

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 Patientenserum mittels EAST eingesetzt. Die Charakterisierung der Allergene hinsichtlich ihres MG erfolgte mit 56 Probandenserum, 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 Profilinen 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-Inhibition, 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-reactivities 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.