Die Typ I Allergie gegen Mangofrüchte unter Berücksichtigung von Kreuzreaktionen

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg

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

vorgelegt von

Heiko Kinder
aus Soltau

Hamburg 1999

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom November 1997 bis zum April 1999 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. H. Steinhart am Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie -Abteilung Lebensmittelchemie- an der Universität Hamburg angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. H. Steinhart
2. Gutachter: Prof. Dr. R. Bredehorst

Tag der mündlichen Prüfung:

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. H. Steinhart danke ich für die Überlassung des Themas.
Bei Frau Dr. A. Paschke bedanke ich mich für Ihre Hilfsbereitschaft und die stets vertrauensvolle Zusammenarbeit.

Für die bereitwillige Übernahme des Koreferats danke ich Herrn Prof. Dr. R. Bredehorst.

Allen Mitarbeitern der Hautklinik des Universitäts-Krankenhauses Hamburg-Eppendorf danke ich recht herzlich für die Kooperationsbereitschaft und die Möglichkeit, Patientenseren zu erhalten.

Mein Dank gilt ferner den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Allergie, insbesondere Herrn M. Linkogel, Frau. B. Scharf, Frau C. Heift, Herrn D. Beil, Herrn M. Möller, Herrn M. Besler, Herrn M. Wigotzki und Frau K. Zunker. Ausdrücklich möchte ich mich zudem bei Frau B. Jacobsen für die Hilfe bei der experimentellen Durchführung und die tolle Zusammenarbeit bedanken.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. Einleitung und Problemstellung 1

2. Theoretischer Teil 3

2.1 Grundlagen allergischer Reaktionen 3

2.1.1 Einleitung 3

2.1.2 Antikörper 4

2.1.3 Die Typ I Allergie 5

2.2 Nachweis von Lebensmittelallergien 8

2.3 Allergencharakterisierung 8

2.4 Allergene in Lebensmitteln 9

2.5 Allergien gegen Mango 12

2.6 Die Mangofrucht 13

3. Material und Methoden 15

3.1 Untersuchungsmaterial 15

3.2 Patientenseren 15

3.3 Extraktion der Allergene 15

3.4 Quantifizierung des Proteingehaltes 16

3.5 Enzymallergosorbent-Test (EAST) 16

3.6 EAST-Inhibition 17

3.7 Elektrophorese 17

3.7.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) 18

3.7.2 Isoelektrische Fokussierung (IEF) 18

3.7.3 2D-Elektrophorese 19

3.7.4 Semidry-Blotting 19

3.8 Färbung elektrophoretisch getrennter Proteine 19

3.8.1 Färbung in Gelen 19

3.8.2 Färbung auf Membranen 20

3.9 Verfahren zur Allergenisolierung 22

3.9.1 Ionenaustauschchromatographie (IEC) 22

3.9.2 Entsalzung und Aufkonzentrierung über Mikrokonzentratoren 22

3.9.3 Affinitätschromatographie (AC) 22

3.10 Sequenzanalyse 23

Seite

4. ERGEBNISSE **24**

4.1 Proteingehalte der Extrakte 24

4.2 EAST-Ergebnisse 24

4.3 Untersuchung der Mangoallergene 26

4.3.1 SDS-PAGE/Silberfärbung 26

4.3.2 IEF/Silberfärbung 26

4.3.3 SDS-PAGE/IB 27

4.3.4 IEF/IB 30

4.3.5 2D-Elektrophorese/IB 32

4.3.6 Prüfung auf Profiline 33

4.3.7 Prüfung auf Kohlenhydratstrukturen 34

4.3.8 Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse 35

4.4 Untersuchung einer möglichen Sortenabhängigkeit der allergenen Potenz von Mangofrüchten 36

4.4.1 SDS-PAGE/Silberfärbung 36

4.4.2 SDS-PAGE/IB 37

4.4.3 IB-Inhibition 37

4.4.4 EAST-Inhibition 38

4.5 Untersuchung der Veränderung der Allergenität von Mangofrüchten während der Lagerung und Reifung 41

4.5.1 SDS-PAGE/Silberfärbung 41

4.5.2 SDS-PAGE/IB 43

4.5.3 IB-Inhibition 44

4.5.4 EAST-Inhibition 45

4.6 Untersuchungen zur Kreuzreaktivität 46

4.6.1 SDS-PAGE/Silberfärbung 46

4.6.2 IB-Inhibition 47

4.6.3 EAST-Inhibition 54

4.7 Entwicklung einer Methode zur Isolierung der Mangoallergene 59

4.7.1 Isolierung der Hauptallergene mittels IEC 59

4.7.2 Isolierung der Hauptallergene mittels AC 65

Seite

5. **Diskussion** **71**
5.1 Allergene der Mango 71
5.2 Sortenabhängigkeit der allergenen Potenz von Mangofrüchten 73
5.3 Veränderung der Allergenität von Mangofrüchten während der Lagerung und Reifung 74
5.4 Kreuzreaktivität 75
5.5 Entwicklung einer Methode zur Isolierung der Mangoallergene 77
5.6 Ausblick 79

6. Zusammenfassung / Summary **80**

7. Anhang **84**
7.1 Gewinnung der Patientenseren 84
7.2 Extraktion der Proteine 84
7.3 Proteinbestimmung 86
7.4 Enzymallergosorbent-Test (EAST) 88
7.5 EAST-Inhibition 91
7.6 Elektrophorese 93
7.7 Unspezifische Färbungen in Gelen 101
7.8 Unspezifische Färbung auf Membranen 103
7.9 Spezifische Färbung auf NC-Membranen 104
7.10 Verfahren zur Allergenisolierung 108
7.11 EAST-Ergebnisse 113
7.12 IB-Ergebnisse 119
7.13 Untersuchung zur Sortenabhängigkeit der Allergenität 120
7.14 Untersuchung der Reifeabhängigkeit der Allergenität 124
7.15 Ergebnisse der EAST-Inhibition zur Untersuchung von Kreuzreaktivitäten 128
7.16 Chemikalienliste, Geräte, Verbrauchsmittel, Zubehör 132
7.16.1 Chemikalienliste 132
7.16.2 Geräte 134
7.16.3 Verbrauchsmittel, Zubehör 135

8. Literaturverzeichnis **136**

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
AC	Affinitätschromatographie
Act c 2	Actinidia chinensis 2 (Hauptallergen der Kiwi)
AP	Alkylierte Phosphatase
Api g 1	Apium gravolen 1 (Hauptallergen des Sellerie)
Api g 2	Apium gravolen 2 (Hauptallergen des Sellerie)
app.	apparent
APS	Ammoniumperoxodisulfat
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
Art v 1	Artemisia vulgaris 1 (Hauptallergen der Beifußpollen)
Art v 2	Artemisia vulgaris 2 (Hauptallergen der Beifußpollen)
B_0	Meßwert ohne Inhibitiorzusatz
Beifußp.	Beifußpollen
Bet v 1	Betula verucosa 1 (Hauptallergen der Birkenpollen)
Bet v 2	Betula verucosa 2 (Birkenpollen Profilin)
BfA	Bundesversicherungsanstalt für Angestellte
bidest.	bidestilliert
Bis	N,N´-Methylenbisacrylamid
BP	Birkenpollen
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
C_{50}	Inhibitorkonzentration bei 50 %iger Inhibition im EAST
C	Vernetzungsgrad (Crosslinking)
CAA	Carragena arborescens (Lectin)
CAPS	(3-Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure
CBB	Coomassie Brilliant Blau
Con A	Concanavalin A (Lectin)
Da	Dalton
Dau c 1	Daucus carota 1 (Hauptallergen der Karotte)
dest.	destilliert
Disk	diskontinuierlich
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DONS	Dioctylnatriumsulfosuccinat
DTT	Dithiothreitol
EACA	6-Aminohexansäure
EAST	Enzymallergosorbent-Test
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F	Fraktion

Fab	fragment antigen binding
Fc	Fragment crystallizable
Geschl.	Geschlecht
GS II	Griffonia simplificonia II (Lectin)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase)
IB	Immunoblot
IEC	Ionenaustauschchromatographie (ion exchange chromatography)
IEF	Isoelektrische Fokussierung
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
klin.	klinisch
Lotus	Lotus tetragonolobus (Lectin)
LSD-Test	kleinste signifikante Differenz (lowest significant difference)
m	männlich
Mal d 1	Malus domesticus 1 (Hauptallergen des Apfels)
Man i 1	Mangiferia indica 1 (Hauptallergen der Mango)
Man i 2	Mangiferia indica 2 (Hauptallergen der Mango)
MG	Molekulargewicht
MHC	major-histocompatibility complex
n.b.	nicht bestimmt
NC	Nitrocellulose
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMR	Kernresonanzspektroskopie
NSB	nichtspezifische Bindung
OA	Ovalbumin
p.A.	pro Analysis
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenraktion
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
pI	Isoelektrischer Punkt
PNPP	p-Nitrophenylphosphat
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RAST	Radioallergosorbent-Test
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodiumdodecylsulfate)
SEC	Größenaustauschchromatographie (size exclusion chromatography)
Skt.	Skalenteile
spez.	spezifisch

T	Totalacrylamidkonzentration
TA	Tommy Atkins (Mangosorte)
TEMED	N,N,N´,N´-Tetramethylendiamin
™	eingetragenes Warenzeichen
TMB	3,3`,5,5´-Tetramethylbenzidin
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
TTBS	Tween-Tris-Puffersalzlösung (tween tris buffer saline)
U	Unit (= 2,4 ng IgE)
UV	Ultraviolett
w	weiblich

1 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

In den letzten Jahren haben Lebensmittelallergien zunehmend an Bedeutung gewonnen, da sich aus verschiedenen epidemiologischen Studien Anhaltspunkte für eine Zunahme allergischer Erkrankungen ergeben (WÜTHRICH ET AL., 1986, AULEPP UND VIETHS, 1992, ANDRE ET AL., 1994, SCHÄFER UND RING, 1996, WÜTHRICH 1996a). Pathogenetisch ist zwischen Lebensmittelallergien im eigentlichen Sinne und Pseudoallergien zu unterscheiden, obwohl sich beide hinsichtlich ihres klinischen Bildes gleichen. Während Lebensmittelallergien eine immunologische Reaktion darstellen, ist dies bei pseudoallergischen Reaktionen nicht der Fall. Lebensmittelallergien verlaufen zumeist als Soforttypreaktionen unter Beteiligung von Immunglobulinen (Ig) der Klasse E. Bei den Allergenen handelt es sich meist um natürlicherweise im Lebensmittel vorkommende Proteine oder Glycoproteine (AULEPP UND VIETHS, 1992).

Häufig treten Lebensmittelallergien gemeinsam mit Allergien gegen Pollen auf, denen ein gemeinsames immunochemisches Prinzip, eine sogenannte Kreuzreaktivität der IgE-Moleküle gegenüber Allergenen der Pollen und der betreffenden Lebensmittel (AULEPP UND VIETHS, 1992), zugrunde liegt.

Durch die Globalisierung des Weltmarktes und eine erhebliche Verbesserung der Transportbedingungen ist der Verzehr von tropischen Früchten in den letzten Jahren erheblich gestiegen, weshalb auch vermehrt von Allergien gegen tropische Früchte berichtet wird. Nach der Banane ist die Mango mit einer Weltjahresproduktion von 14,7 Mio. Tonnen die am häufigsten angebaute Tropenfrucht. Sie wird weltweit in mehr als 1000 Sorten kultiviert, von denen in Europa jedoch viele aufgrund ihres terpenartigen Geschmacks vom Verbraucher nicht akzeptiert werden. In Europa werden vorwiegend die Sorten Tommy Atkins (TA), Osteen, Eden und Ngowe vertrieben, die dieses Fehlaroma nicht aufweisen. Daß ein Zusammenhang zwischen Sorten und dem allergenen Potential nicht auszuschließen ist, zeigen die Untersuchungen von VIETHS ET AL. (1993, 1994b) sowie LI-SHAN ET AL. (1995), die nachweisen konnten, daß einige Apfelsorten ein erhöhtes allergenes Potential besitzen, welches im Verlauf des Reifeprozesses noch zunimmt.

WÜTHRICH UND HOFER (1984) berichteten von Patienten, die ohne vorausgehende Sensibilisierung eine allergische Reaktion gegen Mango zeigten. Sie vermuten, daß der Grund hierfür eine Kreuzreaktivität zwischen Mango, Sellerie und Beifußpollen ist.

In der vorliegenden Arbeit sollen die Allergene der Mango, die für eine Soforttypreaktion verantwortlich sind, charakterisiert werden. Des weiteren gilt es zu klären, ob eine Sorten- und Reifeabhängigkeit der Allergenität vorliegt. Da die Mango in der Literatur als beifußpollenassoziiertes allergenes Lebensmittel beschrieben wird (WÜTHRICH UND HOFER, 1984), gilt es zu untersuchen, ob eine immunologische Verwandtschaft der verantwortlichen Allergene vorliegt. In der Literatur wird zudem von einer Assoziation zwischen Beifußpollen, Sellerie, Karotte und Birkenpollen berichtet (BAUER ET AL., 1996). Es gilt zu prüfen, ob diese Kreuzreaktionen auch in dem in dieser Arbeit zu untersuchenden Patientenkollektiv auftreten

und welche Allergene diesen Kreuzraktionen zugrunde liegen. Nach der Charakterisierung der Hauptallergene ist eine Methode zur Isolierung der Hauptallergene der Mango zu entwickeln.
Zur Umsetzung der Ziele sollen zunächst Allergenextrakte der Mango aus den vier in Europa am häufigsten verkauften Sorten (Osteen, Eden, TA, Ngowe) sowie aus Birkenpollen, Beifußpollen, Sellerie und Karotte hergestellt werden. Durch Einsatz des Enzymallergosorbent-Test (EAST, s. 3.5) soll unter Verwendung dieser Extrakte der Nachweis von spezifischem IgE in Seren von Patienten mit einer Allergie gegen zumindest eine dieser Pflanzen geführt werden. Anschließend sollen die Proteine der Allergenextrakte unter Anwendung elektrophoretischer Verfahren [Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelektrophorese (SDS-PAGE, s. 3.7.1), Isoelektrische Fokussierung (IEF, s. 3.7.2), 2D-Elektrophorese (s. 3.7.3)] aufgetrennt und die Allergene im Immunoblot (IB) hinsichtlich ihres Molekulargewichtes (MG) und ihres isoelektrischen Punktes (pI) charakterisiert werden.
Mittels EAST- und IB-Inhibition (s. 3.6 und 3.8.2.2) gilt es anschließend zu untersuchen, ob bei der Mango, ähnlich wie beim Apfel (VIETHS ET AL., 1994a, LI-SHAN ET AL., 1995) eine Sorten- und Reifeabhängigkeit der Allergenität vorliegt. Zur weitergehenden Untersuchung der Allergene wäre es anschließend erforderlich, über ausreichende Mengen des Allergens zu verfügen. Daher gilt es unter Anwendung chromatographischer und elektrophoretischer Methoden eine Methode zur Isolierung der Allergene zu entwickeln, wobei hierfür die Ionenaustauschchromatographie (IEC, s. 3.9.1) sowie die Affinitätschromatographie (AC, s. 3.9.3) zur Verfügung stehen und somit eingesetzt werden sollen.
Abschließend sollen die so isolierten Allergene einer N-terminalen Sequenzierung unterworfen werden, um einen Vergleich dieser Sequenz mit der anderer Proteine durchzuführen.

2 THEORETISCHER TEIL

2.1 GRUNDLAGEN ALLERGISCHER REAKTIONEN

2.1.1 Einleitung

VON PIRQUET definierte 1906 den Begriff „Allergie", um in die Vielfalt der Definitionen von nutzbringender und schädigender Immunität Ordnung zu bringen. Er verstand hierunter eine spezifisch veränderte Reaktionsfähigkeit des Organismus. Unter diese Definition fallen nicht nur Überempfindlichkeitsreaktionen, sondern auch abgeschwächte immunologische Reaktionen.

An der Definition hat sich bis heute wenig geändert. Die Definition einer Allergie von RING (1993) als „Änderung der Immunitätslage im Sinne einer krankmachenden Überempfindlichkeit“ konkretisiert diesen Sachverhalt lediglich. Lebensmittelallergien sind nicht-toxische, immunvermittelte Überempfindlichkeitsreaktionen (s. Tab. 2.1). Sie sind klar von den nicht-immunvermittelten Lebensmittelintoleranz-Reaktionen sowie Erkrankungen mit bisher ungeklärter Immunitätslage und psychosomatischen Erkrankungen abzugrenzen (BRUIJNZEEL-KOOMEN ET AL., 1995).

Tab. 2.1: Klassifizierung nicht-toxischer Überempfindlichkeitsreaktionen gegen Lebensmittel (nach BRUIJNZEEL-KOOMEN ET AL., 1995)

IMMUNVERMITTELT „Lebensmittelallergie"	NICHT-IMMUNVERMITTELT „Lebensmittelintoleranz"	UNBEKANNTE ROLLE im Immunmechanismus
• IgE-vermittelt Typ I: Soforttypreaktion (IgE, Mastzellen) • nicht-IgE-vermittelt (IgG / IgM, Immunkomplexreaktion, zellvermittelt)	• enzymatische Reaktionen (z.B. Lactase-Mangel) • pharmakologische Reaktionen (z.B. auf vasoaktive Amine) • undefinierte Reaktionen („pseudoallergische Reaktionen")	• Zöliakie • Gefäßentzündungen der Haut • eosinophile Entzündungen der Magen- und Darmschleimhäute • Protein-induzierte Gastroenteropathie • Zusatzstoffe wie Sulfite oder Azofarbstoffe • „Ökosyndrom"

Die Pathomechanismen von Allergien werden modifiziert nach COOMBS UND GELL (1963) in vier verschiedene Typen eingeteilt. Dabei handelt es sich um die IgE vermittelte Soforttypreaktion (Typ I), cytotoxische Reaktionen, die durch IgG bzw. IgM vermittelt werden (Typ II), Immunkomplexreaktionen (Typ III) sowie die zellvermittelte Spättypreaktion (Typ IV). Bei Lebensmittelallergien ist einzig der IgE vermittelte Soforttyp (Typ I) eindeutig gesichert (BRUIJNZEEL-KOOMEN ET AL., 1995).

2.1.2 Antikörper

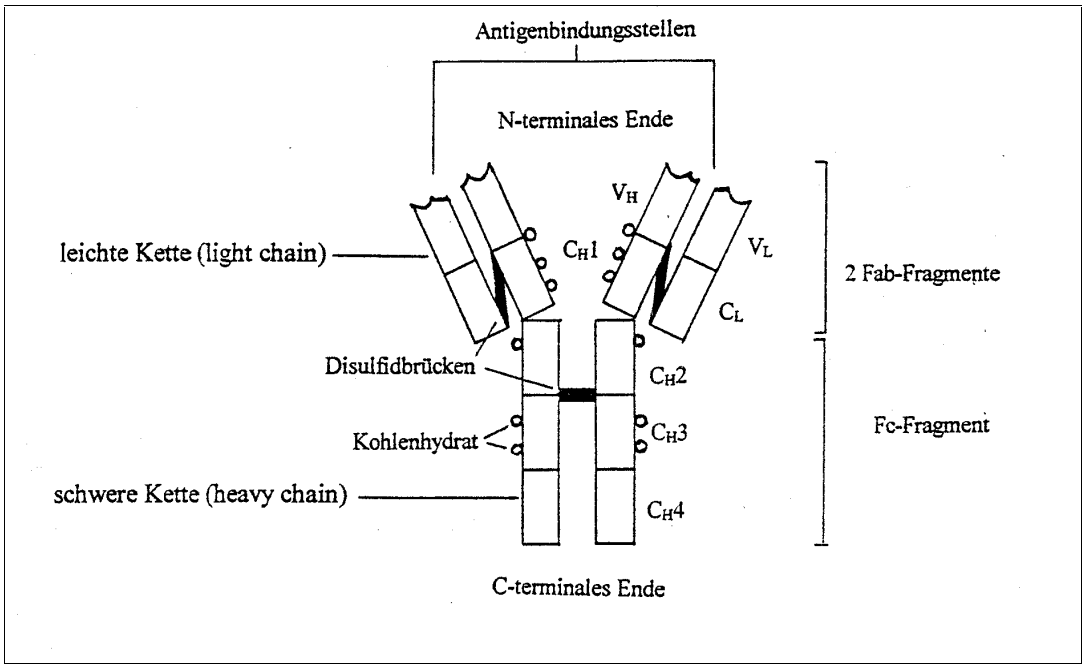


Abb. 2.1: Schematischer Aufbau eines Immunglobulins

Ig sind γ-Globuline, die von B-Lymphozyten gebildet werden und in der körpereigenen Immunabwehr als Antikörper fungieren. Bei den höheren Säugetieren sind fünf Ig-Klassen bekannt: IgG, IgM, IgA, IgD und IgE. Sie unterscheiden sich in ihrem MG, ihrer elektrischen Ladung, der Aminosäuresequenz und ihrem Kohlenhydratanteil voneinander. Die jedem Ig zugrundeliegende Struktureinheit umfaßt zwei identisch schwere (heavy chain) und zwei identisch leichte (light chain) Polypeptidketten, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (s. Abb. 2.1). In den sog. Fab-Fragmenten (fragment antigen binding), die aus den leichten Ketten und dem N-terminalen Ende der schweren Ketten bestehen, ist durch unterschiedliche Aminosäuresequenzen die Spezifität des Antikörpers lokalisiert. Das andere, konstante, leicht auskristallisierende Fragment (Fc = fragment crystallizable), spielt bei der Bindung von Antigenen keine Rolle, sondern bestimmt die Funktionalität des Antikörpers (KLEIN, 1991, ROITT, 1993, JANEWAY UND TRAVERS, 1995).

Die ursprüngliche Aufgabe der IgE-Moleküle ist unbekannt, es wird jedoch vermutet, daß sie für die immunologische Abwehr parasitären Wurmbefalls verantwortlich sind (JANEWAY UND TRAVERS, 1995).

2.1.3 Die Typ I Allergie

2.1.3.1 SYMPTOME

Allergien vom Soforttyp können eine Vielzahl von Symptomen auslösen. Der Grund hierfür ist, daß unterschiedliche Allergene (s. 2.1.3.5) an verschiedenen Stellen mit dem Immunsystem des Körpers in Kontakt kommen. In den oberen Atemwegen erzeugen sie allergische Rhinitis (Fließschnupfen), in den unteren Atemwegen kann es zur Verschleimung der Bronchien und somit zum allergischen Asthma kommen. Im Mund- und Rachenraum tritt oftmals eine Kontakturtikaria (Nesselsucht) auf. Der Kontakt des Allergens mit dem Magen-Darm-Trakt kann zu Übelkeit, Bauchkrämpfen, Durchfall oder Erbrechen führen. Schließlich vermag ein in die Blutbahn gelangtes Allergen in weit von seiner Eintrittsstelle entfernten Regionen Reaktionen auszulösen, wozu beispielsweise der anaphylaktische Schock zählt, der im Extremfall tödlich verlaufen kann. Die Symptome der Lebensmittelallergie können das gesamte Spektrum umfassen (WÜTHRICH, 1981, AMLOT, 1987, LICHTENSTEIN, 1993, RING, 1993, WÜTHRICH, 1996a).

2.1.3.2 SENSIBILISIERUNG

Bevor es zum Ausbruch einer Typ I Allergie kommt, erfolgt eine Sensibilisierung des Immunsystems gegen das betreffende Allergen, wobei diese Phase ohne klinische Symptome verläuft. Zur Sensibilisierung kann bereits der einmalige Kontakt mit einem Allergen ausreichen. Abb. 2.2 zeigt eine vereinfachte Darstellung der Sensibilisierungsphase.

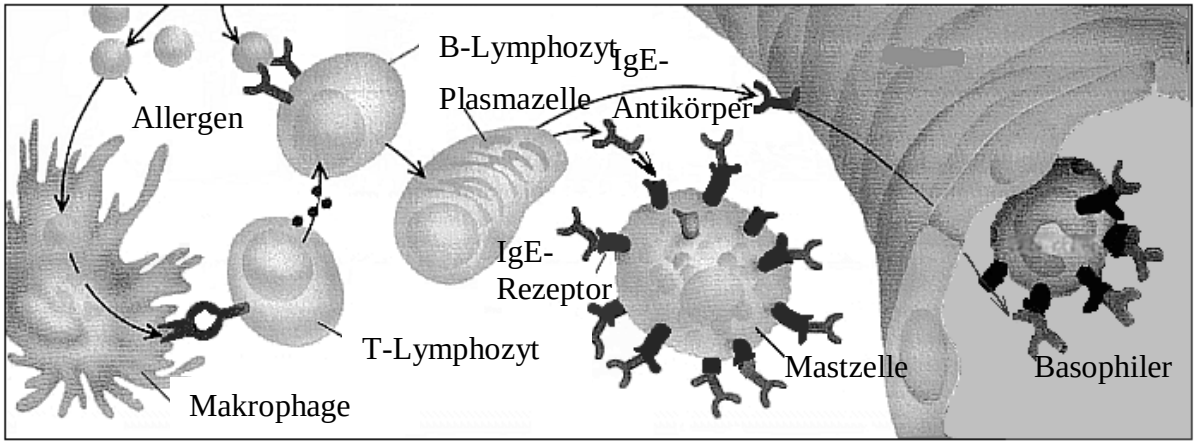


Abb. 2.2: Vereinfachte Darstellung der Sensibilisierungsphase (LICHTENSTEIN, 1993)

Täglich werden große Mengen an nutritiven, potentiell sensibilisierenden Allergenen im Gastroentestinaltrakt verarbeitet. Mit Hilfe der Verdauungsenzyme erfolgt ein Abbau der Proteine zu nicht mehr immunogen wirksamen Molekülen mit MG kleiner 1 kDa. Die lokalen Abwehrmechanismen, einschließlich des sekretorischen IgA, beugen der Aufnahme nicht degradierter Proteine aus dem Darm vor. Die intestinale Barriere ist jedoch unvollständig, weshalb sowohl bei normalen als auch bei allergisch disponierten Personen nutritive Proteine in den Körper gelangen und eine Immunantwort auslösen können (DANNAEUS UND JOHANSSON,

1979, KJELLMAN UND JOHANSSON, 1979, HAMBURGER ET AL., 1983, JÄGER ET AL., 1991, TAYLOR, 1992, HEFLE UND TAYLOR, 1999).

Nach Eintritt des Allergens in den Körper wird es von einem Makrophagen, der hier als antigenpräsentierende Zelle (APZ) wirkt, aufgenommen und enzymatisch in kleinere Peptide gespalten. Diese Peptide werden anschließend auf der Zelloberfläche als sog. T-Zellepitope zusammen mit einem MHC-II-Protein (major-histocompatibility complex) präsentiert.

Ein spezifischer T-Zellrezeptor erkennt das Peptid und führt in Zusammenhang mit Kostimulatorsignalen anderer Oberflächenmoleküle der T-Lymphozyten (T-Zelle) zur Bildung von T-Helferzellen. Der Kontakt mit normalerweise „harmlosen" Antigenen hat die Proliferation von Th1-Zellen zur Folge, die nicht an der Entstehung von Allergien beteiligt sind. Im Gegensatz hierzu kommt es bei der Sensibilisierung mit Allergenen zur Bildung von Th2-Zellen. Diese führen unter Einfluß von Interleukinen (u.a. IL-4, IL-13) zur Differenzierung von spezifischen B-Lymphozyten zu Plasmazellen, die in der Folge IgE-Antikörper sezernieren.

Diese IgE-Moleküle sind durch ihren hochaffinen Rezeptor in der Lage, sich über einen langen Zeitraum an Mastzellen der Haut oder basophile Granulozyten zu binden. Die einmal begonnene Produktion von IgE-Antikörpern dauert über Monate an (ESSER, 1990, BLASER, 1993, LICHTENSTEIN, 1993, ENGELHARD, 1994 , JANEWAY UND TRAVERS, 1995).

2.1.3.3 AKUTSTADIUM

Die Zweitexposition leitet innerhalb von Sekunden ein Stadium der Überemfindlichkeitsreaktion ein, das mit klinischen Symptomen auch äußerlich in Erscheinung tritt.

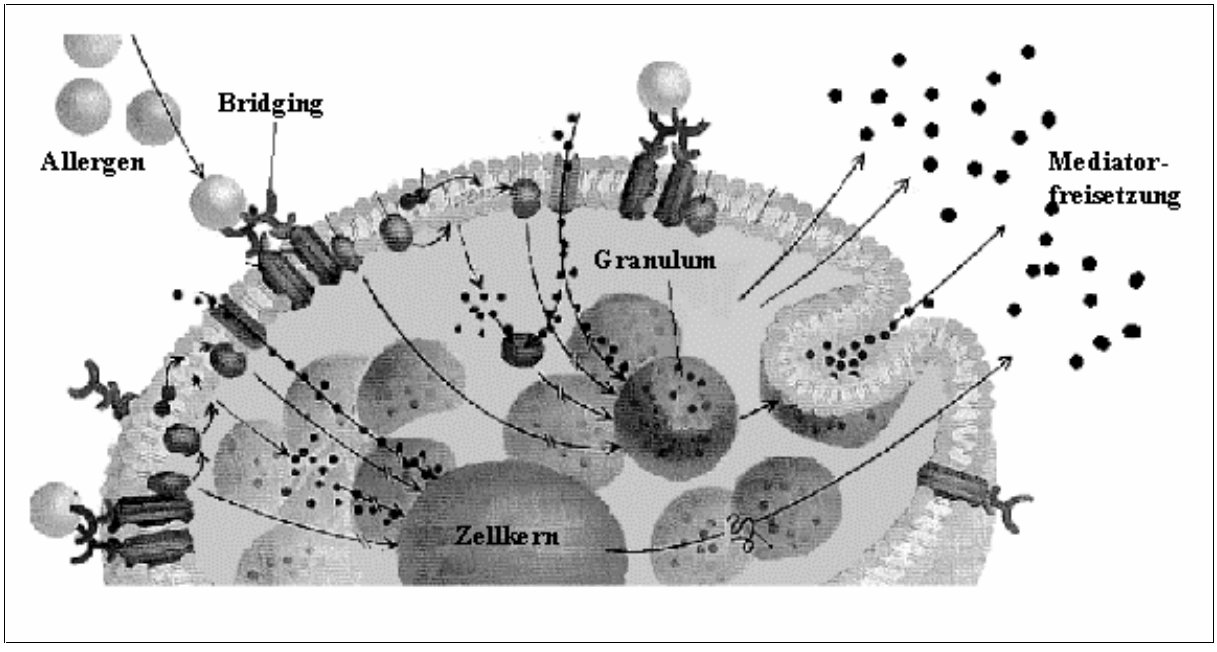


Abb. 2.3: Vereinfachte Darstellung des akuten Stadiums (LICHTENSTEIN, 1993)

Der Verlauf ist in Abb. 2.3 dargestellt. Das Epitop des Allergens bindet sich an das Paratop des zellständigen Antikörpers. Werden zwei IgE-Moleküle vom Allergen überbrückt, zieht es die beiden anhaftenden IgE-Rezeptoren aufeinander zu (bridging) und aktiviert dadurch auf direktem oder indirektem Weg verschiedene Enzyme in der Zellmembran. Kaskaden chemischer Reaktionen, an denen Tyrosinkinasen, Phospholipase C, Proteinkinase C und der Einstrom an Calcium-Ionen beteiligt sind, bewirken die sog. Exozytose.
Hierunter versteht man einen Prozeß der Ausschüttung vorgefertigter Mediatoren wie Histamin aus speziellen zellulären Kompartimenten, den sog. Granula. Die Granula wandern zur Plasmamembran, fusionieren mit ihr und öffnen sich, um ihre Inhaltsstoffe auf die Außenseite der Zelle zu entladen. Dieser Prozeß wird als Degranulation bezeichnet. Andere Kaskaden chemischer Reaktionen bewirken die Freisetzung von Lipiden wie Prostaglandinen und Leukotrienen, die aus Arachidonsäure gebildet werden (CHARKRAVARTY, 1990, KLEIN, 1991, HOLGATE UND CHURCH, 1993, LICHTENSTEIN, 1993).

2.1.3.4 CHRONISCHES STADIUM

Die von Mastzellen in das Gewebe ausgeschütteten Mediatoren können basophile und eosinophile Granulozyten sowie andere im Blut zirkulierende Immunzellen dazu anregen, aus den Gefäßen in das Gewebe überzutreten. Die Mediatoren erleichtern den Blutzellen die Einwan-

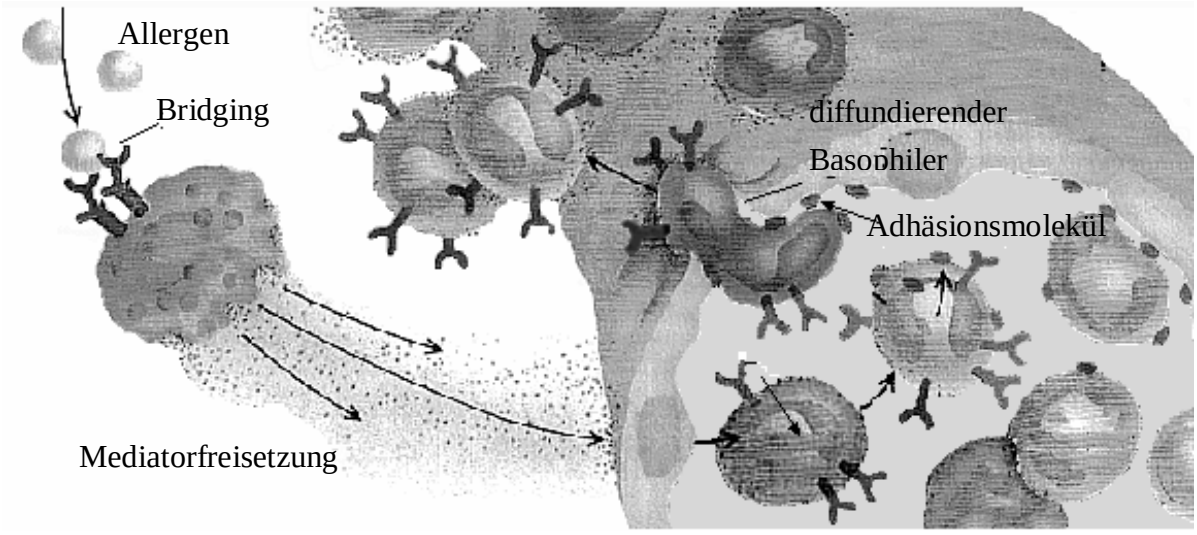


Abb. 2.4: Vereinfachte Darstellung des chronischen Stadiums (LICHTENSTEIN, 1993)

derung, indem sie dafür sorgen, daß sich sowohl auf ihnen als auch auf den Endothelzellen (der „Innenauskleidung“ der Gefäße) sog. Adhäsionsmoleküle bilden und aktiv sind. Die Blutzellen bleiben dadurch an den Endothelzellen haften und diffundieren schließlich zwischen ihnen hindurch in die umgebende Gewebeschicht (Abb. 2.4). Hier schütten sie ebenfalls

Mediatoren aus, die das Gewebe dauerhaft schädigen (HOLGATE UND CHURCH, 1993, LICHTENSTEIN, 1993).

2.1.3.5 ALLERGENE

Stoffe, die eine zelluläre oder humorale Immunantwort hervorrufen können, bezeichnet man als Antigene. Allergene sind solche Antigene, die eine allergische Reaktion im Organismus auslösen. Bei den bisher als Auslöser einer Typ I Allergie identifizierten Substanzen in Lebensmitteln handelt es sich fast ausschließlich um Proteine oder Glycoproteine, aber auch Polysaccharide können antigen wirken. Niedermolekulare Substanzen mit MG von weniger als 1 kDa können nur nach verheriger kovalenter Bindung an Makromoleküle eine Immunantwort auslösen (SWEENY UND KLOTZ, 1987, DEICHER 1990, KLEIN, 1991, ROITT, 1993). Das kleinste bekannte Soforttyp-Allergen ist das Peptid Melittin aus dem Gift der Honigbiene. Es besteht aus 26 Aminosäuren und hat ein MG von 2,84 kDa (KING, 1990).

Epitope sind die Bereiche eines Antigen- oder Allergenmoleküls, die spezifische Bindungen mit Antikörpern oder Rezeptoren von T-Lymphozyten eingehen können. Hierbei müssen nicht notwendigerweise die gleichen Abschnitte des Allergenmoleküls für die Sensibilisierung des Allergikers und die Auslösung von Symptomen verantwortlich sein. Es findet eine grundsätzliche Differenzierung zwischen Sequenz- und Konformationsepitopen statt.

Sequenzepitope hängen ausschließlich von der Sequenz, also der Primärstruktur eines Proteins ab, während Konformationsepitope von der Raumstruktur bestimmt werden und somit durch diskontinuierliche Abschnitte der Polypeptidkette gebildet werden können, wenn z.B. zwei oder mehr Sequenzabschnitte aus unterschiedlichen Bereichen des Proteinmoleküls an ihrem Aufbau beteiligt sind (KING, 1990, JÄGER ET AL., 1991).

2.2 NACHWEIS VON LEBENSMITTELALLERGIEN

Die Diagnose einer Lebensmittelallergie umfaßt die vier Bereiche der Anamnese, Hauttestung, in-Vitro-Tests und Provokation (RING ET AL., 1995, WÜTHRICH, 1996b). Verschiedene Hauttests und der Radioallergosorbent-Test (RAST) bzw. der Enzymallergosorbent-Test (EAST) sind zwar empfindliche Indikatoren bzw. Nachweismethoden für spezifisches IgE, induzieren aber nicht zwingend eine klein. Relevanz (KNOP UND SALOGA, 1996, SAMPSON UND HO, 1997). Daher gilt der doppelt blinde, placebokontrollierte Provokationstest mit dem Allergen als der einzig akzeptierte Nachweis zur eindeutigen Feststellung einer Lebensmittelallergie (BRUIJNZEEL-KOOMEN ET AL., 1995).

2.3 ALLERGENCHARAKTERISIERUNG

Eine Auswahl von Methoden zur Isolierung und Charakterisierung der physikochemischen und immunologischen Eigenschaften von Allergenen stellt Tab. 2.2 dar. Die Charakterisierung eines Allergens sollte neben dem Nachweis einzelner Allergenbanden im IB und der Be-

stimmung des pI und des MG auch eine N-terminale Sequenzierung zur eindeutigen Identifizierung des Allergens einschließen (LIEBERS ET AL., 1995).

Tab. 2.2: Isolierung und Charakterisierung von Lebensmittelallergenen nach BERNHISEL-BROADBENT (1995), LIEBERS ET AL. (1995)

METHODE	ANALYT	ZIEL
RAST/EAST SDS-PAGE/IB IEF/IB 2D-IEF/SDS-PAGE/IB	Allergenextrakt gereinigtes Allergen	IgE-Bindung Molekulargewicht Isoelektrischer Punkt Isoelektrischer Punkt und Molekulargewicht
SDS-PAGE/Elektroelution IEC/SEC AC	Allergenextrakt	Isolierung / Reinigung
Immunoblot-Inhibition RAST- / EAST-Inhibition	Allergenextrakte oder Allergene	Kreuzreaktivität
Protein- /DNA-Sequenzierung Kohlenhydratanalyse	gereinigtes Allergen bzw. DNA	Primärstruktur Kohlenhydratzusammensetzung
Chemische oder enzymatische Fragmentierung	gereinigtes Allergen	Sequenzepitope
Festphasensynthese Polymerase-Kettenreaktion	synthetische Peptide rekombinante Peptide	Sequenzepitope Sequenzepitope
Massenspektrometrie NMR-Spektroskopie Röntgenstrukturanalyse	gereinigtes Allergen Antigen-Antikörper-Komplex	Molekulargewicht Konformationsepitope 3D-Struktur

Weiterführende Untersuchungen können den Nachweis von Kreuzreaktivitäten zum Ziel haben, wie dies in der Literatur am Beispiel von Kiwi-, Apfel- und Birkenpollenallergenen beschrieben wird (MÖLLER ET AL., 1997a).

2.4 ALLERGENE IN LEBENSMITTELN

Bei den Komponenten, die bislang eindeutig als Auslöser einer Lebensmittelallergie identifiziert werden konnten, handelt es sich ausschließlich um Proteine oder Glycoproteine mit MG zwischen 10 und 70 kDa. Die untere Grenze wird von der Immunogenität bestimmt, die obere vermutlich von der Permeabilität der Schleimhautmembranen (JÄGER ET AL., 1991, TAYLOR, 1992, HEFLE UND TAYLOR, 1999). Als Hauptallergene bezeichnet man Proteine oder Glycoproteine, gegen die mehr als 50 % der getesteten Patienten spezifische IgE-Antikörper aufweisen (VIETHS ET AL., 1996). Bei Abschätzung der minimalen Substanzmengen, die zur Auslösung einer Allergie führen, kann nach BALDO UND TOVEY (1989) davon ausgegangen werden, daß bereits Pikogrammengen ausreichend sind. Fisch, Hühnereier, Kuhmilch und pflanzliche Lebensmittel sind häufig Auslöser von Lebensmittelallergien. Eine Sensibilisierung gegen die beiden erstgenannten Lebensmittel sowie gegen Sojabohnen ist sehr häufig bei Kindern anzutreffen. Auf pflanzliche Lebensmittel reagieren vorwiegend Erwachsene mit allergischen Symptomen, wobei hier häufig eine sog. pollenassoziierte Lebensmittelallergie vorliegt. In pflanzlichen Lebensmitteln und Pollen findet man oft Isoallergene eines individu-

ellen Allergenmoleküls. Hierbei handelt es sich um Moleküle mit gleicher oder sehr ähnlicher Antigenität, gleichen funktionellen Eigenschaften und einer Aminosäuresequenzidentität von wenigstens 67 %. Die Unterschiede sind neben der Variation der Aminosäuresequenz z.T. auch in einem unterschiedlichen Glycosilierungsmuster begründet. Eine pollenassoziierte Lebensmittelallergie kommt vorwiegend bei Patienten mit einer Sensibilisierung gegen Birken- und/oder Beifußpollen vor (ERIKSSON ET AL., 1982, WÜTHRICH UND HOFER, 1984, WÜTHRICH UND DIETSCHI, 1985, HOFFMANN-SOMMERGRUBER ET AL., 1997, FRITSCH ET AL., 1998, VIETHS ET AL., 1998). So zeigen beispielsweise 50 bis 93 % der Birkenpollenallergiker die klinischen Symptome einer Lebensmittelallergie. Die Birkenpollenallergie ist hauptsächlich mit einer Allergie gegen Apfel, Birne, Kirsche und andere Steinfrüchte, Kiwi, Sellerie, Karotte und Haselnuß assoziiert. Eine Sensibilisierung gegen Sellerie, Karotten und Umbelliferen ist häufig bei Beifußpollenallergikern zu beobachten. Demgegenüber ist die Allergie gegen Gräserpollen nur sehr selten mit einer Lebensmittelallergie assoziiert. In der Literatur werden hierfür nur wenige Beispiele, die vorwiegend aus dem Mittelmeerraum stammen, genannt (DE MARTINO ET AL., 1988, ORTOLANI ET AL., 1993, BOCCAFOGLI ET AL., 1994). In diesem Zusammenhang werden die Allergien gegen Tomate, Erdnuß, Melone und Orange erwähnt.

Bislang wurden drei wesentliche kreuzreaktive Strukturen in Pollen und pflanzlichen Lebensmitteln beschrieben:

1. Die meisten birkenpollenassoziierten Lebensmittelallergien begründen sich auf niedermolekulare pflanzliche Proteine, die gemeinsame Epitopstrukturen mit dem Bet v 1, dem Hauptallergen der Birkenpollen, aufweisen. Solche Allergene wurden bisher in Apfel, Haselnuß, Kirsche, Birne, Sellerie und Karotte nachgewiesen (EBNER ET AL., 1991, HIRSCHWEHR ET AL., 1992, VIETHS ET AL., 1993, VIETHS ET AL., 1994b, EBNER ET AL., 1995). Diese Allergene, die auch als „Bet v 1-Familie“ bezeichnet werden, sind in zahlreichen Pollen von Bäumen, aber nicht in Gräserpollen, zu finden (BAUER ET AL., 1996). Hierdurch gibt es keine Kreuzreaktivität zu Beifußpollenallergikern.
2. Profiline sind ebenfalls als Auslöser für Kreuzreaktionen zwischen Pollen und Früchten unterschiedlicher botanischer Herkunft ermittelt worden (VALENTA ET AL., 1992, VAN REE ET AL., 1992, BERNHISEL-BROADBENT, 1995, EBNER ET AL., 1995, VIETHS ET AL., 1995, BAUER ET AL., 1996, PETERSEN ET AL., 1996, LEITNER ET AL., 1998a). Profiline sind Proteine mit einem MG von 12–15 kDa, die in einer großen Anzahl von Pflanzen vorkommen. Sie sind mit Actin, Profilactin und Prolylhydroxylase assoziiert und Bestandteil einer Vielzahl physiologischer Prozesse, wie beispielsweise der Signaltransduktion oder der Actinpolymerisation (VALENTA ET AL., 1991a, RIHS ET AL.,1994, LEITNER ET AL., 1998a). Da nur 10-20 % der Pollenallergiker auf Profiline reagieren, ist ihre Relevanz wesentlich geringer als die der Bet v 1-Familie. Demgegenüber kann es bei einer Sensibilisierung gegen Profiline zu einer ungleich größeren Zahl an Allergien gegen pflanzliche Lebensmittel kommen.

3. Weiterhin ist bekannt, daß Glycoproteine ebenfalls kreuzreaktiv wirken können, wobei dieses Phänomen erst in neuerer Zeit intensiv untersucht wird. So ist beispielsweise bekannt, daß ein Hauptallergen der Beifußpollen, das Art v 1, zur Gruppe der Glycoproteine zählt (HEISS ET AL., 1996, GROTE ET AL., 1998). Dieses Allergen wird auch als eines der Allergene betrachtet, das für die Kreuzreaktion zwischen Beifußpollen, Birkenpollen und Sellerie verantwortlich ist (BAUER ET AL., 1996). Die Sequenz des Art v 1 ist bis heute nicht bekannt, da einerseits der N-Terminus des Proteins maskiert ist und andererseits eine Spaltung des Proteins mit Trypsin nicht möglich ist. Auch gelang es bisher nicht, die cDNA-Sequenz zu ermitteln, was mit posttranslationalen Veränderungen nach der Proteinsynthese erklärt wird (HEISS ET AL., 1996, GROTE ET AL, 1998). Bekannt ist jedoch, daß die spez. IgE-Antikörper stark kreuzreaktiv reagieren (TRETTER ET AL., 1993, SANTIAGO ET AL., 1998, BATANERO ET AL., 1999). In einigen Fällen wurde eine IgE-Reaktivität gegen fast alle pflanzlichen Lebensmittel nachgewiesen (VIETHS ET AL., 1996). In vielen Studien wurde gezeigt, daß der Kohlenhydratanteil keinen Einfluß auf die IgE-Bindung besitzt (BESLER ET AL., 1997, BREITENEDER ET AL., 1989, Nilsen et al., 1990). Dagegen konnten VIETHS ET AL. (1994c) nachweisen, daß einige Kohlenhydrate, insbesondere Stachyose, Lakto-N-tetraose und Xylan in der Lage sind, eine spezifische IgE-Bindung zu bewirken. Nach Deglycosilierung von Apfel- und Sellerieproteinen konnte anschließend im höheren MG-Bereich (> 30 kDa) keine IgE-Bindung mehr festgestellt werden.

Daß die Konzentration der Allergene in einer Frucht mitunter stark von der Sorte abhängig ist, konnten VIETHS ET AL. (1993, 1994a) sowie LI-SHAN ET AL. (1995) zeigen. Sie wiesen nach, daß die „alten“ Apfelsorten wie Jamba, Gloster oder Boskop einen geringeren Gehalt am Hauptallergen Mal d 1 aufweisen als beispielsweise die Sorten Granny Smith und Golden Delicious. Ferner konnten sie am Beispiel der Sorte Golden Delicious nachweisen, daß der Gehalt am Mal d 1 im Verlauf der Reifung zunahm (VIETHS ET AL., 1994a, LI-SHAN ET AL., 1995).

2.5 ALLERGIEN GEGEN MANGO

Das Auftreten von Allergien im Sinne einer Typ I Reaktion nach dem Verzehr von Mangos wurde erstmals 1965 von RUBIN ET AL. beschrieben. Seitdem wurde diese Reaktion mehrfach erwähnt (DANG UND BELL, 1967, IPPEN, 1983, WÜTHRICH UND HOFER, 1984, JANSEN ET AL., 1992). MIELL ET AL. (1988) berichten über einen besonders schweren Fall der Typ I Reaktion nach dem Verzehr der Frucht. Als Symptome traten Atemnot, generalisierte Urtikaria sowie Erytheme im Gesicht auf. In einer in Frankreich durchgeführten Studie konnten ANDRE ET AL. (1994) nachweisen, daß aus einem Kollektiv von 580 Patienten mit nachgewiesener Lebensmittelallergie 6 % allergisch auf Mango reagierten.

Abb. 2.5: Kontaktdermatitis nach Schälen einer Mango und anschließendem Berühren des Armes mit der Hand (TUCKER UND SWAN, 1998)

Als Grund für diese relativ hohe Zahl ist das Vorkommen von Kreuzreaktivitäten zu vermuten. So berichten WÜTHRICH UND HOFER (1984) von zwei Probanden, die scheinbar ohne vorherige Sensibililierung nach Genuß einer Mango mit einer allergischen Reaktion vom Soforttyp reagierten. Sie vermuteten, daß zwischen Mango und Sellerie bzw. Beifußpollen eine Kreuzreaktion vorliegt. WELLHAUSEN ET AL. (1996) beschreiben ein Minorallergen der Birkenpollen mit einem MG von 35 kDa. Sie untersuchten dieses mittels IB- und EAST-Inhibition und konnten nachweisen, daß dieses Allergen mit einem ähnlich großen Allergen in Mango-, Kiwi- und Litchifrüchten sowie in Banane, Apfel, Birne und Karotte kreuzreagiert. FERNANDEZ ET AL. (1995) wiesen mittels Hauttest und RAST-Inhibitionstest eine Kreuzsensibilisierung zwischen Pistazie, Erdnuß und Mango nach. Nach JANSEN ET AL. (1992) eignet sich das Fruchtfleisch der Mango besser für Hauttestungen als die Schale.

Von einer Kontaktdermatitis (Typ IV Reaktion, s. Tab. 2.1) gegen Mango berichten GEROSO UND ELPERN (1992), CALVERT ET AL. (1996) sowie TUCKER UND SWAN (1998). Die Symptome wurden hier auf die natürlichen Inhaltsstoffe Urushiol, ß-Pinen und Limonen zurückgeführt (s. Abb. 2.5).

2.6 DIE MANGOFRUCHT

Die **Mango** (*Mangifera indica L.*) gehört zur Familie der Anacardiaceae und ist in Ostasien beheimatet. Sie wird dort bereits seit 4000 Jahren kultiviert. Heute wird die Mango auch in den Subtropen, wie Israel, Kenia, Florida und Südafrika angebaut. Die Mangifera indica gehört zu den Sumachgewächsen und zählt in den Anbaugebieten zur wirtschaftlich wichtigsten Gattung.

Abb. 2.6: Mangofrucht der Sorte TA

Der Baum wird bis zu 30 m hoch mit sehr dicker, kugeliger, breiter Krone, länglich-zugespitzten Blättern und kleinen gelblich-grünen, in Rispen stehenden Blüten. Die Steinfrucht ist nieren- bis birnenförmig, gelb, rot oder grün und kann bis zu 2 kg schwer werden (FRANKE, 1997). Die nicht eßbare, ledrige Schale bedeckt ein gelb- bis orangerotes, saftiges, faseriges Fruchtfleisch mit großem Steinkern, der sich nur schwer herauslösen läßt, da er mit dem Fruchtfleisch verwachsen ist (s. Abb. 2.6). Mangos werden meist frisch verzehrt, aber auch zu Naßkonserven, Getränken, Marmeladen, Mus, Soßen oder Kleinkindernahrung verarbeitet (HERRMANN, 1993).

1994 wurden weltweit 18,5 Mill. Tonnen Mango geerntet, davon allein 10 Mill. Tonnen in Indien. Da die Früchte nur kurze Zeit lagerfähig sind, wurden sie in der Vergangenheit nur selten exportiert. Durch die Globalisierung des Welthandels und eine Verbesserung der Transport- und Lagerungsbedingungen nimmt auch die Beliebtheit der Mango zu. Durch den Luftfrachttransport sind Mangos in Deutschland mittlerweile ganzjährig erhältlich. In Europa sind hauptsächlich die Sorten TA, Osteen, Eden und Ngowe von Bedeutung, da in vielen der insgesamt über 1000 Mangosorten ein starkes Terpenaroma zu verzeichnen ist, was in Europa vom Verbraucher nicht akzeptiert wird (LIEBSTER, 1988, HERRMANN, 1993, FRANKE, 1997).

Für die Untersuchungen wurden die hauptsächlich in Europa vertriebenen Sorten eingesetzt. In Tab. 2.3 sind die Merkmale der verwendeten Früchte aufgeführt.

Tab. 2.3: Merkmale der untersuchten Mangosorten

	OSTEEN	**EDEN**	**TA**	**NGOWE**
Herkunft	Spanien	Israel	Brasilien	Kenia
Form	kartoffelförmig	unregelmäßig rundoval	unregelmäßig rundoval	keimlingform
Farbe	grünrot	gelbrot	grünrot	gelb
Geschmack	fruchtig, saftig Intensiv	saftig, leicht wäßrig, bitterer Nachgeschmack	nicht intensiv leicht säuerlich	wäßrig, grün, bitterer Nachgeschmack

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 UNTERSUCHUNGSMATERIAL

Die Mangofrüchte zur Herstellung der Extrakte wurden vom Großmarkt Hamburg bezogen, da dort genaue Angaben über Sorte, Herkunftsland und Erntezeitpunkt gemacht werden konnten. Für die Untersuchungen wurden die vier am häufigsten in Europa vertriebenen Mangosorten, TA, Osteen, Eden und Ngowe, ausgewählt, die fünf Tage vor der Herstellung der Allergenextrakte geerntet wurden. Die anderen Früchte und Gemüse (Sellerie und Karotte) wurden im reifen Zustand erworben. Die Beifuß- und Birkenpollenallergenextrakte wurden von der Fa. Allergopharma, Reinbek, kommerziell bezogen. Das Hauptallergen der Birkenpollen, Bet v 1, wurde im Forschungslabor der Fa. Allergopharma, Reinbek, mittels Affinitätschromatographie unter Verwendung monoklonaler Antikörper aus dem Birkenpollenextrakt isoliert und zur Verfügung gestellt.

3.2 PATIENTENSEREN

Patienten mit einer pollenassoziierten Lebensmittelallergie sowie einer Typ I Allergie bzw. einer Sensibilisierung gegen Mango, Sellerie, Karotte, Beifuß- oder Birkenpollen wurden in Zusammenarbeit mit der Hautklinik des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf (Patienten KDH, GS usw.), der Klinik Borkum der BfA, Borkum (Patienten Bo 507, Bo 508 usw.) rekrutiert und deren Seren gewonnen (s. Anh. 7.1). Darüberhinaus wurde das Serum Mast 103 kommerziell von der Firma Mast Diagnostica, Reinfeld, bezogen.

3.3 EXTRAKTION DER ALLERGENE

Vorraussetzung für die Extraktion der Proteine aus den pflanzlichen Lebensmitteln ist die möglichst vollständige Isolierung der globulären Proteine und Glycoproteine im nativen Zustand. Dies wird durch den geringen Gehalt an Proteinen und den hohen Gehalt an phenolischen Inhaltsstoffen erschwert. Bei der industriell häufig eingesetzten Extraktion des zerkleinerten Gewebes mit wäßrigen Pufferlösungen bei 4 °C kommt es zu einer Zerstörung der Zellkompartimente, wodurch Phenole freigesetzt werden, die durch enzymatische Bräunungsreaktionen zu Melaninen umgesetzt werden. Diese Reaktion bewirkt einen Allergenitätsverlust des Extraktes (MC EVILY ET AL., 1992, VIETHS ET AL., 1992a, VIELUF ET AL., 1997).

Bei der von CLEMENTS (1965) entwickelten und von VIETHS ET AL. (1992a) modifizierten Tieftemperaturmethode wird das pflanzliche Gewebe mit Aceton bei –40 °C homogenisiert, filtriert und der gewaschene Rückstand lyophilisiert. Durch diese Vorbehandlung werden die in Aceton gelösten phenolischen Inhaltsstoffe abgetrennt. Des weiteren wird durch die tiefe Temperatur die Enzymaktivität unterdrückt. Aus dem Lyophilisat werden die Proteine mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) oder bidest. Wasser extrahiert (s. Anh. 7.2).

Die wäßrigen Extrakte werden zur Isolierung der Allergene mittels Ionenaustauschchromatographie verwendet.

3.4 QUANTIFIZIERUNG DES PROTEINGEHALTES

Die Quantifizierung des Proteingehaltes der Allergenextrakte erfolgt nach der photometrischen Methode von BRADFORD (1976). Als Farbreagenz wird hierbei Coomassie Brilliant Blue (CBB) verwendet. Die Farbreaktion beruht auf der Anlagerung der negativ geladenen Farbstoffmoleküle an die Aminogruppen der Proteine. Der Protein-Farbstoff-Komplex, der zu einem Farbumschlag von rot nach blau führt, wird photometrisch bei 590 nm vermessen. Die Bestimmung kann ohne weitere Aufarbeitung aus den Allergenextrakten durchgeführt werden. Die quantitative Bestimmung erfolgt durch Erstellen einer Kalibriergeraden mit Rinderserumalbumin (BSA) (s. Abb. 7.1 im Anhang). Da BSA und die Proteingemische der Allergenextrakte unterschiedliche Responsefaktoren besitzen, ist lediglich eine Abschätzung und ein Vergleich der Extrakte untereinander möglich. Eine absolute Proteinbestimmung erfolgt hierbei nicht. Die Durchführung der Bestimmung ist in Anhang 7.3 beschrieben.

3.5 ENZYMALLERGOSORBENT-TEST (EAST)

Der EAST ist eine enzymimmunologische Methode zur Messung des freien, spezifischen IgE im Blutserum und stellt eine Variante des RAST dar. Er zählt zu den wichtigsten in vitro-

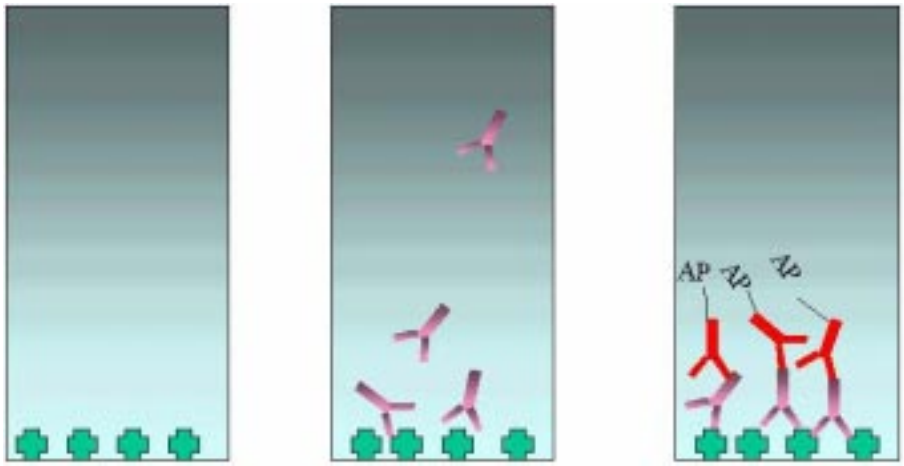


Abb. 3.1: PRINZIP DES EAST: Eine Cellulosescheibe mit gebundenem Allergen (1) wird mit Patientenserum inkubiert, wobei spez. IgE-Antikörper an die festphasengebundenen Allergene binden (2). Anschließend wird das spez. IgE mit enzymgelabeltem anti-IgE (gelabelt mit alkalischer Phosphatase (AP)) versetzt (3). Die AP wird in einer enzymatischen Farbreaktion mit p-Nitrophenylphosphat (PNPP) zum gelbgefärbten p-Nitrophenolat umgesetzt und anschließend photometrisch detektiert.

Untersuchungen bei Diagnose einer Lebensmittelallergie. Das Prinzip des EAST geht aus Abb. 3.1 hervor.

Zur Herstellung der Festphasen für die Kopplung der Allergene werden bromcyanaktivierte Cellulosescheiben (s. Anh. 7.4.1) mit den entsprechenden Allergenen inkubiert, wobei eine kovalente Bindung der Proteine an die Festphase erfolgt.

Adsorbierte Substanzen werden durch Waschen entfernt und verbliebene reaktive Bereiche mit Ethanolamin abgesättigt (CESKA UND LUNDKVIST, 1972, s. Anh. 7.4.2).
Hierbei erfolgt die Auswertung des EAST über Referenzseren mit bekanntem IgE-Gehalt gegen Lieschgras unter Verwendung der entsprechenden Festphasen. Die Ergebnisse werden in Units (U; 1 U = 2,4 ng IgE) oder in EAST-Klassen (0-4) angegeben (s. Anh. 7.4.3).

3.6 EAST-INHIBITION

Durch die EAST-Inhibition ist es möglich, eine Allergenverwandtschaft zu ermitteln. Sie dient damit einerseits dem Nachweis und der relativen Quantifizierung einer Kreuzreaktivität, andererseits kann beispielsweise eine Überprüfung und relative Quantifizierung der Sorten- und Lagerungsabhängigkeit der Allergenität einer Frucht durchgeführt werden.
Bei der EAST-Inhibition handelt es sich um einen kompetitiven Hemmtest, bei dem ein Serum mit bekanntem Gehalt an spez. IgE vor der EAST-Bestimmung mit einer Inhibitorlösung, die ein zweites, auf Kreuzreaktionen zu prüfendes Allergen enthält, versetzt wird. Dabei konkurrieren die festphasengebundenen Allergene mit den Allergenen in Lösung um das spez. IgE. Die Anwesenheit kreuzreagierender Allergene führt somit zu einer Verminderung des Meßsignals. Je stärker die Kreuzreaktivität, d.h. je stärker die Übereinstimmung der Epitope, desto stärker nimmt das Meßsignal ab. In den Untersuchungen wurde jeweils eine Verdünnungsreihe zur EAST-Inhibition eingesetzt, und es wurde die Proteinkonzentration, die zu einer 50 %igen Verminderung des Meßsignals führten (C_{50}-Wert) sowie die maximalen Inhibitionen bestimmt. Durch den C_{50}-Wert kann die allergene Potenz verschiedener Extrakte miteinander verglichen werden. Zur Überprüfung der Richtigkeit der Testdurchführung wird immer eine homologe Inhibition durchgeführt, d.h., das festphasengebundene Allergen wird mit sich selbst inhibiert, wodurch es zu einer starken Reduzierung der IgE-Bindung kommen muß. Unspezifische Hemmungen wurden mit Ovalbumin (OA) als Inhibitor ausgeschlossen. Unspezifische Bindungen wurden durch die Verwendung eines Kontrollserums eines nicht allergisch reagierenden Probanden ausgeschlossen. Die Durchführung ist in Anhang 7.5 beschrieben.

3.7 ELEKTROPHORESE

Bei der Elektrophorese wandern geladene Moleküle in einem elektrischen Gleichstromfeld jeweils in Richtung der Elektrode mit entgegengesetztem Vorzeichen. Die elektrophoretische Trennung von Proteinen wird unter Verwendung von Trägermaterialien durchgeführt. Eingesetzt wurden in der vorliegenden Arbeit ausschließlich Polyacrylamidgele, die durch Copolymerisation von Acrylamid und N,N´-Methylenbisacrylamid (Bis) erhalten wurden.

Durch die nachstehend definierte Totalacrylamidkonzentration T und den Vernetzungsgrad C (engl.: crosslinker) wird die Porengröße der Gele definiert:

$$T\,[\%] = \frac{a+b}{V} \bullet 100 \qquad C\,[\%] = \frac{b \bullet 100}{a+b}$$

mit a: Masse Acrylamid [g], b: Masse Bis [g], V: Volumen [mL]

3.7.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

In der SDS-PAGE werden Proteine ausschließlich nach ihrem MG getrennt. Hierzu werden die Proteine mit dem anionischen Detergenz SDS beladen und die Disulfidbrücken reduktiv mit 2-Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT) gespalten. Es werden rund 1,4 g SDS pro g Protein gebunden. Durch das SDS wird die Eigenladung der Proteine unterdrückt, und das resultierende Ladungs-/Masse-Verhältnis der SDS-Protein-Micellen ist für alle Proteine, mit Ausnahme von Glycoproteinen, gleich (GUTTMAN, 1996). Durch die Reduktion kommt es zu einer einheitlichen Form der Micellen. Die Trennung der so behandelten Proteine erfolgt in sogenannten restriktiven Gelen, die aufgrund ihrer engen Poren die Wanderung großer Micellen stärker behindern als die kleinerer Micellen. Die resultierende Wanderungsgeschwindigkeit ist somit proportional zum MG. Ausgewertet wurde anhand von Markerproteinen (s. Anh. 7.6.1).

Die Trennung der Proteine im MG-Bereich von 14-94 kDa erfolgte in dem 1970 von LÄMMLI beschriebenen diskontinuierlichen (disk.) SDS-PAGE-System. Es wurde ein weitmaschiges Sammelgel (6 % T, 3 % C) und ein engmaschiges Trenngel (13 % T, 3 % C) verwendet. Das im Elektrodenpuffer gelöste Glycin führt im Sammelgel bei pH 6,8 als Folgeion zur Konzentrierung der Proben. Im restriktiven Gel erhöht sich die elektrophoretische Mobilität des Glycins bei pH 8,8 und es wird zum Leition (Durchführung s. Anh. 7.6.1).

3.7.2 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Bei der IEF werden Proteine nach ihren pI in einem pH-Gradienten getrennt. Entsprechend ihrer Ladung wandern sie im Gradienten in Richtung Anode oder Kathode und werden bei Erreichen des pH-Wertes, der ihrem pI entspricht, fokussiert, da ihre Nettoladung bei diesem pH-Wert gleich Null ist. In dieser Arbeit wurden freie Trägerampholyte zur Ausbildung des pH-Gradienten von 2-11 verwendet. Damit die Proteine ungehindert im Gel fokussiert werden konnten, wurde ein nicht restriktives Gel (5 % T, 3 % C) eingesetzt. Die Auswertung erfolgte durch visuelle Abschätzung des pI anhand von Markerproteinen. Die Durchführung ist in Anhang 7.6.2 beschrieben (WESTERMEIER, 1990).

3.7.3 2D-Elektrophorese

Die Kombination von IEF und SDS-PAGE wird als 2D-Elektrophorese bezeichnet. Mit ihr kann eine hohe Auflösung komplexer Proteingemische bzw. eine Trennung von Isoproteinen erreicht werden. Nach Trennung in der ersten Dimension (IEF) werden die Proben in der SDS-PAGE nach ihrem MG getrennt. Die Abschätzung von pI und MG erfolgte anhand von Markerproteinen (Durchführung s. Anh. 7.6.3).

3.7.4 Semidry-Blotting

Das Übertragen von elektrophoretisch getrennten Proteinen aus dem Trägergel auf Membranen kann mittels Semidry-Blotting erfolgen. Es wurde nach der Methode von KHYSE-ANDERSEN (1984) mit zwei horizontalen Graphitelektroden, zwischen denen mit Puffer getränkte Elektrodentücher sowie die Blottingmembran und das Gel angeordnet werden, gearbeitet. Zur Durchführung einer anschließenden Immundetektion wurden Nitrocellulose (NC)–Membranen und ein diskontinuierliches Puffersystem eingesetzt (VIETHS ET AL., 1992b). Für eine anschließende Aminosäuresequenzierung wurde eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)–Membran verwendet, da NC gegenüber den Reagentien des Edman-Abbaus nicht stabil ist. Die Durchführung des Semidry-Blotting ist in Anhang 7.6.4 beschrieben.

3.8 FÄRBUNG ELEKTROPHORETISCH GETRENNTER PROTEINE

3.8.1 Färbung in Gelen

Zur unspezifischen Färbung von elektrophoretisch getrennten Proteinen in der Gelmatrix wurden zwei Färbemethoden eingesetzt:

3.8.1.1 Coomassie brilliant blue (CBB)-FÄRBUNG

Hierbei handelt es sich um eine reversible Proteinfärbung mit dem Farbstoff CBB R-250. Diese Färbung ist besonders geeignet, wenn weitere Untersuchungen, wie Elektroelution oder Blotting, der elektrophoretisch getrennten Proteine erfolgen sollen. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei ca. 30 ng Protein pro Bande. Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an die 1986 veröffentlichte Methode von FLING UND GREGERSON (s. Anh. 7.7.1).

3.8.1.2 SILBERFÄRBUNG

Diese Färbemethode ist um den Faktor 100 sensitiver als die CBB-Färbung, sie ist jedoch irreversibel, weshalb eine weitere Untersuchung der Proteine nach Silberfärbung nicht mehr möglich ist. Bei dieser Methode werden Silber-Ionen in das Polyacrylamid-Gel und an die Protein-Banden gebunden. Beim Reduktionsschritt mit Formaldehyd werden aufgrund der Erniedrigung des Redoxpotentials zuerst die an die Proteine assoziierten Ionen zu elementarem Silber reduziert (MORRISEY, 1981). Die Durchführung ist in Anhang 7.7.2 beschrieben.

3.8.2 Färbung auf Membranen

3.8.2.1 Unspezifische Färbungen

Zur unspezifischen Färbung auf Blotting-Membranen wurden drei Färbemethoden eingesetzt. Die Färbung der Proteine auf NC-Membranen erfolgte mittels Indian-Ink-Färbung nach Hancock und Tsang (1983) sowie der kolloidalen Goldfärbung nach Danscher und Noorgard (1983). Die Anfärbung der Proteinbanden auf PVDF-Membranen erfolgte nach der Methode von Ward et al. (1990) mit CBB R-250. Die Durchführung der Methoden ist in Anhang 7.8.1-7.8.3 aufgeführt.

3.8.2.2 Spezifische Immunfärbung mit Antikörpern

Die spezifische Proteinfärbung mit Antikörpern auf Membranen wird auch als IB bezeichnet (Stott, 1989). In dieser Arbeit wurden verschiedene Antikörper zur spezifischen Detektion eingesetzt. Zur Visualisierung allergener Proteine erfolgte die Färbung mit spezifischem IgE aus Humanseren. Zum Nachweis von Profilinen wurden Kaninchen-Antikörper eingesetzt. Durch Detektion mit biotinylierten Lectinen erfolgte ein Nachweis von Glycoproteinen.

3.8.2.2.1 Detektion mit Human IgE

In dieser Arbeit wurde die Methode zum spezifischen Nachweis von allergen wirkenden Proteinen nach Vieths et al. (1992b) eingesetzt. Hierbei handelt es sich um eine verstärkte immunochemische Detektion IgE-bindender Proteine oder Glycoproteine auf NC-Membranen. Nach der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit Milchproteinen werden die Proteine oder Glycoproteine mit einer Reihe von Antikörpern verschiedener Spezifität inkubiert (s. Abb. 3.2) und anschließend unter Zuhilfenahme einer enzymatischen Farbreaktion visualisiert.

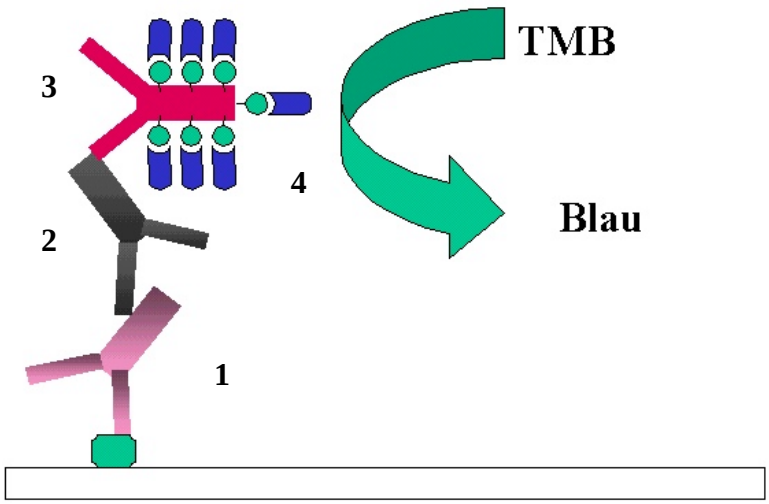


Abb. 3.2: Prinzip des Immunoblottings Die IgE Antikörper der Patientenseren binden an die getrennten und immobilisierten Allergene (1). Die IgE-Antikörper werden nun mit Kaninchen Anti-Human-IgE (2) und mehrfach biotinyliertem Anti-Kaninchen IgG von der Ziege inkubiert (3). An das eine Anti-Kaninchen IgG binden mehrere Streptavidin-Meerrettichperoxidase-(HRP)-Moleküle (4), woraus sich ein Verstärkungseffekt ergibt. Es schließt sich eine enzymatische Farbreaktion mit 3,3´,5,´-Tetramethylbenzidin (TMB) an, wodurch sich eine Blaufärbung der Allergene ergibt.

Um eine unspezifische Bindung auszuschließen, wird bei jeder Detektion zusätzlich ein Kontrollserum eingesetzt. Die Durchführung der Untersuchung ist in Anhang 7.9.1 beschrieben.

3.8.2.2.2 IB-Inhibition

Die IB-Inhibition entspricht dem System der EAST-Inhibition. Hier wird ebenfalls vor der immunologischen Detektion das Patientenserum mit dem auf Kreuzreaktivität zu prüfenden Allergenextrakt, dem Inhibitor, inkubiert. Die Anwesenheit von kreuzreagierenden Allergenen im Inhibitorextrakt führt aufgrund der Konkurrenzreaktion zwischen gelöstem und gebundenem Allergen zu einer Schwächung bzw. Löschung von Banden auf der NC-Membran (MÖLLER ET AL., 1997a). Wie bei der EAST-Inhibition wird auch hier die Methode durch homologe Inhibition bzw. durch Prüfung auf unspezifische Inhibition mit OA kontrolliert. Die Durchführung des Versuchs mit dem Kontrollserum einer nicht allergisch reagierenden Person dient der Prüfung auf nichtspezifische Bindung (Durchführung s. Anh. 7.9.2).

3.8.2.2.3 Nachweis von Profilinen

Auf die Bedeutung der Profiline als kreuzreagierende Allergene in Pollen und Früchten wurde bereits eingegangen.

Der Nachweis von Profilinen erfolgt mit polyklonalen Antikörpern. Die Gewinnung erfolgt nach Immunisierung von Kaninchen mit Profilinen von Pollen oder Lebensmitteln. In diesen Untersuchungen wurden Seren, die gegen Profiline von Sellerie und Traubenkraut gerichtet waren, verwendet, was aufgrund der engen Verwandtschaft von Profilinen unterschiedlicher Herkunft möglich ist. Für den Nachweis wurden die Proteine wie beschrieben mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf NC transferiert. Nach Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte die Inkubation mit den Profilinen. Die weitere Detektion erfolgte wie unter 3.8.2.2.1 beschrieben (s. Anh. 7.9.3) (VIETHS ET AL., 1994b, FÄH ET AL., 1995).

3.8.2.2.4 Nachweis von Kohlenhydratstrukturen mittels Lectinblot

Auf die Bedeutung der Glycoproteine unter den Lebensmittelallergenen ist bereits eingegangen worden. Lectine sind Proteine oder Glycoproteine, die sowohl im pflanzlichen als auch im tierischen Organismus vorkommen. Aufgrund ihrer chemischen Struktur binden sie spezifisch an Kohlenhydratstrukturen und können somit zur Detektion von Zuckern eingesetzt werden. Im Lectinblot werden die einzelnen Streifen der NC-Membran mit biotinylierten Lectinen inkubiert. Die genaue Durchführung ist in Anhang 7.9.4 beschrieben (VIETHS ET AL., 1994a).

3.9 VERFAHREN ZUR ALLERGENISOLIERUNG

3.9.1 Ionenaustauschchromatographie (IEC)

Die IEC stellt eine schonende Technik zur Trennung von Proteinen und Peptiden dar. Somit ist eine Aufrechterhaltung der biologischen Aktivität wahrscheinlich (MALMQUIST UND LUNDELL, 1992). Das Trennprinzip beruht auf der reversiblen Adsorption geladener Moleküle an immobilisierten Gruppen mit entgegengesetzter Ladung. Die Anfangsbedingungen des Elutionsgradienten werden so gewählt, daß die Probenmoleküle das Gegenion von der Austauschergruppe verdrängen und reversibel gebunden werden. Durch Erhöhung der Ionenstärke werden sie im Verlauf des Gradienten von der Säule eluiert. Zur Trennung wird eine Anionenaustauschersäule (Resource Q, 6 mL) verwendet. Das Ionenaustauscherharz besteht aus Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymeren. Als Festionen sind quaternäre Ammoniumgruppen eingesetzt. Die Eignung dieser Säule zur Probenaufreinigung in größerem, präparativem Maßstab wurde von PHILLIPS ET AL. (1992) sowie von MÖLLER ET AL. (1997b) festgestellt. Die Durchführung der IEC ist in Anhang 7.10.1 beschrieben.
Da ein hoher Salzgehalt zu einer Verminderung der Wechselwirkung zwischen Protein und Ankergruppe führt, wurden zur Isolierung wäßrige Proteinextrakte eingesetzt.

3.9.2 Entsalzung und Aufkonzentrierung über Mikrokonzentratoren

In der vorliegenden Arbeit wurden zum Aufkonzentrieren und Entsalzen von Proteinlösungen Mikrokonzentratoren der Fa. Millipor mit einer Ausschlußgröße von 5 kDa eingesetzt. Salze und kleine Moleküle wandern durch die Membran, während Moleküle mit einem MG > 5 kDa zurückgehalten werden (Durchführung s. Anh. 7.10.2).

3.9.3 Affinitätschromatographie (AC)

Als Alternativmethode zur Isolierung der allergen wirkenden Proteine wurde die AC eingesetzt. Die AC basiert auf einer Antigen-Antikörperreaktion, bei der der Antikörper kovalent an eine Gelmatrix gebunden ist. Wichtig ist hierbei, daß die biologische Aktivität des Antikörpers erhalten bleibt, d.h. er muß weiterhin in der Lage sein, das zu isolierende Antigen zu binden. Das Prinzip der AC ist in Abb. 3.3 dargestellt. Zunächst werden Antikörper kovalent an eine Matrix gebunden (1).

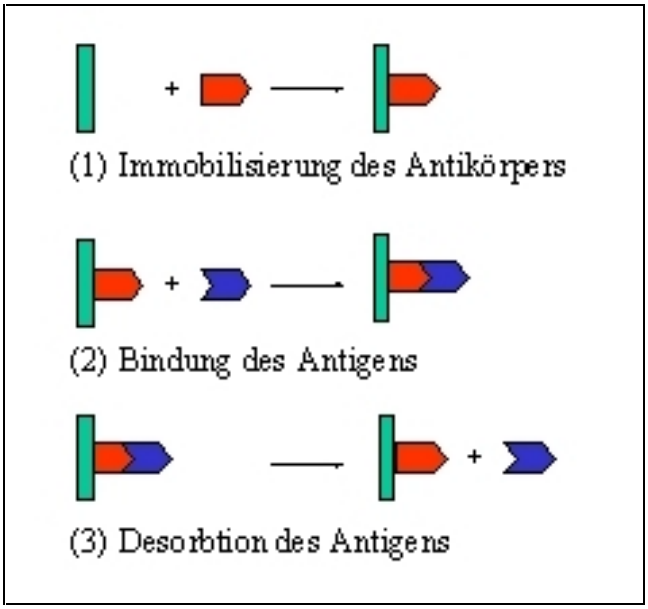


Abb. 3.3: Prinzip der Affinitätschromatographie

Ist der Antikörper immobilisiert, wird die Probensubstanz, die das zu isolierende Antigen enthält, aufgegeben. Bei milden Bedingungen (physiologische Salzkonzentration, physiologischer pH-Wert) erfolgt die Ausbildung einer Antigen-Antikörperbindung (2). Das zu isolierende Antigen wird also reversibel an den Antikörper gebunden, während die abzutrennenden Probenbestandteile ohne Ausbildung einer Bindung eluiert werden. Ist dies quantitativ erfolgt, wird die Antigen-Antikörperbindung durch Veränderung der Bedingungen (Erhöhung der Salzkonzentration, Absenkung des pH-Wertes) gelöst und das zu isolierende Antigen desorbiert (3) (LOWE UND DEAN, 1974).
Bei der Auswahl einer geeigneten Matrix fiel die Wahl auf N-Hydroxysuccinimid (NHS)-aktivierte Sepharose, da diese in der Lage ist, sehr schnell und effektiv Antikörper zu binden. Zudem ist die Kopplung sowohl während der Durchführung der Chromatographie als auch bei Lagerung sehr stabil (VAN SOMMEREN ET AL., 1993). Für die Kopplung des Antikörpers, die Inaktivierung der ungenutzten Bindungsstellen und die Durchführung der Chromatographie wurden die von VAN SOMMEREN ET AL. (1993) vorgeschlagene Puffersysteme eingesetzt (s. Anh. 7.10.3).

3.10 SEQUENZANALYSE

Die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz mit einem vollständig automatisierten System wurde erstmals von EDMANN UND BEGG (1967) durchgeführt. Hierbei werden die Aminosäuren vom N-terminalen Ende her stufenweise mit Phenylisothiocyanat zu Phenylthiohydanthoin-Derivaten umgesetzt, die mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) identifiziert werden. Mit dieser Methode ist eine Routinebestimmung von bis zu maximal 20 Aminosäureresten möglich.
Für die Sequenzanalyse wurden die Proteine mittels SDS-PAGE getrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die entsprechende Bande wurde ausgeschnitten und zur Sequenzierung eingesetzt. Dafür war eine Mindestmenge von 100 pmol Protein erforderlich.
Die Sequenzanalyse wurde in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Biochemie der Universität Hamburg von Herrn Dr. Teppke durchgeführt.

4 ERGEBNISSE

4.1 PROTEINGEHALTE DER EXTRAKTE

Die Ergebnisse der Proteingehaltsbestimmung nach BRADFORD (1976) in den in dieser Arbeit eingesetzten Extrakten sind in Tab. 4.1 aufgeführt. In Klammern sind die Herkunftsländer angegeben (s. Anh. 7.3).

Tab. 4.1: Proteingehalte der Extrakte nach BRADFORD (1976)

EXTRAKT	PROTEINGEHALT [µg/mL]
Mango Osteen (Spanien)	578,1
Mango Eden (Israel)	659,8
Mango TA (Brasilien)	627,8
Mango Ngowe (Kenia)	416,3
Sellerie (Deutschland)	351,9
Karotte (Deutschland)	489,8
Beifußpollen	161,3
Birkenpollen	461,2

4.2 EAST-ERGEBNISSE

Für die Untersuchungen standen insgesamt 56 Seren von Probanden mit einer Sensibilisierung gegen Mango, Sellerie, Karotte, Beifuß- und Birkenpollen zur Verfügung. Als sensibilisiert galten die Probanden, wenn mittels EAST ein Gehalt von min. 0,35 U/mL spez. IgE nachgewiesen werden konnte (Durchführung s. Anh. 7.4.3). Die Daten jedes Probanden sind in Anhang 7.11 dokumentiert.

Eine Sensibilisierung gegen Mango konnte bei 52 von 56 Probanden festgestellt werden. Bei vier Probanden konnte kein spez. IgE im Serum nachgewiesen werden.

Beachtlich ist, daß die Sensibilisierung gegen Mango bei keinem Probanden isoliert auftrat. Sie stand immer in Verbindung mit einer Sensibilisierung gegen Beifuß- und/oder Birkenpollen und/oder einer Lebensmittelallergie gegen Sellerie oder Karotte.

Spez. IgE gegen Beifußpollen und Mango konnte bei 45 von 52 Probanden nachgewiesen werden, wobei 2 Probanden nicht auf eine gleichzeitige Sensibilisierung gegen Beifußpollen untersucht werden konnten, da zu wenig Serum zur Verfügung stand. In 30 Fällen war der Gehalt an spez. IgE gegen Beifußpollen höher als gegen Mango. Lediglich in drei Fällen war die Sensibilisierung gegen Mango stärker ausgeprägt.

Eine Sensibilisierung gegen Sellerie und Mango war bei 36 der 52 untersuchten Probanden feststellbar, wobei vier Probanden nicht auf spez. IgE gegen Sellerie untersucht werden konnten, da die Menge an zur Verfügung stehendem Serum nicht ausreichte. Die Sensibilisierung gegen Sellerie war bei 11 Probanden stärker ausgeprägt als die gegen Mango.

Eine gleichzeitige Sensibilisierung gegen Mango, Beifußpollen und Sellerie konnte bei 35 Probanden nachgewiesen werden. Das heißt, nur ein Proband (MR), der spez. IgE gegen Sellerie und Mango ausgebildet hatte, wies kein spez. IgE gegen Beifußpollen auf. Zieht man nun noch die Karotte, deren Kreuzreaktivität zu Sellerie und Beifußpollen in der Literatur (WÜTHRICH UND DIETSCHI, 1985) beschrieben wird, dieser Betrachtung hinzu, so wiesen immerhin noch 21 Probanden spez. IgE gegen diese Allergene auf.
Von den 52 Probanden mit spez. IgE gegen Mango konnte bei 45 eine gleichzeitige Sensibilisierung gegen Birkenpollen nachgewiesen werden, wobei zwei Probanden nicht auf eine Sensibilisierung gegen Birkenpollen untersucht wurden. Hierbei war der Gehalt an spez. IgE gegen Birkenpollen bei 37 Probanden höher als gegen Mango. Eine Sensibilisierung gegen alle hier untersuchten Allergene wiesen 20 Probanden auf. Hierbei muß noch berücksichtigt werden, daß insgesamt sechs Probanden nicht auf alle Allergene untersucht werden konnten, da zu geringe Mengen an Serum zur Verfügung standen.

4.3 UNTERSUCHUNG DER MANGOALLERGENE

4.3.1 SDS-PAGE/Silberfärbung

Zunächst wurden die Proteinmuster der eingesetzten Proteinextrakte der Mango mittels SDS-PAGE charakterisiert.

Abb. 4.1: SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung eines Mangoextraktes

Es wurden nach MÖLLER ET AL. (1997a) Gele ohne Porengradienten mit T von 5 % im Sammel- und 13 % im Trenngel eingesetzt (s. Anh. 7.6.1). Die Visualisierung erfolgte mittels Silberfärbung (s. Anh. 7.7.2). Eine gute Trennung ist für die nachfolgenden Untersuchungen mittels IB wichtig.

In Abb. 4.1 ist die elektrophoretische Trennung eines Proteinextraktes der Mangosorte TA dargestellt. Deutlich zu erkennen ist, daß es eine gute Trennung der Proteine MG-Bereich von 14 bis 94 kDa gibt. Der Extrakt zeigt drei Banden mit MG < 14 kDa. Zwischen 14 und 20 kDa werden ebenfalls drei diskrete Banden mit einem apparenten (app.) MG von 15, 17 und 19 kDa detektiert Sehr stark detektierte Banden sind bei app. MG von ca. 27 und 29 kDa erkennbar. Wiederum sehr stark gefärbte Proteinbanden finden sich bei app. MG von 40 und 43 kDa. Zwischen 43 und 67 kDa sind keine diskreten Banden erkennbar. Im höheren MG-Bereich wird eine diskrete Bande mit einem MG von ca. 75 kDa visualisiert.

4.3.2 IEF/Silberfärbung

Die IEF wird von unterschiedlichen Parametern beeinflußt. Diese betreffen die Probe selbst (Salzgehalt, Zusatz von Additiven, Aufgabestelle), das Gel (pH-Bereich, freie Trägerampholyten oder immobilisierte pH-Gradienten) und die Trennbedingungen (Stromstärke, Spannung, Trennzeit). Verwendet wurden Polyacrylamidgele (T=5 %) mit freien Trägerampholyten (pH 2-11) und einer Dicke von 1 mm (s. Anh. 7.6.2).

Die Probelösungen wurden durch Rekonstitution der Lyophilisate in bidest. Wasser und anschließende Entsalzung mittels Ultrafiltration hergestellt. Die Entsalzung der Proben erwies sich als notwendig, da Salze die IEF erheblich störten. Zur Ermittlung der geeigneten Probenaufgabestelle wurde der von WESTERMEIER (1990) vorgeschlagene Stufentest durchgeführt. Hierbei werden die Proben über den gesamten pH-Bereich aufgetragen. Ein kathodischer Auftrag führte hierbei zu einer Präzipitation von Proteinen mit vermutlich niedrigem pI im gesamten pH-Bereich des Gels.

Für eine störungsfreie Trennung der Proteine ist bei der IEF die gewählte Spannung von großer Bedeutung. Die von WESTERMEIER (1990) vorgeschlagene Spannung von 2000 V führte zu einer starken Wärmeentwicklung und somit zum Durchbrennen des Gels. Eine Spannung von 800 V zur Vorfokussierung der freien Trägerampholyte (MÖLLER, 1997c) führte zu einer partiellen Austrocknung des Gels im anodischen Bereich, was sich bei der anschließenden Hauptfokussierung als störend erwies. Durch Vorgabe einer konstanten Leistung von 12 W bei der Vorfokussierung erfolgte bei Ausrichtung der freien Trägerampholyte eine lansame Spannungserhöhung von etwa 200 auf 800 V. Hierdurch konnte eine partielle Austrocknung vermieden werden. Bei der Hauptfokussierung erwies sich eine langsame Erhöhung der Spannung von 400 auf 800 V als ausreichend für die Ausbildung scharfer Banden. Eine weitere Erhöhung der Spannung führte zu keiner Verbesserung der Trennleistung (optimierte Bedingungen s. Tab. 7.5 in Anh. 7.6.2). Als Anhaltspunkt für das Beenden der Fokussierung diente der im pI-Marker enthaltene Indikator Methylrot, der als rote Bande sichtbar ist.

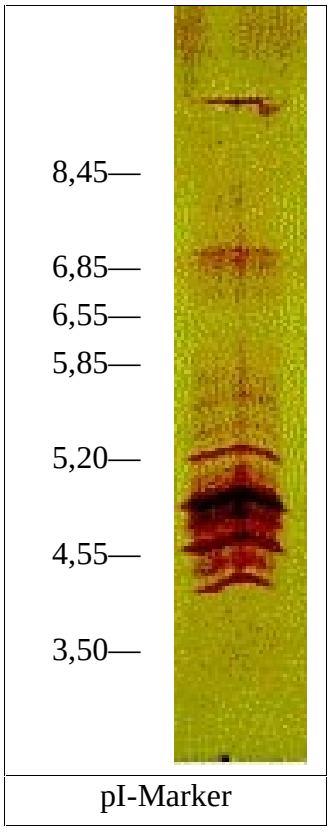


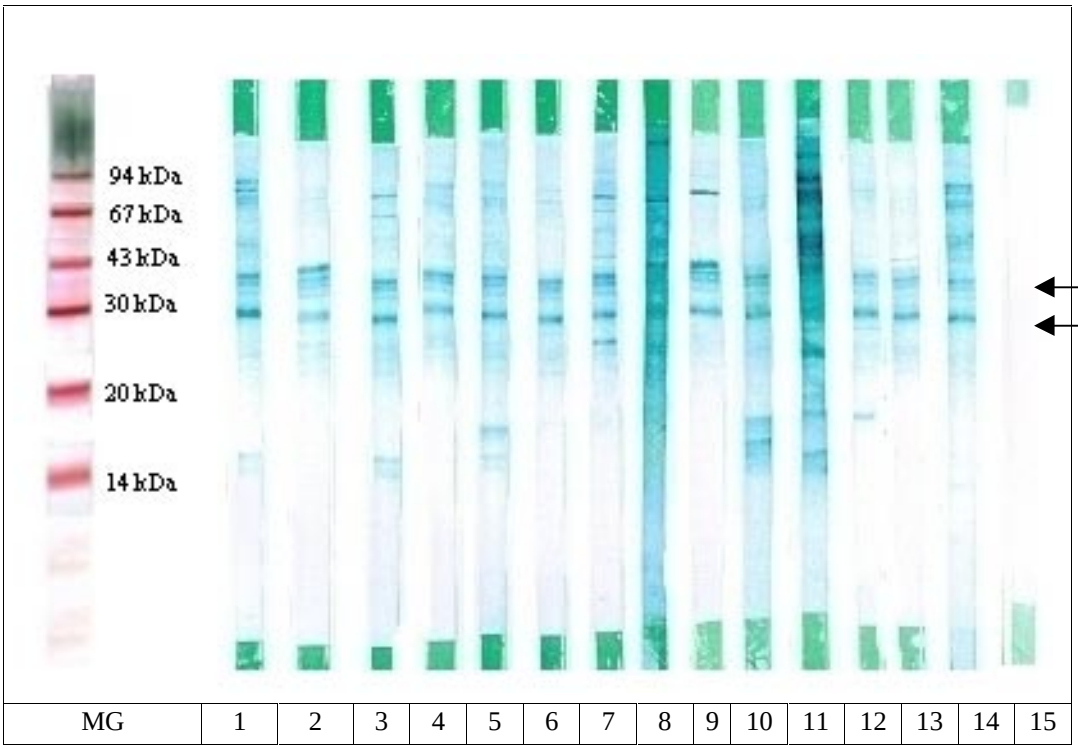
Abb. 4.2: IEF (pH 2-11) / Silberfärbung, Extrakt : Mango TA

Bei der anschließenden Silberfärbung wurde im Gegensatz zur SDS-PAGE eine starke Hintergrundfärbung beobachtet. Diese konnte durch intensiveres Waschen nach der Inkubation sowie durch einen zusätzlichen Waschschritt nach der Versilberung vermieden werden. Das Ergebnis einer IEF der Mangosorte TA ist in Abb. 4.2 dargestellt. Es wurden jeweils ca. 5 µg Protein aufgetragen. Im Mangoextrakt sind deutlich 5 diskrete Banden mit einem geschätzten pI von ca. 3,9, 4,1, 4,3, 4,5 und 4,7 zu erkennen (Auftrag ganz rechts). Schwächer detektiert werden eine Doppelbande bei einem pI von ca. 6,4 sowie mehrere Banden zwischen einem pI von 3,8 und 5,5. Dieses Ergebnis galt auch für die anderen in dieser Untersuchung eingesetzten Mangosorten (nicht dargestellt).

4.3.3 SDS-PAGE/IB

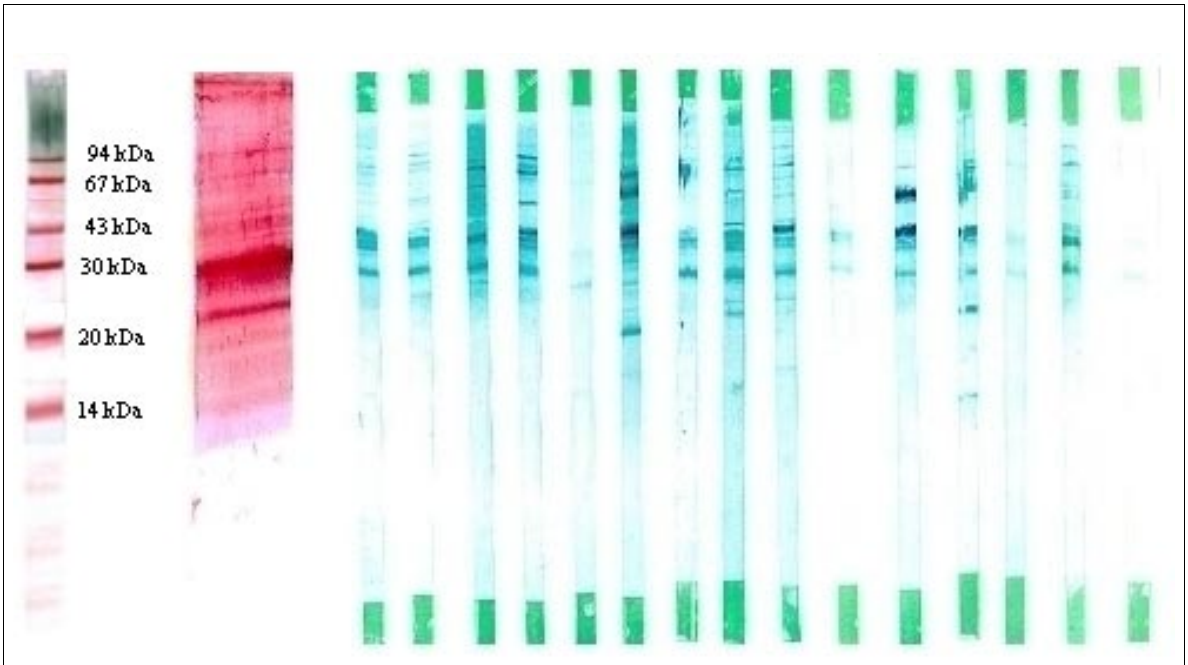
Zur Charakterisierung der Allergene wurden jeweils ca. 6 µg/cm Protein der Mangosorte TA aufgetragen, mittels SDS-PAGE getrennt und auf eine NC-Membran transferiert (s. Anh. 7.6.1 und 7.6.4). Daß diese Sorte als repräsentativ gelten kann, wird später dargestellt (s. Kap. 4.4). Einzelne Streifen der Blotmembran mit den getrennten Proteinen wurden nach Blockierung mit einer Magermilchpulverlösung mit jeweils einem Allergikerserum inkubiert. Im Anschluß erfolgte eine immunchemische Detektion (s. Anh. 7.9.1).

Vier IB des Mango-Extraktes sind in den Abb. 4.3-4.6 dargestellt. Im unspezifisch gefärbten Mango-Extrakt in Abb. 4.4 sind hauptsächlich Proteine mit MG von ca. 30 und 23 kDa zu erkennen.



MG	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15

Abb. 4.3: IB Mango TA, Seren: 1: GS, 2: Bo 509, 3: JPH, 4: IS, 5: AC, 6: TB, 7: JP, 8: BH, 9: CL, 10: DE, 11: KDH , 12: BS, 13: PV, 14: TD, 15: Kontrolle, MG: Molekulargewichtsmarker



MG	Mango	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15

Abb. 4.4: IB Mango TA, Seren: 1: VW, 2: EA, 3: AM, 4: IB, 5: HB, 6: UW, 7: TS, 8: Mast 103, 9: HS, 10: BB, 11: STM, 12: PW, 13: HK, 14: PL, 15: Kontrolle, MG: Molekulargewichtsmarker

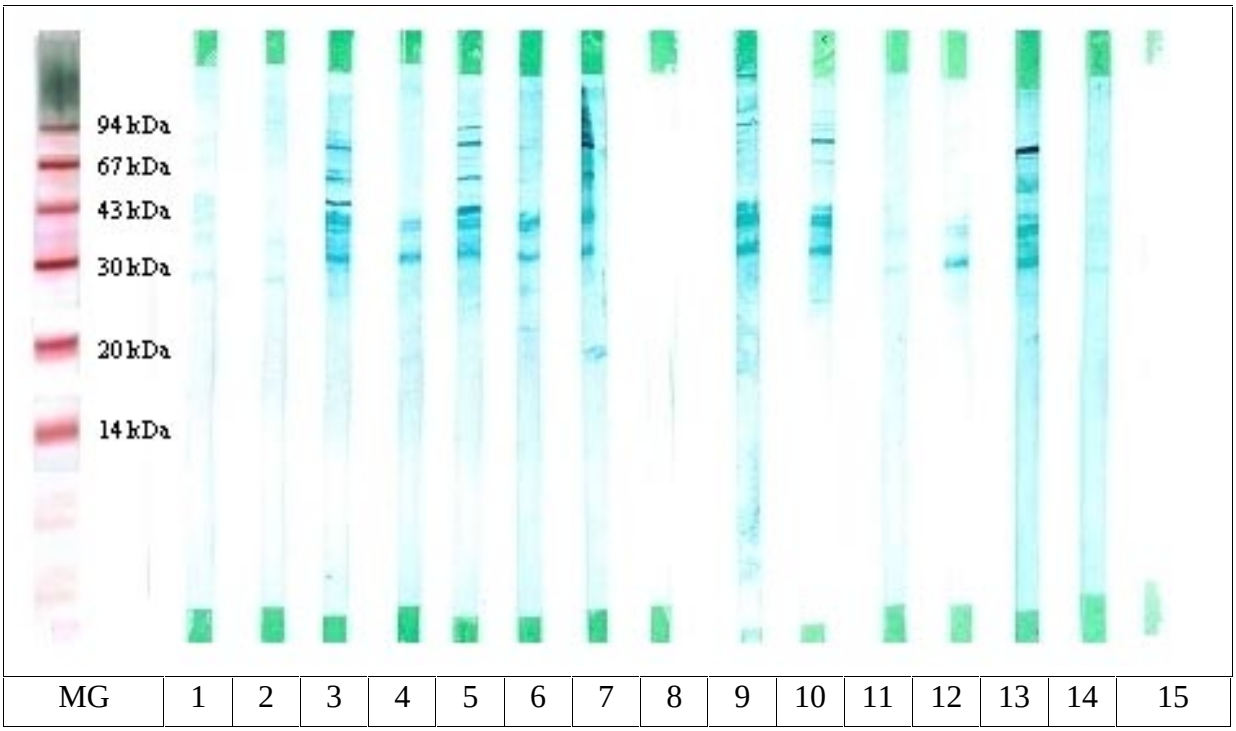


Abb. 4.5: IB Mango TA, Seren: 1: NN 2: CB, 3: KSC, 4: SB, 5: BP, 6: SJB, 7: CF, 8: LA, 9: GG, 10: CG, 11: GR, 12: UN, 13: DS, 14: SM, 15: Kontrolle, MG: Molekulargewichtsmarker

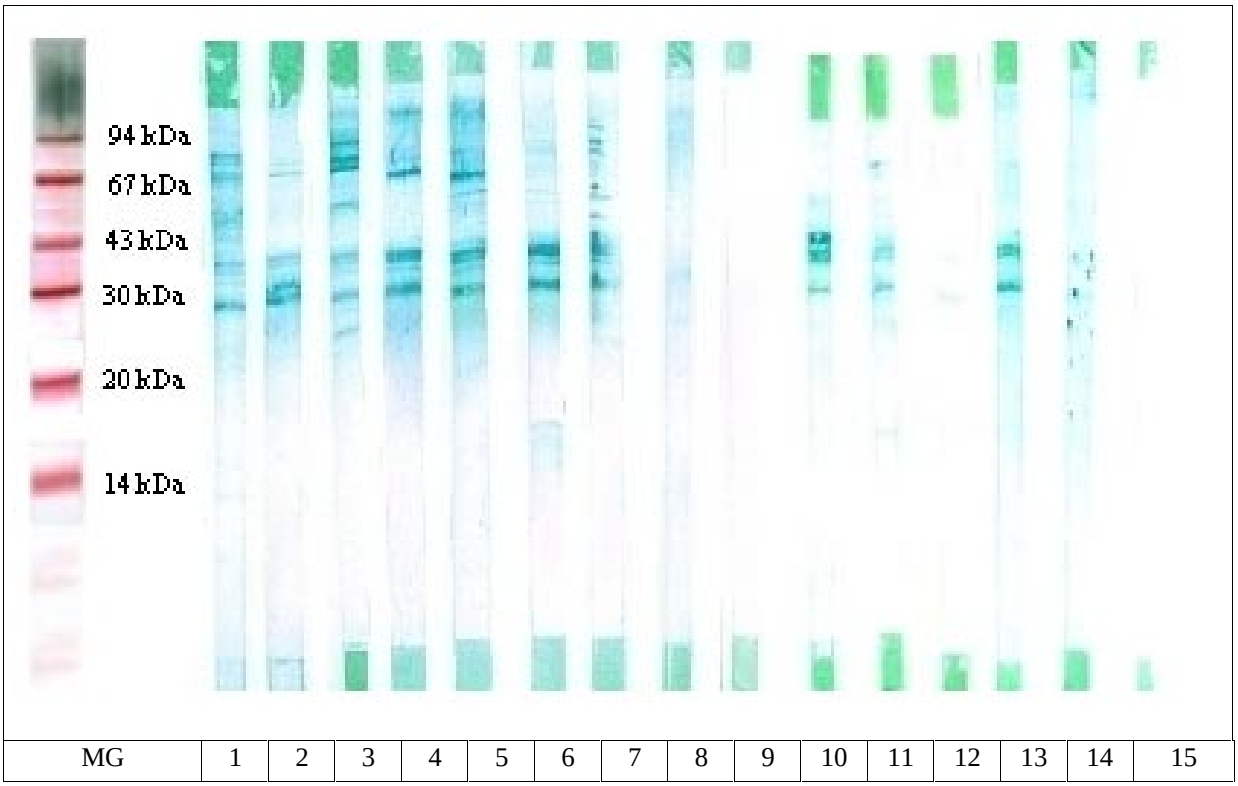


Abb. 4.6: IB Mango TA, Seren: 1: ZI, 2: AK, 3: NS, 4: MV, 5: JS, 6: RG, 7: SuB, 8: TB, 9: HG, 10: MR, 11: KG, 12: KD, 13: KLR, 14: RP, 15: Kontrolle, MG: Molekulargewichtsmarker

In Tab. 4.2 sind die in den Abb. 4.3-4.6 erhaltenen Ergebnisse der 56 untersuchten Patientenseren zusammengefaßt. Bei den angegebenen MG handelt es sich um über einen Vergleich mit dem MG-Marker geschätzte Werte. Deutlich wird, daß die Allergenität gegen die Mangofrucht hauptsächlich auf zwei Proteine mit MG von 30 und 40 kDa zurückzuführen ist, auf die 82 % der untersuchten Seren reagieren. Bei allen anderen Proteinen scheint es sich um Minorallergene zu handeln, da sie von weniger als 50 % der untersuchten Seren detektiert werden. Zu beobachten ist auch, daß fast alle Seren, die Allergene mit den anderen aufgeführten MG detektieren, gleichzeitig auch auf die beiden Hauptallergene reagieren. Dies kann auf eine Allergenverwandschaft hindeuten. Eine isolierte Bindung an das 25 kDa Allergen lag nur bei einem Serum (HB) vor. Es fällt weiterhin auf, daß 8 Seren (14 %) ein Protein mit einem app. MG von 14 kDa detektieren. Es ist daher zu prüfen, ob es sich bei diesem Protein um ein Profilin handelt.

Tab. 4.2: app. MG der Mango-Allergene und Zahl der Seren, anhand derer diese detektiert wurden (s. Anh. 7.13).

MG [kDa]	ANZAHL DER SEREN 56 (100%)
40	46 (82 %)
30	46 (82 %)
67	21 (38%)
43	17 (30 %)
> 67	14 (25 %)
50	12 (21 %)
14	8 (14 %)
25	6 (11 %)
16	6 (11 %)
keine Banden	7 (12 %)

Durch das Kontrollserum eines Nichtallergikers wurden keine Banden detektiert. Unspezifische Bindungen konnten somit ausgeschlossen werden.

4.3.4 IEF/IB

Um die Allergene der Mango auch hinsichtlich ihrer pI zu charakterisieren, wurden die Proteine des Extraktes von Mango TA mittels Ultrafiltration entsalzt. Zur Ermittlung der geeigneten Probenaufgabestelle wurde der von WESTERMEIER (1990) vorgeschlagene Stufentest durchgeführt. Ein kathodischer Auftrag führte hierbei zu einer Präzipitation von Proteinen über den gesamten pH-Bereich des Gels (s. Abb. 4.7, Auftragspunkt 1). Als optimal erwies sich ein Probenauftrag in der Mitte des Gels (s. Abb. 4.7, Auftragspunkt 3). Die Durchführung der IEF erfolgte nach den in Anhang 7.6.2 beschriebenen optimierten Bedingungen. Wichtig für den an die IEF anschließenden Transfer auf eine NC-Membran ist die Beladung der Proteine mit SDS, da die Mobilität der nach der Fokussierung ungeladenen Proteine im elektrischen Feld gegen Null geht. Damit ein anschließendes Semidry-Blotting möglich wird, wurde das Gel zunächst 10 min in einem gegenüber dem Blotting von SDS-Gelen modifizierten Kathodenpuffer II equilibriert. In diesem Puffer ist die Konzentration an SDS um den Faktor 10 erhöht (s. Anh. 7.6.4).

Es wurde analog zum Blotting aus SDS-Gelen eine NC-Membran mit einer Porengröße von 0,2 µm verwendet. Als optimal erwies sich eine Blotzeit von 75 min für den Transfer auf die NC-Membran. In Abb. 4.7 ist das Ergebnis einer IEF mit anschließendem IB dargestellt (Durchführung s. Anh. 7.9.1), wobei die Detektion mit einem Poolserum aus gleichen Teilen Einzelseren der Probanden Bo 509, Mast 103, IB und GS erfolgte. Es ist deutlich zu erkennen, daß zwei starke Allergenbanden bei einem pI zwischen 4,55 und 5,2 detektiert und mehrere schwache Banden ebenfalls in einem pI-Bereich unter 5,20 detektiert wurden.

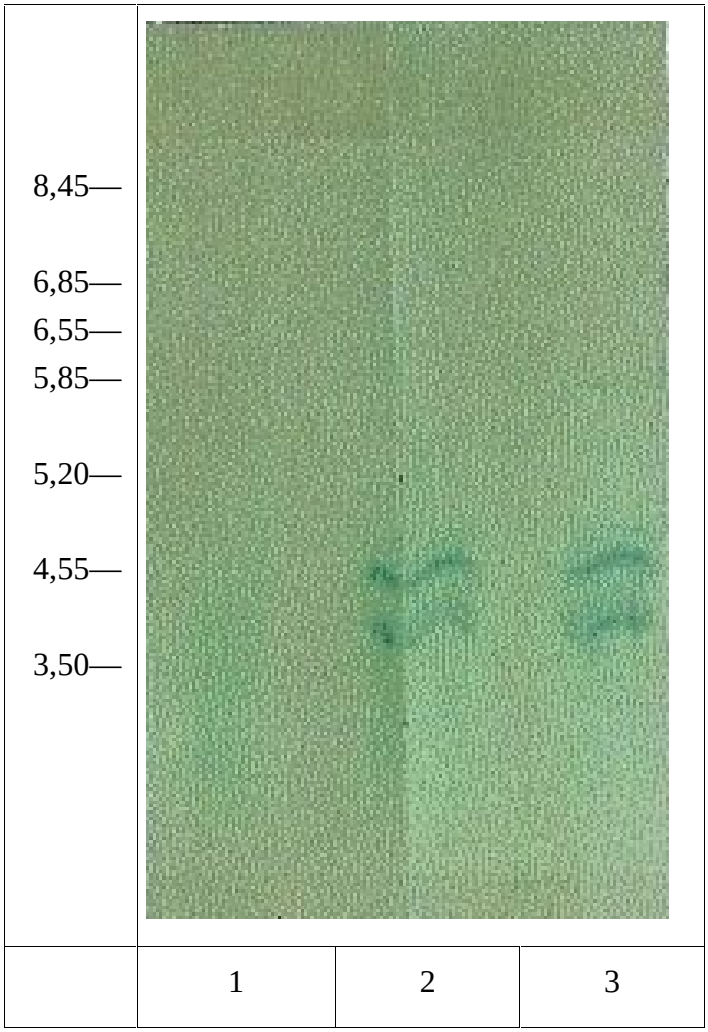


Abb. 4.7: IB Mango TA, Detektion mit Poolserum, 1: kathodischer Auftrag, 2: Auftrag zu 2/3 kathodisch, 3: Auftrag in der Mitte zwischen Kathode und Anode

4.3.5 2D-Elektrophorese/IB

Um den mittels SDS-PAGE/IB bestimmten MG der Allergene pI zuordnen zu können, wurden die Allergene aus der Mangosorte TA mittels 2D-Elektrophorese mit anschließendem IB aufgetrennt. Dabei wurde in der ersten Dimension eine Trennung mittels IEF und in der zweiten Dimension eine Trennung mittels SDS-PAGE durchgeführt. Nach Durchfühung eines Semidry-Blotting erfolgte die Detektion der Allergene im IB (Durchführung s. Anh. 7.6.3, 7.6.4 und 7.9.1).

Abb. 4.8 stellt das Ergebnis einer 2D-Elektrophorese dar. Für die Immundetektion wurde das

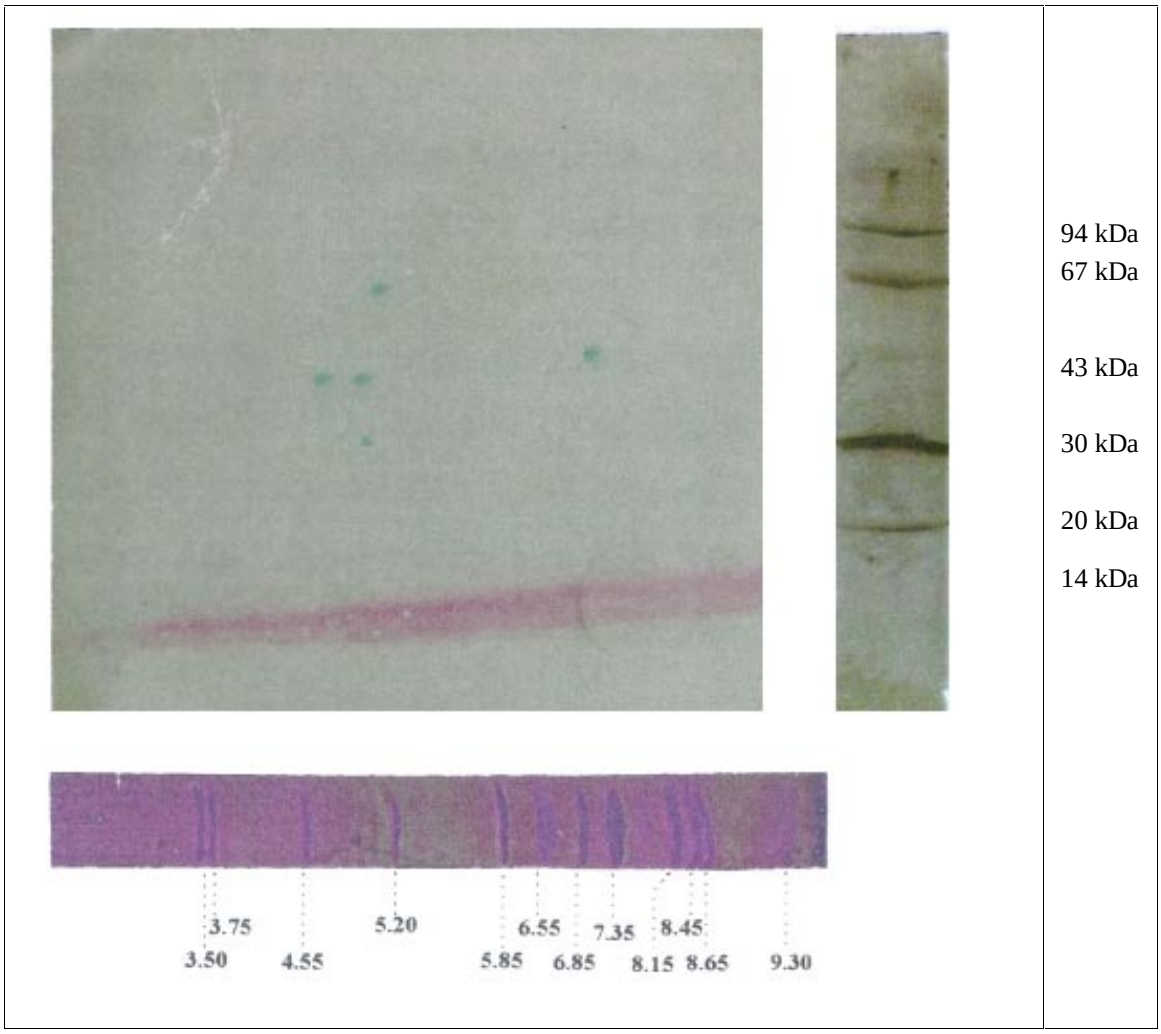


Abb. 4.8: 2D-Elektrophorese Mango TA, Detektion mit Serum Mast 103

Serum Mast 103 verwendet.

Bei der visuellen Auswertung dieses Blots kann es aufgrund der komplexen elektrophoretischen Bedingungen zu Problemen bei der Auswertung kommen, denn bei geringen Unterschieden im MG kann keine genaue Differenzierung zwischen den Allergenen erfolgen. Dem 67 kDa-Allergen kann ein pI von ca. 4,9 zugeordnet werden. Dagegen wurde das Allergen, das im eindimensionalen IB ein MG von 43 kDa aufwies, vermutlich in zwei Isoallergene mit pI von ca. 6,7 und 4,55 aufgetrennt.

Das Vorliegen von zwei Isoallergenen mit pI von ca. 4,6 und 4,8 war ebenso bei dem 40 kDa Hauptallergen gegeben. Durch die erwähnte Problematik bei der Zuordnung der MG erscheint es allerdings auch möglich, daß sich das 40 kDa Hauptallergen in drei Isoallergene auftrennt, wobei der Spot mit dem pI von ca. 6,7 dann nicht dem 43 kDa, sondern dem 40 kDa Allergen zuzuordnen wäre. Weiterhin ließ sich dem Allergen mit einem MG > 67 kDa ein pI von ca. 5,0 zuordnen. Schwach detektiert wurde das Allergen mit einem MG von etwa 30 kDa und einem pI von ca. 4,9. Nicht nachgewiesen werden konnte das Allergen mit einem app. MG von 14 kDa.

4.3.6 Prüfung auf Profiline

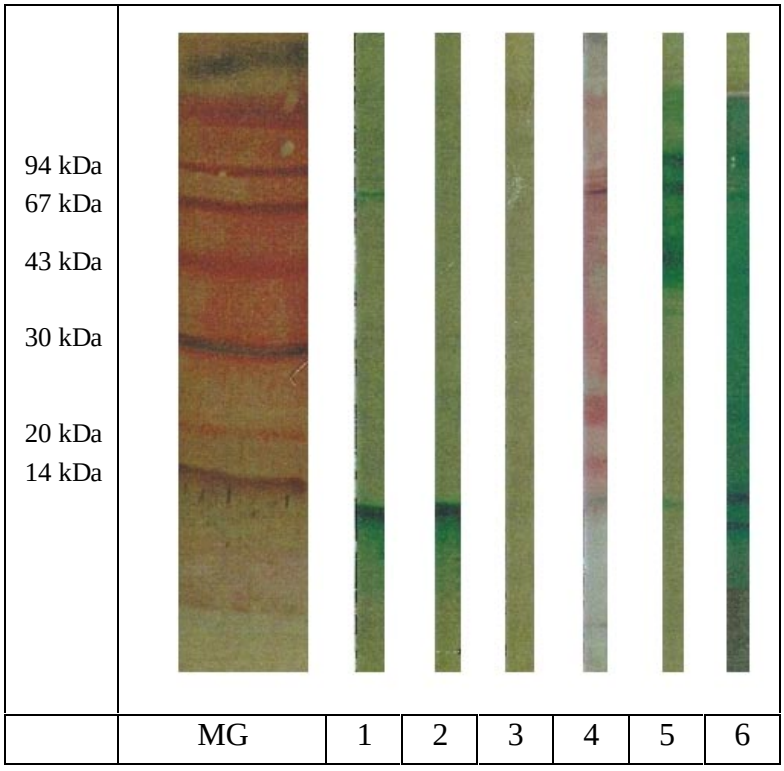


Abb. 4.9: Mango TA SDS-PAGE/Profilinblot
1. Anti-Sellerie-Profilin, 2: Anti-Traubenkraut-Profilin, 3: Inkubationspuffer, 4: Gold-Immunfärbung, Serum:BB, 5+6 Immunfärbung, Seren Mast 103 und Bo 509

Aufgrund der beschriebenen Kreuzreaktionen der Mango und der nachgewiesenen Allergene mit MG von ca. 14 bis 16 kDa bei den Probanden GS, JPH, AC, Bo 509, Mast 103, BS und PW stellt sich die Frage, ob es sich hierbei um Profiline handeln könnte. Zum Nachweis von Profilinen wurde der Extrakt der Mangosorte TA mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine NC-Membran transferiert und die Blotstreifen mit Antikörpern gegen Profiline inkubiert. Anschließend erfolgte eine Immunfärbung (Durchführung s. Anh. 7.6.1, 7.6.4 und 7.9.3). Zum Vergleich des MG des nachzuweisenden Profilins mit den in Kap. 4.3.3 detektierten Allergenen, wurden zwei Blotstreifen mit den Seren Mast 103 und Bo 509 inkubiert.

Anhand beider verwendeter Antiseren konnten Profiline mit einem MG von etwas weniger als 14 kDa nachgewiesen werden (Abb. 4.9). Anhand eines Blotstreifens, der nur mit Inkubationspuffer inkubiert wurde, konnte gezeigt werden, daß keine unspezifischen Bindungen vorliegen.

4.3.7 Prüfung auf Kohlenhydratstrukturen

Kohlenhydrate sind gelegentlich Teil der Epitope von Allergenen (s. Kap. 2.4). Um zu prüfen, ob dies auch in der Mango der Fall sein kann, wurde durch den Einsatz von Lectinen geprüft, ob Kohlenhydratstrukturen im Gesamtproteinextrakt nachzuweisen sind. Die nach einer SDS-PAGE auf eine NC-Membran transferierten Proteine wurden mit vier verschiedenen Lectinen inkubiert und anschließend immunochemisch detektiert (s. Anh. 7.6.1, 7.6.4 und 7.9.4). Abb. 4.10 zeigt, daß unspezifische Bindungen ausgeschlossen werden konnten, da der eingesetzte Inkubationspuffer keine Detektion hervorrief. Das Lectin Concanavalin A (Con A) zeigte eine Bindung an Proteine mit app. MG von 25, 40, 43, 55 und 60 kDa. Durch Con A werden Polysaccharide, die α-Mannose, α-Glucose oder α-N-Acetylglycosamin enthalten, detektiert. Schwach zu erkennen ist auch, daß das Lectin Lotus Tetragonolobus (Lotus) eine Bindung an Proteine mit app. MG von 40 und 60 kDa zeigt. Dieses Lectin detektiert spezifisch α-Fucose (NILSEN UND PAULSEN, 1990). Keine Detektion erfolgte durch die Lectine Carragena arborescens (CAA) und Griffonia simplificonia II (GS II).

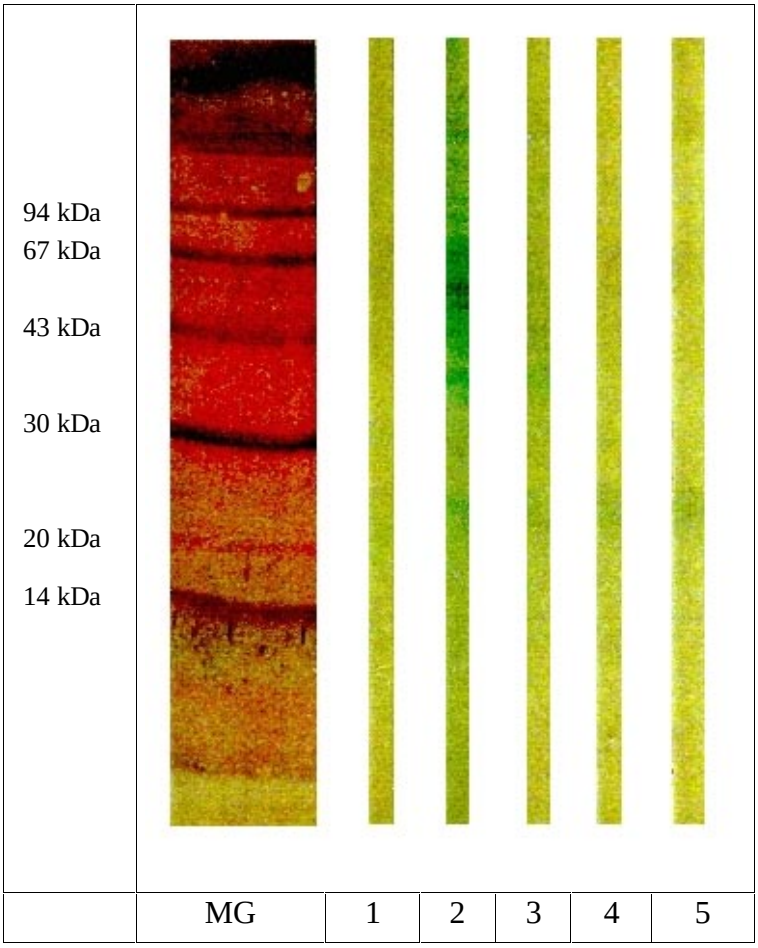


Abb. 4.10: Mango TA SDS-PAGE/Lectinblot. 1: CAA, 2: Con A, 3: Lotus, 4: GS II, 5: Inkubationspuffer

Aufgrund dieser Ergebnisse ist es möglich, daß es sich bei den Allergenen der Mango mit app. MG von 25, 40 und 43 kDa um Glycoproteine handeln kann. Endgültige Aussagen können aber erst getroffen werden, wenn die isolierten Allergene vorliegen, da eine Deglycosilierung mit anschließendem IB durchgeführt werden kann.

4.3.8 Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse

Es konnte gezeigt werden, daß jeweils 82 % der Probanden Allergene mit app. MG von 40 und 30 kDa detektierten, womit diese als Hauptallergene bezeichnet werden können. Weiterhin reagierten 38 bzw. 30 % der Seren mit Allergenen, die ein app. MG von 67 bzw. 43 kDa besitzen. Auch ein Allergen mit einem app. MG von 14 kDa wurde von 14 % der Seren detektiert. Durch Untersuchung des Allergenextraktes mittels IEF/IB konnte gezeigt werden, daß die pI der Allergene ausschließlich im sauren pH-Bereich liegen. Die 2D-Elektrophorese ergab, daß das 40 kDa-Hauptallergen in Form zweier Isoallergene mit pI von 4,6 und 4,8 vorliegt. Dem 30 kDa-Hauptallergen konnte ein pI von 4,9 zugeordnet werden. Auch das 43 kDa-Allergen lag in Form zweier Isoallergene, und zwar mit pI von 6,7 und 4,55, vor. Dem Allergen mit einem MG von 67 kDa konnte ein pI von 4,9 zugeordnet werden. Nicht detektiert werden konnte in der 2D-Elektrophorese das Allergen mit einem app. MG von 14 kDa.

Entsprechend der WHO-Nomenklatur wird das 40 kDa Allergen als *Mangifera indica* 1 (Man i 1) und das 30 kDa Allergen als *Mangifera indica* 2 (Man i 2) bezeichnet (MARSH ET AL., 1987).

Durch den Einsatz monoklonaler Antikörper konnten Profiline im Gesamtextrakt der Mango nachgewiesen werden. Auch Kohlenhydratstrukturen wurden durch den Einsatz von Lectinen detektiert.

4.4 UNTERSUCHUNG EINER MÖGLICHEN SORTENABHÄNGIGKEIT DER ALLERGENEN POTENZ VON MANGOFRÜCHTEN

Wie bereits in Kapitel 2.4 beschrieben, konnten VIETHS ET AL. (1993, 1994b) sowie LI-SHAN ET AL. (1995) bei Äpfeln nachweisen, daß die allergene Potenz von Früchten sortenabhängig sein kann.
Zur Untersuchung einer möglichen Sortenabhängigkeit wurden die Proteinextrakte von vier Mangosorten (Eden, Osteen, TA, Ngowe), die in unterschiedlichen Kontinenten angebaut wurden und in Europa zu den am häufigsten konsumierten Sorten zählen, mittels SDS-PAGE getrennt und unspezifisch mittels Silberfärbung detektiert. Anschließend erfolgte eine Untersuchung mittels IB, IB-Inhibition sowie EAST-Inhibition.

4.4.1 SDS-PAGE/Silberfärbung

Wie Abb. 4.11 zeigt, konnten in allen Extrakten der vier Mangosorten zahlreiche Proteinbanden detektiert werden (Durchführung s. Anh. 7.6.1 und 7.7.2). Alle Extrakte zeigten drei Banden mit MG < 14 kDa. Zwischen 14 und 20 kDa wurden ebenfalls drei diskrete Banden mit einem app. MG von 15, 17 und 19 kDa detektiert, wobei die Proteinbanden mit 15 und 17 kDa bei der Sorte Ngowe stärker als bei den anderen Mangosorten ausgeprägt waren. Sehr stark detektierbare Banden waren in allen Sorten bei app. MG von 27 und 29 kDa erkennbar. Die Bande mit einem MG von 35 kDa war bei den Sorten Osteen, Eden und TA stärker ausgeprägt als bei der Mango Ngowe. Wiederum sehr stark gefärbte Proteinbanden fanden sich bei app. MG von 40 und 43 kDa. Zwischen 43 und 67 kDa waren keine diskreten Banden erkennbar. Im höheren MG-Bereich wurde eine diskrete Bande mit einem MG von > 67 kDa visualisiert. Zusammenfassend ist zu sagen, daß zwischen den Gesamtproteinmustern der verschiedenen Sorten nur sehr geringe Unterschiede bestehen.

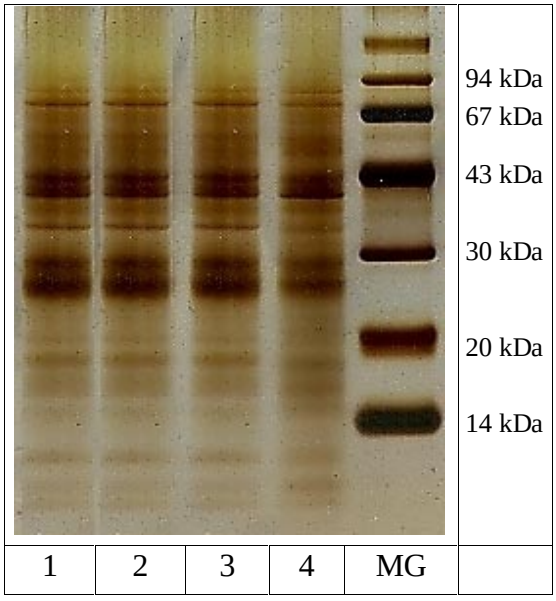


Abb. 4.11: SDS-PAGE der Mangosorten mit anschließender Silberfärbung, 1: Mango Osteen, 2. Mango Eden, 3: Mango TA, 4: Mango Ngowe

Obwohl die Proteinbandenmuster der vier Mangosorten sich in der unspezifischen Silberfärbung nicht unterscheiden, kann durchaus eine unterschiedlich starke allergene Potenz vorliegen.

In der Silberfärbung werden Proteine mit einem MG von 40 und 43 kDa zwar sehr stark detektiert, da sich aber schon in der 2D-Elektrophorese mit immunologischer Detektion eine Aufspaltung in Isoallergene zeigte, kann davon ausgegangen werden, daß mehrere Proteine mit diesem MG in den Mangofrüchten vorhanden sind. Somit kann die unspezifische Färbung keine Aussage über die Konzentration der Allergene treffen. Gleiches gilt für nicht detektierte Proteine. So ist beispielsweise das nachgewiesene 14 kDa Allergen in der Silberfärbung nicht erkennbar.

4.4.2 SDS-PAGE/IB

Um zu untersuchen, ob in den vier Mangosorten unterschiedliche Allergene vorliegen oder ob gleiche Probandenseren die Allergenbanden unterschiedlich stark detektieren, wurden jeweils 6 µg Protein/cm auf ein SDS-PAGE Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Nach Transfer auf eine NC-Membran erfolgte eine immunologische Detektion (Durchführung s. Anh. 7.6.1, 7.6.4 und 7.9.1).

Zur Detektion wurden die Seren der Probanden GG, IS, GS, KDH, KLR, TB und RG eingesetzt, da durch sie nach den Ergebnissen aus Kap. 4.3.3 eine Detektion der Allergene gewährleistet war. Alle Seren detektierten in allen Sorten das gleiche Proteinbandenmuster, wobei die Intensität der Färbung visuell nicht zu unterscheiden war (nicht dargestellt). Daher ist in Abb. 4.12 die Detektion der unterschiedlichen Sorten mit einem Poolserum der oben beschriebenen Probanden dargestellt.

In Übereinstimmung mit den vorherigen Ergebnissen ist in Abb. 4.12 deutlich zu erkennen, daß in allen vier Mangosorten die Hauptallergene Man i 1 und Man i 2 sowie die Allergene mit geschätzten MG von 14, 43 und 67 kDa detektiert wurden. Ein Unterschied kann weder in Hinblick auf die MG der detektierten Banden noch auf die Intensität der Färbung erkannt werden. Somit ist anhand der Ergebnisse des IB davon auszugehen, daß keine Sortenabhängigkeit der Allergie bei Mangofrüchten vorliegt. Dieses Ergebnis sollte im folgenden mittels IB- und EAST-Inhibition abgesichert werden.

4.4.3 IB-Inhibition

Durch die IB-Inhibition sollte überprüft werden, ob die Allergene der verschiedenen Sorten miteinander kreuzreagieren. Es wurden alle vier Sorten mittels SDS-PAGE/IB-Inhibition untersucht, wobei zur Detektion ein Poolserum aus den Probanden GG, IS, GS, KDH, KLR, TB und RG eingesetzt wurde (Durchführung s. Anh. 7.6.1, 7.6.4 und 7.9.2).

In Abb. 4.13 ist das Ergebnis der IB-Inhibtion der Mangosorte Eden dargestellt. Auf Position 1 ist die Immunfärbung ohne Zusatz eines Inhibitors dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, daß die detektierten Banden mit denen aus 4.3.3 und 4.4.2 übereinstimmen. Auch hier werden die Hauptallergene Man i 1 und Man i 2 sowie Allergene mit den MG von 14, 43 und 67 kDa deutlich detektiert. Die Auftragspositionen 2-5 zeigen die Inhibition mit den vier Mangosor-

ten. Es ist zu erkennen, daß alle Allergenbanden ausgelöscht wurden. Auf Position 6 wurde OA als unspezifischer Inhibitor zugegeben. Da keine Verringerung der Färbung erkennbar ist, wurde sichergestellt, daß keine unspezifische Hemmung stattfand. Das Blindserum, das zur Detektion unspezifischer Bindungen eingesetzt wurde, reagierte nicht. Die Ergebnisse der IB-Inhibition bestätigen die des IB, daß zwischen den Sorten keine Unterschiede in der allergenen Potenz vorliegen.

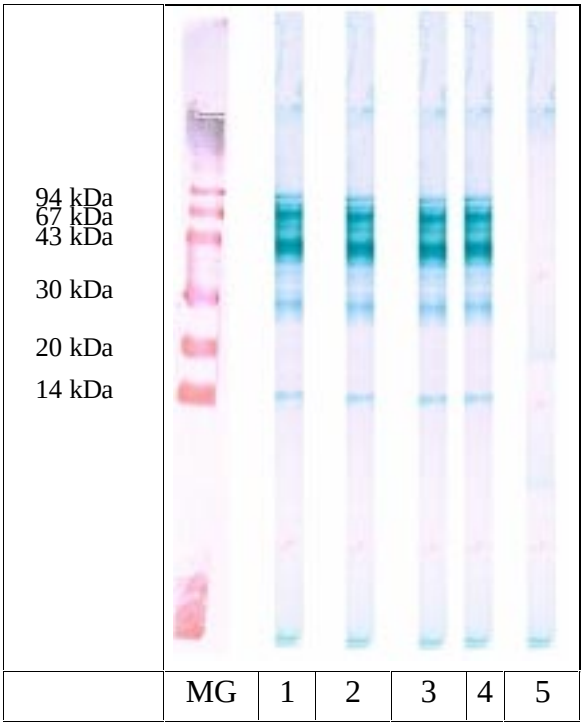


Abb. 4.12: IB verschiedener Mangosorten, 1: Osteen, 2: Eden, 3: TA, 4: Ngowe, 5: Kontrollserum. Detektion mit Poolserum GG, IS, GS, KDH, KLR, TB, RG.

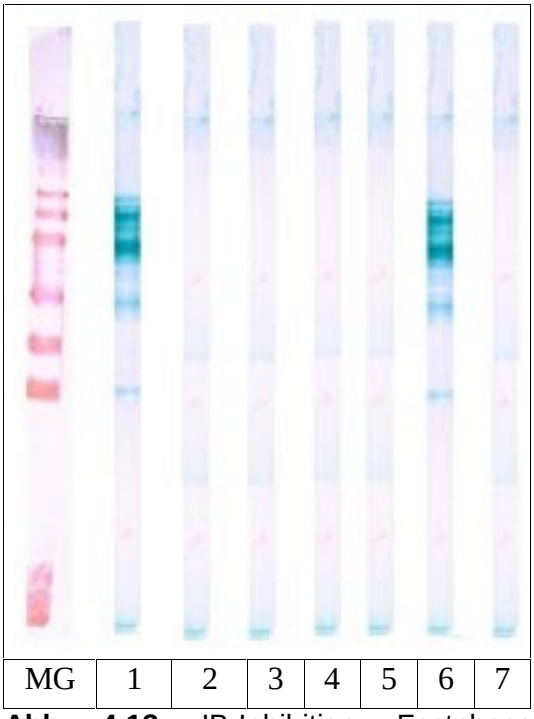


Abb. 4.13: IB-Inhibition. Festphase: Eden, Inhibitoren: 1: ohne, 2: Osteen, 3: homolog, 4: TA, 5: Ngowe, 6: OA, 7: Kontrollserum. Detektion mit Poolserum GG, IS, GS, KDH, KLR, TB, RG.

4.4.4 EAST-Inhibition

Zur Quantifizierung der qualitativen Ergebnisse aus IB und IB-Inhibition wurde abschließend eine EAST-Inhibition durchgeführt. Hierbei wurden die Allergenextrakte der jeweiligen Sorte an Maxisorb™-Mikrotiterplatten festphasengebunden und mit Konzentrationen von 446,5 bis 0,0447 µg/mL der jeweils anderen Mangosorten inhibiert. Zur Absicherung der Ergebnisse wurde zudem eine homologe Inhibition durchgeführt. Auf unspezifische Inhibitionen wurde durch Inhibition mit einer OA-Lösung geprüft. Unspezifische Bindungen konnten durch Einsatz eines Nichtallergikerserums ausgeschlossen werden. In allen anderen Fällen erfolgte die Detektion mit einem Poolserum, das aus den Seren der Probanden GG, IS, GS, KDH, KLR, TB, RG gewonnen wurde (Durchführung s. Anh. 7.5).

Die graph. Darstellung der EAST-Inhibition am Beispiel der festphasengebundenen Sorte Osteen ist in Abb. 4.14 dargestellt.

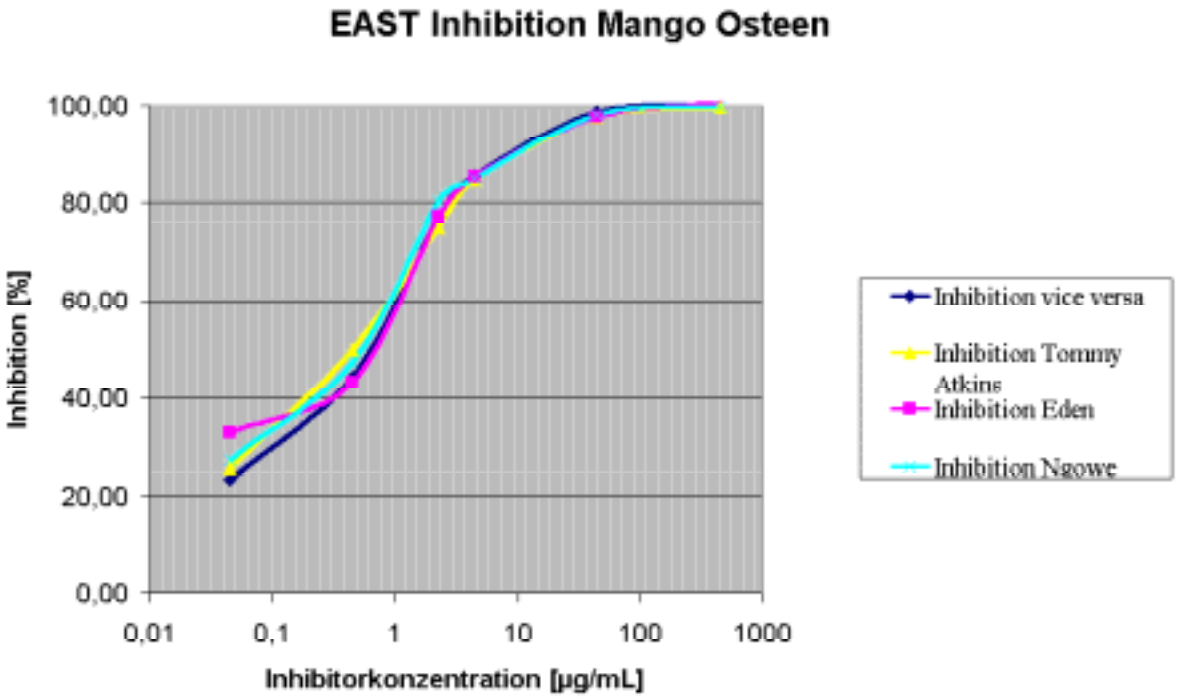


Abb. 4.14: Graphische Darstellung der EAST-Inhibition. Festphasengebunden: Mango Osteen, Detektion: Poolserum GG, IS, GS, KDH, KLR, TB, RG.

Die Graphen zeigen, daß die Inhibitionskurven nahezu deckungsgleich verlaufen. Dies spricht dafür, daß kein Unterschied in der Allergenität zwischen den vier untersuchten Mangosorten besteht und bestätigt somit die Ergebnisse aus IB und IB-Inhibition.

Tab. 4.3: Ergebnisse der EAST-Inhibition zur Untersuchung der Sortenabhängigkeit der Allergenität

GEBUNDENER EXTRAKT	INHIBITOR	OSTEEN	EDEN	TA	NGOWE
OSTEEN	50 %ige Inhibition [µg/mL]	0,7	0,8	0,5	0,6
	max. Inhibition [%]	100	100	100	100
EDEN	50 %ige Inhibition [µg/mL]	0,9	0,5	0,6	0,8
	max. Inhibition [%]	96	97	97	95
TA	50 %ige Inhibition [µg/mL]	0,5	0,5	1,0	1,4
	max. Inhibition [%]	92	92	96	95
NGOWE	50 %ige Inhibition [µg/mL]	1,2	0,7	0,8	0,8
	max. Inhibition [%]	93	93	95	95

Zur Charakterisierung der Ergebnisse werden in der EAST-Inhibition zwei Kenngrößen verwendet: die Konzentration an Inhibitorlösung, die für eine 50 %ige Inhibition des festphasengebundenen Allergens notwendig ist, sowie die max. erreichbare Inhibition.

Diese Größen sind als Mittelwerte aus Doppelbestimmungen für die durchgeführten Untersuchungen in Tab. 4.3 aufgeführt. Es konnte gezeigt werden, daß die Einzelwerte (s. Anh. 7.13) nach Kolmogorov-Smirnov normalverteilt sind ($p<0,05$). Die Einzelwerte der Inhibitionen wurden in Hinblick auf signifikante Unterschiede zwischen den Sorten mittels LSD (Lowest Significant Difference)-Test, der ein Äquivalent des t-Tests für unabhängige Stichproben darstellt, verglichen.

Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ($p<0,05$) zwischen den Mittelwerten. Somit kann festgestellt werden, daß die Allergenität der unterschiedlichen Sorten sich nicht voneinander unterscheidet (STATISTICA, 1995, SACHS, 1996).

Dies wird auch durch die max. Inhibition bestätigt, die in allen Fällen > 90 % ist.

4.5 UNTERSUCHUNG DER VERÄNDERUNG DER ALLERGENITÄT VON MANGOFRÜCHTEN WÄHREND DER LAGERUNG UND REIFUNG

VIETHS ET AL. (1993, 1994b) sowie LI-SHAN ET AL. (1995) konnten in ihren Untersuchungen nicht nur nachweisen, daß die allergene Potenz des Apfels abhängig von der Sorte ist, vielmehr beschrieben sie auch, daß die Konzentration des Mal d 1, im Verlauf der Reifung zunahm. Es schien von Interesse, dies auch am Beispiel der Mango nachzuvollziehen, denn in der Literatur wird beschrieben, daß sich die Konzentration verschiedener Proteine der Mango im Verlauf der Reifung verändert (BOJORQUEZ UND GOMEZ-LIM, 1995). Da sich in Kapitel 4.4 zeigte, daß eine Sortenabhängigkeit der allergenen Potenz bei Mango nicht vorliegt, wurde für diese Untersuchungen die Mangosorte TA, die in Europa am häufigsten verzehrt wird, verwendet. Auch hier erfolgte eine Untersuchung mittels SDS-PAGE/Silberfärbung, IB, IB-Inhibition sowie EAST-Inhibition. Hierzu wurden die Früchte, die vier Tage vor dem Kauf geerntet wurden, im Kühlschrank bei 4 °C gelagert und zu verschiedenen Zeitpunkten aufgearbeitet (s. Anh. 7.2). Die Aufarbeitungen erfolgten am 5., 12., 21., 35. und 40. Tag nach der Ernte. Die Lagerung über einen noch längeren Zeitpunkt war nicht möglich, da die Grenze der Verzehrsfähigkeit der Früchte nach 40 Tagen erreicht war.

4.5.1 SDS-PAGE/Silberfärbung

Die Untersuchung der Extrakte erfolgte analog den in Kap. 4.4.1 durchgeführten Untersuchungen.

Bei der Untersuchung der Veränderung des Proteinmusters während der Lagerung ist das elektrophoretische Bild weniger homogen als beim Vergleich der Mangosorten (Abb. 4.15). In allen fünf Aufarbeitungen wurden ebenfalls drei Banden mit MG < 14 kDa detektiert. Während bei der Aufarbeitung am 5. und 12. Tag nach der Ernte die Intensität der Banden nicht auffällig variierte, war bei den anderen drei Aufarbeitungen eine unterschiedlich starke Detektion erkennbar. Bei der am 21. Tag nach der Ernte durchgeführten Aufarbeitung war die Intensität der beiden Proteinbanden mit dem höheren MG stärker ausgeprägt als die der Proteinbande mit dem niedrigsten detektierten MG. Die Aufarbeitun-

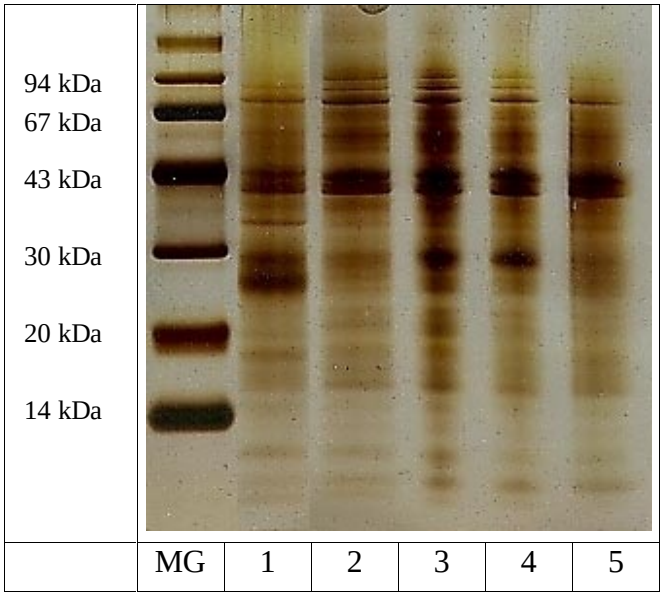


Abb. 4.15: SDS-PAGE der Mangosorte TA mit anschließender Silberfärbung. 1: 5. Tag, 2: 12. Tag, 3: 21. Tag, 4: 35. Tag, 5: 40. Tag

gen, die am 35. und 40. Tag nach der Ernte vorgenommen wurden, zeigten eine stärkere Visualisierung der mittleren Bande. Im MG-Bereich zwischen 14 und 20 kDa gab es ebenfalls Unterschiede im Proteinmuster der einzelnen Extrakte. Während bei der Aufarbeitung am 5. Tag nach der Ernte die Bande mit einem app. MG von 19 kDa am stärksten visualisiert wurde, war die Detektion der Bande mit einem app. MG von 15 kDa bei den Aufarbeitungen vom 21. bis 40. Tag am stärksten. Auch bei den Proteinen mit app. MG von 27 und 29 kDa waren starke Unterschiede erkennbar. Während sie am 5. Tag nach der Ernte nahezu identisch stark ausgeprägt waren, war dies bei den später aufgearbeiteten Extrakten nicht mehr der Fall. Die Aufarbeitungen des 12. und 40.Tages zeigten kaum diskrete Banden. Bei den Aufarbeitungen des 21. und 35. Tages nach der Ernte wurde die Bande mit einem app. MG von 29 kDa stärker visualisiert. Das Protein mit einem app. MG von 35 kDa war lediglich bei der Aufarbeitung des 5. Tages als diskrete Bande erkennbar. Die Proteine mit app. MG von 40 und 43 kDa wiesen keine offensichtlichen Unterschiede auf. Das Protein mit einem app. MG von ca. 75 kDa wurde in allen Aufarbeitungen deutlich visualisiert, zusätzlich sind bei den Aufarbeitungen am 12., 21. und 35. Tag noch zwei weitere diskrete Proteinbanden mit MG > 67 kDa erkennbar.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die Konzentration der Proteine mit MG < 14 kDa im Verlauf der Lagerung zunimmt, während die der Proteine mit app. MG von 19, 28 und 35 kDa abnimmt.

4.5.2 SDS-PAGE/IB

Zur Untersuchung der Veränderung der allergenen Potenz während der Lagerung wurden die o.g. Proteinextrakte (ca. 6 µg Protein/cm) mittels SDS-PAGE elektrophoretisch getrennt und auf eine NC-Membran transferiert (Durchführung s. Anh. 7.6.1 und 7.6.4). In Abb. 4.16 ist das Ergebnis einer SDS-PAGE/IB dargestellt. Die Inkubation erfolgte mit einem Poolserum, das aus Seren der Probanden GG, IS, GS, KDH, KLR, TB und RG zusammengestellt wurde. Die Ergebnisse aus Kapitel 4.3 werden hier bestätigt. Das Poolserum detektierte die Hauptallergen Man i 1 und Man i 2 sowie Allergenbanden mit apparenten MG von 14, 43 und 67 kDa.

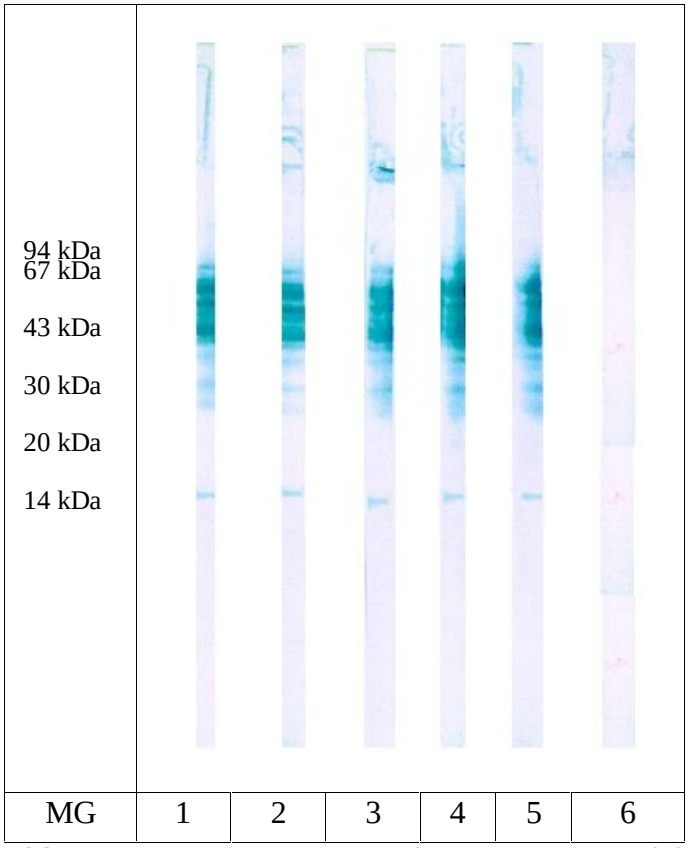


Abb. 4.16: IB Lagerungsversuch Mango TA, Detektion mit Poolserum GG, IS, GS, KDH, KLR, TB, RG. 1: 5. Tag, 2: 12. Tag, 3: 21. Tag, 4: 35. Tag, 5: 40. Tag, 6: Detektion 40. Tag mit Kontrollserum

In allen fünf Proteinextrakten wurde jeweils schwach ein Allergen mit einem app. MG von 14 kDa detektiert. Ein Unterschied in der Intensität der Färbung ist nicht erkennbar. Das Man i 2 wurde ebenfalls in allen fünf Extrakten durch das Poolserum detektiert. Die Färbung war hier nicht sehr stark ausgeprägt, was jedoch in allen Allergenextrakten der Fall ist. Ein offensichtlicher Unterschied in der Stärke der Detektion bestand nicht. Sehr stark werden das Man i 1 sowie die Allergene mit app. MG von 43 und 67 kDa in allen Allergenextrakten visualisiert. Eine Aussage, ob hier ein Unterschied in der Intensität der Färbung vorliegt, kann aufgrund der starken Färbung nicht getroffen werden. Zusammenfassend ist zu sagen, daß ein Unterschied in der Intensität der Färbung visuell nicht erkennbar ist, wobei bemerkt werden muß, daß die Bandenschärfe der Auftragspunkte 3-5 nicht sonderlich hoch ist. Die Untersuchung der Veränderung der Allergenität im Verlauf der Reifung mittels IB wurde auch mit Einzelseren durchgeführt (nicht dargestellt), wobei auch hier keine Unterschiede erkennbar waren.

4.5.3 IB-Inhibition

Durch Anwendung der IB-Inhibition sollte geprüft werden, ob sich im Verlauf der Lagerung die Konzentration einiger Allergene so stark verändert, daß eine gegenseitige Inhibition der Aufarbeitungen vermindert wird. Hierzu wurden die unterschiedlichen Extrakte mittels SDS-PAGE getrennt und auf eine NC-Membran transferiert (s. Anh. 7.6.1 und 7.6.4). Das verwendete Poolserum (GG, IS, GS, KDH, KLR, TB und RG), wurde wie in Anhang 7.9.2 beschrieben, behandelt und dann zur Detektion eingesetzt. In Abb. 4.17 ist exemplarisch eine IB-Inhibition dargestellt, wobei ein Extrakt der Aufarbeitung vom 21. Tag nach der Ernte elektrophoretisch getrennt wurde. Dieser Extrakt wurde sowohl mit den anderen Aufarbeitungen als auch mit sich selbst inhibiert. Zur Überprüfung unspezifischer Inhibitionen wurde eine Inkubation mit OA durchgeführt. Unspezifische Bindungen des Allergenextraktes wurden durch den Einsatz eines Kontrollserums ausgeschlossen. Wie aus Abb. 4.17 zu erkennen ist, wurden vom Poolserum ohne Inhibitor das Man i 1, das Man i 2 sowie Allergene mit app. MG von 14, 43 und 67 kDa detektiert. In sämtlichen Inhibitionsversuchen fand eine vollständige Auslöschung der Allergenbanden statt.

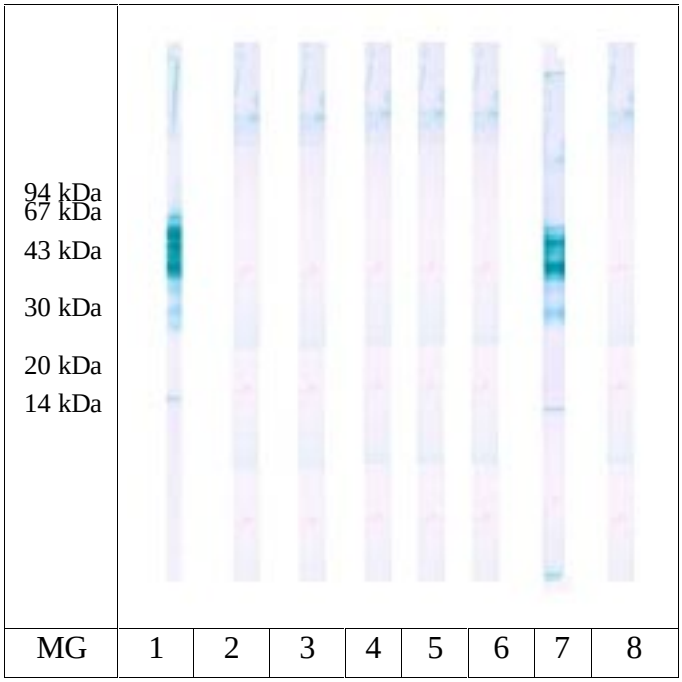


Abb. 4.17: IB-Inhibition Mango TA Lagerungsversuch. Festphase: 21. Tag, 1: ohne Inhibitor, 2: Inhibition mit 5. Tag, 3: Inhibition mit 12. Tag, 4: homologe Inhibition, 5: Inhibition mit 35. Tag, 6: Inhibition mit 40. Tag, 7: Inhibition mit OA, 8: Kontrollserum. Detektion mit Poolserum (GG, IS, GS, KDH, KLR, TB, RG)

Somit ergibt sich in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus 4.5.2, daß eine Veränderung der Allergenität der Mangosorte TA im Verlauf der Lagerung nicht stattfindet. Die Inhibitionsversuche der anderen festphasengebundenen Aufarbeitungen lieferten entsprechende Ergebnisse.

4.5.4 EAST-Inhibition

Zur Quantifizierung der mittels IB und IB-Inhibition erhaltenen Ergebnisse wurde abschließend eine EAST-Inhibition durchgeführt. Hierbei wurden die Allergenextrakte, die am 5. und am 40. Tag nach der Ernte gewonnen wurden, festphasengebunden und mit Konzentrationen von 230,0 – 0,023 µg/mL der jeweils anderen Aufarbeitungen inhibiert (Durchführung s. Anh. 7.5). Zur Bestätigung der richtigen Testdurchführung wurde eine homologe Inhibition durchgeführt. Unspezifische Bindungen wurden durch den Einsatz eines Kontrollserums ausgeschlossen. Daß eine unspezifische Hemmung nicht stattfand, wurde durch Inhibition mit OA abgesichert. In Tab. 4.4 sind die max. Inhibition sowie die Konzentrationen an Inhibitorlösung, die zum Erreichen einer 50 %igen Inhibition eingesetzt werden mußten, aufgeführt.

Tab. 4.4: Ergebnisse der EAST-Inhibition der Mangosorte TA zur Untersuchung der Veränderung der Allergenität während der Lagerung und Reifung

GEBUNDENER EXTRAKT	INHIBITOR	5. TAG	12. TAG	21. TAG	35. TAG	40. TAG
5. Tag	50 %ige Inhibition [µg/mL]	1,3	0,6	0,8	1,1	1,1
	max. Inhibition [%]	99	99	99	99	98
40. Tag	50 %ige Inhibition [µg/mL]	1,5	0,7	0,9	1,1	1,1
	max. Inhibition [%]	96	96	96	93	98

In Tab. 4.4 sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen aufgeführt (s. Anh. 7.14). Die Normalverteilung der Einzelwerte konnte nach Kolmogorov-Smirnov nachgewiesen werden. Die Mittelwerte der Inhibitionen wurden in Hinblick auf signifikante Unterschiede zwischen den Sorten mittels LSD-Test verglichen. Hierbei ergaben sich bei einigen Mittelwerten signifikante Unterschiede ($p<0,05$). Betrachtet man jedoch die Konzentrationen der Inhibitorlösung, die zum Erzielen einer 50 %igen Inhibition eingesetzt werden mußten, so wird deutlich, daß diesen Werten kein Trend zugrunde liegt.

Würde die Allergenkonzentration der Inhibitorlösung kontinuierlich zu- oder abnehmen, würde die Allergenität im Verlauf der Lagerung ab- oder zunehmen. Da dies jedoch nicht der Fall ist, kann nicht von einer gerichteten Veränderung ausgegangen werden. Dies wird auch durch die Ergebnisse der max. Inhibition verdeutlicht, die in allen Fällen > 90 % ist.

4.6 UNTERSUCHUNGEN ZUR KREUZREAKTIVITÄT

Wie bereits in den Kapiteln 2.4 und 2.5 erwähnt, gibt es Hinweise darauf, daß es sich bei der Allergie gegen Mango um eine pollenassoziierte Lebensmittelallergie handelt. In diesem Zusammenhang wird von einer Assoziiation zur bekannten kreuzreaktiven Gruppe Beifußpollen-Sellerie-Karotte-Birkenpollen ausgegangen (WÜTHRICH UND HOFER, 1984, WÜTHRICH UND DIETSCHI, 1985, HELBING ET AL., 1993, BREITENEDER ET AL., 1995, JANKIEWICZ ET AL., 1996). In diesem Abschnitt soll nun mittels IB-Inhibition sowie EAST-Inhibition geklärt werden, ob die Hinweise bestätigt werden können.

4.6.1 SDS-PAGE/Silberfärbung

Da eine gute elektrophoretische Auftrennung der Proteinextrakte für die weitergehenden Untersuchungen mittels IB-Inhibition unabdingbar ist, erfolgte zunächst eine Überprüfung der Bedingungen der SDS-PAGE (vergl. Kap. 4.3.1). Für diese Untersuchungen wurde ebenfalls das von MÖLLER ET AL. (1997a) beschriebene Gel verwendet. In Abb. 4.18 ist das Ergebnis einer solchen Trennung mit anschließender unspezifischer Silberfärbung (s. Anh. 7.7.2) dargestellt.

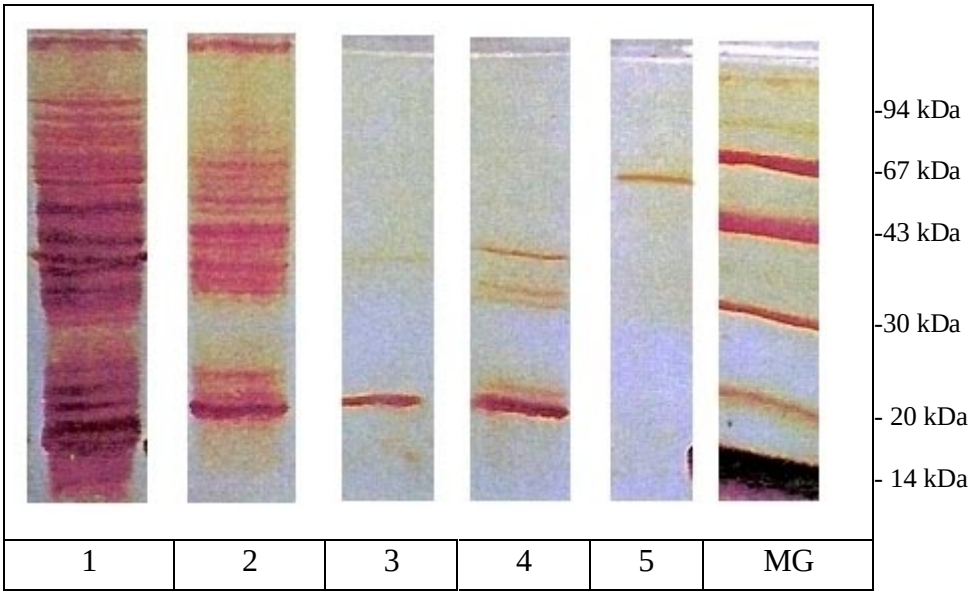


Abb. 4.18: SDS-PAGE und Silberfärbung der zur Untersuchung eingesetzten Proteinextrakte 1: Sellerie, 2: Karotte, 3: Bet v 1, 4: BP, 5: Beifußp., MG: Molekulargewichtsmarker

Der aufgetrennte Proteinextrakt des Selleries zeigt zahlreiche Proteinbanden, denen MG zwischen 14 und 94 kDa zugeordnet werden konnten. Deutlich zu erkennen waren Banden mit app. MG von 16, 18, 19, 20, 33, 35, 42 und 45 kDa. Der Proteinextrakt der Karotte zeigte ein Bandenspektrum in einem MG-Bereich von 30 bis 70 kDa, wobei eine Bande mit einem app. MG von 42 kDa besonders deutlich detektiert wurde. Desweiteren konnte eine stark ausgeprägte Bande bei ca. 18 kDa visualisiert werden.

Der Proteinextrakt der Birkenpollen wies vier deutliche Proteinbanden bei app. MG von 17, 30, 32 und 34 kDa auf. Wie aus dem Elektropherogramm des Bet v 1 ersichtlich ist, handelte es sich bei der Proteinbande mit einem app. MG von 17 kDa um das Hauptallergen der Bir-

kenpollen. Im Proteinextrakt der Beifußpollen wurde lediglich eine Bande mit einem MG von ca. 60 kDa deutlich detektiert.
Der Proteinextrakt der Mango ist hier nicht dargestellt (s. Kap. 4.3). Für die nachfolgenden Untersuchungen wurde ein Extrakt der Mangosorte TA verwendet, der nach den Ergebnissen des Kap. 4.4 als repräsentativ gelten kann.

4.6.2 IB-Inhibition

Die IB-Inhibition bietet die Möglichkeit, die verantwortlichen Allergene für eine vermutete Kreuzreaktion nachzuweisen, da es zu einer Konkurrenzreaktion der Allergene um das spez. IgE der Patientenseren kommt. Liegt eine Kreuzreaktivität vor, so kommt diese in der Schwächung bzw. vollständigen Auslöschung des kreuzreagierenden Allergens zum Ausdruck. Die Untersuchungen wurden mit einem Poolserum, das aus gleichen Teilen der Seren der Probanden AC, NS, RG, KLR, DE, BS, GG, BH und KDH zusammengestellt wurde, durchgeführt.

4.6.2.1 IB-Inhibition des Mangoextraktes

In Abb. 4.19 ist die IB-Inhibition eines Extraktes der Mango dargestellt. Vom Poolserum wurden ohne Zusatz eines Inhibitors, in Übereinstimmung mit den zuvor erhaltenen Ergebnissen, die Hauptallergene Man i 1 und Man i 2 sowie Allergenbanden mit app. MG von 14, 43 und 67 kDa detektiert. Durch die homologe Inhibition kam es erwartungsgemäß zur vollständigen Auslöschung der Allergenbanden. Dagegen führte die Inhibition mit Extrakten von Beifußpollen und Karotte nur zur Auslöschung des Man i 1 sowie der Banden mit app. MG von 43 und 67 kDa. Bei Einsatz des Proteinextraktes des Selleries als Inhibitor kam es ebenfalls zur Auslöschung des Man i 1 sowie von Allergenbanden mit app. MG von 43 und 67 kDa. Zusätzlich wurde das Allergen mit einem app. MG von 14 kDa inhibiert.
Durch Inhibition mit dem Birkenpollenextrakt wurde die Bindung von spez. IgE an das Man i 1 sowie die Banden mit app. MG von 43 und 67 kDa gehemmt. Die Bande mit einem app. MG von 14 kDa wurde nicht mehr detektiert.
Die Inhibition mit dem Hauptallergen der Birkenpollen, dem Bet v 1, führte zu einer Inhibition des Allergens mit einem app. MG von 14 kDa. Somit konnte nachgewiesen werden, daß die Kreuzreaktivität der Mango unter anderem auf ein Protein zurückzuführen ist, das eine Homologie zum Bet v 1 aufweist.
Dies folgt auch aus den Ergebnissen der Inhibition mit dem Extrakt des Selleries, da die Kreuzreaktivität zweier Hauptallergene des Selleries, des Api g 1 und des Api g 2, zum Bet v 1 bekannt ist (Breiteneder et al., 1995, Bauer et al., 1996, Hoffmann-Sommergruber et al., 1996, 1997).
Dafür spricht ebenfalls, daß diese Bande durch Beifußpollen und Karotte nicht inhibiert wird, da bekannt ist, daß weder Beifußpollen noch Karotte Bet v 1-homologe Allergene besitzen (Ebner et al., 1995, Bauer et al., 1996, Grote et al., 1998, Hirschwehr et al., 1998).

Dieses Allergen ist jedoch nicht allein für die Kreuzreaktivität der Mango verantwortlich, sondern auch das Man i 1 sowie Proteine mit MG von 43 und 67 kDa konnten in diesem Versuch inhibiert werden.
Eine unspezifische Inhibition mit OA fand nicht statt. Des weiteren konnten unspezifische Bindungen mit Hilfe eines Kontrollserums ausgeschlossen werden.

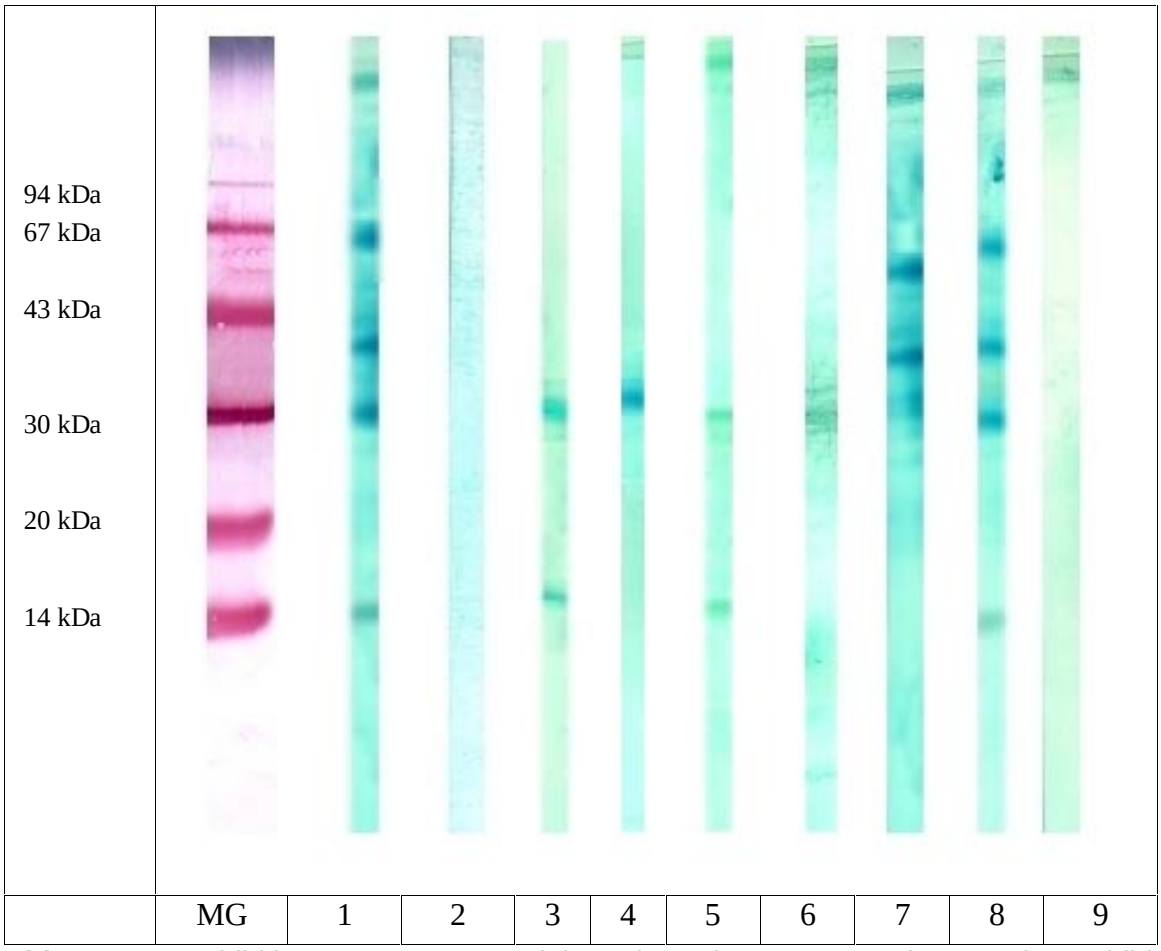


Abb. 4.19: IB-Inhibition Mango TA. Detektion mit Poolserum. 1: Poolserum ohne Inhibitor, 2: homologe Inhibition, 3: Inhibition mit Beifußpollen, 4: Inhibition mit Sellerie, 5: Inhibition mit Karotte, 6: Inhibition mit Birkenpollen, 7: Inhbition mit Bet v 1, 8: Inhibition mit OA, 9: Kontrollserum

4.6.2.2 IB-INHIBITION DES BEIFUßPOLLENEXTRAKTES

Die Untersuchung des Beifußpollenextraktes zeigte, daß vom Poolserum ohne Zusatz eines Inhibitors Allergene mit app. MG von 35, 60 und 70 kDa nachgewiesen werden können (s. Abb. 4.20). Bei dem Allergen mit einem app. MG von 35 kDa handelt es sich um das Glycoprotein Art v 2, ein Hauptallergen der Beifußpollen, das erstmals von NILSEN UND PAULSEN (1990) durch Kombination von IEC und AC isoliert werden konnte und dessen MG mit 35 kDa angegeben wird (NEDERGAARD-LARSEN UND LOEWENSTEIN, 1999). Bei dem Allergen mit einem app. MG von 60 kDa handelt es sich um das Glycoprotein Art v 1 (BAUER ET AL., 1996, HEISS ET AL., 1996, GROTE ET AL., 1998, HIRSCHWEHR ET AL., 1998), das auch homologe Strukturen mit niedrigeren MG besitzt (DE LA HOZ ET AL., 1990, NEDERGAARD-LARSEN UND LOEWENSTEIN, 1999). Auch homologe Allergene mit höheren MG sind bekannt, so zeigten in Untersuchungen von HEISS ET AL. (1996) die eingesetzten Probanden ebenfalls eine Reaktion auf Beifußpollenproteine mit MG von 60–69 kDa. In einer IB-Inhibition mit isoliertem Art v 1 konnte die Bindung an das Protein mit 69 kDa ebenfalls vollständig inhibiert werden, so daß davon ausgegangen werden kann, daß hier eine Homologie der Epitope vorliegt.

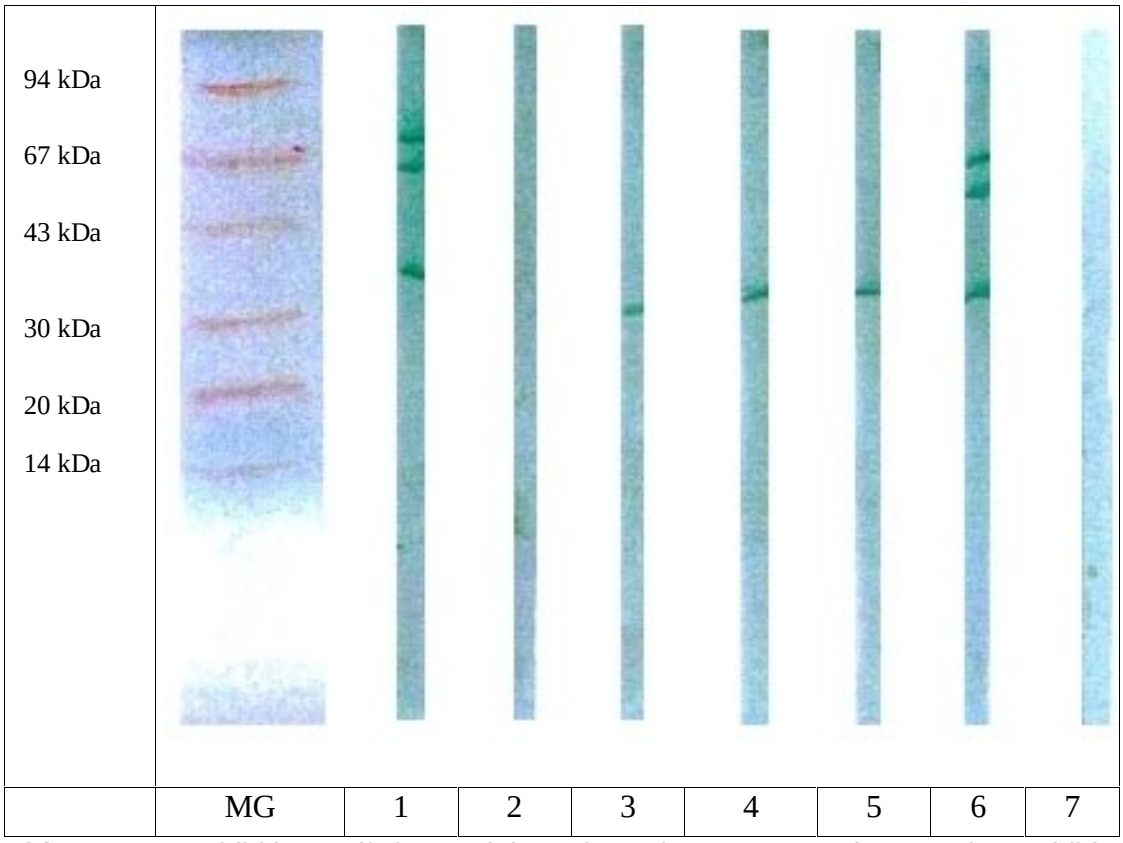


Abb. 4.20: IB-Inhibition Beifuß. Detektion mit Poolserum, 1: Poolserum ohne Inhibitor, 2: homologe Inhibition, 3: Inhibition mit Mango, 4: Inhibition mit Sellerie, 5: Inhibition mit Karotte, 6: Inhibition mit OA, 7: Kontrollserum

Ein weiteres wichtiges Beifußpollen-Allergen, das Profilin mit einem MG von 14 kDa (BAUER ET AL., 1996) wurde vom eingesetzten Probandenserum nicht detektiert.
Die Inkubation mit Proteinextrakten von Sellerie, Karotte und Mango bewirkten jeweils eine Inhibition der Allergene mit app. MG von 60 und 70 kDa. Eine Hemmung des Allergens mit einem app. MG von 35 kDa konnte nicht beobachtet werden. Somit ist die Kreuzreaktivität zwischen Sellerie, Karotte, Mango und Beifußpollen wahrscheinlich auf das Art v 1 und das homologe Allergen mit einem app. MG von 70 kDa zurückzuführen.
Unspezifische Inhibtionen mit OA traten nicht auf und auch nichtspezifische Bindungen konnten durch Einsatz des Kontrollserums ausgeschlossen werden.

4.6.2.3 IB-INHIBITION DES SELLERIEEXTRAKTES

Durch das eingesetzte Poolserum konnten Allergenbanden mit app. MG von 14, 16, 45 und 60 kDa visualisiert werden (s. Abb. 4.21). Bei dem Allergen mit einem app. MG von 14 kDa handelt es sich um das von BREITENEDER ET AL. (1995) mittels Sequenzanalyse bestimmte Api g 1 mit einem MG von 16 kDa (NEDERGAARD-LARSEN UND LOEWENSTEIN, 1999). Ferner wird es sich bei dem Allergen mit einem app. MG von 16 kDa um das Api g 2, ein Protein mit einem MG von 17 kDa handeln (HOFFMANN-SOMMERGRUBER ET AL., 1996). Beide Allergene besitzen eine hohe Analogie zum Bet v 1. Auch die Detektion von Banden mit app. MG von 35-60 kDa wird häufig in der Literatur beschrieben. Hierbei handelt es sich nach übereinstimmender Auffassung um kreuzreagierende Glycoproteine (EBNER ET AL., 1995, BAUER ET AL., 1996, HEISS ET AL., 1996, JANKIEWICZ ET AL., 1997, 1998, GROTE ET AL., 1998).
Ein weiteres wichtiges Sellerieallergen, das Sellerieprofilin mit einem MG <14 kDa (BAUER ET AL., 1996, JANKIEWICZ ET AL., 1996, 1997, 1998), konnte nicht detektiert werden.
Durch die homologe Inhibition kam es zur vollständigen Auslöschung der Allergenbanden. Durch Inkubation mit dem Proteinextrakt der Mango kam es zu einer vollständigen Inhibition des Api g 1 und des Api g 2, während die Allergene mit höherem MG noch abgeschwächt detektiert wurden. Dies spricht wiederum für das Vorliegen kreuzreaktiver Strukturen im MG Bereich um 60 kDa sowie für Bet v 1 homologe Strukturen.
Die Inhibition mit den Proteinextrakten von Beifußpollen und Karotte bewirkte eine Abschwächung der Intensität der Färbung von Allergenen mit einem MG von ca. 60 kDa.
Daß keine unspezifischen Inhibitionen vorlagen, konnte mit dem Einsatz von OA als Inhibitor nachgewiesen werden. Ferner wurden unspezifische Bindungen durch Verwendung eines Kontrollserums ausgeschlossen.

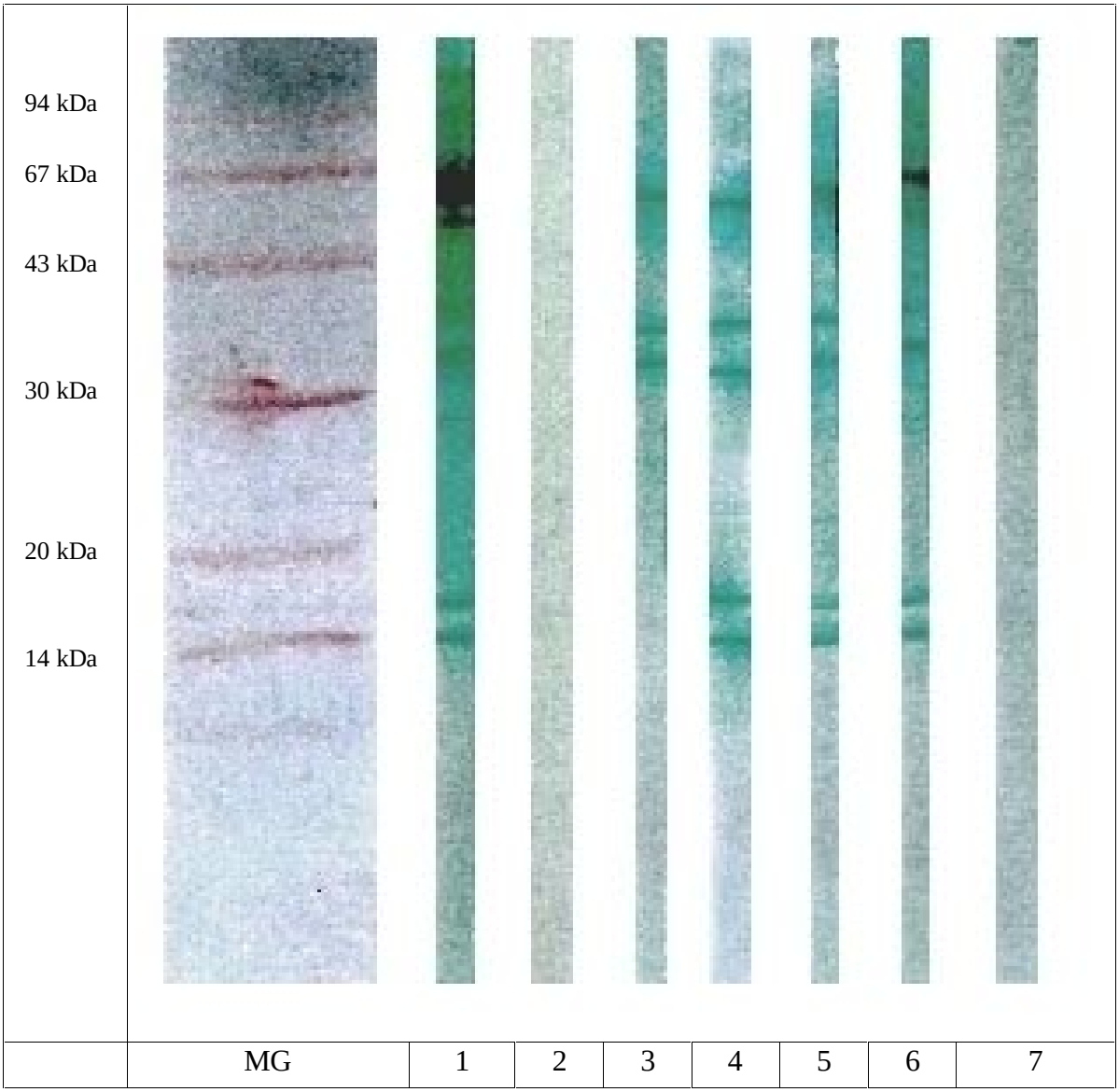


Abb. 4.21: IB-Inhibition Sellerie. Detektion mit Poolserum, 1: Poolserum ohne Inhibitor, 2: homologe Inhibition, 3: Inhibition mit Mango, 4: Inhibition mit Karotte, 5: Inhibition mit Beifußpollen, 6: Inhibition mit OA, 7: Kontrollserum, 8: Molekulargewichtsmarker

4.6.2.4 IB-INHIBITION DES KAROTTENEXTRAKTES

Die Untersuchung der Allergene der Karotte in der IB-Inhibition ohne Zusatz eines Inhibitors führte zur Detektion von Allergenen mit app. MG von 16, 40, 43, 45, 50 und 67 kDa (s. Abb. 4.22). Dies stimmt mit den Ergebnissen der vorliegenden Literatur weitgehend überein. So kann das von HOFFMANN-SOMMERGRUBER ET AL. (1996) mittels Sequenzanalyse bestimmte Allergen Dau c 1 mit einem MG von 16,1 kDa dem detektierten Allergen mit einem app. MG von 16 kDa zugeordnet werden. Des weiteren werden in der Literatur Allergene mit MG von ca. 40 und 66 kDa beschrieben (HELBING ET AL., 1993, JORDAN-WAGNER ET AL., 1993, QUIRCE ET AL, 1997). Das von EBNER ET AL. (1995) nachgewiesene Profilin mit einem MG von 14 kDa wurde jedoch nicht detektiert. Die korrekte Durchführung der Untersuchung konnte nachgewiesen werden, indem in der homologen Inhibition keine Allergene mehr detektiert wurden.

Ferner konnten unspezifische Inhibitionen durch Einsatz von OA ausgeschlossen werden und auch unspezifische Bindungen des Kontrollserums wurden nicht beobachtet. Durch Inhibition mit den Proteinextrakten von Sellerie und Beifußpollen wurden die Allergene mit app. MG von 40, 45, 50 und 67 kDa nicht mehr visualisiert.

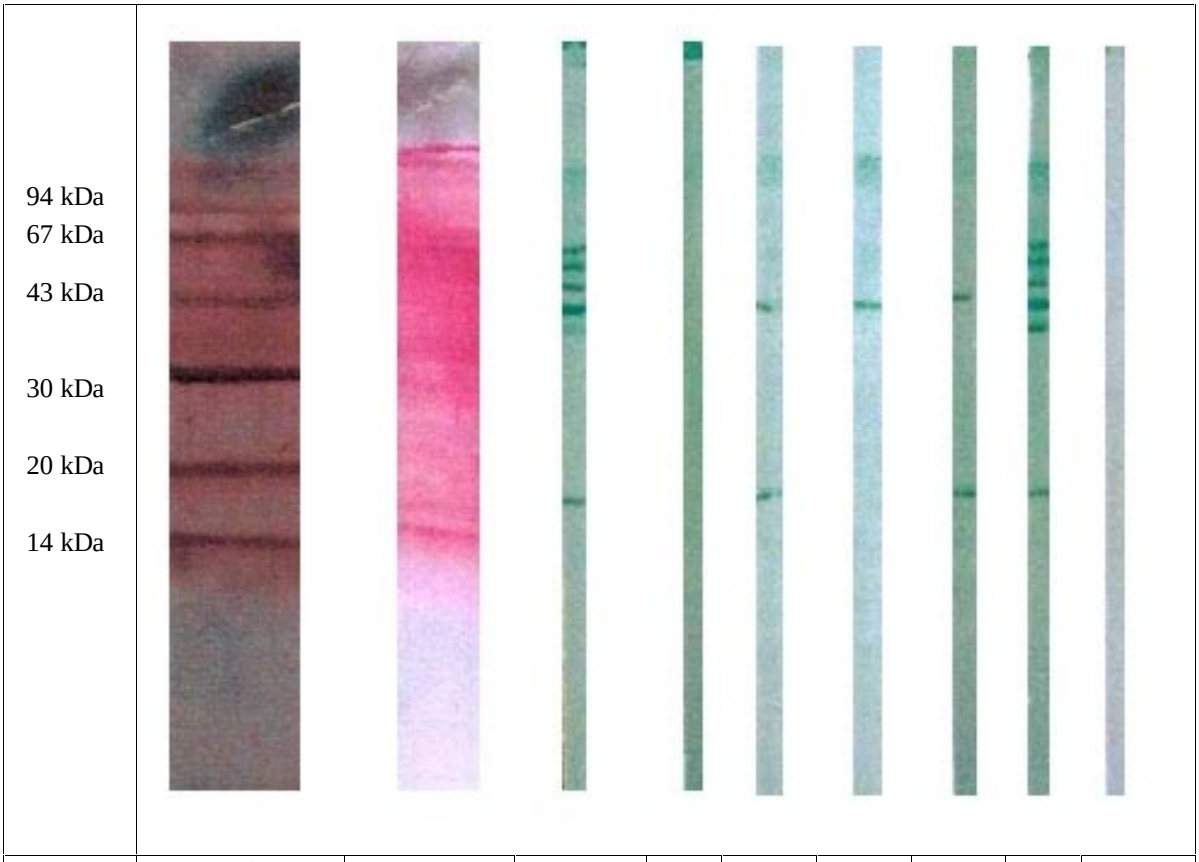


Abb. 4.22: IB-Inhibition Karotte. Detektion mit Poolserum, 1: Poolserum ohne Inhibitor, 2: homologe Inhibition, 3: Inhibition mit Sellerie, 4: Inhibition mit Mango, 5: Inhibition mit Beifußpollen, 6: Inhibition mit OA, 7: Kontrollserum, MG: Molekulargewichtsmarker

Eine Verminderung der IgE-Bindung der 16 und 43 kDa Allergene konnte nicht festgestellt werden. Auch der Proteinextrakt der Mango führt zu einer Inhibition der Allergene mit app. MG von 40, 45, 50 und 67 kDa, zusätzlich zu den anderen Proteinextrakten fand eine IgE-Bindung an das 16 kDa Allergen nicht mehr statt. Nur das Allergen mit einem app. MG von 43 kDa wurde weiterhin detektiert.

4.6.2.5 ZUSAMMENFASSUNG

Die nachgewiesene Kreuzreaktivität zwischen Beifußpollen und Mango ist bei der Mango auf das Man i 1 sowie die Proteine mit einem app. MG von 43 und 67 kDa zurückzuführen. Auf Seiten der Beifußpollen ist hierfür das Art v 1 verantwortlich. Das Allergen der Mango mit einem app. MG von 14 kDa sowie das Man i 2 besitzen ebenso wie das Art v 2 der Beifußpollen keine Bedeutung für die Kreuzreaktivität. Da im Proteinextrakt der Beifußpollen durch das eingesetzte Poolserum kein Profilin detektiert werden konnte und das Mangoallergen mit

einem app. MG von 14 kDa unvermindert stark detektiert wird, ist anzunehmen, daß es sich bei diesem Protein nicht um ein Profilin handelt.

Auf das Man i 1 sowie die Allergene mit app. MG von 14, 43 und 67 kDa der Mango ist die Kreuzreaktion zum Sellerie zurückzuführen. Weiter konnte gezeigt werden, daß die Allergene Api g 1, Api g 2 sowie die Glycoproteine mit MG um 60 kDa für die Kreuzreaktion des Selleries zur Mango verantwortlich sind. Da die Kreuzreaktivität von Api g 1 und Api g 2 zum Bet v 1 erwiesen ist, ist anzunehmen, daß es sich bei dem Allergen der Mango mit einem app. MG von 14 kDa um ein Bet v 1 homologes Protein handelt.

Auch für die Kreuzreaktion zwischen Mango und Karotte zeigen sich das Man i 1 sowie die Allergene mit MG von 43 und 67 kDa verantwortlich. Auf Seite der Karotte ist die Kreuzreaktion auf Proteine mit app. MG von 16, 40, 50 und 67 kDa zurückzuführen.

Durch Inhibition der Mango mit Bet v 1 konnte gezeigt werden, daß die Mango ein Bet v 1 homologes Allergen mit einem app. MG von 14 kDa besitzt. Die Inhibition mit einem Birkenpollenextrakt führt zusätzlich zu einer Inhibition des Man i 1 sowie der Proteine mit MG von 43 und 67 kDa.

Die Kreuzreaktivität der Mango ist demnach also in erster Linie auf das Man i 1 sowie die Proteine mit app. MG von 43 und 67 kDa sowie auf das Allergen mit einem app. MG von 14 kDa zurückzuführen, das eine Homologie zum Bet v 1 der Birkenpollen zeigt.

Die Kreuzreaktivität zwischen Beifußpollen, Sellerie und Karotte konnte auf die Kreuzreaktivität der Proteine mit MG um die 60 kDa zurückgeführt werden. Diese kreuzreaktiven Proteine wurden bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (HEISS ET AL., 1996, JANKIEWICZ ET AL., 1997, 1998, GROTE ET AL., 1998, HIRSCHWEHR ET AL., 1998).

Von Interesse ist weiterhin, daß bei dem zweiten Hauptallergen der Mango, dem Man i 2, keine Kreuzreaktivität nachgewiesen werden konnte, so daß anzunehmen ist, daß die Epitopstrukturen isoliert vorkommen.

4.6.3 EAST-Inhibition

Die EAST-Inhibition stellt eine weitere Möglichkeit der Untersuchung von Kreuzreaktivitäten dar. Im Gegensatz zur IB-Inhibition erfolgt hier keine Auftrennung der Proteine nach ihrem MG, sondern sie werden nach Kopplung an eine Festphase in Summe detektiert.
Zur Detektion wird das in 4.6.2 beschriebene Poolserum verwendet. Um unspezifische Inhibitionen auszuschließen, wurde jeweils eine Inhibition mit OA durchgeführt. Unspezifische Bindungen wurden durch Verwendung eines Serums eines Nichtallergikers ausgeschlossen (Durchführung s. Anh. 7.5).

4.6.3.1 Festphasengebundener Mango-Proteinextrakt

Die maximalen Hemmwerte, die durch Inhibition mit den jeweiligen Proteinextrakten erreicht wurden, sind, ebenso wie die Konzentrationen an Inhibitorlösung, die zum Erreichen einer 50 %igen Inhibition benötigt wurden, in Tab. 4.5 aufgeführt. Eine Auflistung der Meßwerte erfolgt in Anhang 7.15.1.

Tab. 4.5: Ergebnisse der EAST-Inhibition des festphasengebundenen Mango-Extraktes

FESTPHASE	INHIBITOR	MANGO	BEIFUßP.	SELLERIE	KAROTTE
MANGO	50 %-Inhib. [µg/mL]	0,7	16,0	27,3	0,5
	max. Inhibition [%]	93	--	59	72
	INHIBITOR	**BP**	**BET V 1**		
	50 %-Inhib. [µg/mL]	24,6	--		
	max. Inhibition [%]	58	28		

In der homologen Inhibition erreichte der Proteinextrakt der Mangosorte TA eine max. Inhibition von 93 %. Um eine Inhibition von 50 % zu erreichen, mußte ein Proteinextrakt mit einer Konzentration von 0,7 µg/mL eingesetzt werden. Dieser Wert ist mit den zuvor erzielten Daten (s. Kap. 4.4 und 4.5) vergleichbar und bestätigt die Richtigkeit der Testdurchführung.
Die Kreuzreaktivität zwischen Beifußpollen und Mango konnte bestätigt werden, denn der Beifußpollenextrakt reduzierte die IgE-Bindung der Mango um 50 %. Diese Inhibiton ist nach den Ergebnissen der IB-Inhibition auf das Art v 1 sowie auf das homologe Allergen mit einem app. MG von 70 kDa zurückzuführen.
Zum Erreichen der 50 %igen Inhibition mußte beim Sellerie ein Proteinextrakt mit einer Konzentration von 27,3 µg/mL eingesetzt werden. Die max. Inhibition, die durch Sellerie zu erreichen war, beträgt 59 % und ist somit höher, als die Inhibition, die durch den Beifußpollenextrakt erzielt werden konnte. Dieses Ergebnis stimmt mit dem Ergebnis der IB-Inhibition überein, denn die Kreuzreaktivität ist einerseits wie bei Beifußpollen auf Glycoproteine

zurückzuführen, andererseits wird durch die Bet v 1-homologen Allergene Api g 1 und Api g 2 eine zusätzliche Hemmung erzielt.
Auch die Kreuzreaktivität von Mango und Karotte konnte bestätigt werden, da der Proteinextrakt der Karotte vermindert die IgE-Bindung an die Mango um 72 % verminderte. Beachtlich hierbei ist, daß zur 50 %igen Inhibition eine Konzentration der Inhibitorlösung von 0,5 µg/mL ausreichte. Diese starke Kreuzreaktivität weicht von den Ergebnissen der IB-Inhibition ab, denn dort wurde die Inhibition lediglich durch das Man i 1 sowie die Allergene mit MG von 43 und 67 kDa bewirkt. Die hier beobachtete starke Inhibition könnte einerseits auf eine sehr starke Kreuzreaktivität der Allergene zurückzuführen sein, andererseits ist es möglich, daß unter den reduzierenden Bedingungen der SDS-PAGE Konformationsepitope zerstört wurden, die in der EAST-Inhibition weiterhin detektierbar sind.
Der Birkenpollenextrakt bewirkte eine max. Inhibition von 58 %, was ebenfalls als Nachweis für eine Kreuzreaktion betrachtet werden kann. Dieses Ergebnis stimmt sehr gut mit der max. Inhibition durch den Sellerieextrakt überein, der nach den Ergebnissen der IB-Inhibition die gleichen kreuzreaktiven Strukturen, nämlich Glycoproteine sowie eine Bet v 1 Assoziation, aufweist.
Das Bet v 1, bewirkt eine max. Inhibition von 28 %. Somit bestätigen sich die Ergebnisse der IB-Inhibition, wo gezeigt werden konnte, daß das Allergen der Mango mit einem app. MG von 14 kDa eine Homologie zum Bet v 1 aufweist.

4.6.3.2 Festphasengebundener Beifußpollen-Proteinextrakt

Zur Überprüfung der Ergebnisse, die mit dem festphasengebundenen Mango-Proteinextrakt gewonnen wurden, erfolgte eine Inhibition des Beifußpollenextraktes mit Mango-, Sellerie- und Karottenproteinextrakten. Die Ergebnisse der max. Inhibition sowie die Proteinkonzentrationen, die zum Erreichen einer 50 %igen Inhibition benötigt wurden, sind in Tab. 4.6 dargestellt. Die Darstellung der Einzelwerte erfolgt in Anh. 7.15.2.

Tab. 4.6: Ergebnisse der EAST-Inhibition des festphasengebundenen Beifußpollen-Extraktes

FESTPHASE	INHIBITOR	BEIFUßP.	MANGO	SELLERIE	KAROTTE
BEIFUßP.	50 %ige Inhib. [µg/mL]	1,6	5,9	0,3	49,5
	max. Inhibition [%]	82	58	55	57

Die IgE-Bindung des Beifußpollenextraktes konnte in der homologen Inhibition um 82 % vermindert werden. Die zur 50 %igen Inhibition benötigte Konzentration des Proteinextraktes betrug 1,6 µg/mL.
Die Kreuzreaktion zwischen Mango und Beifußpollen konnte auch in diesem Versuch nachgewiesen werden, denn der Mangoextrakt reduzierte die Bindung der spez. Antikörper um

58 %. Zum Erreichen einer 50 %igen Inhibition wurde eine Konzentration des Mangoproteinextraktes von 5,9 µg/mL benötigt. Dieses Ergebnis stimmt mit dem der IB-Inhibition überein, denn dort konnte gezeigt werden, daß die Proteine der Mango eine Inhibition des Art v 1 sowie des Allergens mit einem app. MG von 70 kDa erzielen.
Die bekannte Kreuzreaktivität zwischen Beifußpollen und Sellerie wurde in der vorliegenden Untersuchung bestätigt. Der Proteinextrakt des Selleries bewirkte eine max. Inhibition von 55 %. Die Konzentration des Inhibitorextraktes, die zum Erreichen einer 50 %igen Inhibition benötigt wurde, betrug beim Sellerie 0,3 µg/mL. Da die Kreuzreaktivität zwischen Beifußpollen und Sellerie nach den Ergebnissen der IB-Inhibition auf die gleichen Allergene zurückzuführen ist, bestätigen sich die max. Inhibitionen, die durch den Mango- und den Sellerieextrakt erreicht werden konnten, mit 58 bzw. 55 % gegenseitig.
Dies gilt auch für die Kreuzreaktivität zwischen Beifußpollen und Karotte. Hier wurde eine max. Inhibition von 57 % bestimmt. Die Konzentration des Proteinextraktes zur 50 %igen Inhibition beträgt hierbei 49,5 µg/mL.

4.6.3.3 FESTPHASENGEBUNDENER SELLERIE-PROTEINEXTRAKT

In Tab. 4.7 ist die max. Hemmung des Sellerie-Proteinextraktes dargestellt. Desweiteren wird die Konzentration an Inhibitorlösung, die zu einer 50 %igen Hemmung der Bindung von spez. IgE führt, aufgezeigt. Die Einzelergebnisse dieser Untersuchung sind in Anh. 7.15.3 aufgeführt.

Tab. 4.7: Ergebnisse der EAST-Inhibition des festphasengebundenen Sellerie-Proteinextraktes

FESTPHASE	INHIBITOR	SELLERIE	MANGO	BEIFUßP.	KAROTTE
SELLERIE	50 %ige Inhib. [µg/mL]	0,1	0,58	0,02	301,7
	max. Inhib. [%]	89	83	71	54

Der Proteinextrakt des Selleries führte in der homologen Inhibition zu einer max. Hemmung von 89 %. Für die 50 %ige Inhibition mußte eine Proteinkonzentration von 0,1 µg/mL eingesetzt werden.
Die Kreuzreaktivität von Mango und Sellerie bestätigte sich auch in dieser Untersuchung. Durch den Proteinextrakt der Mango ist eine max. Inhibition von 83 % erreicht worden. Eine 50 %ige Inhibition des Selleries wurde durch eine Mangoproteinkonzentration von 0,58 µg/mL bewirkt. Die relativ hohe max. Inhibition ist auf die kreuzreaktiven Strukturen zurückzuführen, denn die Mangoproteine sind nach der Ergebnissen der IB-Inhibition in der Lage, die Bindung des spez. IgE sowohl an die Glycoproteine im höheren MG-Bereich als auch an die beiden Hauptallergene Api g 1 und Api g 2 zu inhibieren. Erstaunlich ist, daß die max.

Inhibition durch Mangoproteinextrakt bedeutend höher ist, als die, die am festphasengebundenen Mangoextrakt durch die Inhibition mit Sellerie erreicht wurde.
Die durch den Beifußpollenextrakt max. erreichbare Inhibition lag bei 71 %. Um eine 50 %ige Inhibition zu erzielen, mußte die Konzentration des Beifußpollenextraktes lediglich 0,02 µg/mL betragen. Diese hohe max. Inhibition, schließlich geht die Kreuzreaktivität nach den Ergebnissen der IB-Inhibition nur vom Art v 1 aus, ist ebenfalls erstaunlich. Sie ist jedoch ein Indiz dafür, daß es sich hierbei um ein sehr potentes Allergen handelt, was sich mit den Aussagen von HEISS ET AL. (1996) sowie von GROTE ET AL. (1998) deckt.
Weniger potent sind dagegen die Allergene der Karotte, die nach den Ergebnissen der IB-Inhibition ebenfalls mit den Glycoproteinen kreuzreagieren. Hier liegt die max. Inhibition durch den Extrakt der Karotte bei 54 %. Zum Erreichen einer 50 %igen Inhibition mußte eine Proteinkonzentration von 301,7 µg/mL eingesetzt werden.

4.6.3.4 FESTPHASENGEBUNDENER KAROTTEN-PROTEINEXTRAKT

Die max. Hemmungen, die durch Inhibition mit den jeweiligen Proteinextrakten erreicht werden konnten, sowie die Konzentration an Proteinlösung, die zum Erreichen einer 50 %igen Inhibition führen, sind in Tab. 4.8 dargestellt. Die Einzelwerte finden sich in Anhang 7.15.4.

Tab. 4.8: Ergebnisse der EAST-Inhibition des festphasengebundenen Karotten-Proteinextraktes

FESTPHASE	INHIBITOR	KAROTTE	MANGO	BEIFUßP.	SELLERIE
KAROTTE	50 %ige Inhib. [µg/mL]	10,4	62,3	16,0	2,1
	max. Inhib. [%]	83	73	--	69

Die max. Hemmung der IgE-Bindung in der homologen Inhibition betrug 83 %. Zum Erreichen einer 50 %igen Inhibition mußte hierbei ein Proteinextrakt mit einer Konzentration von 10,4 µg/mL eingesetzt werden.
Auch diese Untersuchung bestätigt, daß eine Kreuzreaktivität zwischen Karotte und Mango vorliegt. Die Tatsache, daß die IgE-Bindung an den Proteinextrakt der Karotte durch eine Inkubation mit einem Mangoproteinextrakt bis auf 73 % inhibiert wurde, deckt sich mit den Ergebnissen der IB-Inhibition, denn dort konnte gezeigt werden, daß nur die Mango in der Lage war, an das Dau c 1 zu binden. Eine 50 %ige Inhibition wird durch eine Proteinkonzentration von 62,3 µg/mL bewirkt.
Auch das Vorliegen einer Kreuzreaktion zwischen Karotte und Beifußpollen bestätigte sich. Eine 50 %ige Inhibition wird bei einer Proteinkonzentration von 16,0 µg/mL erreicht; dies stimmt gut mit den Ergebnissen der IB-Inhibition überein, denn dort konnte gezeigt werden, daß das Dau c 1 der Karotte durch den Proteinextrakt der Beifußpollen nicht inhibiert wurde.

Da dies auch für Sellerie gilt, ist die hohe max. Inhibition von 69 % erstaunlich. Zur 50 %igen Hemmung der Bindung des spez. IgE wurde eine Proteinkonzentration von 2,1 µg/mL benötigt. Dieses Phänomen ist entweder auf eine hohe Potenz der kreuzreagierenden Proteine zurückzuführen oder aber es liegen hier Konformationsepitope vor, die in der SDS-PAGE zerstört worden sein könnten.

4.7 ENTWICKLUNG EINER METHODE ZUR ISOLIERUNG DER MANGOALLERGENE

Im folgenden Teil galt es, die bisher charakterisierten Hauptallergene zu isolieren und erste Ansätze für die Aufklärung der Epitopstruktur zu erarbeiten.

Nach den bisher erhaltenen Ergebnissen weisen alle mittels IEF/IB bzw. 2D-Elektrophorese/IB detektierten Allergene pI im sauren pH-Bereich auf, wobei es nicht gelang, das Allergen mit einem app. MG von 14 kDa zu detektieren. Daher wurde IEC unter Verwendung einer Anionenaustauschersäule zunächst als Verfahren zur Isolierung der Hauptallergene gewählt. Für diese Untersuchungen wurden Extrakte der Mangosorte TA verwendet.

4.7.1 Isolierung der Hauptallergene mittels IEC

Da Salze die Trennung von Proteinen an der IEC erheblich verschlechtern, wurden salzfreie, wäßrige Extrakte (s. Anh. 7.2) auf die Anionenaustauschersäule (Resource Q, 6 mL, Pharmacia) gegeben. Aufgrund der ermittelten pI der Allergene erschien der von BALESTRIERI ET AL. (1990) vorgeschlagene pH-Wert des Puffers von 9,5 als unnötig hoch für eine ausreichende Trennung. Die Elution der Proteine erfolgte daher in Anlehnung an MÖLLER ET AL. (1997b) mit einem 0,02 M Tris-HCl-Puffer bei einem pH von 8,0 unter Verwendung eines Salzgradienten (0-0,5 M NaCl). Die Detektion wurde bei 220 nm durchgeführt.

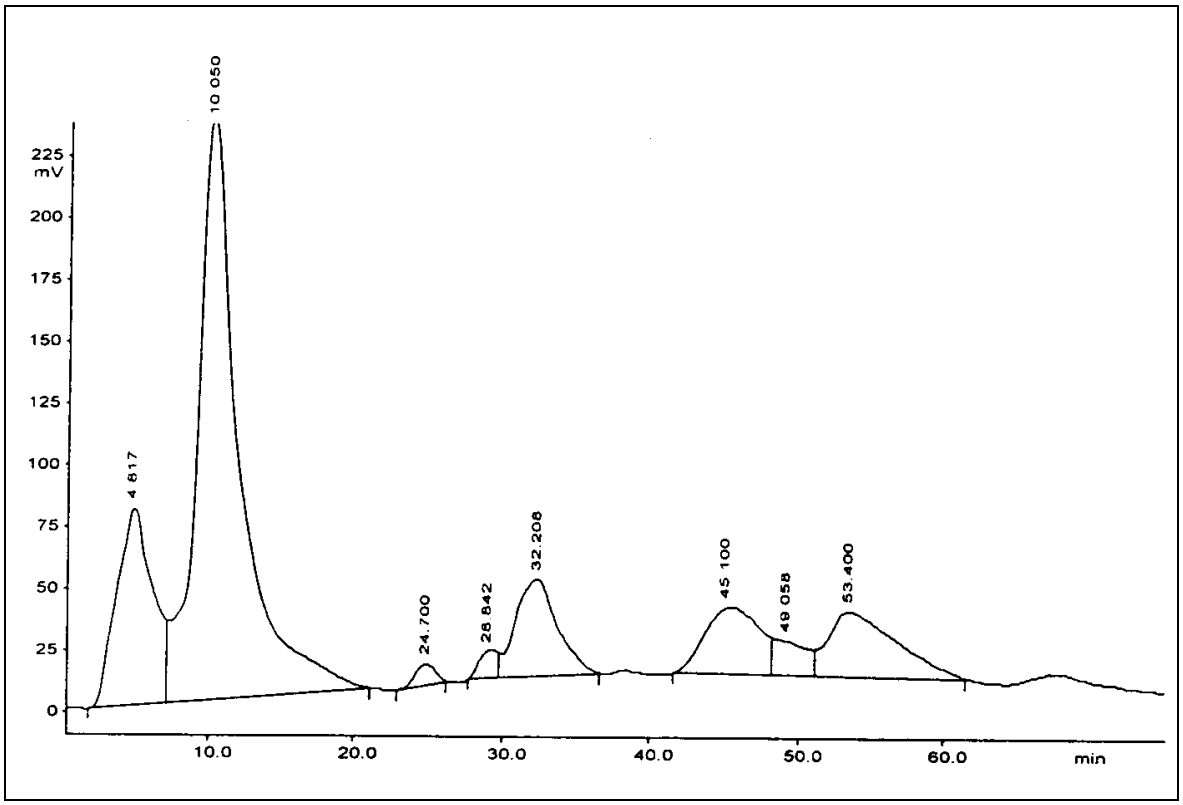


Abb. 4.23: IEC-Trennung eines wäßrigen Mango-Extraktes (=0,8 mg Protein, Injektionsvolumen: 2 mL, Flow: 2 mL/min, UV 220 nm)

Durch die Kalibrierung der Säule anhand von Standardproteinen wurde die Trennleistung überprüft. Weiterhin konnte aufgrund der bekannten pI eine gezielte Sammlung der Fraktionen erfolgen. Die eingesetzten Standardproteine sowie deren Retentionszeit ist in Anhang 7.10.1.2 dokumentiert.
In Abb. 4.23 ist ein Chromatogramm eines mittels IEC aufgetrennten Proteinextraktes der Mango dargestellt (Durchführung s. Anh. 7.10.1). Die Peaks waren gleichmäßig über das gesamte Chromatogramm verteilt. Das Totvolumen der Säule lag bei 10 min. Hier wurden basische und nichtionische Proteine sowie andere UV-aktive Stoffe der Probenmatrix eluiert.
Wie in Kap. 4.3.4 und 4.3.5 ermittelt, sind allen Allergenen pI von 4,6 bis 6,7 zuzuordnen. Aus der Kalibrierung mit den Standardproteinen ergibt sich eine Retentionszeit von 22,4-48,8 min.

4.7.1.1 Untersuchung der IEC-Fraktionen mittels SDS-PAGE/Silberfärbung

Um weitere Untersuchungen durchführen zu können, wurde während der Trennung des Proteinextraktes eine Fraktionssammlung im Abstand von 2,5 min vorgenommen. Jede Fraktion enthielt ein Volumen von 5 mL. Die jeweiligen Fraktionen von vier Läufen wurden gepoolt und lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in 100 µL Probenpuffer aufgenommen und reduziert (s. Anh. 7.6.1.4). Nach Auftrennung der in den Fraktionen enthaltenen Proteine mittels SDS-PAGE wurden die Proteinbanden durch Silberfärbung visualisiert (s. Anh. 7.7.2). Die nachfolgend verwendete Bezeichung der Fraktionen ist in Tab. 4.9 erläutert.

Tab. 4.9: Bezeichnung der IEC-Fraktionen

Fraktion	Retentionszeit [min]
F8	17,5-20,0
F9	20,0-22,5
F10	22,5-25,0
F11	25,0-27,5
F12	27,5-30,0
F13	30,0-32,5
F14	32,5-35,0
F15	35,0-37,5
F16	37,5-40,0
F17	40,0-42,5
F18	42,5-45,0
F19	45,0-47,5
F20	47,5-50,0

In Abb. 4.24 ist das Ergebnis der SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung dargestellt. Während der Proteinextrakt der Mango zahlreiche Banden zwischen 14 und 94 kDa aufwies, zeigten die IEC-Fraktionen nur noch vereinzelte Banden. In Fraktion 8 (F8) waren keine Banden erkennbar. Dagegen wurden in F9 drei Banden mit einem app. MG von 33, 40 und 43 kDa detektiert, wobei die Bande mit einem MG von 33 kDa besonders stark visualisiert wurde. In F10-F12 wurden zusätzlich noch zwei Proteinbanden mit app. MG von 25 und 67 kDa detektiert. In F13 war die Bande mit einem app. MG von 40 kDa nicht mehr zu erkennen. Proteinbanden mit app. MG von 30, 43 und 67 kDa waren in F14 detektierbar, während in F15 keine Proteine visualisiert wurden. In F16 bis F18 konnte eine Bande mit einem app. MG von 42 kDa detektiert werden.

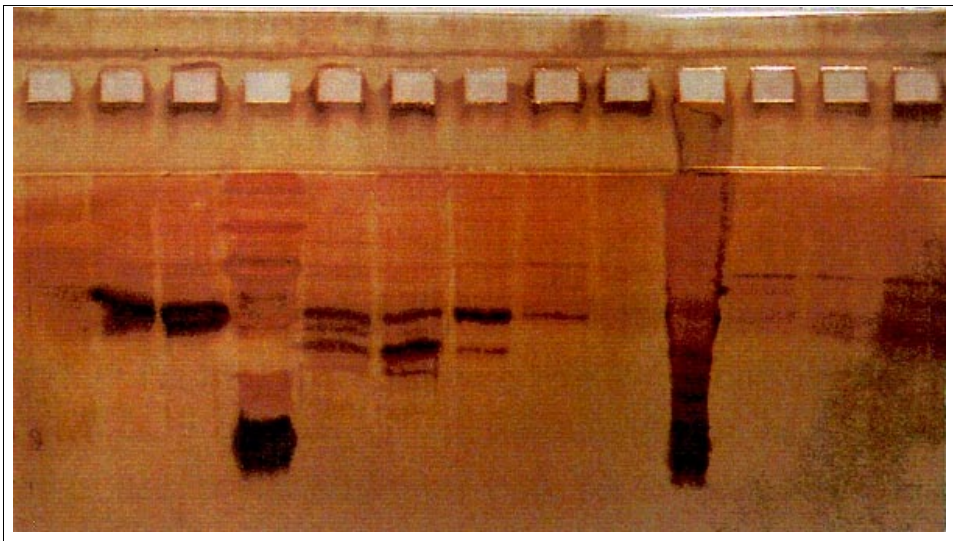


Abb. 4.24: Mango, SDS-PAGE/Silberfärbung der IEC-Fraktionen (mit M=Gesamtextrakt der Mango, MG: Molekulargewichtsmarker)

4.7.1.2 UNTERSUCHUNG DER IEC-FRAKTIONEN MITTELS SDS-PAGE/IB

Die in Tab. 4.9 beschriebenen Fraktionen wurden zum Nachweis der Allergene mittels SDS-PAGE/IB untersucht. Die Untersuchung wurde mit einem Poolserum, das aus gleichen Teilen der Seren der Probanden AC, NS, RG, KLR, DE, BS, GG, BH und KDH zusammengestellt wurde, durchgeführt. Die Darstellung erfolgt in Abb. 4.25 sowie in Tab. 4.10.

Auffällig ist die starke Detektion des 67 kDa Allergens F10 und F11 neben einer etwas schwächeren Detektion in F12 bis F15. Durch Vergleich mit dem Chromatogramm ist ersichtlich, daß dieses Allergen hauptsächlich im Peak bei 25 min eluierte. In der Silberfärbung wurde jedoch deutlich, daß der Anteil am Gesamtpeak sehr klein ist, denn eine Visualisierung fand beispielsweise im Gegensatz zum Protein mit einem app. MG von 30 kDa kaum statt. Da

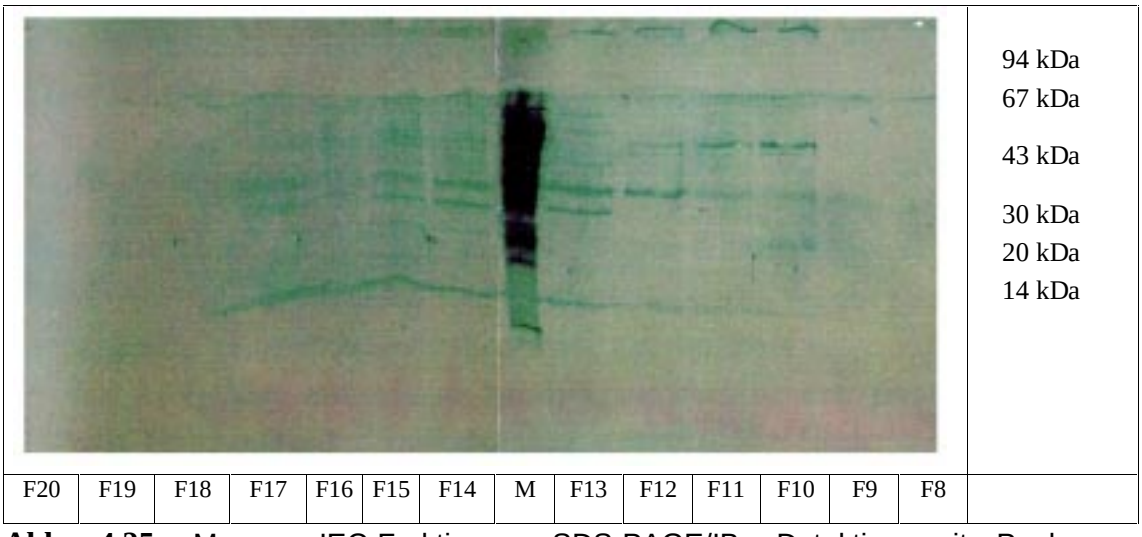


Abb. 4.25: Mango, IEC-Fraktionen, SDS-PAGE/IB, Detektion mit Poolserum (mit M=Gesamtextrakt der Mango)

die Elution dieses Allergens im Zeitraum von 22,5-38 min erfolgte, ergab sich durch Vergleich mit den Standardproteinen (s. Anh. 7.10.1.2) ein pI-Bereich von 6,6 bis ca. 4,5. In der 2D-Elektrophorese konnte lediglich ein Allergen mit einem pI von 4,9 detektiert werden. Somit konnte mittels IEC ein weiteres Isoallergen des Proteins mit einem app. MG von 67 kDa ermittelt werden.

Das Allergen mit einem app. MG von 43 kDa eluierte in F9 bis F17, wobei die Detektion in F12 bis F15 besonders stark war. In der Silberfärbung zeigte sich, daß die Konzentration dieses Allergens im Vergleich zu den koeluierenden Proteinen sehr gering war. Mittels 2D-Elektrophorese konnte das Isoallergen mit einem pI von 6,7 weder dem Allergen mit einem app. MG von 40 kDa, noch dem mit einem MG von ca. 43 kDa eindeutig zugeordnet werden (s. Kap. 4.3.5). Hier konnte gezeigt werden, daß das Allergen mit einem app. MG von 43 kDa über einen Zeitraum von 22,5-42,5 min eluierte, was im Vergleich mit den Elutionszeiten der Standardproteine (s. Anh. 7.10.1.2) einem pI-Bereich von ca. 6,6 bis 4,1 entspricht. Somit kann dieses Isoallergen dem 43 kDa Allergen zuzugeordnet werden.

Tab. 4.10: Enthaltene Allergene in den IEC-Fraktionen (+: geringe Konzentration, +++: hohe Konzentration)

MW [kDa]	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16	F17
67		+++	+++	++	+	+	++		
43	+	+	+	+++	+++	+++	+++	+	+
40					+++	+++	++	+	+
30						+	+		

In F13 bis F17 eluierte das Man i 1 (40 kDa), wobei eine besonders starke Visualisierung in den Fraktionen F13 bis F15 erfolgte. Die Elution erfolgte somit im Zeitraum von 30-42,5 min, woraus sich ein pI-Bereich von ca. 4,8 bis 4,4 ergibt, der mit den Ergebnissen der 2D-Elektrophorese, wo zwei Isoallergen mit app. pI von 4,8 und 4,6 ermittelt wurden, übereinstimmt.

Das Man i 2 (30 kDa) konnte in F14 und F15 schwach detektiert werden. Es eluierte somit im Zeitraum von 32,5-37,5 min, was einem pI von ca. 4,8 entspricht. Dies stimmt mit den Ergebnisse der 2D-Elektrophorese, wo ein app. pI von 4,9 bestimmt werden konnte, überein. Durch Vergleich mit der Silberfärbung ist zu erkennen, daß das Man i 2 nur einen sehr geringen Anteil an der Gesamtsumme der Proteine mit einem app. MG von 30 kDa bildet. Während in F9 bis F13 eine sehr starke Proteinbande von ca. 30 kDa detektiert wurde, ist diese in F14 noch knapp sichtbar, in F15 kann sie nicht mehr visualisiert werden. Eine Aufreinigung des Man i 2 ist somit durch Anwendung der IEC nicht möglich.

Das Allergen mit einem app. MG von 14 kDa wurde nicht detektiert. Zwar ist im IB eine durchgängige Bande in diesem MG-Bereich zu erkennen, aber der Vergleich mit dem

Gesamtproteinextrakt der Mango zeigt, daß diese Front nicht mit dem 14 kDa Allergen übereinstimmt.

Durch Vergleich von SDS-PAGE/Silberfärbung und SDS-PAGE/IB wird deutlich, daß die Konzentration der Allergene im Proteinextrakt der Mango sehr gering ist. Bei den im Gesamtextrakt detektierten Proteinen mit MG von 43, 40 und 30 kDa handelt es sich nur zu einem geringen Teil um Allergene. Durch die IEC wurde eindeutig geklärt, daß das Isoallergen mit einem pI von 6,7, das mittels 2D-Elektrophorese weder dem 43 kDa-Allergen noch dem Man i 1 zugeordnet werden konnte, ein Isoallergen des 43 kDa-Allergens ist. Ferner konnte gezeigt werden, daß auch das 67 kDa-Allergen mindestens ein Isoallergen im pI-Bereich von 6,7 besitzt, das in der 2D-Elektrophorese nicht detektiert wurde. Ansonsten ergibt sich eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse der IEC mit denen der 2D-Elektrophorese.

4.7.1.3 N-terminale Sequenzierung des Allergens mit einem app. MG von 43 kDa

Aufgrund der geringen Konzentration der Allergene wurden zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz insgesamt 88 mL (entsprechend 36,3 mg Gesamtprotein) mittels IEC aufgetrennt. Die Fraktionen F10 bis F15 wurden gesammelt, vereinigt und lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde mittels Ultrafiltration entsalzt (s. Anh. 7.10.2) und nochmals lyophilisiert. Das resultierende Lyophilisat wurde in 150 µL Probenpuffer aufgenommen und reduziert (s. Anh. 7.6.1). Für die Sequenzanalyse wurde der Allergenextrakt mittels SDS-PAGE getrennt und ein Semidry-Blot auf eine PVDF-Membran durchgeführt (s. Anh. 7.6.4). Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mittels CBB-Färbung (s. Anh. 7.8.3).

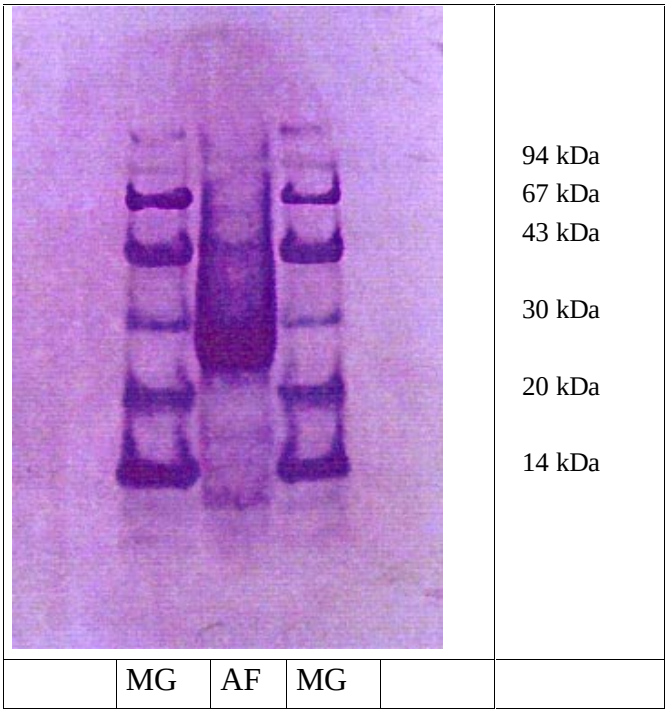


Abb. 4.26: PVDF-Semidry-Blot/Coomassiefärbung der isolierten Allergene der Mango (mit AF: Allergenfraktion)

Wie in Abb. 4.26 erkennbar ist, wurde in erster Linie ein Protein mit dem app. MG von 27-29 kDa visualisiert. Daß es sich hierbei nicht um ein Allergen handelte, konnte zuvor gezeigt werden. Zu erkennen ist weiterhin das Allergen mit einem app. MG von 43 kDa. Diese Proteinbande wurde ausgeschnitten und einer N-terminalen Sequenzierung unterworfen. Die Analyse erfolgte durch die Abteilung für Biochemie der Universität Hamburg.

Die ersten 15 Aminosäuren konnten über den Edmann-Abbau bestimmt werden. Die in der Sequenzierung abgeschätzte Menge des Proteins betrug 5 pmol.
Der Sequenzvorschlag dieses Allergens ist in Tab. 4.11 dargestellt. Auf Position 9 konnte keine Aminosäure identifiziert werden. Hierbei handelt es sich möglicherweise um Cystein oder Tryptophan, die beim Edman-Abbau nicht erfaßt bzw. zu 100 % zerstört werden (LOTTSPEICH ET AL., 1994).

Tab. 4.11: N-terminale Aminosäuresequenz des Mangoallergens mit einem app. MG von 43 kDa

Pos.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Mango 43 kDa	A	T	V	S	I	T	N	N	X	P	Y	T	V	R	P

4.7.1.4 FAZIT

Die Aufreinigung der Allergene mittels IEC ist ungenügend, da die Allergene nur in sehr geringer Konzentration vorliegen und über einen längeren Zeitraum eluieren. Somit konnten keine ausreichenden Mengen für weitergehende Untersuchungen isoliert werden. Ein weiteres Problem bestand darin, daß das Allergen mit einem app. MG von 43 kDa im Vergleich zu anderen Proteinen in den gesammelten Fraktionen nur in sehr geringer Menge vorlag und eine Verunreinigung der Allergenfraktion durch die Überladung des Gels mit dem Protein von ca. 27-29 kDa nicht ausgeschlossen werden kann.
Für die beschriebenene N-terminale Sequenzierung mußten insgesamt 44 IEC-Läufe durchgeführt werden, die jeweils einen Zeitraum von ca. 90 min in Anspruch nehmen.
Zudem gelang es nicht, die Hauptallergene der Mango, das Man i 1 und das Man i 2 sowie das Allergen mit einem app. MG von 14 kDa zu isolieren.
Da durch die vorliegenden Patientenseren spez. Antikörper gegen die Allergene vorlagen, wurde als Alternativmethode die AC eingesetzt.

4.7.2 Isolierung der Hauptallergene mittels AC

Um die Allergene mittels AC zu isolieren, mußte zunächst ein geeigneter Antikörper zur Verfügung stehen. In der Literatur ist die Aufreinigung von Allergenen mittels AC beschrieben, dazu wurden in den meisten Fällen monoklonale Antikörper eingesetzt (JAROLIM ET AL., 1989, JUNG ET AL., 1989, PORTNOY ET AL., 1990, AYUSO ET AL., 1993, LEITNER ET AL., 1998a). Der Nachteil hierbei ist, daß lediglich das eine Allergen, mit dem der Antikörper reagiert, isoliert werden kann. Zudem erfordert die Herstellung von monoklonalen Antikörpern das Vorliegen des reinen Allergens. Da dies zu diesem Zeitpunkt nicht der Fall war, wurde die Isolierung mit monoklonalen Antikörpern ausgeschlossen.
Ein geeigneter Antikörper stand jedoch in Form des spez. IgE aus den Patientenseren zur Verfügung. Da neben dem IgE auch alle weiteren Proteine aus dem Serum an NHS-aktivierte Sepharose binden und die Konzentration des IgE im Serum außerdem sehr gering ist, mußte zunächst eine Aufreinigung des IgE aus dem Serum erfolgen. Erst dann sollte das isolierte IgE kovalent an eine NHS-aktivierte Sepharose gebunden und zur Aufreinigung der Allergene aus dem Proteinextrakt der Mango eingesetzt werden.

4.7.2.1 ISOLIERUNG DES SPEZ. IGE AUS DEN PROBANDENSEREN

Grundsätzlich wurden zwei Möglichkeiten zur Isolierung des spez. IgE aus den Probandenseren in Betracht gezogen. Einerseits bestand die Möglichkeit, das Allergen an die NHS-aktivierte Sepharose zu koppeln und nach erfolgter Bindung über eine Antigen-Antikörperreaktion die Isolierung des spez. IgE durchzuführen. Diese Methode wurde von LEITNER ET AL. (1998a) zur Isolierung von spez. IgE gegen Profiline aus Beifuß- und Birkenpollen sowie Sellerie eingesetzt, indem Gesamtextrakte der o.g. Pflanzen an NHS-aktivierte Sepharose gebunden wurden.
Gegen diese Vorgehensweise sprach jedoch die geringe Konzentration an Allergen im Proteinextrakt der Mango. Außerdem binden auch andere Antikörper, wie beispielsweise IgG, an Proteine (AXCRONA ET AL., 1995, MIRABALLES-MARTINEZ ET AL., 1997, LEITNER ET AL., 1998a). Dies hätte zur Folge, daß die IgE-Fraktion mit Antikörpern der Klasse IgG verunreinigt werden würde, obwohl nur Antikörper der Klasse IgE für die Auslösung einer Typ I Reaktion verantwortlich sind. Wird im zweiten Schritt der Allergenaufreinigung nun die IgE-Fraktion an die NHS-aktivierte Sepharose gebunden, würden die Proteine des Gesamtextraktes nicht nur an das IgE, sondern auch an das IgG binden. Somit würden bei der Desorption nicht nur IgE, sondern auch IgG gebundene Proteine eluieren, was zur Folge hätte, daß es zu einer Verunreinigung der Allergenfraktion käme.
Somit wurde das spez. IgE über den zweiten Weg isoliert. Ein monoklonaler Antikörper, das Anti-Human-IgE, wurde an die NHS-aktivierte Sepharose gekoppelt (s. Anh. 7.10.3). Bei Aufgabe des Probandenserums bindet nun das IgE an das Anti-Human-IgE, während die anderen Serumproteine abgetrennt werden. Im zweiten Schritt wird das IgE durch einen Pufferwechsel desorbiert. Dieses Prinzip wurde bereits zur Quantifizierung von Human-IgE beschrieben (PHILLIPS ET AL., 1985, WONGYAI ET AL., 1991, MARLEY ET AL., 1996).

Hierbei werden jedoch nicht nur die IgE-Moleküle, die spez. mit den Allergenen der Mango reagieren, sondern alle Antikörper der Klasse IgE isoliert. Da die NHS-aktivierte Sepharose jedoch in der Lage ist 10 mg Antikörper/mL Matrix zu binden (VAN SOMMEREN ET AL., 1993), kann davon ausgegangen werden, daß das spez. IgE bei entsprechender Dimensionierung der Säule quantitativ gebunden wird. Aus der kovalenten Bindung aller Antikörper der Klasse IgE ergibt sich zudem der Vorteil, daß andere Allergene, auf die der jeweilige Proband, aus dessen Serum die Antikörper isoliert wurden, reagiert, ebenfalls isoliert werden können. Hierdurch

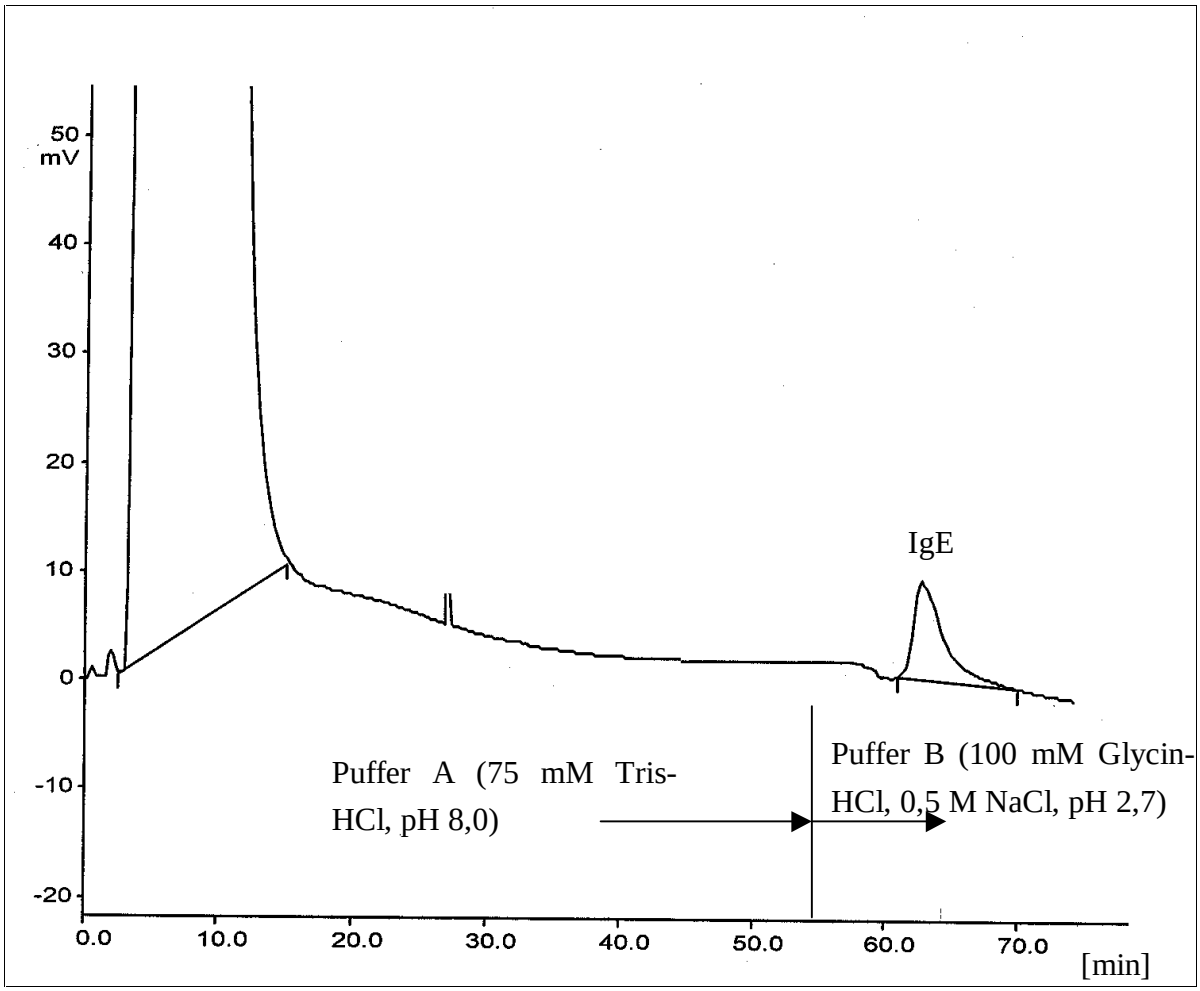


Abb. 4.27: AC-Trennung von Humanserum (Injektionsvolumen 500 µL, Flow: 1 mL/min, UV 280 nm)

erweitert sich das Anwendungsgebiet dieser Säule.

Die kovalente Bindung des Anti-Human IgE an die NHS-aktivierte Sepharose wurde mit einem 0,2 M Natriumhydrogencarbonatpuffer bei pH 8,3 durchgeführt. Um sicher zu stellen, daß die Bindung des Anti-Human IgE quantitativ erfolgt, wurden 1,4 mg Antikörper / g NHS-aktivierte Sepharose gebunden, was unterhalb der maximalen Bindungskapazität der Matrix lag. Die Deaktivierung freier Bindungsstellen erfolgte durch Einsatz zweier Puffersysteme (s. Anh. 7.10.3).

Die Kopplung des IgE aus den Patientenseren an das Anti-Human IgE erfolgte bei pH 8,0 mit einem 75 mM Tris-HCl-Puffer. Nach Elution nicht gebundener Inhaltsstoffe das Serums wurde die Desorption des IgE durch eine pH-Wert Änderung auf pH 2,7 mit einem 100 mM Glycin-HCl-Puffer bewirkt.

Wie aus Abb. 4.27 folgt, hat das im Patientenserum enthaltene IgE an das festphasengebundene Anti-Human-IgE gebunden. Nun galt es zu prüfen, ob es sich bei dem Eluat um IgE handelte und die Fraktion nicht mit IgG verunreinigt war.

Hierzu wurde die Fraktion aufgefangen und mittels Ultrafiltration auf ein Volumen von 50 µL konzentriert, mit 50 µL Probenpuffer versetzt und reduziert (s. Anh. 7.10.2 und 7.6.1). Auf ein SDS-Gel wurden jeweils 10 µL eines unbehandelten Serums (1:1000 verdünnt), des Durchlaufs (1:100 verdünnt) sowie der IgE-Fraktion aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und mittels Semidry-Blot auf eine NC-Membran transferiert (s. Anh. 7.6.1 und 7.6.4). Das Proteinspektrum wurde unspezifisch mittels Goldfärbung detektiert (s. Anh. 7.8.2). Sowohl im unbehandelten Serum als auch im Durchlauf ist eine große Anzahl von Proteinen mit unterschiedlichen MG detektierbar (Abb. 4.28). In der IgE-Fraktion kann durch die unspezifische Goldfärbung kein Protein nachgewiesen werden.

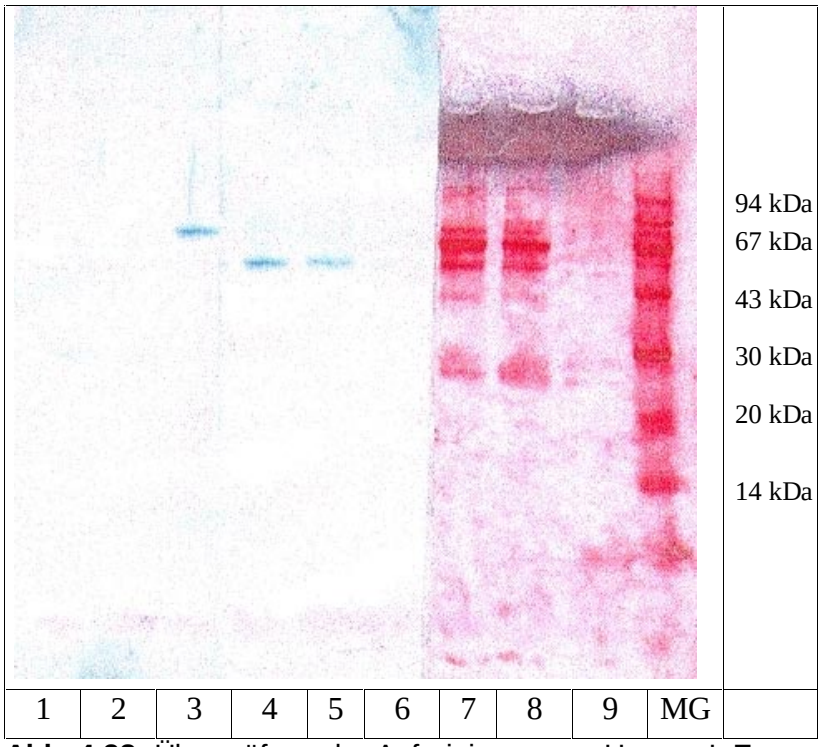


Abb. 4.28: Überprüfung der Aufreinigung von Human-IgE mittels AC; Position 1-3: Detektion mit Anti-Human-IgE: 1: Serum (1:1000 verdünnt), 2: Durchlauf (1:100 verdünnt), 3: IgE-Fraktion; Position 4-6: Detektion mit Anti-Human IgG: 4: Serum (1:1000 verdünnt), 5: Durchlauf (1:100 verdünnt), 6: IgE-Fraktion; 7-10: unspezifische Goldfärbung: 7: Serum (1:1000 verdünnt), 8: Durchlauf (1:100 verdünnt), 9: IgE-Fraktion, MG: Molekulargewichtsmarker

Der Nachweis auf IgG wurde geführt, indem die einzelnen Fraktionen mit Anti-IgG inkubiert und immungefärbt wurden (s. Anh. 7.9.6). Wie in Abb. 4.28 zu erkennen ist, enthalten sowohl das unbehandelte Serum als auch der Durchlauf IgG. Kein IgG ist in der IgE-Fraktion detektierbar. Daß das IgE sich in der vermuteten Fraktion befand, wurde durch eine Detektion mit Anti-Human-IgE und anschließender Immunfärbung nachgewiesen. Im unbehandelten Probandenserum ist aufgrund der Verdünnung kein IgE zu detektieren.

Auch im Durchlauf der AC wurde kein IgE detektiert, was ebenfalls in Abb. 4.28 zu erkennen ist.
Durch die Kopplung von Anti-Human-IgE an die NHS-aktivierte Sepharose ist es gelungen, IgE aus Humanserum zu isolieren. Dieses konnte nun für die weitere Isolierung der Allergene eingesetzt werden.

4.7.2.2 Isolierung der Allergene aus dem Gesamtproteinextrakt der Mango

Zur Isolierung der Allergene aus dem Gesamtproteinextrakt der Mango wurde das IgE aus insgesamt 50 mL Serum des Probanden KDH, wie in 4.7.2.1 beschrieben, isoliert. Die Einzelfraktionen wurden gepoolt und mittels Ultrafiltration auf ein Volumen von 200 µL eingeengt. Die kovalente Bindung des IgE an die NHS-aktivierte Sepharose wurde unter den gleichen Bedingungen wie die Bindung des Anti-Human-IgE durchgeführt (s. Anh. 7.10.3). Auch die chromatographischen Bedingungen zur Aufreinigung des Allergens entsprachen den Bedingungen zur Isolierung des IgE aus dem Probandenserum (s. Anh. 7.10.3).

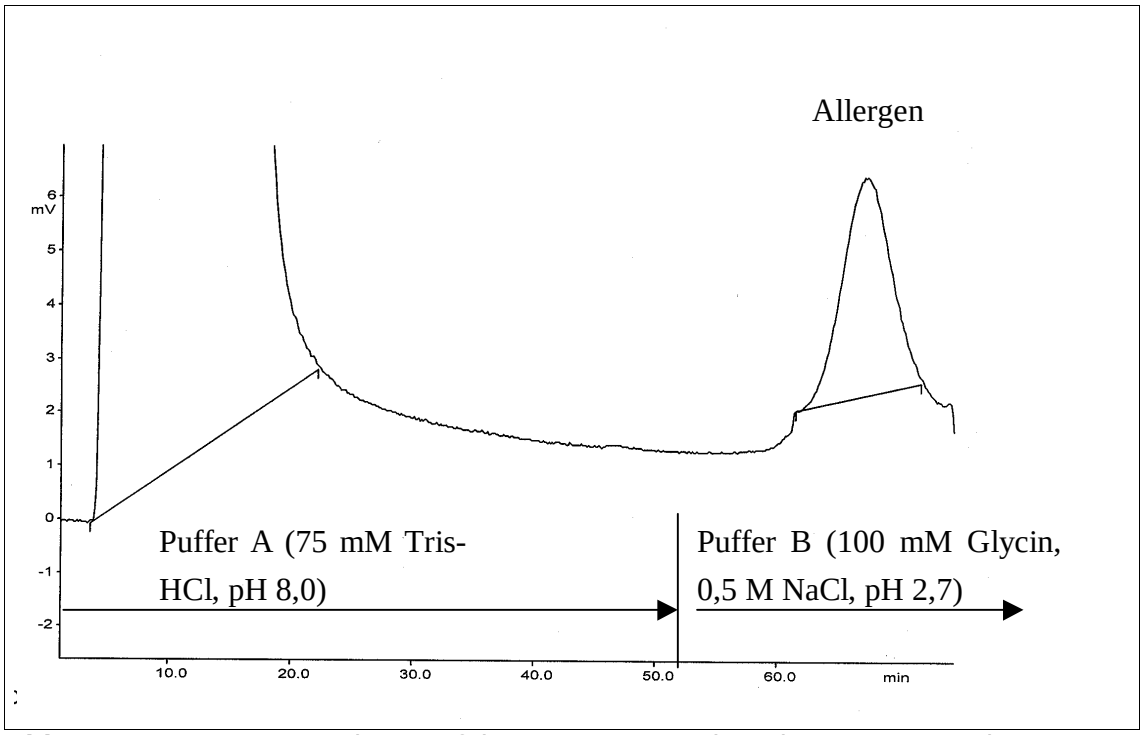


Abb. 4.29: AC-Trennung eines wäßrigen Mango-Extraktes (=0,08 mg Protein, Injektionsvolumen: 500 µL, UV 280 nm)

Die IgE gebundenen Proteine werden durch Einsatz der AC aus dem Gesamtproteinextrakt isoliert (s. Abb. 4.29). Dies geschieht, indem nach Elution der nicht gebundenen Proteine ein Wechsel des Puffers durchgeführt wird und somit die Allergene desorbiert werden. Der Gehalt an Allergenen ist im Verhältnis zum Gesamtextrakt sehr gering. Ein Vergleich der Flächen ergab, daß die Allergene ca. 3 % der Gesamtproteinmenge ausmachen. Durch Variation der injizierten Mengen wurde sichergestellt, daß die Kapazität der Säule nicht überschritten wurde.

Zur Überprüfung der Reinheit der Fraktion wurden insgesamt 0,8 mg Gesamtprotein getrennt.

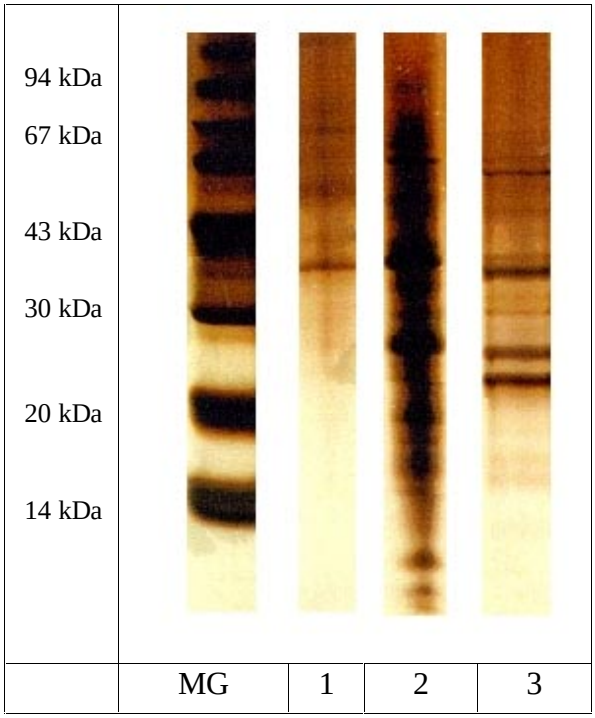


Abb. 4.30: SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung 1: Allergenfraktion, 2: unbehandelter Mangoextrakt (1:100 verdünnt), 3: Durchlauf (1:100 verdünnt)

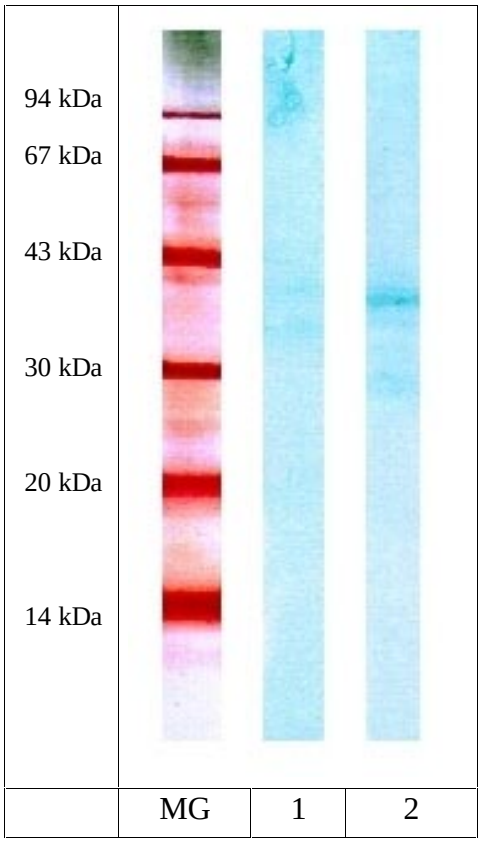


Abb. 4.31: SDS-PAGE/IB, Detektion mit Serum KDH, 1: Durchlauf, 2: Allergenfraktion

Die Fraktionen wurden gepoolt und mittels Ultrafiltration auf ein Gesamtvolumen von 200 µL eingeengt. Diese wurden dann mit 200 µL Probenpuffer versetzt und reduziert (s. Anh. 7.10.2 und 7.6.1). Hiervon wurden ca. 30 µL mittels SDS-PAGE getrennt und unspezifisch durch eine Silberfärbung visualisiert. Das Ergebnis ist in Abb. 4.30 dargestellt. In der Allergenfraktion werden Proteine mit app. MG von 40, 50 und >67 kDa, wenn auch nur in geringer Menge, detektiert. Nicht nachzuweisen ist das Man i 2. Auch das Allergen mit einem MG von ca. 43 kDa, das mit Hilfe der IEC isoliert werden konnte, wird nicht visualisiert. Obwohl der unbehandelte Gesamtextrakt schon um den Faktor 100 verdünnt wurde, ist die Färbung für eine Auswertung zu intensiv. Im Durchlauf ist zu erkennen, daß auf der Höhe des Man i 1 ebenfalls eine Proteinbande zu detektieren ist. Es ist zu prüfen, ob hier ein Teil des Allergens nicht gebunden wurde.

Die Überprüfung, ob es sich bei den Proteinen in der Allergenfraktion tatsächlich um die Allergene handelt und ob diese quantitativ aus dem Gesamtproteinextrakt isoliert wurden, erfolgte mittels SDS-PAGE/IB.

Daß im Durchlauf keine Allergene mehr zu visualisieren sind, wird

aus Abb. 4.31 deutlich. In der Allergenfraktion wird Man i 1 detektiert. Schwach zu erkennen ist zudem auch das Man i 2, das in der Silberfärbung nicht visualisiert werden konnte, also nur in sehr geringer Konzentration vorlag.
Durch Einsatz der AC ist es gelungen, eine Methode zur Isolierung der beiden Hauptallergene der Mango zu etablieren. Durch Aufarbeitung größerer Mengen an Gesamtprotein sollte es somit in Zukunft möglich sein, weitergehende Untersuchungen der Proteine durchzuführen.

5 DISKUSSION

5.1 ALLERGENE DER MANGO

Die Charakterisierung der Allergene hinsichtlich ihres MG erfolgte mittels SDS-PAGE/IB. Dabei konnten in der Mango zwei Hauptallergene mit MG von 40 und 30 kDa ermittelt werden, die von jeweils 82 % der 56 eingesetzten Seren detektiert wurden. Eine IgE-Bindung wurde ferner an Allergene mit MG von > 67, 67, 50, 43, 25, 22, 20, 18 und 14 kDa beobachtet, wobei weniger als 50 % der eingesetzten Seren diese visualisierten. Sie können somit nicht als Hauptallergene bezeichnet werden. In der vorliegenden Literatur werden die für eine Typ I Reaktion verantwortlichen Proteine der Mango kaum beschrieben. WELLHAUSEN ET AL. (1996) beschreiben ein Minorallergen der Birkenpollen mit einem MG von 35 kDa und konnten mittels SDS-PAGE/IB-Inhibition nachweisen, daß dieses Allergen mit einem ähnlich großen Allergen der Mango kreuzreagiert. Ein Allergen mit einem app. MG von 35 kDa konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden, aber es erscheint durchaus möglich, daß es sich bei dem beschriebenen Allergen um eines der Hauptallergene mit app. MG von 30 und 40 kDa handeln kann. MÖLLER ET AL. (1997c) ermittelten mittels SDS-PAGE/IB unter Einsatz von 10 Probandenseren zwei Hauptallergene der Mango mit MG von 30 und 33 kDa. Hier ist somit eine teilweise Übereinstimmung der Ergebnisse zu beobachten. Beachtlich ist, daß auch in dieser Untersuchung das Allergen mit einem app. MG von 30 kDa durch 80 % der eingesetzten Seren detektiert wurde, aber keine gleichzeitige Visualisierung des Allergens mit einem app. MG von 40 kDa erfolgte. Diese Unterschiede sind vermutlich auf unterschiedliche Sensibilisierungen des jeweils betrachteten Patientenkollektivs zurückzuführen.

Nach ZYGMUNT ET AL. (1990) eignet sich die IEF/IB besser zur Immundetektion als die SDS-PAGE/IB, da die Proteine hier im nativen Zustand vorliegen. Sollte jedoch Harnstoff bei der IEF/IB eingesetzt werden, kommt es zur teilweisen Denaturierung der Proteine und somit zu einem Verlust der Immunreaktivität (STOTT, 1989). Zudem wird beschrieben, daß der Harnstoff auf der NC-Membran verbleibt und somit eine Renaturierung der Proteine verhindert (TOVEY ET AL., 1987). Um sicherzustellen, daß native Proteine vorliegen, wurde bei der IEF/IB auf den Einsatz von Harnstoff verzichtet und zur Erhöhung der elektrophoretischen Mobilität beim Semidry-Blot die SDS-Konzentration im Kathodenpuffer erhöht.

Zur Charakterisierung der pI der Mangoallergene erfolgte die Detektion der IEF/IB mit einem Poolserum aus den Seren von vier Probanden. Es konnte gezeigt werden, daß die Allergene der Mango app. pI von 5,0, 4,9, 4,8 und 4,6 aufwiesen. Stark ausgeprägt zeigten sich hierbei Banden mit app. pI von 4,9 und 4,6. Vergleichsdaten aus der Literatur zum pI der Allergene der Mango liegen nicht vor.

Durch Einsatz der 2D-Elektrophorese mit anschließendem IB konnte gezeigt werden, daß das Hauptallergen mit einem app. MG von 40 kDa in Form mehrerer Isoallergene mit pI von 4,6 und 4,8 vorliegt. Dem zweiten Hauptallergen mit einem MG von ca. 30 kDa konnte ein pI von ca. 4,9 zugeordnet werden. Auch die pI der anderen detektierten Proteine liegen im sauren

pH-Bereich. Eine Untersuchung der Allergene der Mango mittels 2D-Elektrophorese ist in der vorliegenden Literatur nicht beschrieben.

Die Ergebnisse von SDS-PAGE/IB, IEF/IB und 2D-Elektrophorese/IB stimmen somit gut überein. Die Hauptallergene mit app. MG von 30 und 40 kDa konnten mit Hilfe dieser Methoden detektiert und charakterisiert werden. Die von STOTT (1989) vermutete Denaturierung und Störung der Immundetektion durch Harnstoff konnte nicht bestätigt werden, da die Äquilibrierungslösung, die in der 2D-Elektrophorese/IB eingesetzt wurde, Harnstoff enthielt und keine wesentlichen Unterschiede zur IEF/IB ohne Harnstoff festgestellt werden konnten.

Gemäß den WHO-Richtlinien (MARSH ET AL., 1987) wird das Allergen mit einem app. MG von 40 kDa und pI von 4,6 und 4,8 als *Mangifera indica* 1 (Man i 1) und das Allergen mit einem app. MG von 30 kDa und einem pI von 4,9 als *Mangifera indica* 2 (Man i 2) bezeichnet.

Profiline sind als stark kreuzreagierende Allergene bekannt, da sie trotz unterschiedlicher botanischer Herkunft eine hohe Sequenzidentität aufweisen. So sind Profiline potente Allergene in Beifuß- und Birkenpollen sowie in Sellerie und Karotte (VALENTA ET AL., 1991a, VAN REE ET AL., 1992, VALLIER ET AL., 1992, MARTINEZ ET AL., 1995, VAN REE ET AL., 1995, EBNER ET AL., 1995, VIETHS ET AL., 1995, BAUER ET AL., 1996, JANKIEWICZ ET AL., 1996, 1997, 1998, PETERSEN ET AL., 1996, LEITNER ET AL., 1998a). Sie besitzen ein nahezu identisches MG von ca. 14 kDa. Die Anzahl der Probanden, die auf Profiline reagieren wird mit 10-20 % angegeben (VALENTA ET AL., 1991b, MARTINEZ ET AL., 1995). Durch den Einsatz polyklonaler Antikörper konnte gezeigt werden, daß Profiline im Gesamtproteinextrakt der Mango bei einem app. MG von 14 kDa detektierbar sind. Zunächst wurde daher vermutet, daß es sich bei dem Allergen mit einem app. MG von 14 kDa um ein Profilin handelt. Da 14 % der Seren ein Allergen mit einem app. MG von 14 kDa detektierten, wurde untersucht, ob es sich bei diesem Allergen um ein Profilin handelt.

In den nachfolgenden Untersuchungen zur Kreuzreaktivität zeigte sich jedoch, daß vom eingesetzten Poolserum ein Bet v 1-homologes Allergen mit dem gleichen MG detektiert wurde. Da mit dem Bet v 1 eine vollständige Hemmung der IgE-Bindung an das Mangoallergen mit einem app. MG von 14 kDa erfolgte, kann davon ausgegangen werden, daß das eingesetzte Poolserum bei einem MG von ca. 14 kDa ausschließlich Bet v 1-homologe Strukturen detektierte. Da durch das polyklonale Antiserum ebenfalls Proteine mit app. MG von 14 kDa detektiert wurden, ist anzunehmen, daß sowohl das Profilin als auch das Bet v 1-homologe Allergen ein sehr ähnliches MG besitzen und eine Trennung mittels SDS-PAGE unter den gewählten Bedingungen nicht möglich ist. Welches Allergen jeweils detektiert wird, ist vermutlich von den eingesetzten Probandenseren abhängig. Eine Bedeutung für die Allergenität gegen Mangofrüchte kann jedoch nicht endgültig ausgeschlossen werden.

5.2 SORTENABHÄNGIGKEIT DER ALLERGENEN POTENZ VON MANGOFRÜCHTEN

Zur Untersuchung einer möglichen Sortenabhängigkeit der allergenen Potenz von Mangofrüchten wurden die vier wichtigen Mangosorten Osteen, Eden, TA und Ngowe, die in vier unterschiedlichen Kontinenten (Afrika, Asien, Europa und Südamerika) angebaut werden, ausgesucht. In der unspezifischen Silberfärbung ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen diesen Sorten. Dieses konnte durch die Untersuchung mittels SDS-PAGE/IB bestätigt werden, in der in allen vier Sorten die Hauptallergene Man i 1 und Man i 2 sowie die Allergene mit app. MG von 14, 43 und 67 kDa detektiert wurden. Wesentliche Unterschiede in der Intensität der Färbung waren nicht zu beobachten. Zur Absicherung dieser Ergebnisse erfolgte eine Untersuchung mittels SDS-PAGE/IB-Inhibition. Es wurde gezeigt, daß die IgE-Bindung an die Allergene sowohl in der homologen Inhibition als auch durch Inhibition mit den jeweils anderen Sorten vollständig inhibiert wurden. Somit ist anzunehmen, daß in den vier untersuchten Sorten identische Allergene vorliegen. Diese Ergebnisse wurden durch Untersuchung mittels EAST-Inhibition bestätigt. Es wurde gezeigt, daß die Inhibitionskurven nahezu deckungsgleich verlaufen. Die Werte für die Proteinkonzentration der Inhibitorlösung zum Erreichen einer 50 %igen Inhibition unterschieden sich statistisch nicht.

Vergleichende Untersuchungen über die Allergene der Mango wurden in der vorliegenden Literatur nicht durchgeführt. VIETHS ET AL. (1993, 1994b) sowie LI-SHAN ET AL. (1995) konnten jedoch zeigen, daß es Unterschiede in der allergenen Potenz verschiedener Apfelsorten gibt. So war das allergene Potential der „alten“ Apfelsorten wie Jamba, Gloster und Boskop wesentlich geringer als das „neuerer“ Apfelsorten wie Granny Smith und Golden Delicious.

Da der Anbau beider Obstsorten eine lange Tradition besitzt und auch die weltweit angebaute Sortenvielfalt vergleichbar ist, wäre zu vermuten gewesen, daß Unterschiede in der allergenen Potenz hätten festgestellt werden können. Dies gilt um so mehr, als daß die ausgewählten Sorten in vier verschiedenen Kontinenten kultiviert wurden.

5.3 VERÄNDERUNG DER ALLERGENITÄT VON MANGOFRÜCHTEN WÄHREND DER LAGERUNG UND REIFUNG

Diese Untersuchungen wurden durchgeführt, indem Mangofrüchte der Sorte TA zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Ernte (5, 12, 21, 35 und 40 Tage) zu Proteinextrakten verarbeitet wurden. Die Wahl dieses Untersuchungszeitraumes erfolgte, da Mangos in Deutschland frühestens fünf Tage nach der Ernte in den Verkehr gebracht werden und nach 40 Tagen ein überreifer Zustand erreicht war, der die Grenze der Verzehrsfähigkeit darstellt.

Obwohl sich bei den Untersuchungen des Proteinextraktes mittels SDS-PAGE und anschließender unspezifischer Silberfärbung eine Veränderung des Proteinmusters in Form einer Abnahme der Konzentration von Proteinen mit app. MG von 19, 27 und 35 kDa zeigte, während die Konzentration der Proteine mit MG < 14 kDa leicht zunahmen, traten bei den anschließenden immunologischen Untersuchungen mittels SDS-PAGE/IB sowie mittels SDS-PAGE/IB-Inhibition keine wesentlichen Veränderungen auf. Dieses Ergebnis wurde durch Anwendung der EAST-Inhibition bestätigt, denn es zeigte sich, daß die Inhibitionskurven sowohl der homologen Inhibtion als auch mit den anderen Proteinextrakten nahezu deckungsgleich verlaufen. Die maximale Inhibition, die mit den jeweils anderen Inhibitorlösungen erreicht wurde, lag weit über 90 %. Obwohl der LSD-Test für einige Mittelwerte Unterschiede auswies, ließ sich kein eindeutiger Trend ableiten. Hätte beispielsweise die Allergenität im Verlauf der Reifung zugenommen, so hätte die Proteinkonzentration der Inhibitorlösung zum Erreichen der 50 %igen Inhibition stetig abgenommen oder im Fall einer Verminderung des allergenen Potentials zugenommen. Da dies nicht der Fall war, kann Personen, die mit einer Soforttypreaktion auf den Verzehr von Mangofrüchten reagieren keine Empfehlungen zum Verzehr eines bestimmten Reifegrades gegeben werden.

In der Literatur wird beschrieben, daß sich die Konzentration einzelner Proteine der Mango im Verlauf der Reifung verändert. So konnten BOJORQUES UND GOMEZ (1995) zeigen, daß die Konzentration eines Proteins mit einem MG von 45,5 kDa im Verlauf der Reifung zunahm.

Untersuchungen zur Veränderung der allergenen Potenz im Verlauf der Mango werden in der vorliegenden Literatur jedoch nicht beschrieben. VIETHS ET AL. (1993, 1994b) sowie LI-SHAN ET AL. (1995) wiesen nicht nur eine Sorten-, sondern auch eine Lagerungsabhängigkeit der allergenen Potenz von Äpfeln nach, indem sie zeigten, daß die Konzentration des Hauptallergens des Apfels, dem Mal d 1, im Verlauf der Reifung zunahm. Hierbei muß jedoch berücksichtigt werden, daß Äpfel sehr lange gelagert werden können und somit die Wahrscheinlichkeit der Veränderung des Proteinmusters erhöht ist.

5.4 KREUZREAKTIVITÄT

Durch Untersuchung der Allergene der Mango mittels IB- und EAST-Inhibition konnte eine Kreuzreaktivität zwischen Mango und Beifußpollen, Sellerie, Karotte sowie Birkenpollen nachgewiesen werden. Dies bestätigt die Aussage von WÜTHRICH UND HOFER (1984), die aufgrund von Hauttests von einer Kreuzsensibilisierung zwischen Mango, Beifußpollen und Sellerie berichteten.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, daß das Man i 1 sowie die Allergene mit einem app. MG von 43 und 67 kDa und das Allergen mit einem MG von 14 kDa für Kreuzreaktionen verantwortlich sind (s. Tab. 4.12). Untersuchungen zu kreuzreaktiven Allergenen der Mango wurden bisher nicht systematisch durchgeführt.

Tab. 4.12: Kreuzreaktive Allergene in Mango

Mangoallergene / kreuzreagierende Allergene	Man i 1	43 kDa	67 kDa	Man i 2	14 kDa
Beifußpollen	Art v 1 homologes Allergen mit MG von ca. 70 kDa			keine	keine
Sellerie	Allergene mit app. MG von 45 und 60 kDa			keine	Api g 1 Api g 2
Karotte	Allergene mit app. MG von 16, 45, 50 und 67 kDa			keine	keine
Birkenpollen	Gesamtextrakt			keine	Bet v 1

Es konnte nachgewiesen werden, daß ein Allergen der Mango mit einem app. MG von 14 kDa mit dem Bet v 1 kreuzreagiert, da dieses Allergen in der IB-Inhibition mit Bet v 1 nicht mehr detektierbar war und in der EAST-Inhibition eine Hemmung der Bindung von spez. IgE von 28 % durch das Bet v 1 erreicht wurde. Dieses Allergen wurde auch durch den Gesamtproteinextrakt von Birkenpollen, deren Hauptallergen das Bet v 1 ist, sowie Sellerie inhibiert. Im Fall des Selleries erklärt sich dies, da für dessen Hauptallergene, das Api g 1 und das Api g 2, eine Kreuzreaktion zum Bet v 1 nachgewiesen wurde (KREMSER UND LINDEMAYR, 1983, HALMEPURO ET AL., 1984, BREITENEDER ET AL., 1995, EBNER ET AL., 1995, HOFFMANN-SOMMERGRUBER ET AL., 1996, 1997, JANKIEWICZ ET AL., 1996, 1997, 1998). Keine Inhibition des Allergens mit einem app. MG von 14 kDa wird durch den Extrakt von Karotte und Beifußpollen erreicht. Dies läßt sich dadurch erklären, daß in beiden Pflanzen keine Bet v 1-homologen Proteine vorkommen (EBNER ET AL., 1995, BAUER ET AL., 1996).

Somit konnte eindeutig nachgewiesen werden, daß in der Mango ein Bet v 1-homologes Allergen vorhanden ist. Dessen Bedeutung erscheint jedoch relativ gering, denn von den 56 untersuchten Probanden reagierten lediglich acht auf ein Protein mit diesem MG. Auch wurde die Bindung von spez. IgE an die Allergene der Mango in der EAST-Inhibition nur um 28 % reduziert.

Es muß darauf hingewiesen werden, daß die EAST-Inhibition nur eine relative Vergleichbarkeit der Daten liefern kann, denn die bestimmten Inhibitionen sind stark von der Zusammensetzung des eingesetzten Poolserums abhängig.
Auch WÜTHRICH UND SCHMID-GRENDELMEIER (1995) vermuteten in Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen, daß die Kreuzreaktivität zwischen Sellerie und Mango auf ein Allergen mit einem app. MG von 15 kDa zurückzuführen ist.
Weiterhin konnte gezeigt werden, daß das Man i 1 sowie die Allergene mit app. MG von 43 und 67 kDa eine Kreuzreaktion mit allen eingesetzten Gesamtproteinextrakten aufwiesen.
Der mittels SDS-PAGE aufgetrennte Gesamtproteinextrakt der Mango zeigte in der IB-Inhibition mit dem Proteinextrakt der Beifußpollen eine Inhibition der o.g. Allergene. In der IB-Inhibition des festphasengebundenen Proteinextrakt der Beifußpollen mit dem Gesamtproteinextrakt der Mango kam es zu einer vollständigen Auslöschung des Art v 1 sowie des homologen Allergens mit einem app. MG von 70 kDa. Somit konnte eine Kreuzreaktion zwischen Art v 1 und dem Man i 1 sowie den Allergenen mit app. MG von 43 und 67 kDa nachgewiesen werden.
Das Art v 1 wird in der Literatur als stark kreuzreagierendes Allergen beschrieben. So konnte nachgewiesen werden, daß die Kreuzreaktion zwischen Sellerie und Beifußpollen wesentlich auf das Art v 1 zurückzuführen ist (BAUER ET AL., 1996, HEISS ET AL., 1996, JANKIEWICZ ET AL., 1996, 1997, 1998, GROTE ET AL., 1998). Auch für die Kreuzreaktivität von Beifußpollen, Sellerie und Karotte ist das Art v 1 teilweise verantwortlich (JANKIEWICZ ET AL., 1996). Weitere bekannte Kreuzreaktionen des Art v 1 sind die zu Birken-, Traubenkraut- und Lieschgraspollen sowie zu Erdnuß, Apfel, Kiwi, Pfeffer, Paprika, Anis, Fenchel, Koriander und Cumin (BAUER ET AL., 1996, HEISS ET AL., 1996, VALENTA UND KRAFT, 1996, JENSEN-JAROLIM ET AL., 1997, GROTE ET AL, 1998, HIRSCHWEHR ET AL., 1998, LEITNER ET AL., 1998b). Daß die Kreuzreaktivität des Art v 1 im Fall der Mango auf min. drei Allergene mit unterschiedlichen MG zurückzuführen ist, ist verständlich, denn das Art v 1 ist, wie bereits erwähnt, ebenfalls kein homogenes Allergen. Auch bei den anderen oben zitierten Kreuzreaktionen zeigte sich, daß das Art v 1 mit mehreren Allergenen unterschiedlichen MG reagierte, die somit ebenfalls ähnliche Epitopstrukturen aufweisen.
Auch die Kreuzreaktion des Man i 1 sowie der Allergene mit app. MG von 43 und 67 kDa zu den anderen Gesamtproteinextrakten ist aufgrund der Ergebnisse der EAST- und IB-Inhibition auf diese kreuzreaktive Struktur zurückzuführen.
Es ist besonders hervorzuheben, daß das Man i 1 und das Man i 2 unterschiedliche Epitopstrukturen aufweisen. Denn in den Untersuchungen mittels SDS-PAGE/IB konnte gezeigt werden, daß die Probanden immer auf beide Allergene gleichzeitig reagierten. In den Untersuchungen zur Kreuzreaktivität zeigte sich hingegen, daß das Man i 2 nicht reagierte.
In der Mango konnten zwei wichtige kreuzreaktive Strukturen nachgewiesen werden. Zum einen handelt es sich hierbei um Art v 1- und zum anderen um Bet v 1-homologe Allergene.

5.5 ENTWICKLUNG EINER METHODE ZUR ISOLIERUNG DER MANGOALLERGENE

Die Untersuchung der Allergene der Mango mittels IEF/IB bzw. 2D-Elektrophorese/IB zeigte, daß alle Allergene pI im sauren pH-Bereich aufweisen, wobei der pI des Allergens mit einem MG von 14 kDa nicht ermittelt werden konnte. Somit wurde zunächst die IEC unter Verwendung einer Anionenaustauschersäule als Verfahren zur Isolierung der Hauptallergene gewählt. Die Isolierung von Proteinen mittels IEC wird in der Literatur häufig beschrieben. Als Beispiele seien hier die Isolierung des Art v 2 und die Isolierung eines Hauptallergens der Kiwi, des Act c 2 aufgeführt (NILSEN UND PAULSEN, 1990, MÖLLER ET AL., 1997b).
Da schon geringe Salzgehalte die Trennung mittels IEC störten, wurden wäßrige Extrakte der Sorte TA eingesetzt. Der in Anlehnung an MÖLLER ET AL. (1997b) eingesetzte Elutionspuffer ermöglichte eine zufriedenstellende Trennung der Proteine. Es zeigte sich jedoch, daß in den IEC-Fraktionen, die die Allergene enthielten, auch andere Proteine enthalten waren. Die MG der koeluierenden Proteine unterschieden sich jedoch so stark von denen der Allergene, daß eine anschließende Trennung mittels SDS-PAGE möglich war. Da die Proteine als Isoallergene mit unterschiedlichen pH-Werten vorlagen, eluierten sie z.T. über einen sehr langen Zeitraum, wie beispielsweise das Allergen mit einem app. MG von 43 kDa, das über 22,5 min eluierte.

Tab. 4.13: N-termiale Sequenz des 43 kDa-Allergens der Mango im Vergleich zum Apfelallergen mit einem MG von 31 kDa (LI-SHAN ET AL., 1995)

Pos.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Mango 43 kDa	**A**	T	V	S	I	**T**	**N**	**N**	**X**	**P**	Y	**T**	**V**	R	**P**
Apfel 31 kDa	**A**	K	I	T	F	**T**	**N**	**N**	**X**	**P**	N	**T**	**V**	W	**P**

Erschwerend für eine Aufreinigung der Allergene mittels IEC erwies sich zudem, daß die Konzentration der Allergene im Verhältnis zum Gesamtprotein sehr gering ist. So gelang es erst nach Sammeln von 44 IEC-Läufen, eine N-terminale Sequenzierung des 43 kDa Allergens durchzuführen, während die Konzentration aller anderen Allergene auch dann noch zu gering war. Die N-terminale Aminosäuresequenzierung ergab bei 15 Zyklen 14 identifzierbare Aminosäurereste. Erwartungsgemäß stimmte die N-terminale Aminosäuresequenz des Allergens mit einem app. MG von 43 kDa nicht mit der von Bet v 1, Api g 1 und Api g 2 überein (BREITENEDER ET AL., 1989, 1995, HOFFMANN-SOMMERGRUBER ET AL., 1996). Die Aminosäuresequenz des Art v 1 ist noch nicht ermittelt worden, da dieses Protein nicht mit Trypsin spaltbar ist und zudem eine Maskierung des N-Terminus vorliegt. (HEISS ET AL., 1996, GROTE ET AL., 1998). Durch eine Recherche in Proteindatenbanken konnte aber eine 53 %ige Übereinstimmung der Sequenz mit einem 31 kDa-Apfelallergen (LI-SHAN ET AL., 1995, s. Tab. 4.13) ermittelt werden. Dieses Protein wurde von den Autoren jedoch nicht auf kreuzreaktive Strukturen untersucht. Somit kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob dieses Protein ebenfalls eine Kreuzreaktivität zum Art v 1 zeigt.

Dieser Weg erscheint wenig erfolgversprechend, denn durch Anwendung der IEC gelang es einerseits nicht, die Hauptallergene der Mango zu isolieren und andererseits reichten die Mengen des isolierten Allergens mit einem app. MG von 43 kDa für weitergehende Untersuchungen der Epitopstruktur nicht aus.

Da in den Patientenseren spez. IgE gegen die Mangoallergene enthalten ist, wurde als Alternativmethode die AC eingesetzt. Die Aufreinigung von Allergenen mittels AC wird in der Literatur häufig beschrieben. Hierbei werden jedoch meist monoklonale Antikörper eingesetzt (JAROLIM ET AL., 1989, JUNG ET AL., 1989, PORTNOY ET AL, 1990, AYUSO ET AL., 1993, LEITNER ET AL., 1998a). Da die Herstellung eines monoklonalen Antikörpers das Vorliegen eines reinen Allergens erfordert, konnte diese Methode nicht eingesetzt werden. Eine andere Möglichkeit, Allergene zu isolieren, ist das Nutzen spez. Eigenschaften dieser Proteine. So wird in der Literatur die Isolierung von Glycoproteinen über Lectine beschrieben (HAAVIK ET AL., 1985, NILSEN ET AL., 1990). Obwohl aufgrund der Kreuzreaktivität des Man i 1 mit dem Glycoprotein Art v 1 und den Ergebnissen des Lectinblottes angenommen werden kann, daß hier eine spezifische Bindung erfolgen würde, ist dies nicht gesichert. Zudem könnte es durch andere Glycoproteine im Gesamtproteinextrakt zu einer nur ungenügenden Aufreinigung der Allergene kommen.
Da in Form des spez. IgE aus den Patientenseren ein geeigneter Antikörper vorlag, wurde dieser für die AC eingesetzt. Um andere Serumproteine zu entfernen, wurde zunächst Anti-Human-IgE vom Kaninchen an NHS-aktivierte Sepharose gekoppelt. Dieses Prinzip wurde bereits zur Quantifizierung von IgE beschrieben (PHILLIPS ET AL., 1985, WONGYAI ET AL., 1991, MARLEY ET AL., 1996).
Hierdurch erfolgte eine Isolierung des IgE aus den Patientenseren, wobei mittels SDS-PAGE/IB unter Einsatz von Anti-Human-IgE und Anti-Human-IgG nachgewiesen werden konnte, daß die Isolierung des IgE aus den Patientenseren erfolgreich durchgeführt wurde. Nach Kopplung des IgE an NHS-aktivierte Sepharose gelang die Isolierung des Man i 1 und des Man i 2, was mittels SDS-PAGE/IB nachgewiesen werden konnte. Durch Vergleich der Peakflächen von Durchlauf und Allergen konnte eine Allergenkonzentration von ca. 3 % des Gesamtproteins ermittelt werden. MÖLLER ET AL. (1997b) bestimmten in der Kiwi einen Allergenanteil von 0,1 %. Für weitere Untersuchungen reichte die Menge an Allergen nicht aus.
Die Aufreinigung von Allergenen unter Verwendung von IgE aus Patientenseren wird in der vorliegenden Literatur nicht beschrieben. Zur Etablierung dieser Methode wurde zunächst mit geringen Antiköpermengen gearbeitet, weshalb die Menge an isoliertem Allergen noch gering ist. Da NHS-aktivierte Sepharose in der Lage ist, ca. 10 mg Antikörper/mL Matrix zu binden (VAN SOMMEREN ET AL., 1993), wird es jedoch möglich sein, relativ große Mengen von IgE innerhalb weniger Arbeitsgänge zu isolieren.

5.6 AUSBLICK

Durch die Etablierung der AC zur Aufreinigung von Allergenen der Mango ist es gelungen, eine Methode zur Verfügung zu stellen, die eine Aufreinigung größerer Allergenmengen ermöglicht. Somit wird es in Zukunft möglich sein, Untersuchungen der Epitopstruktur durchzuführen.

Weiterhin können mit größeren Mengen an aufgereinigtem Allergen monoklonale Antikörper gegen die Allergene hergestellt und zu weiteren Untersuchungen eingesetzt werden.

Auch die Isolierung des spez. IgE gegen ein Mangoallergen wird zukünftig möglich sein, indem das reine Allergen an die NHS-aktivierte Sepharose gekoppelt wird und dieser Antikörper somit aus dem Serum isoliert werden kann. Auf diesem Wege können Kreuzreaktivitäten näher untersucht werden. Gelingt es beispielsweise, das Art v 1 aus einem Beifußpollenproteinextrakt mit Hilfe einer Säule, die mit spez. IgE gegen das Man i 1 versehen ist, zu isolieren, so ist dies der endgültige Nachweis einer Homologie der Epitope beider Allergene.

Eine andere Möglichkeit, ausreichende Allergenmengen zu gewinnen, besteht in der Herstellung des rekombinanten Allergens mittels PCR (polymerase chain reaction). Auf diesem Wege wurden schon andere Allergene, wie beispielsweise das Bet v 1 und das Bet v 2, gewonnen (VALENTA ET AL., 1991b, EBNER ET AL., 1995). Hierbei konnte häufig gezeigt werden, daß weder in vivo noch in vitro Unterschiede zwischen dem rekombinanten und dem nativen Allergen festzustellen waren. Allerdings gelang es bis heute nicht, ein rekombinantes Art v 1 herzustellen, wobei vermutet wird, daß die Ausbildung der Epitope auf posttranslationale Veränderungen nach der Proteinexpression in der Pflanze zurückzuführen ist, die in der mikrobiellen Produktion nicht erreicht werden (HEISS ET AL., 1996, GROTE ET AL., 1998).

6. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der Allergene, die für allergische Reaktionen vom Soforttyp gegen Mango verantwortlich sind. Auch die Abhängigkeit der Allergenität von der Sorte und vom Reifegrad der Früchte sollte untersucht werden. Da in der Literatur von einer pollenassoziierten Allergie gegen Mangofrüchte ausgegangen wird, erschien die Untersuchung einer möglichen Kreuzreaktivität zwischen Mango und Beifußpollen, Sellerie, Karotte und Birkenpollen angebracht. Zu weiteren Untersuchungen der Epitopstruktur war es notwendig, eine Methode zur Isolierung der Allergene der Mango zu entwickeln.

Zur Umsetzung dieser Ziele wurden zunächst Allergenextrakte aus den Rohmaterialien gewonnen. Die Proteine dieser Extrakte wurden zur Bestimmung des spez. IgE der Patientenseren mittels EAST eingesetzt. Die Charakterisierung der Allergene hinsichtlich ihres MG erfolgte mit 56 Probandenseren, indem eine Untersuchung mittels SDS-PAGE/IB durchgeführt wurde. Es konnte gezeigt werden, daß jeweils 82 % der Probanden Allergene mit app. MG von 40 und 30 kDa detektierten, womit sie als Hauptallergene bezeichnet werden können. Weiterhin reagierten 38 bzw. 30 % der Seren mit Allergenen, die ein app. MG von 67 bzw. 43 kDa besitzen. Auch ein Allergen mit einem app. MG von 14 kDa wurde von 14 % der Seren detektiert. Durch Untersuchung des Allergenextraktes mittels IEF/IB konnte gezeigt werden, daß die pI der Allergene ausschließlich im sauren pH-Bereich liegen. Die 2D-Elektrophorese ergab, daß das 40 kDa-Hauptallergen in Form zweier Isoallergene mit pI von 4,6 und 4,8 vorliegt. Dem 30 kDa-Hauptallergen konnte ein pI von 4,9 zugeordnet werden. Auch das 43 kDa-Allergen lag in Form zweier Isoallergene, mit pI von 6,7 und 4,55, vor. Dem Allergen mit einem app. MG von 67 kDa konnte ein pI von 4,9 zugeordnet werden. Nicht detektiert werden konnte in der 2D-Elektrophorese das Allergen mit einem app. MG von 14 kDa.
Gemäß den internationalen Regeln wird das 40 kDa Allergen als *Mangifera indica 1* (Man i 1) und das 30 kDa Allergen als *Mangifera indica 2* (Man i 2) bezeichnet.
Durch den Einsatz polyklonaler Antikörper konnten Profiline im Gesamtextrakt der Mango nachgewiesen werden. Auch Kohlenhydratstrukturen wurden durch den Einsatz von Lectinen detektiert.
Die Untersuchung einer möglichen Sortenabhängigkeit der allergenen Potenz von Mangofrüchten wurde an vier Sorten, die in unterschiedlichen Kontinenten angebaut wurden, durchgeführt. Die verwendeten Sorten Osteen, Eden, TA und Ngowe zählen zu den in Europa am häufigsten verzehrten Mangofrüchten. Die Untersuchung der Sortenabhängigkeit erfolgte unter Einsatz der IB- und der EAST-Inhibiton, wobei bei den untersuchten Mangosorten keine Unterschiede in der allergenen Potenz festgestellt werden konnten.
Eine mögliche Veränderung der allergenen Potenz von Mangofrüchten im Verlauf von Reife und Lagerung wurde anhand der Mangosorte TA untersucht, wobei eine Aufarbeitung am 5., 12, 21, 35 und 40. Tag nach der Ernte erfolgte. Auch hier konnte in Untersuchungen mittels IB- und EAST- Inhibition keine Veränderung der allergenen Potenz nachgewiesen werden.

Kreuzreaktionen konnten zwischen der Mango und Beifußpollen, Sellerie, Karotte sowie Birkenpollen nachgewiesen werden. Durch die IB-Inhibition konnte gezeigt werden, daß das Man i 1 sowie die Allergene mit einem app. MG von 43 und 67 kDa eine Kreuzreaktion zum Art v 1, dem Hauptallergen der Beifußpollen, aufwiesen. Diese kreuzreaktive Struktur konnte auch in Sellerie, Karotte und Birkenpollen nachgewiesen werden. Ferner konnte eine Kreuzreaktion zwischen dem 14 kDa-Allergen der Mango und dem Bet v 1, dem Hauptallergen der Birkenpollen, bestimmt werden. Diese kreuzreaktive Struktur ist auch im Sellerie nachzuweisen. Die Bedeutung von Profilinen für die Kreuzreaktivität der Mango konnte nicht abschließend geklärt werden, da das eingesetzte Poolserum diese nicht detektierte. Das Man i 2 scheint keine kreuzreaktiven Strukturen zu besitzen.

Zur Isolierung der Hauptallergene bot sich aufgrund der sauren pH-Werte der Allergene zunächst die IEC mittels Anionenaustauschersäule an. Aufgrund des geringen Gehalts an Allergenen im Gesamtproteinextrakt der Mango war die Isolierung einer ausreichenden Menge hierbei nicht möglich. Es konnten lediglich ca. 5 pmol des 43 kDa-Allergens isoliert werden. Durch eine N-terminale Sequenzierung wurden in 15 Zyklen 14 Aminosäuren identifiziert. Der N-Terminus dieses Allergens zeigte erwartungsgemäß keine Übereinstimmung mit dem Bet v 1 sowie seinen homologen Allergenen im Sellerie. Durch eine Recherche in Proteindatenbanken konnte jedoch eine 53 %ige Übereinstimmung der 14 N-terminalen Aminosäuren mit einem 31 kDa-Allergen des Apfels ermittelt werden. Ob dieses ebenfalls eine Kreuzreaktion zum Art v 1 zeigt, wird in der vorliegenden Literatur nicht ermittelt und wäre daher noch zu prüfen.

Zur einfachen Aufreinigung größerer Allergenmengen wurde abschließend die AC eingesetzt. Hierbei wurde eine zweistufige Aufarbeitung angewendet, die zunächst die Isolierung des IgE aus dem Humanserum und anschließend die Isolierung des Allergens aus dem Gesamtproteinextrakt der Mango mit dem zuvor isolierten IgE beinhaltet. Durch Untersuchung mittels SDS-PAGE/IB konnte gezeigt werden, daß es möglich ist, daß Man i 1 sowie das Man i 2 auf diesem Wege zu isolieren.

SUMMARY

The topic of the present thesis was the detection of IgE-related allergens in mango fruit. Furthermore the IgE-binding patterns of mango fruit allergens in different varieties were examined and finally the occurrence of allergens during ripening of mango fruit was investigated.
Different publications describe the mango fruit allergy as pollen-related, so the investigation of possible cross-reactivites between mango and mugwort, celery, carrot and birch pollen seemed to be necessary.
For further investigations it was necessary to develop a method for allergen isolation.

In a first step the mango fruit allergens were extracted from the raw material. These proteins were used for the determination of specific IgE using the EAST assay. In order to identify IgE-binding allergens SDS-PAGE/Immunoblot was performed. 56 sera from patients with sensitisation to mango fruit were used. 82 % of these patient sera detected two allergens with Mr of approximately 40 and 30 kDa, therefore these can be described as the so-called main allergens. Allergens with Mr of approximately 67 (43) kDa were detected by 38 (30) % of the patient sera. 14 % showed an additional allergen with a Mr of 14 kDa.
Using IEF/IB it could be shown that all IgE-related allergens in mango fruit share acidic pH-values.
By 2D-electrophoresis it could be proved that the main allergen with a Mr of approximately 40 kDa as well as the allergen with a Mr of approximately 43 kDa are existing as isoallergens with pI´s of 4.6, 4.8 and 6.7, 4.55, respectively. Both important allergens with Mr of approx. 30 kDa and 67 kDa had a pI of 4.9. The allergen with an apparent molecular weight of 14 kDa was not detectable.
According to the international rules, the 40 kDa allergen was named Mangifera indica 1 (Man i 1) and the 30 kDa allergen Mangifera indica 2 (Man i 2).
Profilines and lectines were detected in the protein extract of mango fruit using monoclonal antibodies.
The investigation of a possible variety dependence of the allergenic potency was carried out at the four most frequently consumed strains Eden, Ngowe, Osteen and Tommy Atkins, cultivated in different continents. In order to identify IgE-binding allergens and determine mutual cross-reactivities of the varieties, immunoblot and EAST inhibition were performed. It could be shown that there were no significant differences in allergenic potency among the four varieties.
A possible change in the occurrence of IgE-binding patterns during ripening was examined using the mango fruit variety Tommy Atkins. The protein extraction was performed 5, 12, 21, 35 and 40 days after harvesting the mango fruits. There were no differences in allergenic potency by immunoblot and EAST-inhibition detectable.
A cross-reactivity between mango and mugwort, celery, carrot and birch pollen, respectively,

could be proved. Performing IB-inhibition it was shown that the allergen Man i 1 as well as the allergens with Mr of approx. 43 and 67 kDa possess a cross-reactivity to the main allergen of mugwort, the Art v 1. Celery, carrot and birch pollen show this cross-reactive structure, too. Moreover, a cross-reactivity between the 14 kDa allergen of mango and the main allergen of birch pollen, the Bet v 1 could be detected. It corresponds to the cross-reactive structure in celery.

Since profilines were not detectable by the used pool serum its role for the cross-reactivity of mango fruits could not finally be explained.

Because of the acidic pH-values of the mango fruit allergens anion exchange chromatography was chosen first for their isolation. By reason of the small allergy amounts in relation to the whole protein content, an isolation of sufficient quantities was not possible. Only 5 pmol of the 43 kDa allergen could be isolated.

Using N-terminal protein sequencing, 14 amino acids of the 43 kDa allergen were identified in 15 cycles. As expected, the N-terminus did not correspond to the Bet v 1 and its homologues in celery. The N-terminal sequence of the Art v 1 is still unknown. For that reason, a comparison of these allergens was not possible. However, a correspondence of 53 % to a 31 kDa allergen of apples could be determined by comparing the 14 detected N-terminal amino acids with sequences published in protein data banks. A cross reactivity of this allergen to the Art v 1 has not been described in literature yet and has to be examined in the future.

A simple clean-up method for larger amounts of allergens was finally performed by affinity chromatography. For that a two step clean-up was applied. First, IgE was isolated from human sera. In the following step mango fruit allergens were isolated from the whole protein extract by using the previously obtained human IgE.

Performing SDS-PAGE/IB it could be shown that the described isolation method is suitable for separating the main allergens Man i 1 and Man i 2.

7. ANHANG

7.1 GEWINNUNG DER PATIENTENSEREN

- 10 mL Blut mittels Serumröhrchen abnehmen
- min. 30 min abkühlen lassen
- 10 min bei 4 °C und 4000 g zentrifugieren
- überstehendes Serum (ca. 3-4 mL) in Gefäße abfüllen
- Seren bei –80 °C lagern

7.2 EXTRAKTION DER PROTEINE (modifiziert nach VIETHS ET AL., 1992a)

7.2.1 Reagentien

Aceton-Ether-Gemisch — Aceton : Diethylether (1:1; v:v)

PBS (pH 7,4) — 1 Puffertablette ad 200 mL bidest. Wasser

0,01 M K_2HPO_4

0,15 M NaCl

7.2.2 Durchführung

Vorkühlung der Extraktionslösungen

- am Vortag 1000 mL Aceton, 200 mL Diethylether und ein Stahlbecherglas bei –20 °C vorkühlen.

Homogenisierung

- 400 mL Aceton in das Stahlbecherglas geben, in Tiefkühltruhe bei –80 °C vorkühlen bis T < -40 °C
- 200 g der Frucht einwiegen und langsam in das Aceton geben, warten, bis T < -40 °C
- Gefäß in Kühlbox mit ca. 500 g Trockeneis stellen und Gemisch mit Ultraturrax homogenisieren
- Homogenat in 1000 mL Flasche überführen, Stahlbecherglas und Ultraturrax mit Aceton abspülen
- Homogenat bei –80 °C über Nacht in Tiefkühltruhe equilibrieren lassen

Filtration

- Homogenat über Büchnertrichter filtrieren
- 3 x mit je 80 mL Aceton (T < - 40 °C) und 1 x mit 80 mL Aceton-Ether-Gemisch waschen
- Rückstand trockensaugen, Filtrat verwerfen
- Rückstand in 250 mL Rundkolben überführen, tiefgefrieren
- über Nacht lyophilisieren
- Lyophilisat im Achatmörser fein zerreiben und in Glasgefäße überführen, dabei Gesamtmenge des Lyophilisats bestimmen (= sog. Acetonpulver)

Herstellung der PBS- und wäßrigen Extrakte

- 1,8 g Lyophilisat in ein Becherglas einwiegen
- 30 mL PBS-Lösung (bzw. für Extrakte, die zur IEC eingesetzt werden, 30 mL bidest. Wasser) hinzufügen
- 1 h unter Eiskühlung rühren lassen
- Homogenat in Zentrifugenglas überführen
- bei 10500 g und 4 °C 60 min zentrifugieren
- Lösung abnehmen, filtrieren
- ad 25 mL mit PBS bzw. bidest. Wasser
- portionieren (je 2 mL in Gefäße mit einem Füllvolumen von 4 mL)
- Lösungen einfrieren und über Nacht lyophilisieren
- Proteinextrakte bei –20 °C lagern, mehrere Monate haltbar
- aus einem Gefäß jeder Aufarbeitung den Proteingehalt bestimmen (s. Anh. 7.3)

7.3 PROTEINBESTIMMUNG (BRADFORD, 1976)

7.3.1 Lösungen

Lösung 1	10 mL Ethanol (96 %) 20 mL Phosphorsäure (88 %) 35 mg CBB G
Lösung 2	3 mL Lösung 1 3 mL Phosphorsäure (88 %) 1,5 mL Ethanol (96 %) 42,5 mL bidest. Wasser bei RT unter Lichtausschluß aufbewahren
Standardlösung	400 µg BSA / mL 300 µg BSA / mL 200 µg BSA / mL 100 µg BSA / mL 50 µg BSA / mL 40 µg BSA / mL
Probelösungen	Gefäß mit Allergenextrakt (s. Anh. 7.2) in 1 mL bidest. Wasser rehydratisieren, evtl. Verdünnen, hiervon 50 µL zur Bestimmung einsetzen

7.3.2 Durchführung

- 50 µL Standard- bzw. Probelösung in je eine Kavität einer Mikrotiterplatte geben (für den Blindwert 50 µL bidest. Wasser)
- 200 µL Lösung 2 hinzugeben
- im Mikroplattenreader 5 s schütteln, nach 5 min. bei 590 nm gegen Blindwert vermessen

7.3.3 Ergebnisse der Proteinbestimmung der Extrakte

Tab. 7.1: Ergebnisse der Proteinbestimmung der Extrakte

LÖSUNGEN	EXTINKTION [Skt.]	PROTEINKONZENTRATION [µg/mL]
Kalibrierlösung 1	1,237	400
Kalibrierlösung 2	1,142	300
Kalibrierlösung 3	1,031	200
Kalibrierlösung 4	0,716	100
Kalibrierlösung 5	0,459	50
Kalibrierlösung 6	0,379	40
PBS-Extrakte:		
Mango Osteen (Spanien) 1:4 verdünnt	0,874	578,1
Mango Eden (Israel) 1:3 verdünnt	1,028	659,8
Mango TA (Brasilien) 1:3 verdünnt	1,009	627,8
Mango Ngowe (Kenia) 1:2 verdünnt	1,007	416,3
Sellerie 1:2 verdünnt	0,943	351,9
Karotte 1:2 verdünnt	1,069	489,8
Beifußpollen	0,910	161,3
BP 1:4 verdünnt	0,782	461,2
wäßriger Extrakt		
Mango TA (Indonesien)	1,008	418,0

Kalibrierfunktion: $y = 0{,}3809 \ln(x) - 1{,}0263 \quad (r = 0{,}997)$

Kalibriergerade:

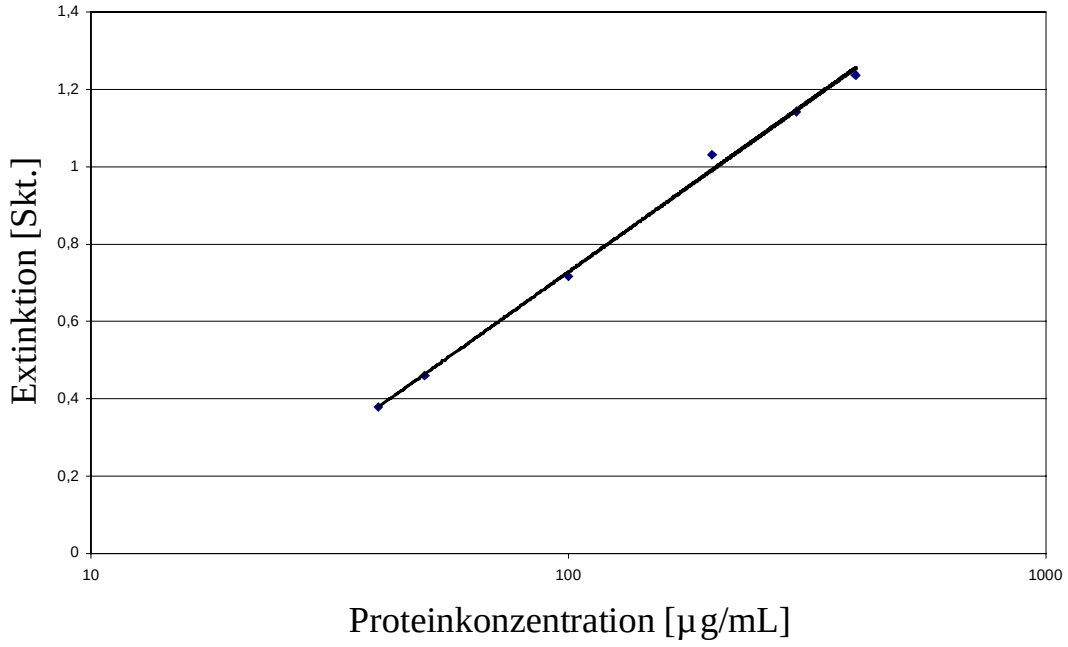


Abb. 7.1: Kalibriergerade der Bradford-Bestimmung

7.4 ENZYMALLERGOSORBENT-TEST (EAST)

7.4.1 Bromcyanaktivierung (modifiziert nach CESKA UND LUNDKVIST, 1972)

- In einem Dreihalskolben, versehen mit 250-mL-Tropftrichter und Thermometer, 15 g Papierscheiben (ca. 5000 Stück) in 150 mL bidest. Wasser quellen lassen
- Inzwischen 15,0 g Bromcyan in 450 mL bidest. Wasser unter Rühren lösen (Abzug !, Schutzmaske !)
- Bromcyanlösung zur Papierscheibensuspension hinzugeben
- Durch Zutropfen von 1 M NaOH pH-Wert auf 10-10,5 einstellen, und solange einhalten, bis 75 mL verbraucht sind. Der pH-Wert darf nicht über 11,5 steigen, ansonsten ist der Versuch zu wiederholen
- Lösung über einen Büchnertrichter absaugen
- Scheiben insgesamt 12 x mit je 0,005 M $NaHCO_3$-Lsg. (2,1 g $NaHCO_3$ ad 10 L dest. Wasser) waschen, je 2 min stehen lassen, absaugen
- Anschließend nacheinander 2 x mit je 375 mL folgender Lösungen waschen: dest.Wasser; Aceton:Wasser (25:75, v:v); Aceton:Wasser (50:50, v:v); Aceton:Wasser (75:25; v:v); Aceton
- Bromcyanaktivierte Scheiben im Exsikkator über Calciumchlorid trocknen.
- Scheiben bei –20 °C lagern

7.4.2 Kopplung der Extrakte (modifiziert nach CESKA UND LUNDKVIST,1972)

7.4.2.1 LÖSUNGEN

Inkubationspuffer	1) 15,6 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ + 1000 mL dest. Wasser 2) 8,4 g $NaHCO_3$ + 1000 mL dest. Wasser 3) 190 mL 1) + 803 mL 2) mischen, pH messen, mit 4 M HCl auf 7,4 einstellen 4) in 800 mL Gemisch 3) 3 g BSA, 37,22 g EDTA, 2 g NaN_3 und 2 mL Tween 20 lösen, mit 4 M HCl auf pH 7,4 einstellen
0,5 M $NaHCO_3$	21,0 g $NaHCO_3$ ad 500 mL dest. Wasser, pH auf 8,4 einstellen
0,1 M $NaHCO_3$	4,2 g $NaHCO_3$ ad 500 mL dest. Wasser, pH auf 9,5 einstellen
Ethanolaminpuffer	5 mL Ethanolamin ad 500 mL dest. Wasser, mit 4 M HCl auf pH 9,2 einstellen
0,1 M Natriumacetatpuffer	4,2 g Natriumacetat ad 500 mL dest. Wasser, mit 4 M HCl auf pH 4,0 einstellen

7.4.2.2 DURCHFÜHRUNG

- Extrakte in bidest. Wasser aufnehmen und so verdünnen, daß ca. 20 µg Protein / mL gelöst vorliegen
- 100 mL Extraktionslösung in 250-mL-Jodzahlkolben füllen
- ca. 300 bromcyanaktivierte Scheiben (ca. 0,6 g) dazugeben
- über Nacht bei 4 °C rühren (Magnetrührer)
- Überstand mit Pasteurpipette absaugen (Wasserstrahlpumpe)
- einmal mit 100 mL 0,5 M $NaHCO_3$ waschen, absaugen
- 100 mL Ethanolaminpuffer dazugeben
- 2 h bei RT rühren
- absaugen und wie folgt waschen:
- 3 x mit 100 mL 0,1 M $NaHCO_3$-Lsg.
- 2 x mit 100 mL 0,1 M Natriumacetatlösung
- 2 x mit 100 mL 0,5 M $NaHCO_3$-Lsg.
- letzte Waschlösung gründlich absaugen
- mit 100 mL dest. Wasser spülen und in 250-mL-Rundkolben überführen, Wasser gründlich absaugen
- 2 h in der Tiefkühltruhe einfrieren
- Papierscheiben über Nacht lyophilisieren
- Scheiben bei –20 °C lagern

7.4.3 EAST-Bestimmung (Testkit der Fa. Allergopharma, Reinbek)

7.4.3.1 LÖSUNGEN

Waschlösung	entsprechend dem Testkit (enthält Tween 20, PBS)
Konjugatlösung	entsprechend dem Testkit (enthält anti-Human-IgE, konjugiert mit AP)
Substratlösung	entsprechend dem Testkit (enthält $MgCl_2$)
Färbetabletten	entsprechend dem Testkit (enthalten PNPP)
Standardallergenscheiben	festphasengekoppelter Lieschgraßextrakt
Standardlösungen	Kalibrierreihe mit vier Seren
	A = 0,35 U/mL spez. IgE gegen Lieschgras (EAST-KLASSE 1)
	B = 0,7 U/mL spez. IgE gegen Lieschgras (EAST-KLASSE 2)
	C = 3,5 U/mL spez. IgE gegen Lieschgras (EAST-KLASSE 3)
	D = 17,5 U/mL spez. IgE gegen Lieschgras (EAST-KLASSE 4)

7.4.3.2 DURCHFÜHRUNG

- alle Messungen sind als Doppelbestimmungen durchzuführen
- für die Bestimmung benötigte Cellulosescheiben in Inkubationspuffer (s. 7.4.2) tauchen und anschließend auf Filterpapier trocknen
- je eine Scheibe in ein Röhrchen überführen
- je 50 µL Patientenserum bzw. Kontrollserum auf die Allergenscheiben und je 50 µL Standardserum auf die Lieschgrasscheiben geben
- Röhrchen mit Parafilm abdecken und 3 h bei RT unter Lichtabschluß inkubieren
- je 2 mL Waschlösung zupipettieren, nach 10 min absaugen, Waschvorgang insgesamt 3 x durchführen
- je 50 µL Konjugatlösung in die Röhrchen geben
- Röhrchen mit Parafilm abdecken und über Nacht unter Lichtabschluß inkubieren
- je 2 mL Waschlösung zupipettieren, nach 10 min absaugen, Waschvorgang insgesamt 3 x durchführen
- 200 µL Färbelösung (1 Tablette in 5 mL Substratlösungsmittel) in jedes Röhrchen geben sowie zusätzlich als Blindwert in 2 leere Röhrchen
- 1 h im Trockenschrank bei 37 °C inkubieren
- je 1 mL Stopplösung (1 M NaOH) zupipettieren, durchmischen (Vortex)
- je 300 µL der Probelösung in je eine Kavität einer Mikrotiterplatte füllen
- bei 405 nm photometrisch bestimmen.

7.4.3.3 AUSWERTUNG DER EAST-KLASSEN IN U/ML

EAST-Klasse 0:	0-0,35	U/mL
EAST-Klasse 1:	0,35-0,70	U/mL
EAST-Klasse 2:	0,70-3,50	U/mL
EAST-Klasse 3:	3,50-17,50	U/mL
EAST-Klasse 4:	> 17,50	U/mL

Die Quantifizierung des Gehalts an spez. IgE in den Seren erfolgt über die logarithmische Regression anhand der Kalibrierreihe.

7.5 EAST-INHIBITION (modifiziert nach BESLER ET AL., 1997)

7.5.1 Lösungen

Waschlösung	entsprechend dem Testkit (enthält Tween 20, PBS)
Konjugatlösung	entsprechend dem Testkit (enthält anti-Human-IgE, konjugiert mit AP)
Substratlösung	entsprechend dem Testkit (enthält $MgCl_2$)
Färbetabletten	entsprechend dem Testkit (enthalten PNPP)
Standardallergenscheiben	festphasengekoppelter Lieschgrasextrakt
Standardlösungen	Kalibrierreihe mit vier Seren
	A = 0,35 U/mL spez. IgE gegen Lieschgras (EAST-KLASSE 1)
	B = 0,7 U/mL spez. IgE gegen Lieschgras (EAST-KLASSE 2)
	C = 3,5 U/mL spez. IgE gegen Lieschgras (EAST-KLASSE 3)
	D = 17,5 U/mL spez. IgE gegen Lieschgras (EAST-KLASSE 4)
0,05 M $NaHCO_3$	2,1 g $NaHCO_3$ ad 500 mL dest. Wasser, pH auf 9,6 einstellen
Allergenverdünnungslösung	1 g BSA + 500 µL Tween 20, ad 100 mL mit PBS-Lösung
OA-Lösung	10 mg OA-Lösung ad 10 mL Allergenverdünnungslösung
Blockierlösung	1 g BSA ad 100 mL PBS-Lösung

7.5.2 Durchführung

a) Kopplung der Proteine an MaxiSorb™-Mikrotiterplatte

- Proteinextrakte mit 0,05 M $NaHCO_3$-Lösung so einstellen, daß die Proteinkonzentration 10 µg/mL beträgt
- je 250 µL Lösung in jede Kavität der Mikrotiterplatte geben, über Nacht bei RT koppeln
- Lösung absaugen
- je 250 µL Blockierlösung in jede Kavität der Mikrotiterplatte geben, 1 h bei RT blockieren
- Lösung absaugen
- je 250 µL Waschlösung in jede Kavität der Mikrotiterplatte geben, 10 min bei RT stehen lassen, absaugen
- Waschvorgang 2 x wiederholen

b) Durchführung der EAST-Inhibition

- alle Messungen sind als Doppelbestimmungen durchzuführen
- folgende Lösungen sind zur Vorinkubation in ein Eppendorf-Gefäß zu pipettieren (die Verdünnung erfolgt jeweils mit Allergenverdünnungslösung):
- je 50 µL unterschiedliche konzentrierte Inhibitionslösung (C1-Cx)
- 50 µL Allergenverdünnungslösung (kein Inhibitor (B_0))
- 50 µL OA-Lösung (unspezifische Inhibition)
- 100 µL Allergenverdünnungslösung (nichtspezifische Bindung (NSB))
- je 70 µL mit Allergenverdünnungslösung verdünntes Serum in die Gefäße geben (außer bei Überprüfung der NSB), nach Zugabe durch Schwenken mischen
- 15 min bei RT inkubieren lassen
- je 50 µL in die Kavitäten der Mikrotiterplatte geben
- Mikrotiterplatte mit Parafilm abdecken und 3 h bei RT unter Lichtabschluß inkubieren
- je 250 µL Waschlösung zupipettieren, nach 10 min absaugen, Waschvorgang insgesamt 3 x durchführen
- je 50 µL Konjugatlösung (1:4, v:v, mit Allergenverdünnungslösung verdünnt) in die Kavitäten geben
- Mikrotiterplatte mit Parafilm abdecken und über Nacht unter Lichtabschluß inkubieren
- je 250 µL Waschlösung zupipettieren, nach 10 min absaugen, Waschvorgang insgesamt 3 x durchführen
- 50 µL Färbelösung (1 Tablette in 5 mL) in jede Kavität geben sowie zusätzlich als Blindwert in 2 leere Kavitäten
- 1 h im Trockenschrank bei 37 °C inkubieren
- je 250 µL Stopplösung (1 M NaOH) zupipettieren
- bei 405 nm photometrisch bestimmen.

7.5.3 Auswertung

$$\%\ Inhibition = \frac{Bo - B}{Bo - NSB} \bullet 100$$

B: Meßwert der einzelnen Inhibitionsstufen
Bo: Meßwert ohne Inhibitorzusatz
NSB: nichtspezifische Bindung

7.6 ELEKTROPHORESE

7.6.1 SDS-PAGE

Zusammensetzung des MG-Markers

Tab. 7.2: Zusammensetzung des MG-Markers

PROTEIN	MG [Da]
Phosphorylase B	94 000
BSA	67 000
OA	43 000
Carboanhydrase	30 000
Trypsininhibitor	20 100
α-Lactalbumin	14 400

Ein Gefäß des MG-Markers wird in 1 mL Probenpuffer aufgenommen und reduziert.
Je nach Slotgröße und Färbemethode werden 10 –20 µL Marker aufgetragen.

7.6.1.1. LÖSUNGEN FÜR DIE GELHERSTELLUNG

Acrylamid / Bis-Lösung 30 % T, 3 % C	29,1 g Acrylamid 0,9 g N,N-Methylenbisacrylamid mit bidest. Wasser ad 100 mL, filtrieren
Sammelgelpuffer (pH) 6,8 0,5 M Tris 0,4 % SDS	6,06 g Tris 0,4 g SDS mit 80 mL bidest. Wasser versetzen mit 4 M HCl auf pH 6,8, ad 100 ml mit bidest. Wasser
Trenngelpuffer (pH) 8,8 1,5 M Tris 0,4 % SDS	18,2 g Tris 0,4 g SDS mit 80 mL bidest. Wasser versetzen mit 4 M HCl auf pH 8,8, ad 100 mL mit bidest. Wasser
Tetraethylendiamin (TEMED)	
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	0,2 g APS in 0,5 mL bidest.Wasser lösen
Glycerinlösung (60 %)	69 g Glycerin (87 %) oder 60 g Glycerin (100 %) mit bidest. Wasser ad 100 mL

7.6.1.2 GELZUSAMMENSETZUNG

Die angegebenen Mengen gelten für Gele mit den Maßen 250 x 120 x 0,5 mm, bei 1 mm dicken Gelen gelten die doppelten Mengen

Sammelgel (pH 6,8)	1 mL Acrylamid/Bis-Lösung
5 % Acrylamid	3 mL Glycerin (60%ig)
0,125 M Tris	1,5 mL Sammelpuffer
0,1 % SDS	0,5 mL bidest. Wasser
30 % Glycerin	15 µL TEMED
	15 µL APS-Lösung
Trenngel (pH 8,8)	7,8 mL Acrylamid/Bis-Lösung
13 % Acrylamid	4,5 mL Trenngelpuffer
0,375 M Tris	5,7 mL bidest. Wasser
0,1 % SDS	15 µL TEMED
	15 µL APS-Lösung

Die Herstellung der Gele erfolgt nach WESTERMEIER (1990).
Die Gele werden auf Trägerfolie (GelBond-PAG-Film™, hydrophile Seite) hergestellt. Für einen Semidry-Blot (IB) wird die hydrophobe Seite verwendet.

- Sammelgel- und Trenngellösungen nach überstehendem Pipettierschema ansetzen
- 1 min im Ultraschallbad entgasen, APS erst direkt vor dem Gießen hinzugeben
- Gießkassette mit Sammelgellösung bis ca. 1-1,5 cm über die Slotformer füllen und ca. 5 min anpolymerisieren lassen
- Trenngellösung bis wenige mm unterhalb des Randes einfüllen
- Gellösung zum Schutz vor Austrocknung mit 1-Butanol überschichten
- Gel 30 min im Trockenschrank bei 60 °C auspolymerisieren lassen
- ca. 30 min abkühlen lassen

7.6.1.3 Reagenzien für die Trennung mittels SDS-PAGE

Probenpuffer (pH 6,8)	3,03 g Tris
(Vieths et al., 1992a)	2,5 mL ß-Mercaptoethanol
	5,0 mL Glycerin
	2,0 g SDS
	0,01 g Bromphenolblau
	150 µL Pyronin Y-Lösung (1%ig in Wasser, w:v)
	mit 40 mL bidest. Wasser versetzen
	mit 4 M HCl auf pH 6,8, ad 50 mL mit bidest.Wasser

Elektrodenpuffer (pH 8,3)	14,4 g Glycin
0,025 M Tris	3,03 g Tris
0,192 M Glycin	1,0 g SDS
0,1 % SDS	ad 1000 mL mit bidest. Wasser

7.6.1.4 Probenvorbereitung

- lyophilisierte Extrakte in bidest. Wasser rekonstituieren und in demselben Volumen Probenpuffer aufnehmen bzw. bei geringem Proteingehalt direkt im Probenpuffer aufnehmen
- Proben 3 min bei 90 °C im Wasserbad reduzieren

7.6.1.5 Durchführung der SDS-PAGE

- Thermostat der Kühlplatte auf 8 °C einstellen
- Gel aus der Gießkassette entnehmen
- Kühlplatte der Elektrophoresekammer mit 2-3 mL Kerosin befeuchten
- Gel mit Trägerfolie luftblasenfrei auflegen
- je nach Slotgröße 10-20 µL Marker oder 10-120 µL Probe auftragen (10 µg Protein / cm)
- Elektrodenbrücken auflegen und 200 V Spannung anlegen
- wenn Proben vollständig in das Sammelgel eingetreten sind, Spannung langsam erhöhen (s. Tab. 7.3); Stromfluß soll ca. 50 mA betragen
- Gel entnehmen, wenn Farbstoffe an der Anodenbrücke angelangt sind
- Gel färben (CBB bzw. Silberfärbung) oder zum Semidry-Blot einsetzen

Tab.7.3: Geräteeinstellung bei der SDS-PAGE

	SPANNUNG [V]	**STROMSTÄRKE** [mA]	**LEISTUNG** [W]	**ZEIT** [min]
PROBENEINTRITT (Sammelgel)	200	max. 50	max. 10	ca. 30-60
TRENNUNG (Trenngel)	500-900	50	max. 30	ca. 90-120

7.6.2 IEF (WESTERMEIER, 1990)

Tab. 7.4: Zusammenetzung des pI-Markers

PROTEIN	**pI**
Trypsinogen	9,30
Lectin (basische Bande)	8,65
Lectin (mittlere Bande)	8,45
Lectin (saure Bande)	8,15
Myoglobin (basische Bande, Pferd)	7,35
Myoglobin (saure Bande, Pferd)	6,85
Carboanhydrase B (Mensch)	6,55
Carboanhydrase B (Rind)	5,85
ß-Lactoglobulin A	5,20
Trypsininhibitor (Soja)	4,55
Methylrot	3,75
Amyloglucosidase	3,50

7.6.2.1 LÖSUNGEN

Acrylamid/Bis-Lösung 30 % T, 3 % C	29,1 g Acrylamid 0,9 g N,N-Methylenbisacrylamid mit bidest. Wasser ad 100 mL, filtrieren
Sorbitlösung (30 %)	30 g Sorbit mit bidest. Wasser ad 100 mL
Servalyte (pH 2-11)	kommerziell erworben

Servalyte (pH 2-4)	kommerziell erworben
APS-Lösung (40 %)	0,2 g Ammoniumperoxidisulfat in 0,5 mL bidest. Wasser lösen
TEMED	

7.6.2.2 GELHERSTELLUNG

Gel (pH 2-11)	250 x 120 x 1 mm
5 % T, 3 % C	6,0 mL Acrylamid/Bis-Lösung
	0,6 mL Servalyte pH 2-4
	1,4 mL Servalyte pH 2-11
	12 mL Sorbitlösung
	16 mL bidest. Wasser
	60 µL TEMED
	50 µL APS

Die Herstellung der Gele erfolgt nach WESTERMEIER (1990).
Die Gele werden auf Trägerfolie (GelBond-PAGE-Film™, hydrophile Seite) hergestellt.
Für einen anschließenden Semidry-Blot wird die hydrophobe Seite verwendet.

- Gießkassette zusammensetzen (ohne Slotformer)
- Gellösung einfüllen, mit 1-Butanol überschichten
- 30 min bei 60 °C auspolymerisieren lassen, 30 min abkühlen lassen.

7.6.2.3 ELEKTRODENPUFFER FÜR DIE ELEKTROPHORETISCHE TRENNUNG

Anodenlösung:	0,1 mol/L o-Phosphorsäure
Kathodenlösung:	0,1 mol/L Natronlauge

7.6.2.4 PROBENVORBEREITUNG

- lyophilisierte Extrakte in 2 mL bidest. Wasser rekonstituieren
- zum Entsalzen der PBS-Extrakte ca. 1 h bei 2500 g und 6 °C membranfiltrieren [Membranfilter Ultrafree™, 5 kDa Ausschlußgröße], dabei Volumen bis auf 50 – 100 µL einengen
- Rückstand in 1 mL bidest. Wasser aufnehmen, homogenisieren (wäßriger Extrakt kann direkt zur IEF eingesetzt werden)

7.6.2.5 DURCHFÜHRUNG DER IEF

- Kühlplatte (T: 8 °C) der Trennkammer mit Kerosin befeuchten
- Gel aus Gießkassette entnehmen und luftblasenfrei auf Kühlplatte legen
- mit Elektrodenlösungen getränkte Elektrodenstreifen auf die Kante des Gels legen
- Kammer schließen, Elektroden müssen vollständig aufliegen
- Spannung zur Vorfokussierung (s. Tab. 7.5) anlegen, bis Stromstärke < 5 mA
- Probenaplikationsplättchen auflegen, 15 – 20 µL Probenlösung und IEF-Markerproteine aufgeben
- Spannung entsprechend Tab. 7.5 einstellen
- Hauptfokussierung
- Gel färben (CBB bzw. Silberfärbung) oder zum Semidry-Blot einsetzen

Tab.7.5: Geräteeinstellungen bei der IEF mit freien Trägerampholyten

	SPANNUNG [V]	**STROMSTÄRKE** [mA]	**LEISTUNG** [W]	**ZEIT** [min]
VORFUKUSSIERUNG	200-800	max. 50	const. 12	ca. 30-90
PROBENEINTRITT	300	50	12	30
HAUPTFOKUSSIERUNG	400	50	12	10
(bis Methylrot-Bande	500	50	12	10
scharf fokussiert)	600	50	12	10
	700	50	12	10
	800	50	12	30-40

7.6.3 2D-Elektrophorese (nach GÖRG ET AL., 1988)

7.6.3.1 LÖSUNGEN

Tris-HCl-Puffer (pH 6,8)	6,06 g Tris
0,5 M Tris	0,4 g SDS
0,4 % SDS	mit 80 mL bidest. Wasser versetzen,
	mit 4 M HCl ad pH 6,8, ad 100 mL mit bidest. Wasser
DTT-Lösung	250 mg DTT in 0,5 mL bidest. Wasser lösen
2,6 M DTT	(stets frisch ansetzen, Lösung nicht haltbar !)
Äquilibrierlösung	2,0 g SDS
2 % SDS	36 g Harnstoff
6 M Harnstoff	3 mg EDTA
0,1 mM EDTA	10 mg Bromphenolblau
0,01 % Bromphenolblau	10 mg Pyronin-Y
0,01 % Pyronin-Y	10 mL Tris-HCl-Puffer (pH 6,8)
50 mM Tris-HCl (pH 6,8)	35 mL Glycerin (87 %ig)
30 % Glycerin	ad 100 mL mit bidest. Wasser

7.6.3.2 DURCHFÜHRUNG

- ca. 20 µL Probe und 10-20 µL Marker auf IEF-Gel aufgeben
- IEF wie beschrieben durchführen
- pI-Marker ausschneiden und mit CBB färben
- etwa 5 mm breite Streifen aus den fokussierten Proben ausschneiden
- 1 cm von der Anoden- und Kathodenseite abschneiden
- Gelstreifen in ein Pyrexglas überführen und mit 10-20 mL Äquilibrierlösung und 200 µL DTT-Lösung versetzen
- 3 min bei 90 °C reduzieren
- Gelstreifen auf SDS-Gel (Sammelgel) legen und Luftblasen herausdrücken
- MG-Marker auftragen
- Spannung anlegen, elektrophoretische Trennung analog 7.6.1 durchführen
- nach vollständigem Eintritt der Proben in das Sammelgel Gelstreifen entfernen
- wenn Farbstoff Anodenseite erreicht hat, Gel entnehmen
- Gel färben (Silberfärbung oder CBB) oder Semidry-Blot durchführen

7.6.4 Semidry-Blotting (modifiziert nach KHYSE-ANDERSEN, 1984)

7.6.4.1 LÖSUNGEN

Anodenpuffer 1 (pH 10,4)	18,15 g Tris
0,3 M Tris	0,05 g NaN_3
20 % Ethanol	100 mL Ethanol, mit bidest. Wasser ad 500 mL

Anodenpuffer 2 (pH 10,4)	1,52 g Tris
0,025 M Tris	0,05 g NaN_3
20 % Ethanol	100 mL Ethanol, mit bidest. Wasser ad 500 mL

Kathodenpuffer (pH 7,6)	2,6 g 6-Aminohexansäure (EACA)
0,04 M EACA	0,05 g SDS
0,01 % SDS	0,05 g NaN_3
20 % Ethanol	100 mL Ethanol, mit bidest. Wasser ad. 500 mL

Kathodenpuffer II für IEF (pH 7,6)	2,6 g EACA
0,04 M EACA	0,5 g SDS
0,1 % SDS	0,05 g NaN_3
20 % Ethanol	100 mL Ethanol, mit bidest.Wasser ad 500 mL

Wichtig: Die pH-Werte der Lösungen dürfen nicht eingestellt werden !

7.6.4.2 DURCHFÜHRUNG

- SDS-PAGE, IEF bzw. 2D-Elektrophorese wie beschrieben durchführen
- NC- oder PVDF- Membran entsprechend der Größe der Gele zurechtschneiden und vor dem Blotten ausreichend mit Bleistift markieren
- Graphitanode mit bidest. Wasser anfeuchten
- 4 Lagen rote Haushaltstücher mit Anodenpuffer 1 tränken, luftblasenfrei auf die Anode legen
- Gel mit Trägerfolie aus der Elektrophoresekammer entnehmen
- bei IEF-Gelen: Gel 10 min in Kathodenpuffer 2 quellen lassen
- Blotmembran in Anodenpuffer 2 tränken, luftblasenfrei auf Gel legen
- 2 Lagen rote Haushaltstücher in Andodenpuffer 2 tränken, luftblasenfrei auf Blotmembran legen
- Stapel umdrehen, auf Anodenstapel legen und Trägerfolie vorsichtig entfernen
- Stellen, an denen kein Tranfer erfolgen soll, mit Kunststoffstreifen abdecken
- 6 Lagen blaue Haushaltstücher in Kathodenpuffer (bei Blotting von SDS-Gelen: Kathodenpuffer 1, bei IEF-Gelen: Kathodenpuffer 2) tränken und auf den Stapel legen

- Luftblasen aus dem Stapel rollen
- mit bidest. Wasser angefeuchtete Graphitkathode auflegen
- Semidry-Blot mit den in Tab. 7.6 angeführten Bedingungen durchführen

Tab. 7.6: Geräteeinstellung bei Semidry-Blotting. Die Zeitangaben gelten für 0,5 mm dicke Gele. Bei 1 mm Gelen ist die Zeit zu verdoppeln.

	SPANNUNG [V]	**STROMSTÄRKE** [mA]	**LEISTUNG** [W]	**ZEIT** [min]
SOLL	30	0,8 mA/cm^2	10	SDS: 40 min IEF: 75 min
IST	2-2	maximal	1-2	

7.7 UNSPEZIFISCHE FÄRBUNGEN IN GELEN

7.7.1 Coomassie-Färbung (CBB) (modifiziert FLING UND GREGERSON, 1986)

7.7.1.1 LÖSUNGEN

Fixier- und Färbelösung	500 mL Ethanol
50 % Ethanol	120 mL Essigsäure
12 % Essigsäure	1 g Coomassie R-250
0,1 % Coomassie R-250	mit bidest. Wasser ad. 1000 mL

Entfärbelösung	180 mL Ethanol
18 % Ethanol	80 mL Essigsäure
8 % Essigsäure	mit bidest. Wasser ad 1000 mL

7.7.1.2 DURCHFÜHRUNG

- Gel mit Fixier- und Färbelösung versetzen
- inkubieren, bis Gel stark gefärbt ist (ca. 3 h)
- Fixier- und Färbelöung abziehen
- mit Entfärbelösung versetzen bis Proteine noch deutlich gefärbt sind und Hintergrund entfärbt (ca. 5 h)

7.7.2 Silberfärbung (nach MORRISEY, 1981)

7.7.2.1 LÖSUNGEN

Fixierlösung	75 mL Ethanol
30 % Ethanol	10 mL Essigsäure
10 % Eisessig	ad 250 mL mit bidest. Wasser
Inkubationslösung	75 mL Ethanol
30 % Ethanol	17,0 g Natriumacetat
6,8 % Natriumacetat	1,25 mL Glutardialdehyd (25 %)
0,125 % Glutardialdehyd	0,5 g $Na_2S_2O_3$
0,2 % Natriumthiosulfat	ad 250 mL mit bidest. Wasser (frisch ansetzen)
Versilberungslösung	0,5 g $AgNO_3$
0,2 % Silbernitrat	50 µL Formaldehyd (37 %)
0,01 % Formaldehyd	ad 250 mL mit bidest. Wasser (frisch ansetzen)
Entwicklungslösung (pH 11,8)	7,5 g Na_2CO_3
2,5 % Natriumcarbonat	in 200 mL bidest. Wasser lösen, pH mit $NaHCO_3$ einstellen
0,004 % Formaldehyd	30 µL Formaldehyd (37 %) (erst unmittelbar vor Verwendung hinzugeben)
	ad 250 mL mit bidest. Wasser
Stopplösung	4,65 g Titriplex 3
2 % Titriplex	ad 250 mL mit bidest. Wasser
Präservierlösung	25 g Glycerin (100 %)
10 % Glycerin	mit dest. Wasser ad 250 mL

7.7.2.2 DURCHFÜHRUNG

- Gel mit Fixierlösung versetzen, mind. 30 min inkubieren, abgießen
- Gel mit Inkubationslösung versetzen, mind. 30 min inkubieren, abgießen
- Gel mit bidest. Wasser waschen (SDS-PAGE: 3 x 5 min, IEF: 5 x 10 min), abgießen
- Gel mit Versilberungslösung versetzen, 20 min inkubieren, abgießen
- Gel mit bidest. Wasser waschen (1 x 3 min), abgießen
- Gel mit Entwicklungslösung versetzen, 1 min, abgießen
- Gel mit Entwicklungslösung versetzen bis Banden deutlich gefärbt (ca. 5 min), abgießen
- Gel mit Stopplösung versetzen, 10 min, abgießen
- Gel mit bidest.Wasser waschen, 3 x 5 min, abgießen
- Gel mit Präservierungslösung versetzen, 30 min

7.8 UNSPEZIFISCHE FÄRBUNG AUF MEMBRANEN

7.8.1 Indian-Ink-Färbung auf NC-Membranen (modifiziert nach HANCOCK UND TSANG, 1983)

Tab. 7.7: Durchführung der India-Ink-Färbung auf NC-Membranen

SCHRITT	LÖSUNG	V [mL]	ZEIT [min]
BADEN	0,2 M NaOH	50	5
WASCHEN	PBS-Tween: 48,8 g NaCl 14,5 g Na_2HPO_4 1,17 g NaH_2PO_4 0,5 g NaN_3 2,5 mL Tween 20 mit bidest. Wasser ad 5 L	4 x 50	4 x 10
FÄRBEN	250 mL PBS-Tween 1 mL Seidenmalfarbe (schwarz) 2,5 mL Eisessig	50	bis ausreichend gefärbt 20 – 120 min
WASCHEN	bidest. Wasser	2 x 50	2 x 2

7.8.2 Kolloidale Goldfärbung auf NC-Membranen

(modifiziert nach DANSCHER UND NOORGARD, 1983)

Tab. 7.8: Durchführung der kolloidalen Goldfärbung auf Blotmembranen

SCHRITT	LÖSUNG	V [mL]	ZEIT [min]
INKUBIEREN	TTBS-Lösung (Tween-Tris-Buffer-Saline): 1,21 g Tris 14,61 g NaCl mit 100 mL bidest. Wasser versetzen mit 4 M HCl ad pH 7,5 1,5 mL Tween 20 ad 500 ml mit bidest. Wasser	50	4 x 20
WASCHEN	bidest. Wasser	50	4 x 20
FÄRBEN	Colloidal Gold Protein Stain (Fertiglösung, Fa BioRad™), enthält kolloidales Gold	50	120 oder über Nacht
WASCHEN	bidest. Wasser	2 x 50	2 x 2

7.8.3 Coomassie-Färbung auf PVDF-Membranen

(nach WARD ET AL., 1990)

Tab. 7.9: Durchführung der CBB-Färbung auf PVDF-Membran

SCHRITT	LÖSUNG	V [mL]	ZEIT [min]
FÄRBEN	0,5 g Coomassie brilliant blue R-250 in 250 mL Methanol lösen 50 mL Essigsäure ad 500 mL mit bidest. Wasser	50	10
ENTFÄRBEN	250 mL Methanol 50 mL Essigsäure mit bidest. Wasser ad 500 mL	4 x 50	4 x 2 bis Hintergrund deutlich entfärbt
WASCHEN	bidest. Wasser	50	10

7.9 SPEZIFISCHE FÄRBUNG AUF NC-MEMBRANEN

7.9.1 IB mit Humanserum (nach VIETHS ET AL., 1992b)

7.9.1.1 LÖSUNGEN

PBS (pH 7,4)

0,01 M PBS	1 PBS-Tablette (Sigma™)
0,15 M NaCl	ad 200 mL mit bidest. Wasser

Blockierlösung

5% Magermilchpulver	5 g Magermilchpulver
0,1 % Tween 20	100 µL Tween 20
0,01 M PBS	ad 100 mL mit PBS

Inkubationspuffer

0,1 % BSA	100 mg BSA
0,05 % Tween 20	50 µL Tween 20
0,01 M PBS	ad 100 mL mit PBS

Waschpuffer

0,05 % Tween 20	50 µL Tween 20
0,01 M PBS	ad 100 mL mit PBS

Patientenseren	100 µL Serum (s. 7.1) mit 1,4 mL Inkubationspuffer verdünnen 1:4000 in Inkubationspuffer verdünnen

Anti-Human-IgE	
Anti-Kaninchen-IgG (biotinyliert)	1:6000 in Inkubationspuffer verdünnen
Streptavidin HRP	1:20000 in Inkubationspuffer verdünnen
Umpufferlösung (pH 6,0) 0,01 M Tris	121,2 mg Tris in 80 mL bidest. Wasser lösen mit 4 M HCl pH 6,0 einstellen ad 100 mL mit bidest. Wasser
Färbelösung 1 (frisch ansetzen)	24 mg 3,3`,5,5`-Tetramethylbenzidin (TMB) 80 mg Dioctylnatriumsulfosuccinat (DONS) ad 10 mL mit Ethanol (96 %)
Färbelösung 2 (pH 5,0) 0,15 M Citrat-Phosphat-Puffer	0,94 g Citronensäure 1,82 g Na_2HPO_4 x 2 H_2O in 80 mL bidest. Wasser lösen, pH einstellen ad 100 mL mit bidest. Wasser

7.9.1.2 DURCHFÜHRUNG

- NC-Membran in 0,5 cm breite Streifen schneiden und in Färbekammer einlegen
- unspezifische Färbung 2 x 15 min mit Blockierlösung unterbinden
- über Nacht mit Patientenserum inkubieren
- 3 x 5 min mit Waschpuffer waschen
- 1 h mit anti-Human-IgE inkubieren
- 3 x 5 min mit Waschpuffer waschen
- 1 h mit anti-Kaninchen-IgG inkubieren
- 3 x 5 min mit Waschpuffer waschen
- 20 min mit Streptavidin-HRP inkubieren
- 3 x 5 min mit Waschpuffer waschen
- 1 min mit Umpufferlösung umpuffern
- 30 mL Färbelösung 2 mit 10 mL Färbelösung 1 mischen, mit 20 µL H_2O_2 versetzen und Blotstreifen bis zur ausreichenden Färbung behandeln
- mit Wasser spülen

7.9.2 IB-Inhibition mit Humanserum (nach VIETHS ET AL., 1992b)

- IB wie unter 7.9.1 beschrieben bis zur Blockierung durchführen
- anschließend 100 µL Poolserum mit 200 µL des entsprechenden Inhibitorextraktes (dieser wurde 1:1 in Inkubationspuffer aufgenommen) vermischen
- mit Inkubationspuffer ad 1,5 mL verdünnen
- 1 h bei RT vorinkubieren
- für unspezische Inhibition 100 µL Poolserum mit 200 µL OA-Lösung (1 mg/mL in Inkubationspuffer) vermischen, wie oben beschrieben verfahren
- ein Streifen ohne Inhibitor mit 100 µL Poolserum inkubieren
- ein Streifen mit 100 µL Kontrollserum inkubieren
- wie unter 7.9.1 beschrieben färben.

7.9.3 Nachweis von Profilinen (VIETHS ET AL., 1994b, FÄH ET AL., 1995)

7.9.3.1 LÖSUNGEN

Anti-Sellerie-Profilin	polyklonales Antiserum vom Kaninchen, 1:500 verdünnt in Inkubationspuffer (s.7.9.1)
Anti-Traubenkraut-Profilin	polyklonales Antiserum vom Kaninchen, 1:500 verdünnt in Inkubationspuffer (s. 7.9.1)

7.9.3.2 DURCHFÜHRUNG

- IB wie unter 7.9.1 beschrieben durchführen
- nach dem Blockieren je einen Streifen der NC-Membran mit Anti-Sellerie- bzw. Anti-Traubenkraut-Profilin über Nacht inkubieren
- einen Blotstreifen nur mit Inkubationspuffer inkubieren
- wie unter 7.9.1 beschrieben färben, dabei aber den Inkubationsschritt mit Humanserum auslassen

7.9.4 Nachweis von Kohlenhydratstrukturen (VIETHS ET AL., 1994a)

7.9.4.1 LECTINLÖSUNGEN

je 1 mg der biotinylierten Lectine CAA, Con A, Lotus und GS II in 1 mL PBS (konserviert mit 0,02 % NaN_3) lösen und in Inkubationspuffer (s. 7.9.1) 1:1000 verdünnen (1 µg/mL)

7.9.4.2 DURCHFÜHRUNG

- IB wie unter 7.9.1 beschrieben durchführen
- nach dem Blockieren je einen Blotstreifen mit 1,5 mL der Lectinlösung 1 h inkubieren
- einen Streifen nur mit Inkubationspuffer inkubieren
- 3 x mit Waschpuffer waschen (s. 7.9.1)
- 20 min mit Streptavidin-HRP-Konjugat inkubieren (s. 7.9.1)
- Färbung analog IB durchführen (s. 7.9.1)

7.9.5 Nachweis von Human IgE

- IB wie unter 7.9.1 beschrieben durchführen
- nach dem Blockieren mit Anti-Human-IgE über Nacht inkubieren
- wie unter 7.9.1 beschrieben färben, dabei den Inkubationsschritt mit Humanserum auslassen

7.9.6 Nachweis von Human-IgG

7.9.6.1 LÖSUNG

Anti-Human-IgG (biotinyliert) 1:6000 in Inkubationspuffer (vgl. 7.9.1) verdünnen

7.9.6.2 DURCHFÜHRUNG

- IB wie unter 7.9.1 beschrieben durchführen
- nach dem Blockieren mit Anti-Human-IgG über Nacht inkubieren
- wie unter 7.9.1 beschrieben färben, dabei die Inkubationsschritte mit Humanserum, Anti-Human-IgE und Anti-IgG auslassen

7.10 VERFAHREN ZUR ALLERGENISOLIERUNG

7.10.1 IEC

7.10.1.1 BEDINGUNGEN

Pumpe:	Merck-Hitachi, L-6220
Detektor:	Merck-Hitachi, L-4250, UV-Detektor
Auswerteeinheit:	PC, Software Chrom Star
Meßwellenlänge:	220 nm
Fraktionssammler:	Merck-Hitachi, L-5200 Fraktion Controller
Probenaufgabevolumen:	5 mL (Probenschleife)
Trennsäule:	Pharmacia, Resource Q, 6 mL
Eluent A:	0,02 M Tris-HCl, pH 8,0
Eluent B:	0,02 M Tris-HCl + 0,5 M NaCl, pH 8,0
Gradientenprogramm:	0-7 min 100 % Eluent A 7-70 min linear auf A:B, 85:15 70-80 min auf 100 % Eluent B 80-100 min 100 % Eluent B 100-110 min 100 % Eluent A, equilibrieren
Probe:	Lyophilisat des wäßrigen Proteinextraktes in 5 mL Eluent A lösen, Fraktionen gemäß 7.10.2 entsalzen
Flow:	2 mL/min

7.10.1.2 KALIBRIERUNG

je 10 mg der Standardproteine ad 100 mL Eluent A und je 5 mL dieser Lösung an der IEC trennen

Tab. 7.10: Zusammensetzung des pI-Markers für die IEC

PROTEIN	**pI**	**RETENTIONSZEIT** [min]
Myoglobin	7,4	Totvolumen
Carboanhydrase B (Mensch)	6,55	22,4
α-Lactalbumin	4,8	32,1
OA	4,6	35,6
Ovomucoid	4,1	44,2
Amyloglucosidase	3,5	52,7

7.10.1.3 DURCHFÜHRUNG

a) Untersuchung der IEC-Fraktionen mittels SDS-PAGE/Silberfärbung

- Lyophilisat von 2 mL wäßrigem Mango-Proteinextrakt in 5 mL Eluent A für die IEC rekonstituieren
- 4 x 5 mL Mango-Proteinextrakt (= 3,3 mg Protein) mittels IEC trennen
- Fraktionen im Abstand von 2,5 min (= 5 mL) sammeln
- Fraktionen einfrieren und lyophilisieren
- Rückstand in 100 µL Probenpuffer aufnehmen, reduzieren (s. 7.6.1)
- Je 20 µL mittels SDS-PAGE trennen (s. 7.6.1)
- Proteine mittels Silberfärbung visualisieren (s. 7.7.2)

b) Nachweis der Allergene

- Lyophilisat von 2 mL wäßrigem Mango-Proteinextrakt in 5 mL Eluent A für die IEC rekonstituieren
- 4 x 5 mL Mango-Proteinextrakt (= 3,3 mg Protein) mittels IEC trennen
- Fraktionen im Abstand von 2,5 min (= 5 mL) sammeln
- Fraktionen einfrieren und lyophilisieren
- Rückstand in 100 µL Probenpuffer aufnehmen, reduzieren (s. 7.6.1)
- Je 20 µL mittels SDS-PAGE trennen (s. 7.6.1)
- Semidry-Blot auf NC- oder PVDF-Membran durchführen (s. 7.6.4)
- Allergene mittels Immunfärbung visualisieren (s. 7.9.1)

c) Isolierung der Allergene und Aminosäuresequenzierung

- Lyophilisat von 2 mL wäßrigem Mango-Proteinextrakt in 5 mL Eluent A für die IEC rekonstituieren
- 44 x 5 mL Mango-Proteinextrakt (= 36,3 mg Protein) mittels IEC trennen
- Fraktionen F10-F14 sammeln
- vereinigte Fraktionen einfrieren und lyophilisieren
- Lyophilisate mit bidest. Wasser rekonstituieren und mittels Ultrafiltration (s. 7.10.2) entsalzen
- Rückstand in 150 µL Probenpuffer aufnehmen und reduzieren (s. 7.6.1)
- Je 20 µL mittels SDS-PAGE auftrennen (s. 7.6.1)
- Semidry-Blot auf PVDF-Membran durchführen (s. 7.6.4)
- Proteine mittels Coomassie-Färbung unspezifisch visualisieren
- Allergenbanden ausschneiden
- Die N-terminale Sequenzierung wurde vom Institut für Biochemie der Universität Hamburg durchgeführt

7.10.2 Konzentrierung über Mikrokonzentratoren

Das Entsalzen der IEC-Fraktionen und das anderweitige Aufkonzentrieren von Proteinlösungen in flüssiger Form erfolgt mit Membranfiltern Ultrafree™ der Fa. Millipore.

- Probenlösung in Membranfilter geben
- bei 2000 g und 6 °C zentrifugieren, bis sich über der Membran nur noch 100 µL Probelösung befinden (ca. 60-120 min)
- Rückstand durch Zugabe von 1 mL bidest. Wasser waschen und erneut zentrifugieren

7.10.3 AC

7.10.3.1 Kopplung von Antikörpern an NHS-aktivierte Sepharose (nach Van Sommeren et al., 1993)

7.10.3.1.1 Lösungen

a) Kopplungspuffer	1,68 g $NaHCO_3$
0,2 M $NaHCO_3$	2,92 g NaCl
0,5 M NaCl	in 50 mL bidest. Wasser lösen
pH 8,3	pH-Wert mit 1 M HCl einstellen
	mit bidest. Wasser ad 100 mL
b) Spülpuffer	
1 mM HCl	83 µL mit bidest. Wasser ad 100 mL
c) Deaktivierungspuffer I	3,05 g Ethanolamin
0,5 M Ethanolamin	2,92 g NaCl
0,5 M NaCl	in 50 mL bidest. Wasser lösen
pH 8,3	pH-Wert mit 1 M HCl einstellen
	mit bidest. Wasser ad 100 mL
d) Deaktivierungspuffer II	1,37 g Natriumacetat-Trihydrat
0,1 M Acetat	2,92 g NaCl
0,5 M NaCl	in 50 mL bidest. Wasser lösen
pH 4,0	pH-Wert mit 1 M HCl einstellen
	mit bidest. Wasser ad 100 mL

7.10.3.1.2 Chromatographiebedingungen

Pumpe:	Merck-Hitachi, L-6220
Detektor:	Merck-Hitachi, L-4250, UV-Detektor
Auswerteeinheit:	PC, Software Chrom Star
Meßwellenlänge:	280 nm
Fraktionssammler:	Merck-Hitachi, L-5200 Fraktion Controller
Probenaufgabevolumen:	500 µL (Probenschleife)
Trennsäule:	NHS-aktivierte Sepharose, Pharmacia, Füllvolumen 5 mL
Flow:	1 mL/min

7.10.3.1.3 DURCHFÜHRUNG

- 1 mL Anti-Human-IgE (zur Aufreinigung von Human-IgE) bzw. Human-IgE (Gesamtisolat, zur Aufreinigung der Allergene) in 20 mL Kopplungspuffer lösen
- 5 mL NHS-aktivierte Sepharose (suspendiert in Isopropanol) in Säule füllen, sedimentieren lassen
- Isopropanol 75 min (= 15 Säulenvolumina) mit kaltem Spülpuffer entfernen
- Kopplungspuffer über Nacht im Kreis pumpen lassen
- Deaktivierung freier Bindungsstellen:
    a) 30 min mit Deaktivierungspuffer I (= 6 Säulenvolumina) spülen
    b) 30 min mit Deaktivierungspuffer II (= 6 Säulenvolumina) spülen
    c) Zyklus sechs mal wiederholen
    d) Säule 1 h in Deaktivierungspuffer II stehen lassen
- Säule in 20 %iger ethanolischer Lösung bei 4 °C lagern

7.10.3.2 ISOLIERUNG VON HUMAN-IGE UND ALLERGENEN

(modifiziert nach VAN SOMMEREN ET AL., 1993)

7.10.3.2.1 LÖSUNGEN

e) Kopplungspuffer	1,82 g Tris-HCl
75 mM Tris-HCl	in 100 mL bidest. Wasser lösen
pH 8,0	pH-Wert mit 1 M HCl einstellen
	mit bidest. Wasser ad 200 mL
f) Desorptionspuffer	1,5 g Glycin-HCl
100 mM Glycin-HCl	3,75 g NaCl
0,5 M NaCl	in 100 mL bidest. Wasser lösen
pH 2,7	pH-Wert mit 1 M HCl einstellen
	mit bidest. Wasser ad 200 mL

7.10.3.2.2 CHROMATOGRAPHIEBEDINGUNGEN

Pumpe:	Merck-Hitachi, L-6220
Detektor:	Merck-Hitachi, L-4250, UV-Detektor
Auswerteeinheit:	PC, Software Chrom Star
Meßwellenlänge:	280 nm
Fraktionssammler:	Merck-Hitachi, L-5200 Fraktion Controller
Probenaufgabevolumen:	500 µL (Probenschleife)
Trennsäule:	NHS-aktivierte Sepharose, Pharmacia, Füllvolumen 5 mL
Flow:	1 mL/min

7.10.3.2.3 DURCHFÜHRUNG

- Säule 15 min mit Kopplungspuffer equilibrieren (= 3 Säulenvolumina)
- 500 µL Humanserum bzw. Mango-Proteinextrakt aufgeben
- nach 50 min (= 10 Säulenvolumina) auf Desorptionspuffer umstellen
- Desorbierende Fraktion sammeln
- Fraktion mittels Ultrazentrifugation einengen

7. 11 EAST-ERGEBNISSE

Tab. 7.11: EAST-Ergebnisse und klinische Symptome in den Seren der Patienten

PATIENT GESCHL. GEB.-JAHR	ALLERGEN	EAST-Kl. (spez. IgE [U/mL])	PATIENT GESCHL. GEB.-JAHR	ALLERGEN	EAST-Kl. (spez. IgE [U/mL])
Mast 103	Beifußp.:	4 (>17,5)	EA	Beifußp.:	3 (10,9)
n.b	Sellerie:	4 (>17,5)	w, 1953	Sellerie:	4 (>17,5)
	BP[1]:	4 (40,7)		BP:	2 (2,17)
	Karotte:	3 (14,9)		Karotte:	1 (0,55)
	Mango:	4 (>17,5)		Mango:	2 (2,89)
Bo 509	Beifußp.:	3 (14,2)	JPH	Beifußp.:	1 (0,54)
w, 1967	Sellerie:	2 (2,8)	m, 1950	Sellerie:	1 (0,53)
	BP:	4 (33,0)		BP:	2 (1,76)
	Karotte:	2 (2,08)		Karotte:	0 (<0,35)
	Mango:	2 (2,43)		Mango:	1 (0,57)
KDH	Beifußp.:	4 (>17,5)	IS	Beifußp.:	4 (>17,5)
m, 1944	Sellerie:	4 (>17,5)	w. 1939	Sellerie:	3 (11,7)
	BP:	4 (>17,5)		BP:	4 (>17,5)
	Karotte:	3 (11,5)		Karotte:	2 (0,73)
	Mango:	4 (>17,5)		Mango:	3 (3,87)
GS	Beifußp.:	3 (4,8)	AC	Beifußp.:	3 (8,3)
w, 1965	Sellerie:	0 (<0,35)	w, 1966	Sellerie:	3 (6,4)
	BP:	4 (55,1)		BP:	2 (2,1)
	Karotte:	3 (8,19)		Karotte:	1 (0,48)
	Mango:	2 (1,58)		Mango:	1 (0,67)

[1] BP: Birkenpollen

Patient Geschl. Geb.-Jahr	Allergen	EAST-Kl. (spez. IgE [U/mL])
TB w, 1968	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	2 (3,4) 0 (<0,35) 0 (<0,35) 0 (<0,35) 2 (0,85)
JP m, 1981	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	2 (3,4) 2 (3,4) 1 (1,63) 0 (<0,35) 2 (2,0)
BH w, 1947	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	4 (>17,5) 2 (1,4) 4 (>17,5) 0 (<0,35) 3 (4,9)
CL w, 1958	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	4 (>17,5) 4 (>17,5) 4 (>17,5) 1 (0,55) 3 (12,1)
DE m, 1933	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	4 (>17,5) 3 (7,3) 0 (<0,35) 0 (<0,35) 2 (1,21)

Patient Geschl. Geb.-Jahr	Allergen	EAST-Kl. (spez. IgE [U/mL])
BS w, 1956	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	2 (3,3) 1 (0,55) 4 (>17,5) 2 (1,8) 3 (4,8)
PV m, 1943	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	1 (0,4) 0 (<0,35) 4 (>17,5) 3 (14,5) 3 (5,8)
TD m, 1978	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	4 (>17,5) 3 (5,9) 4 (>17,5) 3 (7,2) 3 (14,8)
VW m, 1966	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	0 (<0,35) 0 (<0,35) 4 (>17,5) 2 (0,9) 3 (14,8)

Patient Geschl. Geb.-Jahr	Allergen	EAST-Kl. (spez. IgE [U/mL])
AM w, 1977	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	0 (<0,35) 0 (<0,35) 4 (>17,5) 3 (10,4) 3 (15,8)
IB w, 1966	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	4 (>17,5) 3 (12,8) 4 (>17,5) 1 (0,6) 3 (4,9)
HB w, 1972	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	3 (4,9) 2 (3,1) 3 (6,9) 2 (1,5) 2 (0,7)
UW w, 1941	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	4 (>17,5) 4 (>17,5) 4 (>17,5) 4 (>17,5) 4 (>17,5)
TS m, 1950	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	3 (10,3) n.b. 4 (>17,5) 2 (3,4) 2 (3,1)

Patient Geschl. Geb.-Jahr	Allergen	EAST-Kl. (spez. IgE [U/mL])
HS m, 1934	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	3 (7,9) n.b. 4 (>17,5) 2 (2,3) 2 (2,7)
BB w, 1969	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	4 (>17,5) 3 (14,2) 4 (>17,5) 1 (0,5) 1 (0,6)
STM m, 1942	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	n.b. n.b. 4 (>17,5)) 2 (2,6) 3 (14,3)
PW m, 1944	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	4 (>17,5) 0 (<0,35) 4 (>17,5) 3 (5,9) 3 (4,3)
HK w, 1963	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	4 (>17,5) 4 (>17,5) 4 (>17,5) 0 (<0,35) 1 (0,4)

Patient Geschl. Geb.-Jahr	Allergen	EAST-Kl. (spez. IgE [U/mL])
PL m, 1978	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	0 (<0,35) 0 (<0,35) 4 (>17,5) 1 (0,5) 2 (2,8)
NN m, 1968	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	4 (>17,5) 2 (1,1) 4 (>17,5) 0 (<0,35) 1 (0,6)
CB w, 1951	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	4 (>17,5) 1 (0,4) 4 (>17,5) 1 (0,6) 1 (0,4)
KSC w, 1955	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	n.b. n.b. 4 (>17,5) 2 (2,8) 3 (6,8)
SB m, 1968	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	2 (2,3) 1 (0,6) 4 (>17,5) 0 (<0,35) 2 (0,9)

Patient Geschl. Geb.-Jahr	Allergen	EAST-Kl. (spez. IgE [U/mL])
BP w, 1930	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	4 (>17,5) 2 (3,2) 4 (>17,5) 1 (0,6) 2 (3,2)
SJB m, 1961	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	2 (0,9) 2 (2,3) 4 (>17,5) 0 (<0,35) 2 (2,4)
CF w, 1950	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	0 (<0,35) 0 (<0,35) 4 (>17,5) 3 (10,8) 3 (9,4)
LA w, 1927	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	0 (<0,35) 0 (<0,35) 4 (>17,5) 0 (<0,35) 0 (<0,35)
GG m, 1935	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	3 (14,2) 3 (7,4) 0 (<0,35) 0 (<0,35) 2 (3,1)

Patient Geschl. Geb.-Jahr	Allergen	EAST-Kl. (spez. IgE [U/mL])
CG w, 1955	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	4 (>17,5) 3 (5,9) 3 (4,3) 0 (<0,35) 2 (3,2)
GR m, 1959	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	3 (12,7) 0 (<0,35) 4 (>17,5) 0 (<0,35) 0 (<0,35)
UN w, 1942	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	3 (5,9) 2 (3,2) 4 (>17,5) 2 (0,8) 2 (1,3)
DS w, 1937	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	4 (>17,5) 3 (12,4) 3 (7,9) 2 (1,0) 3 (6,6)
SM w, 1975	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	4 (>17,5) 0 (<0,35) 4 (>17,5) 0 (<0,35) 0 (<0,35)

Patient Geschl. Geb.-Jahr	Allergen	EAST-Kl. (spez. IgE [U/mL])
ZI m, 1995	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	2 (3,2) 1 (0,6) 4 (>17,5) 1 (0,4) 2 (3,4)
AK w, 1969	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	3 (3,8) 3 (6,4) 0 (<0,35) 0 (<0,35) 3 (6,4)
NS w, 1976	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	4 (>17,5) 4 (>17,5) 4 (>17,5)) 2 (0,9) 3 (3,6)
MV m, 1973	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	4 (>17,5) 2 (2,9) 4 (>17,5) 3 (4,5) 3 (7,1)
JS m, 1977	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	1 (0,4) 0 (<0,35) 4 (>17,5) 0 (<0,35) 2 (3,3)

Patient Geschl. Geb.-Jahr	Allergen	EAST-Kl. (spez. IgE [U/mL])
RG m, 1981	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	3 (5,9) 2 (1,8) n.b. 1 (0,7) 2 (1,1)
SUB w, 1964	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	3 (4,4) 3 (7,3) n.b. n.b. 3 (6,3)
TB w, 1968	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	2 (3,4) 0 (<0,35) 2 (2,3) 1 (0,4) 2 (0,8)
HG m, 1937	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	4 (>17,5) 0 (<0,35) 2 (2,2) 1 (0,6) 2 (0,8)
MR w, 1944	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	0 (<0,35) 2 (2,1) 4 (>17,5) 0 (<0,35) 2 (3,2)
KG m, 1929	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	3 (7,2) 0 (<0,35) 4 (>17,5) 0 (<0,35) 2 (1,3)
KD m, 1992	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	4 (>17,5) 0 (<0,35) 4 (>17,5) 0 (<0,35) 0 (<0,35)
KLR m, 1940	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	4 (>17,5) 3 (10,3) 0 (<0,35) 0 (0,35) 3 (5,9)
RP m, 1996	Beifußp.: Sellerie: BP: Karotte: Mango:	4 (>17,5) 4 (>17,5) 4 (>17,5) 0 (<0,35) 2 (0,8)

Erläuterung zu Tab. 7.11:

n.b.: nicht bestimmt

m: männlich

f: weiblich

BP: Birkenpollen

7.12 IB-ERGEBNISSE

Tab 7.12.: IB-Ergebnisse

Mango TA

Pro-band	EAST-Klasse	Banden im IB [kDa]		
		40	30	andere
GS	2	+	+	14, 16, 50, >67
Bo 509	2	+	+	43
JPH	1	+	+	14, 16
IS	3	+	+	>67
AC	1	+	+	14, 16, 18
TB	2	+	+	
JP	2	+	+	25, 43, >67
BH	3	+	+	25, 43, 67
CL	3	+	+	43
DE	2	+	+	14, 16, 18
KDH	4	+	+	14, 16, 18, 25, >67
BS	3	+	+	14, 16
PV	3	+	+	
TD	3	+	+	67, >67
VW	3	+	+	43
EA	2	+	+	
AM	3	+	+	67
IB	3	+	+	43, 50, 67, >67
HB	2			25
UW	4	+	+	20, 50, 67
TS	2	+	+	67
Mast 103	4	+	+	14, 22, 25, 43, 50, 67, >67
HS	2	+	+	43, 50, 67, >67
BB	1	+	+	
STM	3	+	+	43, 50, 67
PW	3	+	+	14, 22, 43, 50, 67
HK	1	+	+	
PL	2	+	+	43, 50, 67

Pro-band	EAST-Klasse	Banden im IB [kDa]		
		40	30	andere
NN	1	keine Banden		
CB	1	keine Banden		
KSC	3	+	+	43, 67, >67
SB	2	+	+	
BP	2	+	+	43, 67, >67
SJB	2	+	+	
CF	3	+	+	20, 67, >67
LA	0	keine Banden		
GG	2	+	+	43
CG	2	+	+	43, 67
GR	0	keine Banden		
UN	2	+	+	
DS	3	+	+	43, 50, 67
SM	0	keine Banden		
ZI	2	+	+	50, 67, >67
AK	3	+	+	32, 67
NS	3	+	+	25, 50, 67, >67
MV	3	+	+	67
JS	2	+	+	67
RG	2	+	+	
SUB	3	+	+	50, >67
TB	2	keine Banden		
HG	2	keine Banden		
MR	2	+	+	43
KG	2	+	+	
KD	0	keine Banden		
KLR	3	+	+	
RP	2	keine Banden		

7.13 UNTERSUCHUNG ZUR SORTENABHÄNGIGKEIT DER ALLERGENITÄT

Tab. 7.13: Einzelergebnisse der EAST-Inhibition, Festphasengebunden: Mango Osteen

INHIBITOR	KONZEN-TRATION [µg/mL]	EXT. 1	EXT. 2	∅ EXTINKTION	INH. 1	INH. 2	∅ INHIBITION
OSTEEN (HOMOLOG)	446,5	0,053	0,043	0,048	100	101	100
	44,7	0,100	0,087	0,094	99	99	99
	4,47	0,447	0,431	0,439	85	86	86
	2,24	0,664	0,640	0,652	77	78	78
	0,447	1,533	1,488	1,511	43	45	44
	0,0447	2,099	2,007	2,053	22	25	24
EDEN	446,5	0,046	0,042	0,044	100	100	100
	44,7	0,119	0,126	0,123	98	98	98
	4,47	0,448	0,441	0,444	85	85	85
	2,24	0,654	0,648	0,651	77	77	77
	0,447	1,550	1,531	1,540	43	43	43
	0,0447	1,967	1,653	1,810	27	39	33
TA	446,5	0,094	0,039	0,066	99	101	100
	44,7	0,107	0,138	0,123	98	97	98
	4,47	0,407	0,518	0,463	87	82	85
	2,24	0,693	0,718	0,705	76	75	75
	0,447	1,392	1,336	1,364	49	51	50
	0,0447	1,997	2,001	1,999	26	25	25
NGOWE	446,5	0,067	0,029	0,048	100	100	100
	44,7	0,103	0,106	0,105	98	98	98
	4,47	0,401	0,512	0,456	87	83	85
	2,24	0,572	0,569	0,571	80	80	80
	0,447	1,407	1,454	1,430	48	46	47
	0,0447	1,915	2,001	1,958	29	25	27
OA	1000	2,550	2,650	2,600			
B_0		2,715	2,608	2,661			
NSB				-0,042			

Tab.7.14: Ermittlung der Konzentration zur 50 %igen Inhibition, Festphasengebunden: Mango Osteen

Inhibitorlösung	Konzentration 1 [µg/mL]	Konzentration 2 [µg/mL]	θ Konzentration [µg/mL]
Osteen	0,74	0,67	0,71
Eden	0,74	0,79	0,77
TA	0,50	0,41	0,46
Ngowe	0,54	0,61	0,58

Tab 7.15: Einzelergebnisse der EAST-Inhibition, Festphasengebunden: Mango Eden

INHIBITOR	KONZEN-TRATION [µg/mL]	EXT. 1	EXT. 2	∅ EXTINKTION	INH. 1	INH. 2	∅ INHIBITION
OSTEEN	446,5	0,041	-0,004	0,019	95	97	96
	44,7	0,084	-0,011	0,037	93	97	95
	4,47	0,644	0,365	0,505	69	81	75
	2,24	0,946	0,533	0,740	55	73	64
	0,447	1,293	0,894	1,094	40	58	49
	0,0447	1,707	1,436	1,571	22	34	28
EDEN (homolog)	446,5	-0,026	0,000	-0,013	98	97	97
	44,7	0,044	-0,042	0,001	95	98	97
	4,47	0,446	0,287	0,367	77	84	81
	2,24	0,776	0,639	0,708	63	69	66
	0,447	1,137	0,898	1,018	47	57	52
	0,0447	1,666	1,413	1,539	24	35	30
TA	446,5	-,036	0,018	-0,009	98	96	97
	44,7	0,108	0,125	0,116	92	91	92
	4,47	0,340	0,518	0,429	82	74	78
	2,24	0,713	0,806	0,759	66	61	64
	0,447	1,171	1,102	1,137	46	49	47
	0,0447	1,507	1,747	1,627	31	20	26
NGOWE	446,5	0,015	0,046	0,031	96	95	95
	44,7	0,054	0,054	0,054	94	94	94
	4,47	0,545	0,633	0,589	73	69	71
	2,24	0,613	0,919	0,766	70	57	63
	0,447	0,849	1,318	1,084	60	39	49
	0,0447	1,544	1,759	1,649	29	20	25
OA	1000	2,333	2,260	2,296			
B_0		2,186	2,248	2,217			
NSB				0,079			

Tab. 7.16: Ermittlung der Konzentration zur 50 %igen Inhibition, Festphasengebunden: Mango Eden

Inhibitorlösung	Konzentration 1 [µg/mL]	Konzentration 2 [µg/mL]	∅ Konzentration [µg/mL]
Osteen	1,52	0,25	0,89
Eden	0,66	0,26	0,46
TA	0,75	0,51	0,63
Ngowe	0,23	1,40	0,82

Tab. 7.17: Einzelergebnisse der EAST-Inhibition, Festphasengebunden: Mango TA

INHIBITOR	KONZEN-TRATION [µg/mL]	EXT. 1	EXT. 2	∅ EXTINKTION	INH. 1	INH. 2	∅ INHIBITION
OSTEEN	446,5	0,204	0,113	0,159	89	93	91
	44,7	0,087	0,184	0,136	95	90	92
	4,47	0,498	0,533	0,515	76	75	75
	2,24	0,718	0,762	0,740	66	64	65
	0,447	1,148	1,003	1,076	47	54	50
	0,0447	1,799	1,568	1,684	18	28	23
EDEN	446,5	0,180	0,125	0,153	90	93	92
	44,7	0,156	0,148	0,152	92	92	92
	4,47	0,555	0,387	0,471	74	81	77
	2,24	0,802	0,633	0,717	63	70	66
	0,447	1,166	0,856	1,011	46	60	53
	0,0447	1,707	1,341	1,524	22	38	30
TA (HOMOLOG)	446,5	0,010	0,124	0,067	98	93	96
	44,7	0,263	0,363	0,313	87	82	84
	4,47	0,685	0,685	0,685	68	68	68
	2,24	0,817	0,860	0,838	62	60	61
	0,447	1,237	1,232	1,234	43	43	43
	0,0447	1,538	1,626	1,582	30	26	28
NGOWE	446,5	0,097	0,067	0,082	94	96	95
	44,7	0,112	0,155	0,133	93	92	93
	4,47	0,714	0,627	0,670	67	70	68
	2,24	0,717	1,125	0,921	66	48	57
	0,447	1,024	1,262	1,143	53	42	47
	0,0447	1,486	1,752	1,619	32	20	26
OA	1000	2,200	2,261	2,230			
B_0		2,167	2,227	2,197			
NSB				-0,033			

Tab. 7.18: Ermittlung der Konzentration zur 50 %igen Inhibition, Festphasengebunden: Mango TA

Inhibitorlösung	Konzentration 1 [µg/mL]	Konzentration 2 [µg/mL]	∅ Konzentration [µg/mL]
Osteen	0,61	0,30	0,46
Eden	0,72	0,19	0,46
TA	0,98	1,02	1,00
Ngowe	0,32	2,40	1,36

Tab. 7.19: Einzelergebnisse der EAST-Inhibition, Festphasengebunden: Mango Ngowe

INHIBITOR	KONZEN-TRATION [µg/mL]	EXT. 1	EXT. 2	∅ EXTINKTION	INH. 1	INH. 2	∅ INHIBITION
OSTEEN	446,5	0,081	0,162	0,121	94	91	93
	44,7	0,272	0,150	0,211	86	91	89
	4,47	0,815	0,497	0,656	63	77	70
	2,24	1,117	0,702	0,910	50	68	59
	0,447	1,513	1,065	1,289	34	53	43
	0,0447	2,035	1,619	1,827	12	29	20
EDEN	446,5	0,148	0,074	0,111	91	95	93
	44,7	0,287	0,113	0,200	86	93	89
	4,47	0,628	0,425	0,527	71	80	75
	2,24	0,912	0,659	0,785	59	70	64
	0,447	1,311	0,933	1,122	42	58	50
	0,0447	1,742	1,561	1,651	24	32	28
TA	446,5	0,057	0,091	0,074	95	94	95
	44,7	0,253	0,230	0,241	87	88	87
	4,47	0,741	0,808	0,774	66	64	65
	2,24	0,958	0,922	0,940	57	59	58
	0,447	1,210	1,236	1,223	47	45	46
	0,0447	1,650	1,722	1,686	28	25	26
NGOWE (HOMOLOG)	446,5	0,057	0,091	0,074	95	94	95
	44,7	0,253	0,230	0,241	87	88	87
	4,47	0,741	0,808	0,774	66	64	65
	2,24	0,958	0,922	0,940	57	59	58
	0,447	1,210	1,236	1,223	47	45	46
	0,0447	1,650	1,722	1,686	28	25	26
OA	1000	2,304	2,427	2,366			
B_0		2,192	2,431	2,311			
NSB		0,000	-0,110	-0,055			

Tab. 7.20: Ermittlung der Konzentration zur 50 %igen Inhibition, Festphasengebunden: Mango Ngowe

Inhibitorlösung	Konzentration 1 [µg/mL]	Konzentration 2 [µg/mL]	∅ Konzentration [µg/mL]
Osteen	2,20	0,31	1,23
Eden	1,14	0,19	0,67
TA	0,77	0,88	0,83
Ngowe	0,77	0,88	0,83

7.14 UNTERSUCHUNG DER REIFEABHÄNGIGKEIT DER ALLERGENITÄT

Tab. 7.21: Meßwerte der EAST-Inhibition, Festphase: Aufarbeitung des 5. Tages nach der Ernte.

INHIBITOR	KONZENTRATION [µg/mL]	EXT. 1	EXT. 2	∅ EXTINKTION	INH. 1	INH. 2	∅ INHIBITION
5. TAG (HOMOLOG)	230,00	0,022	0,004	0,013	98	99	99
	23,00	0,169	0,147	0,158	93	94	94
	2,30	1,024	0,953	0,989	63	66	65
	1,15	1,580	1,458	1,519	44	48	46
	0,58	2,384	2,238	2,311	17	22	20
	0,23	2,736	2,664	2,700	4	7	6
	0,02	2,726	2,708	2,717	5	5	5
12. TAG	230,00	-0,022	-0,004	-0,013	99	99	99
	23,00	0,065	0,087	0,076	96	96	96
	2,30	0,55	0,519	0,535	80	81	81
	1,15	0,909	0,868	0,889	67	69	68
	0,58	1,475	1,535	1,505	48	46	47
	0,23	2,284	2,235	2,260	20	22	21
	0,02	2,925	2,997	2,961	-2	-5	-4
21. TAG	230,00	-0,018	-0,003	-0,011	99	99	99
	23,00	0,115	0,122	0,119	95	95	95
	2,30	0,673	0,697	0,685	76	75	76
	1,15	1,088	1,079	1,084	61	62	62
	0,58	1,61	1,725	1,668	43	39	41
	0,23	2,181	2,191	2,186	24	23	24
	0,02	2,878	2,915	2,897	-1	-2	-2
OA	1000	2,936	2,796	2,836			
B_0		2,887	2,839	2,863			
NSB		-0,038	-0,036	-0,037			
35.TAG	230,00	0,003	-0,006	-0,002	99	99	99
	23,00	0,142	0,139	0,141	94	94	94
	2,30	0,897	0,916	0,907	68	67	68
	1,15	1,277	1,384	1,331	55	51	53
	0,58	1,98	2,154	2,067	30	24	27
	0,23	2,313	2,407	2,360	19	16	18
	0,02	2,526	2,851	2,689	12	0	6

INHIBITOR	KON-ZENTRATION [µg/mL]	EXT. 1	EXT. 2	∅EXTINKTION	INH. 1	INH. 2	∅ INHIBITION
40. TAG	230,00	0,074	0,059	0,067	97	98	98
	23,00	0,197	0,22	0,209	93	92	93
	2,30	0,745	0,801	0,773	74	72	73
	1,15	1,376	1,377	1,377	52	52	52
	0,58	1,827	1,885	1,856	36	34	35
	0,23	2,421	2,362	2,392	16	18	17
	0,02	2,600	2,760	2,680	9	4	7
OA	1000	2,956	2,723	2,840	-	-	-
B_0		2,868	2,868	2,868			
NSB		-0,008	-0,006	-0,007			

Aus diesen Meßwerten ergeben sich die in Tab. 7.22 dargestellten Werte für eine 50 %ige Inhibition:

Tab. 7.22: Ermittlung der Konzentration zur 50 %igen Inhibition, Festphasengebunden: Aufarbeitung des 5. Tages nach der Ernte

INHIBITORLÖSUNG	KONZENTRATION [µg/mL]	KONZENTRATION [µg/mL]	∅ KONZENTRATION [µg/mL]
5. TAG (HOMOLOG)	1,2	1,3	1,3
12. TAG	0,6	0,6	0,6
21. TAG	0,7	0,8	0,8
35. TAG	1,0	1,1	1,1
40. TAG	1,1	1,1	1,1

Tab. 7.23: Festphasengebunden Aufarbeitung 40. Tag nach Ernte

INHIBITOR	KONZENTRATION [µg/mL]	EXT. 1	EXT. 2	∅ EXTINKTION	INH. 1	INH. 2	∅ INHIBITION
	230,00	-0,102	-0,112	-0,107	95	96	96
	23,00	0,242	0,086	0,164	85	90	88
5. TAG	2,30	1,106	1,102	1,104	59	59	59
	1,15	1,724	1,558	1,641	40	45	43
	0,58	2,332	2,235	2,284	21	24	23
	0,23	2,978	2,91	2,944	1	4	3
	0,02	2,865	2,865	2,865	5	5	5
	230,00	-0,114	-0,128	-0,121	96	96	96
	23,00	0,153	-0,011	0,071	88	93	91
	2,30	0,578	0,536	0,557	75	76	76
12. TAG	1,15	1,001	0,808	0,905	62	68	65
	0,58	1,511	1,493	1,502	46	47	47
	0,23	2,237	2,296	2,267	24	22	23
	0,02	3,132	2,96	3,046	-3	2	-1
	230,00	-0,120	-0,111	-0,116	96	96	96
	23,00	0,277	0,177	0,227	84	87	86
	2,30	0,821	0,69	0,756	67	71	69
21. TAG	1,15	1,149	1,056	1,103	57	60	59
	0,58	1,783	1,743	1,763	38	39	39
	0,23	2,489	2,412	2,451	16	19	18
	0,02	2,951	3,007	2,979	2	1	2
OA	1000	2,987	2,987	2,987			
B_0		3,048	3,007	3,027			
NSB		-0,254	-0,255	-0,255			
	230,00	-0,072	-0,008	-0,040	94	95	95
	23,00	0,140	0,139	0,140	88	92	90
	2,30	0,916	0,916	0,916	67	67	67
35.TAG	1,15	1,450	1,384	1,417	47	52	50
	0,58	2,000	2,154	2,077	27	32	30
	0,23	2,571	2,407	2,489	6	13	10
	0,02	2,898	2,851	2,875	-5	-3	-4

INHIBITOR	KON-ZENTRATION [µg/mL]	EXT. 1	EXT. 2	∅ EXTINKTION	INH. 1	INH. 2	∅ INHIBITION
40. TAG (HOMOLOG)	230,00	0,051	0,049	0,050	98	98	98
	23,00	0,223	0,239	0,231	92	91	92
	2,30	0,774	0,721	0,748	72	74	73
	1,15	1,344	1,335	1,340	51	51	51
	0,58	1,773	1,657	1,715	36	40	38
	0,23	2,333	2,298	2,316	15	16	16
	0,02	2,653	2,567	2,610	3	7	5
OA	1000	2,862	2,683	2,772	-	-	-
B_0		2,794	2,704	2,749			
NSB		-0,002	0,002	0,000			

Aus diesen Meßwerten ergeben sich die in Tab. 7.24 dargestellten Werte für eine 50 %ige Inhibition:

Tab. 7.24: Ermittlung der Konzentration zur 50 %igen Inhibition, Festphasengebunden: Aufarbeitung des 40. Tages nach der Ernte

INHIBITORLÖSUNG	KONZENTRATION [µg/mL]	KONZENTRATION [µg/mL]	∅ KONZENTRATION [µg/mL]
5. TAG	1,6	1,4	1,5
12. TAG	0,7	0,6	0,7
21. TAG	0,9	0,8	0,9
35. TAG	1,2	1,0	1,1
40. TAG (HOMOLOG)	1,1	1,1	1,1

7.15 ERGEBNISSE DER EAST-INHIBITION ZUR UNTERSUCHUNG VON KREUZREAKTIVITÄTEN

7.15.1 EAST-Inhibition des festphasengebundenen Mango-Extraktes

Detektion mit Poolserum AC, NS, RG, KLR, DE, BS, GG, BH, KDH

Tab. 7.25: Einzelergebnisse der EAST-Inhibition mit festphasengebundenem Proteinextrakt der Mangosorte TA

INHIBITOR	KONZEN-TRATION [µg/mL]	EXTINK-TION	INHBITION [%]
MANGO	1169,2	0,109	93
	584,6	0,121	91
	58,5	0,143	82
	5,8	0,216	70
	0,58	0,319	47
OA	1000	0,540	-
B_0	-	0,531	-
NSB	-	0,079	-
SELLERIE	707,6	0,251	59
	353,8	0,227	58
	35,4	0,254	53
	3,5	0,334	40
	0,35	0,404	25
	0,04	0,437	18
OA	1000	0,516	0
B_0	-	0,530	-
NSB	-	0,066	-
BET V 1	200	0,699	28
	40	0,706	28
	4	0,793	18
	0,4	0,869	9
OA	1000	0,966	0
B_0	-	0,947	-
NSB	-	0,075	-

INHIBITOR	KONZEN-TRATION [µg/mL]	EXTINK-TION	INHIBITION [%]
KAROTTE	489,8	0,206	72
	49,8	0,227	67
	4,9	0,259	60
	0,49	0,305	50
	0,05	0,345	41
OA	1000	0,540	-
B_0	-	0,531	-
NSB	-	0,079	-
BP	302,4	0,466	58
	151,0	0,456	56
	15,1	0,553	45
	1,5	0,771	20
	0,15	0,896	5
OA	1000	0,966	0
B_0	-	0,947	-
NSB	-	0,075	-
BEIFUßP.	16,0	0,300	48
	1,6	0,370	32
	0,16	0,429	19
	0,02	0,502	3
OA	1000	0,530	0
B_0	-	0,516	-
NSB	-	0,066	-

7.15.2 EAST-Inhibition des festphasengebundenen Beifußpollen-Extraktes

Detektion mit Poolserum AC, NS, RG, KLR, DE, BS, GG, BH, KDH (1:2 verdünnt)

Tab. 7.26: Einzelergebnisse der EAST-Inhibition mit festphasengebundenem Proteinextrakt von Beifußpollen

INHIBITOR	KONZENTRATION [µg/mL]	EXTINKTION	INHIBITION [%]	INHIBITOR	KONZENTRATION [µg/mL]	EXTINKTION	INHIBITION [%]
BEIFUßP.	16	0,195	82	**KAROTTE**	489,8	0,274	57
	1,6	0,318	50		49,0	0,315	48
	0,16	0,426	22		4,9	0,337	44
	0,02	0,503	1		0,49	0,361	38
OA	1000	0,513	0	OA	1000	0,545	0
B_0	-	0,509	-	B_0	-	0,536	-
NSB	-	0,128	-	NSB	-	0,079	-
MANGO	58,5	0,270	58	**SELLERIE**	3,6	0,287	55
	5,85	0,307	50		0,36	0,302	51
	2,30	0,339	43		0,14	0,327	46
	0,76	0,389	32		0,05	0,390	32
	0,59	0,490	10		0,04	0,407	28
OA	1000	0,545	0	OA	1000	0,545	0
B_0	-	0,536	-	B_0	-	0,536	-
NSB	-	0,079	-	NSB	-	0,079	-

7.15.3 EAST-Inhibition des festphasengebundenen Sellerie-Extraktes

Detektion mit Poolserum AC, NS, RG, KLR, DE, BS, GG, BH, KDH (1:2 verdünnt)

Tab. 7.27: Einzelergebnisse der EAST-Inhibition mit festphasengebundenem Proteinextrakt von Sellerie

INHIBITOR	KONZEN-TRATION [µg/mL]	EXTINK-TION	INHIBITION [%]	INHIBITOR	KONZEN-TRATION [µg/mL]	EXTINK-TION	INHIBITION [%]
SELLERIE	707,6	0,149	89	KAROTTE	489,8	0,333	54
	353,8	0,167	86		48,98	0,430	36
	35,38	0,209	78		4,98	0,493	23,6
	3,54	0,257	69		0,49	0,510	20,4
	0,35	0,328	56		0,05	0,535	16
	0,04	0,394	44				
OA	1000	0,631	0	OA	1000	0,631	0
B_0	-	0,629	-	B_0	-	0,629	-
NSB	-	0,089	-	NSB	-	0,089	-
MANGO	1169,2	0,179	83	BEIFUßP.	16	0,244	71
	584,6	0,188	82		1,6	0,304	60
	5,85	0,256	69		0,16	0,325	56
	0,58	0,357	50		0,02	0,354	50
	0,06	0,423	38	OA	1000	0,617	0
OA	1000	0,631	0	B_0	-	0,617	-
B_0	-	0,629	-	NSB	-	0,091	-
NSB	-	0,089	-				

7.15.4 EAST-Inhibition des festphasengebundenen Karotten-Extraktes

Detektion mit Poolserum AC, NS, RG, KLR, DE, BS, GG, BH, KDH (1:2 verdünnt)

Tab. 7.28: Einzelergebnisse der EAST-Inhibition mit festphasengebundenem Proteinextrakt von Karotte

INHIBITOR	KONZEN-TRATION [µg/mL]	EXTINK-TION	INHIBITION [%]	INHIBITOR	KONZEN-TRATION [µg/mL]	EXTINK-TION	INHIBITION [%]
KAROTTE	489,8	0,129	83	MANGO	584,6	0,163	73
	48,98	0,180	68		58,46	0,248	49
	4,90	0,278	40		5,85	0,295	37
	0,49	0,359	17		0,59	0,328	26
					0,06	0,363	16
OA	1000	0,418	0	OA	1000	0,418	0
B_0	-	0,418	-	B_0	-	0,418	-
NSB	-	0,068	-	NSB	-	0,068	-
BEIFUßP.	16,0	0,234	48	SELLERIE	353,8	0,175	69
	1,60	0,273	32		35,38	0,177	69
	0,16	0,286	19		3,54	0,232	53
	0,02	0,407	3		0,35	0,290	37
					0,04	0,329	25
OA	1000	0,418	0	OA	1000	0,418	0
B_0	-	0,418	-	B_0	-	0,418	-
NSB	-	0,068	-	NSB	-	0,418	-

7.16 CHEMIKALIENLISTE, GERÄTE, VERBRAUCHSMITTEL, ZUBEHÖR

7.16.1 Chemikalienliste

Chemikalie	Hersteller	Toxizität, R- und S-Sätze
Aceton	Merck	F, R11, S9-16-23.2-33
Acrylamid, 2X	Serva	T, R23/24/25-45-46-4, S45-53
6-Aminohexansäure	Merck	
Ammoniumperoxofdisulfat, p.A.	Merck	Xn, R8-22-42/43, S17-26-43.1
Ammoniumhydrogencarbonat	Merck	
Ampholine pH 4-6,5	Pharmacia	
Anti-Human-IgE (Kaninchen)	Dako	
Anti-Kaninchen-IgG, biotinyliert (Ziege)	Dako	
Blue Dextran	Pharmacia	
Bovine Serum Albumin, pH 7, reinst	Serva	
Bromcyan	Merck	T^+, C, R26/27/28-34, S9-26-45
Bromphenolblau	Merck	
1-Butanol	Merck	Xn, R10-20, S16
Chymotrypsinogen	Pharmacia	
Citronensäure	Merck	
Conalbumin	Fluka	
Coomassie Brillant Blue R 250	Serva	
(3-Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure (CAPS)	Serva	
Diethylether	Merck	F^+, R12-19, S9-16-29-33
Dioctylnatriumsulfosuccinat (DONS)	Fluka	Xn, R22, S22-24/25
EAST-Testkit	Allergopharma	
Essigsäure, purum, > 99 %	Fluka	C, R10-35, S2-23.2-26
Ethanol, 96 %	Merck	F, R11, S7-16
Ethanolamin	Merck	Xi, R20-36/37/38
Formaldehyd, 37 %	Merck	T, R23/24/25-40-43, S26-36/37-44-51
Fount-India, Füllfederhaltertinte	Pelikan	
Glutardialdehyd. 25 %	Merck	T, R25-36/37/38-42/43, S36-44
Glycerin, 87 %	Fluka	
Glycin	Fluka	
Harnstoff	Merck	
di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck	

Kerosene	Fluka	
Kupfer-II-sulfat	Merck	Xn, R22-36/38, S22
α-Lactalbumin	Serva	
Lectin CAA	EY-Lab.	
Lectin Con A	EY-Lab.	
Lectin GS II	EY-Lab.	
Lectin Lotus tetragonolobus	EY-Lab.	
Magermilchpulver	Glücksklee	
2-Mercaptoethanol	Serva	T, R22-24-36/37/38, S26-36/37-45
Methanol	Merck	T, F, R11-23/25, S2-7-16-24
MG-Marker (14-94 kDa)	Pharmacia	
Myoglobin (Pferdeherz)	Sigma	
N,N´-Methylenbisacrylamid, 2X	Serva	Xn, R20/21/22-40, S28.1-36
N,N,N´,N´-Tetramethylendiamin (TEMED)	Serva	Xn, F, R11-22-36/37/38
Natriumacetat-Trihydrat	Merck	
Natriumazid	Merck	T^+, R28-32, S28.1
Natriumcarbonat, wasserfrei	Merck	Xi, R36, S22-26
Natriumchlorid	Merck	
Natriumdesoxycholat	Merck	Xn, R22
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck	
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva	Xn, R20/22-36/38, S26-28
Natriumhydrogencarbonat	Merck	
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck	
Natriumhydroxid	Merck	C, R35, S226-37/39
Natriummetaperiodat	Merck	O, R8
di-Natriumtartrat-Dihydrat	Merck	
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Merck	
o-Phosphorsäure, 85 %	Merck	C, R34, S26-36/37/39-45
Ovalbumin	Fluka	
Ovomucoid	Fluka	
Ovotransferrin	Fluka	
PBS-Tabletten	Serva	
pI-Marker (2,5-6,5)	Pharmacia	
pI-Marker (3-10)	Pharmacia	
Polyvinylpyrrolidon (PVP)	Merck	
Pufferlösung (pH 4,00)	Merck	
Pufferlösung (pH 7,00)	Merck	

Pyronin Y	Fluka	
Repel Silane	Merck	Xi, R20, S24/25
Resolyte pH 2,5-5,0	Merck	
Ribonuclease	Pharmacia	
Salzsäure, 37 %	Merck	C, R34-37, S26-36/37/39-45
Servalyte (pH 2-11)	Serva	
Silbernitrat	Merck	C, R34, S26-45
D-Sorbit f. biochem. Zwecke	Merck	
Streptavidin-HRP-Konjugat	Medac	
3,3´,5,5´-Tetramethylbenzidin (TMB)	Fluka	
Titriplex III (EDTA)	Serva	Xn, R22
Trichloressigsäure, reinst	Merck	C, R35, S24/25-26-45
Tris-hydroxymethylaminomethan (Tris)	Merck	Xi, R36/38
Tween 20	Serva	
Wasserstoffperoxid, 30 %	Merck	C, R34, S28-36/39

7.16.2 Geräte

Blotting-Elektroden	Nova Blot 2117-250	LKB
Elektrophorese-Kammer I	2117 Multiphor II Electrophoresis Unit	LKB
Elektrophorese-Kammer II	Desaphor HF	Desaga
Elektrophorese-Kammer III	XCell II	Novex
ELISA-Reader		
Fraktionssammler	L-5200	Merck-Hitachi
HPLC-Controller	L-5000	Merck-Hitachi
HPLC-Pumpe I	655A-12	Merck-Hitachi
HPLC-Pumpe II	L-6220 intelligent pump	Merck-Hitachi
Ionenaustauschersäule	Resource Q, 6 mL	Pharmacia
Lyophilisator	Loc-2, Beta 1-16	Christ
pH-Elektrode	H 6160	Schott
pH-Meter	CG 801	Schott
Schüttler	Typ 3016	GFL
Stromversorger I	2297 Macrodrive 5	LKB
Stromversorger II	Main Power Supply Unit 1200/200	Desaga
Stromversorger III	Power Ease 500	Novex
Thermostat	MGW Lauda RMT 6	Lauda

Ultra-Turrax	T 25	Jahnke und Kunkel
UV-Detektor	L-4250	Meck-Hitachi
Zentrifuge	Labofuge II	Heraeus Christ
Zentrifuge	3 K 12	Sigma

7.16.3 Verbrauchsmittel, Zubehör

Abstandhalter	Glaskets, 0,5 und 1,0 mm	Serva
Applikationsplättchen für IEF	Cellulose, 5 * 10 mm	Pharmacia
Blotmembran	Nitrocellulose, 0,2 µm	Schleicher & Schüll
Dauer-Elektrodenbrücken	Haushaltstücher	Vileda
Elektrodenstreifen für IEF	240 * 6 * 1 mm	Serva (42987)
Filterpapierscheiben	Rundfilter 6 mm	Schleicher & Schüll (401396)
Gelträgerfolien	GelBond-PAGfilm, 124 * 258 mm	Pharmacia
Kunststoffröhrchen (für EAST)	Minisorb 75 * 12 mm	Nunc
Mikrotiterplatten	96 Löcher	Nunc

8. LITERATURVERZEICHNIS

AMLOT PL (1987) The oral allergy syndrom: symptoms of IgE-mediated hypersensitivity to foods, *Clin Allergy*, **17**, 33-42

ANDRE F, ANDRE C, COLIN L, CACARACI F, CAVAGNA S (1994) Role of new allergens and of allergen consumption in the increased incidence of food sensitizations in France, *Toxicology*, **93**, 77-83

AULEPP H, VIETHS S (1992) Probleme der Nahrungsmittelallergie, *Dtsch Lebensm Rundsch*, **5**, 171-179

AXCRONA K, BJORCK L, LEANDERSON T (1995) Multiple ligand interactions for bacterial immunoglobulin-binding proteins on human and murine cells of the hematopoetic lineage, *Scand J Immunol*, **42**, 359-367

AYUSO R, CARREIRA J, LOMBARDERO M, DUFFORT O, PERIS A, BASOMBA A, POLO F (1993) Isolation by mAB based affinity chromatography of two Par j I isoallergens. Comparison of their physicochemical, immunochemical and allergenic properties, *Mol Immunol*, **30**,1347-1354

BALDO BA, TOVEY ER (1989) Protein blotting for the detection and standardization of allergens, in: Baldo BA, Tovey ER (Hrsg.): Protein blotting, Karger Verlag, Basel

BALESTRIERI C, CASTALDO D, GIOVANE A, QUAGLIUOLO L, SERVILLO L (1990) A glycoprotein inhibitor of pectin methylesterase in kiwi fruit (Actinidia chinensis), *Eur J Biochem*, **193**, 183-187

BATANERO E, CRESPO JF, MONSALVE RI, MARTIN-ESTEBAN M, VILLALBA M, RODRIGUEZ RJ (1999) IgE-binding and histamine-release capabilities of the main carbohydrate component isolated from the major allergen of olive tree pollen, ole e 1, *Allergy Clin Immunol*, **103**, 147-153

BAUER L, EBNER C, HIRSCHWEHR R, WÜTHRICH B, PICHLER C, FRITSCH R, SCHREINER O, KRAFT D (1996) IgE cross-reactivity between birch pollen, mugwort pollen and celery is due to at least three distinct cross-reacting allergens: immunoblot investigation of birch-mugwort-celery-syndrome, *Clin Exp Allergy*, **26**, 1161-1170

BERNHISEL-BROADBENT J (1995) Allergenic cross-reactivity of foods and characterization of food allergens and extracts, *Ann Allergy Asthma Immunol*, **75**, 295-303

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

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

BOCCAFOGLI A, VICENTINI L, CAMERANI A, COGLIATI P, D'AMBROSI A, SCOLOZZI (1994) Adverse food reactions in patients with grass pollen allergic respiratory disease, *Allergy*, **73**, 301-308

BOJORQUEZ G, GOMEZ-LIM MA (1995) Peroxisomal thiolase mRNA is induced during mango fruit ripening, *Plant Mol Biol*, **28**, 811-820

BRADFORD MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem*, **72**, 248-254

BREITENEDER H, PETTENBURGER K, BITO A, VALENTA R, KRAFT D, RUMPOLD H, SCHEINER O, BREITENBACH M (1989) Swiss-Prot: P15494, http://expasy.hcuge.ch/

BREITENEDER H, HOFFMANN-SOMMERGRUBER K, O'RIORDAIN G, SUSANI M, AHORN H, EBNER C, KRAFT D, SCHREINER O (1995) Molecular characterization of Api g 1, the major allergen of celery (apium graveolens), and its immunological and structural relationships to a group of 17-kDa tree pollen allergens, *Eur J Biochem*, **233**, 484-489

BRUIJNZEEL-KOOMEN C, ORTOLANI C, AAS K, BINDSLEV-JENSEN C, BJÖRKSTEN B, MONERET-VAUTRIN D, WÜTHRICH B (1995) Adverse reactions to food, *Allergy*, **50**, 623-635

CALVERT ML, ROBERTSON I, SAMARRATUNGA H (1996) Mango dermatitis: allergic contact dermatitis to Mangifera indica, *Australas J Dermatol*, **37**, 59-60

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

CHARKRAVARTY N (1990) Mechanism of histamine secretion, *Agents Actions*, **30**, 5-12

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

COOMBS RRA, GELL PGH (1963) The classification of allergic reactions underlying disease, in: Coombs RRA (Ed.): Clinical aspects of immunology, Davis, Philadelphia

DANG RW, BELL DB (1967) Anaphylactic reaction to the ingestion of a mango, *Hawaii Med J*, **27**, 149-150

DANNAEUS A, JOHANSSON SGO (1979) A follow-up study of infants with adverse reactions to cow´s milk, *Acta Paediatr Scand*, **68**, 377-382

DANSCHER G, NOORGARD JOR (1983) Light microscopic visualization of colloidal gold on resin-embedded tissue, *J Histochem Cytochem*, **31**, 1394-1399

DEICHER H (1990) Das Immunsystem, in: Fuchs E, Schulz KH (Hrsg.) Manuale Allergologicum III.1, Düstri-Verlag München, 1-29

DE LA HOZ F, POLO F, MOSCOSO DEL PRADO J, SELLES JG, LOMBARDERO M, CARREIRA J (1990) Purification of Art v I, a relevant allergen of Artemisia vulgaris pollen, *Mol Immunol*, **7**, 651-657

DE MARTINO M, NOVEMBRE E, COZZA G, DE MARCO A, BONAZZA P, VIERUCCI A (1988) Sensitivity to tomato and peanut allergens in children monosensitized to grass pollen, *Allergy*, **43**, 206-213

EBNER C, BIRKNER T, VALENTA R, RUMPOLD H, BREITENBACH M, SCHEINER O, KRAFT D (1991) Common epitopes of birch pollen and apples – studies by western and northern blot, *J Allergy Clin Immunol*, **88**, 588-594

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

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

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

ERIKSSON NE, FORMGREN H, SVENONIUS E (1982) Food hypersensitivity in patients with pollen allergy, **37**, 437-43

ESSER C (1990) Immunglobulin class switching: molecular and cellular analysis, *Ann Rev*, **8**, 717-53

FÄH J, WÜTHRICH B, VIETHS S (1995) Anaphylactic reaction to lychee fruit – evidence for sensitization to profilin, *Clin exp allergy*, **25**, 1018-1023

FERNANDEZ C, FIANDOR A, MARTINEZ-GARATE A, MARTINEZ-QUESADA J (1995) Allergy to pistachio: crossreactivity between pistachio nut and other Anacardiaceae, *Clin Exp Allergy*, **25**, 1254-1259

FLING SP, GREGERSON DS (1986) Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea, *Anal Biochem*, **155**, 83-88

FRANKE W (1997) Nutzpflanzenkunde, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

FRITSCH R, BOHLE B, VOLLMANN U, WIEDERMANN U, JAHN-SCHMID B, KREBITZ M, BREITENEDER H, KRAFT D, EBNER C (1998) Bet v 1, the major birch pollen allergen, and Mal d 1, the major apple allergen, cross-react at the level of allergen-specific T helper cells, *J Allergy Clin Immunol*, **102**, 679-686

GEROSO AM, ELPERN DJ (1992) Some observation on mango and mokihana dermatitis from Hawaii, *Contact Dermatitis*, **26**, 346-347

GÖRG A, POSTEL W, GÜNTHER S (1988) The current status of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients, *Electrophoresis*, **9**, 531-546

GROTE M, FISCHER S, MULLER WD, VALENTA R (1998) In situ localization of a high plant weigh cross-reactive allergen in pollen and plant-derived food by immunogold electron microscopy, *J Allergy Clin Immunol*, **101**, 250-257

GUTTMAN, A (1996) Capillary sodium dodecyl-sulfate gel electrophoresis of proteins, *Electrophoresis*, **17**, 1333-1341

HAAVIK S, SMESTAD-PAULSEN B, WOLD JK (1985) Glycoprotein allergens in pollen of timothy: Investigation of carbohydrates extracted from pollen of timothy (Phleum pratense) and purification of a carbohydrate-containing allergen by affinity chromatography on concanavalin A-Sepharose, *Int Arch Allergy Appl Immunol*, **78**, 197-205

HALMEPURO L, VUONTELA K, KALIMO K, BJÖRKSTEN F (1984) Cross-reactivity of IgE antibodies with allergens in birch pollen, fruits and vegetables, *Int Arch Appl Immun*, **74**, 235-240

HAMBURGER RN, HELLER S, MELLON M (1983) Current status of the clinical an immunologic consequences of a prototype allergic desease prevention program, *Ann Allergy*, **51**, 281-290

HANCOCK K, TSANG VCW (1983) Indian ink staining of proteins on nitrocellulose paper, *Anal Biochem*, **133**, 157-162

HEFLE SL, TAYLOR SL (1999) Allergenicity of edible oils, *Foodtech*, **53**, 62-70

HEISS S, FISCHER S, MULLER WD, WEBER B, HIRSCHWEHR R, SPITZAUER S, KRAFT D, VALENTA R (1996) Identification of a 60 kd cross-reactive allergen in pollen and plant-derived food, *J Allergy Clin Immunol*, **98**, 938-947

HELBING A, LOPEZ M, SCHWARTZ HJ, LEHRER SB (1993) Reactivity of carrot-specific IgE antibodies with celery, apiaceous spices, and birch pollen, *Ann Allergy*, **70**, 495-499

HERRMANN K (1993) Exotische Lebensmittelinhaltsstoffe und Verwendung, Springer-Verlag, Berlin

HIRSCHWEHR R, VALENTA R, EBNER C, FERREIRA F, SPERR WR, VALENT P, ROHAC M, RUMPOLD H, SCHEINER O, KRAFT D (1992) Identification of comman allergenic structures in hazel pollen and hazelnuts: a possible explanation for sensitivity to hazelnuts in patients allergic to tree pollen, *J Allergy Clin Immunol*, **90**, 927-936

HIRSCHWEHR R, HEPPNER C, SPITZAUER S, SPERR WR, VALENT P, BERGER U, HORAK F, JÄGER S, KRAFT D, VALENTA R (1998) Identification of common allergic structures in mugwort and ragweed pollen, *J Allergy Clin Immunol*, **101**, 197-206

HOFFMANN-SOMMERGRUBER K, FERRIS R, PEC M, O'RIORDAIM G, KRAFT D, SCHEINER O, BREITENEDER H (1996) TrEMBL: P92918, http://expasy.hcuge.ch

HOFFMANN-SOMMERGRUBER K, VANEK-KREBITZ M, RADAUER C, WEN J, FERREIRA F, SCHREINER O, BREITENEDER H (1997) Genomic characterization of members of the Bet v 1 family: genes coding for allergens and pathogenesis-related proteins share intron positions, *Gene*, **197,** 91-100

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

IPPEN H (1983) Kontaktallergien gegen Anacardiacee, *Derm Beruf Umwelt*, **31**, 140-148

JÄGER L, DIENER C, MÜLLER WD, SCHLENVOIGT G (1991) Epitopes on allergens, in: Ring J, Przybilla B (Hrsg.): New trends in allergy III, Springer, Berlin

JANEWAY CA, TRAVERS P (1995) Immunologie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

JANKIEWICZ A, AULEPP H, BALTES W, BOGL KW, DEHNE LI, ZUBERBIER T, VIETHS S (1996) Allergic sensitization to native and heated celery root in pollen-sensitive patients investigated by skin test and IgE binding, *Int Arch Allergy Immunol*, **111**, 268-278

JANKIEWICZ A, BALTES W, BÖGEL KW, DEHNE LI, JAMIN A, HOFFMANN A, HAUSTEIN D, VIETHS S (1997) Influence of food processing of the immunochemical stability of celery allergens, *J Sci Food Agric*, **75**, 359-370

JANKIEWICZ A, AULEPP H, ALTMANN F, FÖTISCH K, VIETHS S (1998) Serological investigation of 30 celery-allergic patients with particular consideration of the thermal stability of IgE-binding celery allergens, *Allergo J*, **7**, 87-95

JANSEN A, DE LIJSTER DE RAADT J, VAN TOORENBERGEN AW, VAN WIJK RG (1992) Allergy to pistachio nuts, *Allergy Proc*, **5**, 255-258

JAROLIM E, TEJKL M, ROHAC M, SCHLERKA G, SCHEINER O, KRAFT D, BREITENBACH M, RUMPOLD H (1989) Monoclonal antibodies against birch pollen allergens: Characterization by immunoblotting and use for single-step affinity purification of the major allergen Bet v 1, *Int Arch Allergy Appl Immunol*, **90**, 54-60

JENSEN-JAROLIM E, LEITNER A, HIRSCHWEHR R, KRAFT D, WÜTHRICH B, SCHEINER O, GRAF J, EBNER C (1997) Characterization of allergens in Apiaceae spices: anise, fennel, coriander and cumin, *Clin Exp Allergy*, **27**, 1299-1306

JORDAN-WAGNER DL, WHISMAN BA, GOETZ DW (1993) Cross-allergenicity among celery, cucumber, carrot, and watermelon, *Ann Allergy,***71**, 70-79

JUNG K, FAHLUSCH B, MUELLER WD, HERRMANN D, DIENER C, JAEGER L (1989) Isolation of timothy (Phleum pratense) allergens by affinity chromatography with monoclonal antibodies, *Allerg Immunol,* **35**, 287-294

KHYSE-ANDERSEN, J (1984) Electroblotting of multiple gels: A simple horizontal apparatus without buffer tank for electrophoretic transfer of proteins from polyacryamide to nitrocellulose, *J Biochem Biophys Meth,* **10**, 203-209

KING TP (1990) Insect venom allergens, in: Baldo BA (Hrsg.): Molecular approaches to the study of allergens, Karger, Basel, 84-100

KJELLMAN NIM, JOHANSSON SGO (1979) Soy versus cow´s milk in infants with a biparntal history of atopic disease, *Clin Allergy*, **9**, 347-358

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

KNOP J, SALOGA J (1996) Discussion of methods for detection of food allergies, in: Eisenbrand G, Aulepp H, Dayan AD, Elias PS, Grunow W, Ring J, Schlatter J: Food Allergies and Intolerances, Verlag Chemie, Weinheim, 31-38

KREMSER M, LINDEMAYR W (1983) Sellerieallergie und Zusammenhänge mit Allergien gegen Pflanzenantigene, *Wien Klin Wochenschr*, **95**, 372-379

LÄMMLI UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685

LEITNER A, VOGEL M, RADAUER C, BREITENEDER H, STADLER BM, SCHEINER O, KRAFT D, JENSEN-JAROLIM E (1998a) A mimotope defined by phage display inhibits IgE binding to the plant panallergen profilin, *Eur J Immunol*, **28**, 2921-2927

LEITNER A, JENSEN-JAROLIM E, GRIMM R, WÜTHRICH B, EBNER H, SCHEINER O, KRAFT D, EBNER C (1998b) Allergens in pepper and paprika. Immunologic investigation of the celery-birch-mugwort-spice syndrom, *Allergy*, **53**, 36-41

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

LIEBERS V, KAMPEN V VON, SANDER I, RAULF-HEIMSOTH M (1995) Aktuelle Aspekte der Allergieforschung, *Allergo J*, **4**, 280-288

LIEBSTER, G (1988) Warenkunde Obst und Gemüse, Band 1, Morion Verlagsproduktion GmbH, Düsseldorf

LI-SHAN H, MOOS M, YUAN L (1995) Characterization of apple 18 and 31 kd allergens by microsequencing and evaluation of their content during storage and ripening, *J Allergy Clin Immunol*, **96**, 960-970

LOTTSPEICH F, HOUTHHAEVE T, KELLNER R (1994) The Edman Degradiation, in: Lottspeich F, Meyer HE (Hrsg.): Microcharacterization of proteins, VCH Verlagsgesellschaft Weinheim

LOWE CR, DEAN PDG (1974) The principles of affinity chormatography, in: Affinity Chromatography, *Wiley and Sons, London*, 12-89

MALMQUIST G, LUNDELL N (1992) Characterization of the influence of displacing salts on retention in gradient elution ion-exchange chromatography of proteins and peptides, *J Chromatogr*, **627**, 107-124

MARLEY SE, LAMMIE PJ, EBERHARD ML (1996) Immunopurification and measurement of IgE in serum samples from bancroftian filariasis patients, *J Parasitol*, **82**, 178-181

MARSH DG, GOODFRIEND I, KING TP, LÖWENSTEIN H, PLATTS-MILLS TAE (1987) Allergen nomenclature, *J Allergy Clin Immunol*, **80**, 639-645

MARTINEZ A, MARTINEZ J, PALCIOS R (1995) The panallergenic character of profilin, *ACI News*, **7**, 85-94

MC EVILY AJ, IYENGAR R, OTWELL WS (1992) Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages, *Crit Rev Food Sci Nutr*, **32**, 253-273

MIELL J, PAPOUCHADO M, MARSHALL AJ (1988) Anaphylactic reaction after eating a mango, *BMJ*, **297**, 1639-1640

MIRABALLES-MARTINEZ I, MARTIN-RODIGUEZ A, HIDALGO-ALVAREZ R (1997) Chloroactivated latex particles for covalent coupling of antibodies. Application to immunoassays, *J Biomater Sci Polym Ed*, **10**, 765-777

MÖLLER M, PASCHKE A, VIELUF D, KAYMA M, VIETHS S, STEINHART H (1997a) Characterization of allergens in kiwi fruit and detection of cross-reactivity with allergens of birch pollen and related fruit allergens, *Food Agric Immunol*, **9**, 107-121

MÖLLER M, KAYMA M, STEINHART H, PASCHKE A (1997b) Isolation and characterization of a major allergen in kiwi fruits, *Z Lebensm Unters Forsch A*, **205**, 364-369

MÖLLER M (1997c) Charakterisierung von Allergenen tropischer Früchte unter Berücksichtigung von Kreuzreaktion, Dissertation, Universität Hamburg

MORRISEY JH (1981) Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity, *Anal Biochem*, **117**, 307-310

NEDERGAARD-LARSEN J, LOEWENSTEIN H (1999) Official list of allergens. IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee, http://biobase.dk/resources/pub/who-iuis/allergen.list

NILSEN BM, PAULSEN BS (1990) Isolation and characterization of a glycoprotein allergen, Art v 2, from pollen of mugwort (Artemisia vulgaris L.), *Mol Immunol*, **27**, 1047-1056

NILSEN BM, SMESTAD-PAULSEN B, CLONIS Y, MELLBYE KS (1990) Purification of the glycoprotein allergen Ag7 from mugwort pollen by concanavalin A affinitiy chromatography, *J Biotechnol*, **16**, 305-316

ORTOLANI C, PASTORELLO EA, FARIOLI L, ISPANO M, PRAVETTONI V, BERTI C, INCORVAIA C, ZANUSSI C (1993), IgE-mediated allergy from vegetable allergens, *Ann Allergy*, **71**, 470-476

PETERSEN A, VIETHS S, AULEPP H, SCHLAAK M, BECKER WM (1996) Ubiquitious structures reponsible for IgE cross-reactivity between tomato fruit and grass pollen allergens, *J Allergy Clin Immunol*, **98**, 805-815

PHILLIPS TM, MORE NS, QUEEN WD, THOMPSON AM (1985) Isolation and quantitation of serum IgE levels by high-performance immunoaffinity chromatography, *J Chromatogr*, **327**, 205-211

PHILLIPS DJ, CHELI PJ, DION DM, HODGON HL, POMFRET AM, SAN SOUCI BR (1992) Schemes for efficient protein purification on a family of polymeric ion exchangers in glass columns, *J Chromatogr*, **599**, 239-253

PIRQUET C VON (1906) Allergie [Münch Med Wschr/24.Juli 1906], *Münch Med Wschr* (1978), **120**, 474

PORTNOY J, OLSON I, PACHECO MS, BARNES C (1990) Affinity purification of a major Alternia allergen using a monoclonal antibody, *Ann Allergy*, **65**, 109-114

QUIRCE S, BLANCO R, DIEZ-GOMEZ ML, CUEVAS M, EIRAS P, LOSADA E (1997) Carrot-induced asthma: immunodetection of allergens, *J Allergy Clin Immunol*, **99**, 718-719

RIHS HP, ROZYNEK P, MAY-TAUBE K, WELTICKE B, BAUR-X (1994) Polymerase chain reaction based cDNA cloning of wheat profilin: a potential plant allergen, *Int-Arch-Allergy-Immunol*, **105**, 190-194

RING J (1993) Allergie-Entstehung und Immunglobulin E-Bildung: Rolle von Infekten und Umweltschadstoffen, *Allergo J*, **2**, 27-30

RING J, VIELUF D, HAMM M, BEHR-VÖLTZER P (1995) Einführung in die Problematik der Nahrungsmittel-Allergie und anderer nahrungsmittelbedingter Unverträglichkeitsreaktionen, *Allergo J*, **4**, 384-388

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

RUBIN JM, SHAPIRO J, MUEHLBAUER P, GROLINCK M (1965) Shock reaction following ingestion of a mango, *J Am Med Assoc*, **193**, 397-398

SACHS L (1996) Angewandte Statistik, 8. Auflage, Springer-Verlag, Berlin

SAMPSON HA, HO DG (1997) Relationship between food-specific IgE concentrations and the risk of positive food challanges in children and adolescents, *J Allergy Clin Immunol*, **100**, 444-451

SANTIAGO ML, HAFALLA JC, KURTIS JD, ALIGUI GL, WIEST PM, OLVEDA RM, OLDS GR, DUNNE DW, RAMIREZ BL (1998) Identification of the Schistosoma japonicum 22,6-kDa antigen as a major target of the human IgE response: similarity of IgE-binding epitopes to allergen peptides, *Int Arch Allergy Immunol*, **117**, 94-104

SCHÄFER T, RING J (1996) Epidemiology of adverse food reactions due to allergy or other forms of hypersensitivity, in: Eisenbrand G, Aulepp H, Dayan AD, Elias PS, Grunow W, Ring J, Schlatter J: Food Allergies and Intolerances, Verlag Chemie, Weinheim, 40-53

STATISTICA FÜR WINDOWS (1995), Version 5.1, StatSoft

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

SWEENY MJ, KLOTZ SD (1987) Immunology of food antigens, in: Breneman JC (Hrsg.): Handbook of food allergiec, Marcel Dekker, New York, 13-54

TAYLOR SL (1992) Chemistry and detection of food allergens, *Food Technol*, **46**, 146-152

TOVEY ER, FORD SA, BALDO BA (1987) Protein blotting on nitrocellulose: some important aspects of resolution and detection of antigens in complex extracts, *J Biochem Biophys Meth*, **14**, 1-17

TRETTER V, ALTMANN F, KUBELKA V, MÄRZ L, BECKER WM (1993) Fucose α-1,3-linked to the core region of glycoprotein N-glycans creates an important epitope for IgE from honey bee venom allergic individuals, *Int Arch Allergy Immunol*, **102**, 259-266

TUCKER MO, SWAN CR (1998) Images in clinical medicine. The mango-poison ivy connection, *N Engl J Med*, **339**, 235

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

VALENTA R, BREITENEDER H, PETTENBURGER K, BREITENBACH M, RUMPOLD H, KRAFT D, SCHEINER O (1991b) Homology of the major birch pollen allergen, Bet v 1, with the major allergens of alder, hazel and hornbeam at the nucleic acid level as determined by cross-hybridization, *J Allergy Clin Immunol*, **87**, 677-682

VALENTA R, DUCHENE M, EBNER C, VALENT P, SILLABER C, DEVILLER P, FERREIRA F, TEIKL M, HIRSCHWEHR R, EBNER C, KRAFT D, SCHREINER O (1992) Profilins constitute a novel family of functional plant allergens, *J Exp M*, **175**, 377-85

VALENTA R, KRAFT D (1996) Type I allergic reactions to plant-derived food: A consequence of primary sensitization to pollen allergens, *J Allergy Clin Immunol*, **97**, 893-95

VALLIER P, DECHAMP R, VALENTA R, VIAL O, DEVILLER P (1992) Purification and characterization of an allergen from celery immunochemically related to an allergen present in several other plant species. Identification as a profiline, *Clin Exp Allergy*, **22**, 774-82

VAN SOMMEREN APG, MACHIELSEN PAGM, GRIBNAU TCJ (1993) Comparison of three activated agaroses for use in affinity chromatography: effects on coupling performance and ligand leakage, *J Chromatogr*, **639**, 23-31

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

VAN REE R, FERNANDEZ-RIVAS M, CUEVAS M, VAN WIJNGAARDEN M, AALBERSE RC (1995) Pollen-related allergy to peach and apple: an important role for profilin, *J Allergy Clin Immunol*, **95**, 726-734

VIELUF D, BEIL D, BEAUREGARD K, VIELUF I, KINDER H, BEHRENDT H, STEINHART H, RING J (1997) Xenobiotics and food allergy: in vivo and in vitro studies in patients with apple allergy, *Int Arch Allergy Immunol*, **113**, 352-354

VIETHS S, SCHÖNING B, BROCKMANN A, AULEPP H (1992a) Untersuchungen zur Allergie gegen Lebensmittel pflanzlicher Herkunft: Herstellung und Charakterisierung von Obst- und Gemüseextrakten für serologische Untersuchungen, *Dtsch Lebensm Rundsch*, **88**, 239-43 und 273-279

VIETHS S, SCHÖNING B, BALTES W (1992b) Allergy to fruits and vegetables in pollen-sensitive patients: allergen characterization by IgE immunoblotting and peroxidase staining, *Food Agricult Immunol*, **4**, 181-197

VIETHS S, SCHÖNING B, JANKIEWICZ A (1993) Occurrence of IgE binding allergens during ripening of apple fruits, *Food Agric Immunol*, **5**, 93-105

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

VIETHS S, JANKIEWICZ A, SCHONING B, AULEPP H (1994b) Apple allergy: the IgE-binding potency of apple strains is related to the occurrence of the 18-kDa allergen, *Allergy*, **49**, 262-271

VIETHS S, MAYER M, BAUMGART M (1994c) Food Allergy: specific binding of IgE antibodies from plant food sensitized individuals to carbohydrate epitopes, *Food Agric Immunol*, **12**, 453-463

VIETHS S, JANKIEWICZ A, WÜTHRICH B, BALTES W (1995) Immunoblot study of IgE binding allergens in celery, *Ann Allergy Asthma Immunol*, **75**, 48-55

VIETHS S, AULEPP H, BECKER WM, BUSCHMANN L (1996) Characterization of labile and stable allergens in foods of plant origin, in: Eisenbrand G, Aulepp H, Dayan AD, Elias PS, Grunow W, Ring J, Schlatter J: Food Allergies and Intolerances, Verlag Chemie, Weinheim, 130-148

VIETHS S, FRANK E, SCHEURER S, MEYER HE, HRAZDINA G, HAUSTEIN D (1998) Characterization of a new IgE-binding 35-kDa protein from birch pollen with cross-reacting homologues in various plant foods, *Scand J Immunol*, **47**, 263-272

WARD LD, REID GE, MORITZ RL, SIMPSON RJ (1990) Strategies for internal amino acid sequence analysis of proteins separated by polyacrylamide gel electrophoresis, *J Chromatogr*, **519**, 199-216

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

WESTERMEIER R, (1990) Electrophorese-Praktikum, VCH-Verlag, Weinheim, 1990

WONGYAI, S, VARGA JM, BONN GK (1991) High-performance affinity chromatography of immunoglobulin E on a column of dinitrophenylamino acids covalently bound to a highly cross-linked polymeric micropellicular support, *J Chromatogr*, **536**, 155-164

WÜTHRICH B (1981) Nahrungsmittelallergie, *Allergologie*, **4**, 320-328

WÜTHRICH B, HOFER T (1984) Nahrungsmittelallergie: Das „Sellerie-Beifuß-Gewürz-Syndrom“: Assoziation mit einer Mangofrucht-Allergie?, *Dtsch Med Wschr*, **109**, 981-986

WÜTHRICH B; DIETSCHI R (1985) The celery-carrot-mugwort-condiment syndrome: skin test and RAST results, *Schweiz Med Wschr,* **115**, 258-264

WÜTHRICH B, SCHNYDER UW, HENAUER SA, HELLER A (1986) Häufigkeit der Pollinosis in der Schweiz. Ergebnisse einer repräsentativen Umfrage unter Berücksichtigung allergischer Erkrankungen, *Schw Med Wschr,* **116**, 909-917

Wüthrich B, Schmid-Grendelmeier P (1995) Nahrungsmittelallergien, *Internist*, **36**, 1052-1062

WÜTHRICH B (1996a) Zur Nahrungsmittelallergie: Begriffsbestimmung, Diagnostik, Epidemiologie, Klinik, *Schw Med Wschr*, **126**, 770-776

WÜTHRICH B (1996b) Epidemiology of allergies and intolerances caused by foods and food additives: the problem of data validity, in: Eisenbrand G, Aulepp H, Dayan AD, Elias PS, Grunow W, Ring J, Schlatter J: Food Allergies and Intolerances, Verlag Chemie, Weinheim, 31-38

ZYGMUNT MS, MARTIN JC, DUBRAY G (1990) Analysis of immune response: comparison of immunoblots after isoelectric focussing and sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis using cytoplasmic protein extract from Brucella, *FEMS Microbiol Lett*, **58**, 263-268

Lebenslauf

Berufserfahrung

seit 1997 Universität Hamburg
Wissenschaftlicher Mitarbeiter
- Ausbildung von Studierenden am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hamburg, Durchführung verschiedener Studien

1996 Natec-Institut Hamburg
Praktikum
- GC-MS Bestimmungen, Rückstandsanalytik, Projektbetreuung

1990-1993 Nestlé Deutschland AG Hamburg
Betriebsschlosser
- Durchführung verschiedener Arbeiten und Projekte

Ausbildung

1996-1999 Universität Hamburg
Promotion
- Lebensmittelallergien

1991-1996 Universität Hamburg
Studium Lebensmittelchemie
- Abschluß: Diplom in Lebensmittelchemie (sehr gut)

1988-1990 Abendgymnasium Hamburg
Abitur (1,9)

1987-1990 Nestlé Deutschland AG Hamburg
Ausbildung zum Betriebsschlosser (gut)

1984-1987 Nestlé Deutschland AG Hamburg
Ausbildung zur Fachkraft für Süßwarentechnik (gut)

Ehrenamtliche Tätigkeiten

1991-98 Gemeinde Bispingen
Mitglied im Gemeinderat
- Mitwirkung in unterschiedlichen Gremien, u.a. im Verwaltungsausschuß, dem Gremium, das Einstellungen, Ausschreibungen u.ä. entscheidet

Stipendien

1991-96 Stipendium der Friedrich-Ebert-Stiftung