstützung in fachlichen Fragen und die Hilfsbereitschaft während der gesamten Zeit. Hier seien besonders **Frauke Koops, Britta Graßau und Michael Baden** erwähnt.

Meiner Familie und meinen Freunden für ihre verständnisvollen Unterstützungen während der letzten Jahre.

8.3 Lebenslauf

Familienname: Przewozna
Vorname: Joanna
Geburtsdatum: 15.11.1977
Geburtsort: Kattowitz/Polen
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schul- und Ausbildungsweg:

01.09.1984 - 19.06.1992	Besuch der Grundschule in Dabrowa Gornicza/Polen
01.09.1992 - 04.06.1996	Besuch des allgemeinbildenden Gymnasiums in Dabrowa Gornicza/Polen
05.05.1996	Abitur
06.01.1998 - 09.12.1998	Besuch des Studienkollegs an der Universität Hamburg und Erwerb der deutschen Hochschulreife
06.04.1999 – 31.05.2007	Medizinstudium an der Hamburger Universität
01.07.08	Assistenz in der Inneren Medizin (Gastroenterologie und Hepatologie) in der Asklepios Klinik Barmbek

8.4 Veröffentlichungen

Przewozna J, Yu F, Bittner C, Baur X

Diagnostik arbeitsbedingter Latex- Allergie mittels rekombinanter Allergene
Arbeitsmed Sozialmed Umweltmed 2004;39(4):211

Przewozna J, Yu F, Bittner C, Baur X

Diagnostik arbeitsbedingter Latex- Allergie mittels rekombinanter Allergene
Österreichische Gesellschaft für Arbeitsmedizin
Deutsche Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e. V.
Gemeinsame Wissenschaftliche Jahrestagung in Innsbruck vom 21. bis 24. April 2004
Innsbruck: Athesia-Tyrolia Druck, 2004:428-429

Przewozna J, Yu F, Bittner C, Baur X

Diagnostics of work-caused latex allergy using recombinant allergens
XXIII EAACI Congress 12-16 June 2004, Amsterdam Abstract book. Amsterdam,
2004:346

Bittner C, Grassau B, Frenzel K, Przewozna J, Baur X

Vergleich der Allergenität von nativem und rekombinantem Hev b 13 für die
Diagnostik der Latexallergie. Arbeitsmed Sozialmed Umweltmed 2006;41(3):135

1. Posterpreis

Bittner C, Grassau B, Frenzel K, Przewozna J, Baur X

Kann rekombinantes Hev b 13 in der Diagnostik der Latexallergie eingesetzt
werden?

47. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie in Nürnberg vom 29.

März bis 1. April 2006

Pneumologie 2006; 60

DOI: 10.1055/s-2006-933882

8.5 Erklärungen

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes als solche kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich diese Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, den

(Joanna Przewozna)