

Untersuchungen zur Allergenität der Mango und der Litchi

Dissertation

Zum Erlangen des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg

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

vorgelegt von

Katy Zunker

aus Neustadt in Holstein

Hamburg 2001

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 1998 bis Juli 2001 unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. H. Steinhart am Institut für Biochemie- und Lebensmittelchemie, Abteilung Lebensmittelchemie, der Universität Hamburg angefertigt.

*Je kühner die Naturwissenschaft forscht und kombiniert, desto näher rückt sie der Evidenz, daß der
eigentliche Urgrund außerhalb der menschlichen Forschung liegt.*

(Joseph Freiherr von Eichendorff)

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

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Dezember 2001

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Dr. H. Steinhart und Frau Dr. A. Paschke möchte ich für das Überlassen des Themas sowie für die nette Betreuung dieser Arbeit danken.

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

Mein Dank für die finanzielle Unterstützung, die diese umfassenden Untersuchungen ermöglichte, gilt dem Forschungskreis der Ernährungsindustrie (FEI).

Ein besonderer Dank gilt Arne Mohring, Mark Dube und Sonja Hoppe, die mit ihrer engagierten und großartigen Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere möchte ich mich bei Bettina Jacobsen für die tolle Zusammenarbeit und die experimentelle Hilfe sehr bedanken.

Den Mitarbeiterin der Abteilung pflanzlicher Herkunft des Instituts für Lebensmitteltechnologie der Universität Hohenheim – Herrn Prof. Dr. habil. R. Carle, Frau Dr. S. Neidhart, Frau P. Hutasingh und Herrn K. Mix – möchte ich herzlich für die hervorragende Kooperation und Gastfreundschaft danken.

Für die Hilfsbereitschaft und Zusammenarbeit bei der Rekrutierung der Patienten sowie der Blutentnahme danke ich allen Mitarbeitern der Hautklinik des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf.

Ich danke Udo Jürgens und den Ärzten, deren muntere Weisen mir die Nächte des Zusammenschreibens musikalisch untermalt haben.

Ein ganz besonderer Dank für die großartige Zusammenarbeit und die daraus resultierende schöne Promotionszeit gilt Silke Schubert und Marco Sell.

Für die wunderbare Zusammenarbeit, die fachliche & moralische Unterstützung sowie für die Durchsicht des Skriptes möchte ich Michael Wigotzki sehr danken.

Abschließend gilt für die vielfältige Unterstützung während meiner gesamten Studien- & Promotionszeit ein sehr großer Dank Jochen Siebeneicher, der immer an mich geglaubt hat und für mich da war.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Problemstellung und Arbeitsplan | 1 |
| 1.2 | Definitionen und immunologische Grundlagen allergischer Reaktionen | 3 |
| 1.3 | Charakterisierung und Diagnostik echter Lebensmittelallergien | 7 |
| 1.4 | Pollenassoziierte Lebensmittelallergien und Kreuzreaktivitäten | 8 |
| 1.5 | Lebensmittelallergien gegen Mango und Litchi | 9 |
| 1.6 | Technologische Verarbeitungsprozesse | 11 |
| 1.7 | In-vitro Verdauung | 13 |
| 2 | Material | 14 |
| 2.1 | Patientenseren | 14 |
| 2.2 | Mango (<i>Mangifera indica</i> L.) | 14 |
| 2.2.1 | FrISChe Früchte | 15 |
| 2.2.2 | Fluide und feste Mangoerzeugnisse | 17 |
| 2.3 | Litchi (<i>Litchi chinensis</i> SONN.) | 19 |
| 2.3.1 | FrISChe Früchte | 19 |
| 2.3.2 | Verarbeitete Litchierzeugnisse | 20 |
| 2.4 | Enzyme | 22 |
| 3 | Methoden | 24 |
| 3.1 | Übersicht der eingesetzten Methoden | 24 |
| 3.2 | Proteinextraktion | 25 |
| 3.3 | Bestimmung des Proteingehaltes | 25 |
| 3.4 | Enzymallergosorbent-Test (EAST) | 26 |
| 3.5 | EAST-Inhibition | 26 |
| 3.6 | Elektrophorese | 27 |
| 3.6.1 | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE) | 27 |
| 3.6.2 | Isoelektrische Fokussierung (IEF) | 28 |
| 3.7 | Semidry-Blotting | 28 |
| 3.7.1 | Immunoblot (IB) | 29 |
| 3.7.2 | Imunoblot-Inhibition | 30 |
| 3.7.3 | Profilin-Blot | 30 |
| 3.8 | Unspezifische Färbungen | 30 |
| 3.9 | Methoden der Proteinisolierung | 31 |
| 3.10 | N-terminale Sequenzanalyse | 32 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 4 | Ergebnisse | 33 |
| 4.1 | Untersuchungen zur Mango | 33 |
| 4.1.1 | Charakterisierung der Mangoallergene mittels SDS-PAGE/Immunoblot | 33 |
| 4.1.2 | Sortenvergleich | 34 |
| 4.1.3 | Fraktionen und Fruchtreife | 35 |
| 4.1.4 | Charakterisierung der Mangoallergene mittels IEF | 38 |
| 4.1.5 | Profilin-Nachweis | 39 |
| 4.1.6 | Technologische Verarbeitungsprozesse | 40 |
| 4.1.7 | In-vitro Verdauung | 49 |
| 4.2 | Untersuchungen zur Litchi | 55 |
| 4.2.1 | Charakterisierung der Litchiallergene mittels SDS-PAGE/Immunoblot | 55 |
| 4.2.2 | Sortenvergleich | 57 |
| 4.2.3 | Arillus und Perikarp | 58 |
| 4.2.4 | Charakterisierung der Mangoallergene mittels IEF | 60 |
| 4.2.5 | Profilin-Nachweis | 62 |
| 4.2.6 | Sequenzierung | 63 |
| 4.2.7 | Kreuzreaktivitäten | 63 |
| 4.2.8 | Technologische Verarbeitungsprozesse | 70 |
| 4.2.9 | In-vitro Verdauung | 78 |
| 5 | Diskussion | 83 |
| 5.1 | Mango | 83 |
| 5.2 | Litchi | 90 |
| 5.3 | Ausblick | 98 |
| 6 | Zusammenfassung – Summary | 100 |
| 7 | Anhang | 106 |
| 8 | Literatur | 158 |

Abkürzungsverzeichnis

| | | |
|-----------------|--|---------------------------------|
| AC | Affinitätschromatographie | |
| AP | Alkalische Phosphatase | |
| Api g 1 bzw. 2 | Apium graveolen | Hauptallergene des Selleries |
| Art v 1 bzw. 2 | Artemisis vulgaris | Hauptallergene der Beifußpollen |
| Bet v 1 bzw. 2 | Betula verucosa | Hauptallergene der Birke |
| Bis-Tris-HCl | Bis[2-hydroxyethyl]imino-tris[hydroxymethyl]methan-HCl | |
| BSA | Rinderserumalbumin | Bovine serum albumin |
| CA | Choke Anan | |
| CBB | Coomassie-Brilliant-Blue | |
| Dau c 1 | Daucus carota | Hauptallergen der Karotte |
| DBPCFC | doppeltblinder, placebokontrollierter Expositionstest | |
| EAST | Enzymallergosorbent-Test | |
| EE | Elektroelution | |
| Fab | | fragment antigen binding |
| Fc | | fragment crystalline |
| F-Wert | Sterilisationswert | |
| G3PC-Sinal | Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase aus weißem Senf | |
| HRP | Meerrettich Peroxidase | horseradish peroxidase |
| IB | Immunoblot | |
| IEF | Isoelektrische Fokussierung | |
| Ig | Immunglobulin | Klassen: A – D – M – G – E |
| LMA | Lebensmittelallergie | |
| LN ₂ | Flüssiger Stickstoff | |
| Mal d 1 | Malus domestica | Hauptallergen des Apfels |
| Man i 1 bzw. 2 | Mangifera indica | Hauptallergene der Mango |
| MES | 2-(N-morpholino)- ethansulfonsäure | |
| MG | Molekulargewicht | |
| NC | Nitrocellulose | |
| NDM | Nam Dok Mai | |
| NKW | Nang Klang Wan | |
| NT | Niedertemperatur | |
| OA | Ovalbumin | |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese | |
| PBS | phosphatgepufferte Kochsalzlösung | phosphate buffered saline |
| Phl p 1 | Phleum pratense | Hauptallergen des Pflirsichs |
| PHT | Phenylthiohydantoin | |
| PL | Polygalacturonase | |
| PNPP | p-Nitro-phenylphosphat | |
| PTE | Pektinlyase | |
| PVDF | Polyvinylidendifluorid | |

| | | |
|---------|--------------------------|----------------------|
| P-Wert | Pasteurisationswert | |
| Pyr c 4 | Pyrus communis | Birnenprofilin |
| RAST | Radioallergosorbent-Test | |
| SDS | Natriumlaurylsulfat | sodiumdodecylsulfate |
| TA | Tommy Atkins | |
| TK-Ware | Tiefkühlware | |
| TMB | Tetramethylbenzidin | |
| UH | Universität Hohenheim | |

1 Einleitung

Lebensmittelallergien sind entgegen der häufig in der Bevölkerung anzutreffenden Meinung kein Phänomen unserer modernen Konsumgesellschaft sondern bereits aus der Antike bekannt. Die Ärzte HIPPOKRATES (500 v.Chr.) und GALEN (200 n.Chr.) berichteten z.B. über Fälle von Nahrungsmittelunverträglichkeiten, die nach heutigem Wissensstand zu den allergischen Reaktionen zählen könnten (KREFT et al. 1995). Die aufwendige Diagnostik dieser sehr individuellen Erkrankung ist durch die vielfältige Manifestation der klinischen Symptome zu erklären. Zu den am häufigsten betroffenen Organen zählen die Haut sowie der Respirations- und Gastrointestinaltrakt. Jedoch ist der Zusammenhang der Nahrungsaufnahme mit verzögert auftretenden Symptomen wie Diarrhoe, Urticaria oder sogar anaphylaktischen Reaktionen häufig nur schwer zu verifizieren (z.B. RING 1989; SAMPSON 1992; HEFLE 1996; WÜTHRICH 1996a). Aufgrund dieser Problematik und dem leichtfertigen Umgang mit dem Begriff der Allergie wird der Anteil von einer allergischen Erkrankung betroffener Individuen häufig viel zu hoch eingeschätzt. In einer Befragung von 1483 Probanden glaubten 12.4 % an einer Lebensmittelallergie zu leiden, während die nachgewiesene Prävalenz 2.4 % betrug (NIESTIJL et al. 1994). Trotz der in zahlreichen epidemiologischen Studien belegten Zunahme an erkrankten Lebensmittelallergikern (AULEPP & VIETHS 1992; ANDRÉ et al. 1994; MONERET-VAUTRIN & KANNY 1995; WÜTHRICH 1996b) wird die Prävalenz bei Erwachsenen nur mit 1-2 % und bei Kindern mit 0.3-7 % angegeben (AULEPP & VIETHS 1992; BURKS & SAMPSON 1993; HELBING 1994; CASTILLO et al. 1996; VIETHS 1996; CHANDRA 1997; HILL et al. 1997; SAMPSON 1997). Die erheblichen Differenzen der Studienergebnisse verdeutlichen die bis heute bestehende Problematik dieser sehr individuell determinierten und u.a. durch regionale Gewohnheiten beeinflussten Krankheit. Lediglich die erhöhte Prävalenz bei Kleinkindern wurde hinreichend untersucht. Bis zum 3. Lebensjahr erfolgt die Sensibilisierung - häufig gegen Kuhmilch, Hühnereier und/oder Soja - ausschließlich über den Gastrointestinaltrakt und kann sich mit zunehmendem Alter wieder verlieren (LIECHTENSTEIN 1993; VIETHS 1996; HELBING 1998). Die Sensibilisierung bei älteren Kindern und Erwachsenen verläuft dagegen zusätzlich über die Atemwege, wobei die Bildung von spezifischen Antikörpern induziert wird, die im Sinne einer Kreuzreaktion sowohl Lebensmittelallergene als auch Inhalationsallergene erkennen (CALKOVEN et al. 1987; HELBING 1997). Schätzungsweise 80-90 % der Pollenallergiker reagieren auch auf Nahrungsmittel, wobei auch taxonomische Grenzen überschritten werden (ERIKSSON et al. 1982; WÜTHRICH & SCHMID-GRENDELMEIER 1995). Die pollenassoziierte Lebensmittelallergie gilt als häufigste Form der Nahrungsmittelunverträglichkeit und ist eine überwiegend auf den Oropharynx beschränkte Lokalreaktion. Die bisher wirksamste und sicherste Therapie besteht in der möglichst konsequenten Karenz der Allergene. Eine erfolgreiche medikamentöse Behandlung dieser Erkrankung konnte bisher noch nicht etabliert werden.

1.1 Problemstellung und Arbeitsplan

Lebensmittelallergien verlaufen nach heutigen Kenntnissen überwiegend als Soforttyp-Reaktion unter Beteiligung von Immunglobulin E als spezifischer Antikörper. Neben der Klärung der pathogenetischen Wirkungsweise wurden auch eine Reihe von Lebensmittelallergenen tierischer oder

pflanzlicher Herkunft entdeckt und charakterisiert. Eingehende Studien erfolgten bereits u.a. am Hauptallergen des Apfels (VIETHS et al. 1995; HSIEH et al. 1995), des Selleries (BREITENEDER et al. 1995; EBNER et al. 1995; VIETHS et al. 1995; HOFFMANN-SOMMERGRUBER et al. 1999), der Kiwi (MÖLLER et al. 1997; PASTORELLO et al. 1998) oder der Karotte (HOFFMANN-SOMMERGRUBER et al. 1999). Die Strukturaufklärung und Charakterisierung allergener Proteine aus exotischen Früchten erfolgte ebenso wie die Untersuchung der technologischen oder gastrointestinalen Einflüsse auf ihr allergenes Potential bisher kaum. Durch die steigende Beliebtheit dieser Früchte und ihrer mittlerweile ganzjährigen Verfügbarkeit im Handel rückt auch die Allergie gegen Mangos und Litchis zunehmend in den Fokus des Interesses, besonders hinsichtlich der postulierten Birken- bzw. Beifußpollenassoziation (HELBING 1997; WELLHAUSEN et al. 1996; HENZGEN et al. 1998; PASCHKE et al. 2001a). Ziel dieser Arbeit ist nun eine umfassende Untersuchung der Mango- und Litchiallergene. Neben der Charakterisierung der jeweiligen Haupt- und Nebenallergene mittels etablierter elektrophoretischer Verfahren soll die Allergenisolierung mittels Elektroelution erfolgen und so die Möglichkeit einer anschließenden Sequenzanalyse eröffnen. Die klimakterische Mangofrucht wird aufgrund ihrer inhomogenen schnellen Reifung (ABU-SARRA & ABU-GOUKH 1992) sowohl fraktioniert als auch nach unterschiedlich langer Lagerzeit untersucht. Zusätzlich wird das allergene Potential des jeweiligen Perikarp mit dem des Fruchtfleisches verglichen. Die u.a. beim Apfel von VIETHS et al. (1994a), HSIEH et al. (1995) sowie von SON et al. (1995) nachgewiesene Abhängigkeit der Allergenität von der Fruchtsorte wird sowohl bei der Mango als auch bei der Litchi verifiziert. Ein weiteres Ziel besteht in der Untersuchung der Stabilität der Allergene gegen technologische Verarbeitungsprozesse und einer sich daraus ableitenden potentiellen Eliminierung der Allergenität. Es werden fluide und feste Mangoerzeugnisse sowie stückige Litchiprodukte definiert im kleintechnologischen Maßstab hergestellt und das allergene Restpotential der anfallenden Zwischen- und Endprodukte bestimmt. Vergleichbare Studien werden in der Literatur bisher nur selten beschrieben. Die Hitzeempfindlichkeit der Allergene des Apfels und der Karotte anhand prozeßbegleitender Stufenkontrollen wurde von WIGOTZKI (2001) beschrieben, ähnliche Untersuchungen zum Sellerie u.a. von JANKIEWICZ et al. (1995, 1997) sowie von LÜTTKOPF et al. (2000) und zur Erdnuß von BURKS et al. (1992), VIETHS et al. (1996) und KOPPELMANN et al. (1999). Ansonsten fanden lediglich Untersuchungen zur Hitzeempfindlichkeit von Allergenen bzw. Allergenextrakten statt (DREBORG & FOUCARD 1983; VIETHS 1998a; BESLER ET AL. 2001). Zur Absicherung der Ergebnisse der im kleintechnologischen Maßstab selbst hergestellten Erzeugnisse erfolgt ein Vergleich mit handelsüblichen Produkten. Die Charakterisierung der Litchiallergene umfaßt zusätzlich bisher in der Literatur noch nicht dokumentierte Untersuchungen zur Kreuzreaktivität mit anderen birkenpollenassoziierten Lebensmitteln. Abschließend wird durch Simulation der in-vitro Verdauung die Persistenz der in der Mango und Litchi identifizierten Allergene gegen die gastrointestinalen Enzyme überprüft.

Die Untersuchungen aller Versuchsreihen zur Mango und Litchi erfolgten mittels etablierter elektrophoretischer und immunologischer Methoden. Neben der Identifizierung einzelner Allergene kann z.B. anhand der EAST-Inhibition auch eine relative Quantifizierung vorgenommen werden. Die technologischen Versuche werden mit Unterstützung der Universität Hohenheim (UH), Institut für Lebensmitteltechnologie durchgeführt.

1.2 Definitionen und immunologische Grundlagen allergischer Reaktionen

Eine erste Definition des Begriffes „Allergie“ wurde im Jahr 1906 von dem Wiener Kinderarzt CLEMENS VON PIRQUET geprägt. Er verstand darunter ganz allgemein eine veränderte immunologische Reaktionsfähigkeit des Organismus. RING bezeichnete 1986 eine Allergie als „... eine spezifische Änderung der Immunitätslage im Sinne einer krankmachenden Überempfindlichkeit“. Die „echte Lebensmittelallergie (LMA)“ wird heutzutage als eine nicht-toxische, immunvermittelte Überempfindlichkeitsreaktion im Sinne einer Typ I-Reaktion klassifiziert und ist somit von den nicht-immunvermittelten Lebensmittelintoleranzen eindeutig abzugrenzen (WÜTHRICH 1996a). Eine mögliche Einteilung aller Unverträglichkeitsreaktionen basiert auf ihrer pathogenetischen Wirkungsweise und wird in der Übersicht in Abbildung 1-1 veranschaulicht.

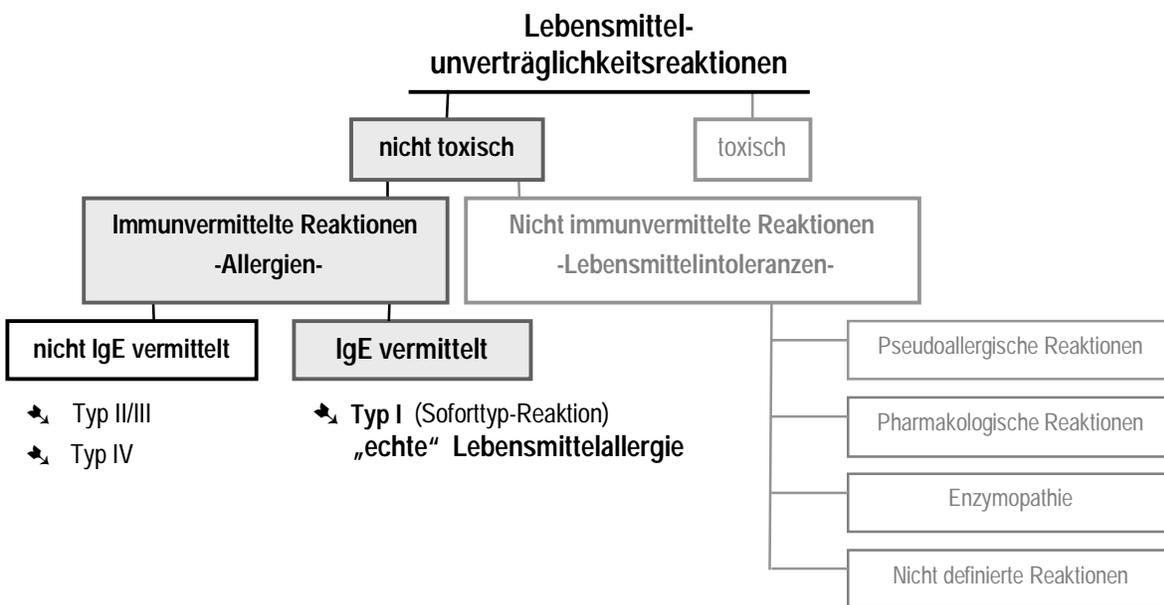


Abb. 1-1: Klassifizierung der Lebensmittelunverträglichkeitsreaktionen

Eine echte LMA beruht auf einer spezifischen Interaktion zwischen Allergenen und dem Immunsystem (Antigen-Antikörper-Reaktion) und läßt sich als fehlgesteuerte Überreaktion der körpereigenen Abwehr auf natürliche, nicht toxische Lebensmittelbestandteile einstufen. Als **Antigene** werden allgemein Substanzen bezeichnet, die über die Aktivierung von B-Lymphozyten die Produktion spezifischer Antikörper bzw. über eine Aktivierung der T-Lymphozyten eine spezifische Immunantwort induzieren (REICH 1993). **Allergene** sind Antigene, die bei sensibilisierten Individuen eine allergische Reaktion auslösen. Als Lebensmittelallergene lassen sich Proteine oder Glykoproteine mit Molekulargewichten zwischen 10 und 70 kDa (SAMPSON 1991; LEHRER et al. 1996) bzw. bis zu 100 kDa (AULEPP & VIETHS 1992) klassifizieren. Niedermolekulare Proteine mit einem mittleren Molekulargewicht von 1 kDa vermögen erst nach Konjugation an Trägermoleküle (Carrier) die Antikörperbildung anzuregen – sie werden dann als Haptene bezeichnet (AULEPP & VIETHS 1992). Die allergene Wirkung des Proteins wird somit zum einen durch die Immunogenität sowie zum anderen durch die intestinale Permeabilität bestimmt (TAYLOR 1992). Ein Nahrungsmittel kann mehrere Allergene ent-

halten, die u.a. DREBORG et al. (1994) nach ihrer Relevanz für den Probanden in *Major-* und *Minorallergene* unterteilen. Als Hauptallergene gelten demnach die Proteine oder Substanzen einer Allergenquelle, gegen die mehr als 50 % der getesteten Patienten einer epidemiologischen Studie spezifische IgE-Antikörper aufweisen. Alle anderen Allergene werden entsprechend als Minorallergene bezeichnet.

Die Antigenmarkierung und deren Inhibierung bzw. Eliminierung übernehmen bei der immunvermittelten LMA die *Immunglobuline* (Ig), die im Falle einer Sensibilisierung von differenzierten Plasmazellen des humanen Organismus als Antikörper sezerniert werden. Der Mensch besitzt fünf Ig-Klassen, die sich aufgrund ihrer Ladung, ihres Molekulargewichtes, ihrer Aminosäuresequenz und ihres Kohlenhydratanteils in die Isotypen IgA, IgD, IgE, IgG und IgM einteilen lassen (JANEWAY & TRAVERS 1995). Mit 70-75 % des gesamten Ig-Pools ist IgG zwar der Hauptantikörper des humanen Serums, bei der allergischen Soforttyp-Reaktion kommt allerdings dem IgE die bedeutendste

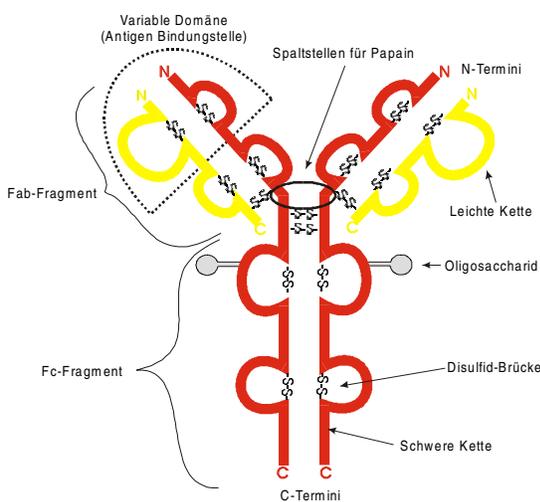


Abb. 1-II: Darstellung eines Antikörpers

Bei der Soforttyp-Reaktion wird vom Organismus IgE als Antikörper gegen das Lebensmittelallergen produziert. Im menschlichen Blut liegt der Gehalt bei $50 \mu\text{g/L}$, beim Allergiker zeigt sich dieser Wert deutlich erhöht. Das Molekulargewicht des gesamten Antikörpers beträgt 180 - 196 kDa (65 kDa je schwerer und 25 kDa je leichter Kette).

Rolle zu. Physiologisch dienen die IgE-Antikörper ursprünglich der Immunität gegen Wurmparasiten (JANEWAY & TRAVERS 1995; KREFT et al. 1995). Abbildung 1-II zeigt den schematischen Aufbau des Antikörpers, dessen Y-förmige Grundstruktur ein symmetrisches Tetramer aus jeweils zwei identischen schweren (heavy chain) und leichten Polypeptidketten (light chain) darstellt. Die antiparallelen β -Stränge werden durch nicht kovalente Kräfte und intramolekulare Disulfidbrücken stabilisiert (ROITT 1993; ROITT et al. 1995). Die beiden kurzen Arme oder „Fab“-Fragmente (fragment antigen binding) werden von je zwei variablen und zwei konstanten Domänen gebildet, wobei die Spezifität des Antikörpers in den unterschiedlichen Sequenzen der antigenbindenden Bereiche lokalisiert liegt. Das aus vier konstanten Domänen bestehende „Fc“-Fragment (fragment crystalline) besitzt für jede Ig-Klasse eine gleichbleibende Aminosäuresequenz und legt die Funktionalität des Antikörpers fest (JANEWAY 1993).

Eine Antigen-Antikörperreaktion ist nur dann möglich, wenn die Allergene die passende molekulare Dimension aufweisen, um das IgE-bridging auszulösen (TAYLOR et al. 1987). Bisher werden verschiedene Theorien der notwendigen Molekülstruktur postuliert. Entscheidend für eine Kreuzvernetzung mit dem Antikörper ist, egal ob man von einer divalenten oder monovalenten „switch“

Bindung ausgeht, nur ein diskreter Bereich der Protein-Oberflächenstruktur, das sogenannte *Epitop*. Diese allergenen Determinanten, die üblicherweise bis zu 20 Aminosäuren umfassen, lassen sich in zwei Arten differenzieren. Während sich Sequenzepitope ausschließlich durch ihre Aminosäuresequenz (Primärstruktur) definieren, resultiert die allergene Aktivität der Konformationsepitope aus der Faltung des Proteins (Sekundär- und Tertiärstruktur). Sequenzepitope zeichnen sich durch eine hohe Stabilität gegen mechanische, thermische und enzymatische Behandlungen aus (WÜTHRICH 1993; GLICK & PASTERNAK 1995).

COOMBS & GELL systematisierten 1963 neben der IgE vermittelten Typ-I-Reaktion drei weitere *Reaktionstypen*. Allergische Reaktionen des Typs-II (antikörperabhängige zytotoxische Überempfindlichkeit) und des Typs-III (Immunkomplexreaktion) sind demnach ebenfalls antikörpervermittelt, werden allerdings auf die Immunglobulinklassen G oder M zurückgeführt. Der Reaktionstyp IV beschreibt die Kontaktallergie und beruht auf der Ausbildung immunreaktiver Lymphozyten.

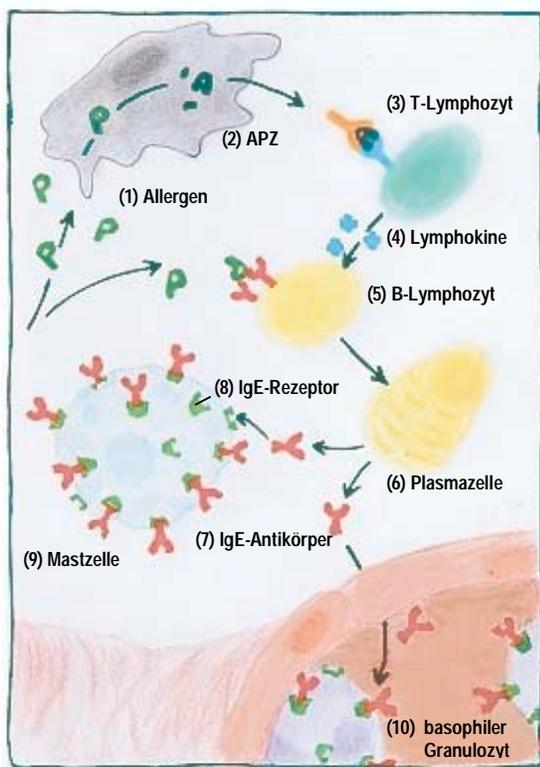


Abb. 1-III: Die Sensibilisierungsphase

Die Sensibilisierung beginnt mit der Aufnahme und Spaltung der Allergene (1) durch Makrophagen, die als antigenpräsentierende Zellen (2) die entstehenden Fragmente T-Lymphozyten (3) darbieten. Diese setzen nach Erkennung der Fragmente Lymphokine (4) frei, welche daraufhin B-Lymphozyten (5) zu Plasmazellen (6) ausreifen lassen. Es kommt zu einer Ausscheidung von IgE-Antikörpern (7), die sich über einen langen Zeitraum an IgE-Rezeptoren (8) von Mastzellen (9) und an basophile Granulozyten (10) binden.

Nach SPREITZER (1996) verlaufen 90 % der LMA als Typ I-Reaktion, über deren Verlauf und physiologische Grundlagen ein detailliertes Wissen existiert. Dem Ausbruch dieser Soforttyp-Reaktion geht zunächst eine Sensibilisierung des Immunsystems gegen das betreffende Allergen voraus. Diese Sensibilisierungsphase, welche Tage, Wochen oder Jahre dauern kann, beschreibt den ersten Kontakt zwischen Eiweißmolekül und Immunsystem, der noch keine Symptome induziert (ROTH et al. 1988). Dieser Prozeß ist in Abbildung 1-III vereinfacht dargestellt. Zunächst trifft die allergieauslösende Substanz (1) auf Makrophagen oder Freßzellen (2), die als antigenpräsentierende Zelle (APZ) den „Fremdstoff“ aufnehmen, zerstückeln und die erhaltenen Fragmente schließlich auf ihrer Oberfläche als T-Zellepitope präsentieren. Im weiteren Verlauf erkennen die T-Lymphozyten diese T-Zellepitope (3) und setzen daraufhin Lymphokine, wie Interleukin 4 und γ -Interferon, frei (4), wodurch die Differenzierung der spezifischen B-Lymphozyten (5) zu Antikörper produzierenden Plasmazellen (6) initiiert wird. Die Sezernierung der IgE-Antikörper (7) kann Tage oder Wochen dauern und hält über Monate oder Jahre an. Die gebildeten IgE-Antikörper binden auf-

grund ihrer Molekülstruktur über einen langen Zeitraum an die hochaffinen IgE-Rezeptoren (8) der Mastzellen (9) und der basophilen Granulozyten (10) und können bei erneuter Exposition mit dem Allergen innerhalb von Sekunden zu allergischen Reaktionen führen (BLASER 1993; LIECHTENSTEIN 1993; HELBING 1994). Dieser Verlauf wird in Abbildung 1-IV illustriert. Das aufgenommene Allergen (1) bindet zunächst an das Paratop eines IgE- Moleküls, welches überwiegend an die Oberfläche von Mastzellen (2) oder basophilen Granulozyten gebunden vorliegt. Die Überbrückung zweier zellständiger IgE-Moleküle (bridging) (3) durch ein Allergen bewirkt eine Oberflächen deformation der Mastzelle und induziert eine Aktivierung der zahlreichen Enzyme in der Zellmembran. Durch die angeregte direkte oder indirekte Enzymtätigkeit werden Kaskaden chemischer Reaktionen ausgelöst, die sich in der Ausschüttung präformierter Mediatoren aus speziellen Zellkompartimenten (Granula) wie z.B. die vasoaktiven Amine Histamin, Serotonin und Heparin äußern (4). Zum einen induzieren die degranulierten Mediatoren klinische Symptome, zum anderen penetrieren sie auch in die Blutgefäße (5) und lösen dort die Bildung von sogenannten Adhäsionsmolekülen (6) aus, die sowohl auf den Mediatoren selbst als auch auf den Endothelzellen (7) haften. Die zirkulierenden Immunzellen (8) des Blutes bleiben an den Endothelzellen haften und treten schließlich mit Hilfe der Adhäsionsmoleküle als diffundierende Immunzellen (9) aus den Blutgefäßen in die umgebende Gewebeschicht ein, wo sie eine weitere Mediatorenfreisetzung und somit eine Schädigung des Gewebes bewirken. Dieses manifestiert sich äußerlich in Form von klinischen Symptomen (HOLGATE & CHURCH 1993; LIECHTENSTEIN 1993). Der Granula-Mediator „Histamin“ bewirkt zum Beispiel die

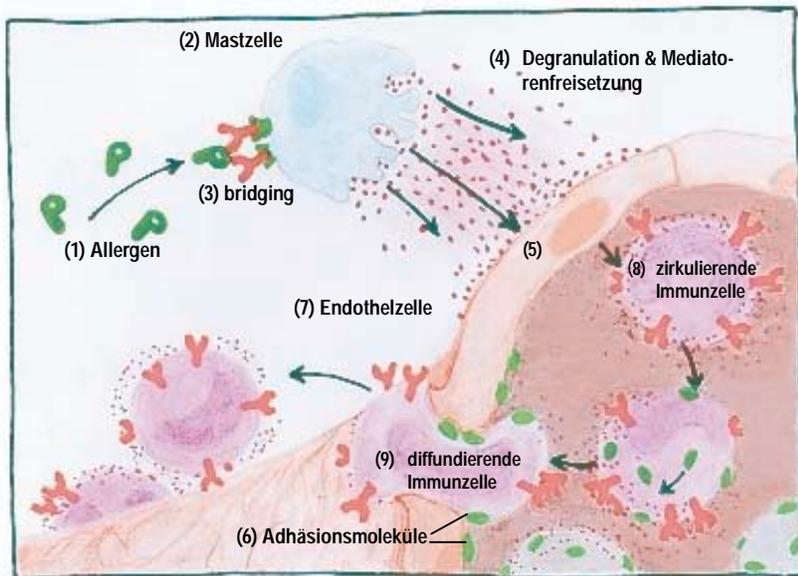


Abb. 1-IV: Ablauf der allergischen Reaktion

Der erneute Kontakt des sensibilisierten Organismus mit dem Allergen (1) führt nach Bindung des Allergens an zwei auf einer Mastzelle lokalisierte Antikörper (2) zu deren Überbrückung (bridging - 3). Aufgrund der resultierenden Deformation der Oberfläche der Mastzelle setzt diese präformierte Mediatoren frei (4), die in Blutgefäße übergehen (5) und dort die Bildung von Adhäsionsmolekülen induzieren (6). Diese bewirken nach Anhaften an die Mediatoren und Endothelzellen ein Diffundieren (9) von zirkulierenden Immunzellen des Blutes (8) aus den Gefäßen in das umliegende Gewebe .

Verengung der Bronchien, die Erweiterung und Durchlässigkeit der Blutgefäße und stimuliert die Schleimabsonderung in den Atemwegen. Leukotriene verengen die feinen Verästelungen der Bronchien und wirken hundert- bis tausendfach stärker als Histamin oder Prostaglandine. Symptome wie lokale Hautrötungen, Hautjucken und Gewebsschwellungen sind ebenso zu beobachten wie Atemnot oder anaphylaktische Reaktionen (BUISSERET 1988; LIECHTENSTEIN 1993).

1.3 Charakterisierung und Diagnostik echter Lebensmittelallergien

Die LMA gilt als eine spezifische Überempfindlichkeitsreaktion auf Nahrungsmittel, die sowohl tierischer als auch pflanzlicher Herkunft sein können. Sie tritt häufig bei genetisch disponierten Individuen auf und ist nicht dosisabhängig (AULEPP & VIETHS 1992). Der Krankheitsverlauf variiert sehr individuell, so daß nicht jede Sensibilisierung zu manifestierten Symptomen mit klinischer Relevanz führen muß. Ebenfalls scheinen die regionalen Ernährungsgewohnheiten die Prävalenz stark zu beeinflussen. Je nach exponierter Nahrung entwickeln sich beispielsweise in mediterranen Ländern verstärkt Fischallergien während in der Schweiz Sellerie als Hauptauslöser einer LMA gilt (SAMPSON & MCCASKILL 1985; MONRET-VAUTRIN 1986; KREFT et al. 1995). Als weitere wichtige, allergische Reaktionen induzierende Lebensmittel sind Hühnerei, Kuhmilch, Fisch, Soja und Nüsse zu erwähnen (WÜTHRICH 1996a; HAYAKAWA et al. 1999). Die Symptome manifestieren sich häufig innerhalb kurzer Zeit überwiegend an den Organen Haut, Respirations- und Gastrointestinaltrakt, selten dagegen zeigen sich kardiovaskuläre Störungen. Die Urtikaria sowie das „orale Allergiesyndrom“, welches sich durch Anschwellen der Lippen und der Zunge sowie durch einen Juckreiz an Mund- und Rachenschleimhaut äußert, zählen zu den häufigsten Beschwerden (WÜTHRICH 1993; HELBING 1994; WÜTHRICH & SCHMID-GRENDELMEIER 1995; KLEINE-TEBBE & RYTTER 1997; SAMPSON 1997). Aufgrund der vielfältigen, sehr individuell ausgeprägten Symptomatik erfordert die eindeutige Diagnostik einer LMA Sachverstand und Geschick. Zu Beginn erfolgt eine umfassende Anamnese, die durch Führen eines Beschwerdetagebuches ergänzt werden kann, um den Zusammenhang zwischen der Nahrungsmittelexposition und den klinischen Symptomen aufzudecken. Die weitere diagnostische Vorgehensweise umfaßt dann sowohl Hauttests mit kommerziellen Extrakten (Prick-Test) oder frischen Nahrungsmitteln (Prick-zu-Prick-Test) als auch verschiedene Provokationstests und Eliminationsdiäten. Die Kutantests beruhen auf dem Einbringen des Allergenextraktes unter die Hautoberfläche und dienen überwiegend als screening-Methoden, da sie bei 65 % der Atopiker zu falsch positiven Ergebnissen führen. Zur Verifizierung eines positiven Hauttests wird dem Probanden mittels offener und oraler Provokationstests das potentielle Allergen dargeboten. Führt die Provokation zu positiven Ergebnissen ist ein doppelblindes, placebokontrollierter Expositionstest (DBPCFC) erforderlich, der in der Diagnostik als „goldener Standard“ gilt. Zusätzliche Hinweise können durch Allergiesuchdiäten erhalten werden, die sich durch eine Karenz der in Frage kommenden Lebensmittel definieren. Diese *in-vivo*-Tests werden durch *in-vitro*-Untersuchungen ergänzt, die den erhöhten Gehalt an spezifischem IgE (Radio- bzw. Enzymallergosorbent-Tests RAST bzw. EAST) oder an Mediatorsubstanzen (Histaminfreisetzung, Leukotrientest) im Blut nachweisen (WÜTHRICH 1996a & 1996b; WÜTHRICH & SCHMID-GRENDELMEIER 1995; KLEINE-TEBBE & RYTTER 1997; BINDSLEV-JENSEN 1998; HELBING 1998; SAMPSON 1997). Der positive Antikörpernachweis induziert allerdings nicht zwingend eine klinische Relevanz, sondern kann auch lediglich eine Sensibilisierung anzeigen (THIEL 1991; SAMPSON & HO 1997). Deshalb gilt der DBPCFC zur Zeit als einziger akzeptierter Nachweis einer gesicherten LMA (BRUIJNZEEL-KOOMEN et al. 1995).

1.4 Pollenassoziierte Lebensmittelallergien und Kreuzreaktivitäten

Eine LMA ist in bis zu 80 % der Fälle an die Disposition zu einer Pollenallergie gebunden (ERIKSSON et al. 1982; AULEPP & VIETHS 1992; VIETHS 1996). Dieses Phänomen wird als „pollenassoziierte LMA“ bezeichnet und stellt bei Erwachsenen die häufigste Form der allergischen Erkrankung dar. Diese häufig auf den Oropharynx beschränkte, mild ablaufende Lokalreaktion tritt in den meisten Fällen nach einer entsprechenden Pollensensibilisierung, unabhängig von Symptomen einer Pollinosis, auf (FERNANDEZ-RIVAS et al. 1997). Als Ursache für die zusammen auftretenden Sensibilisierungen werden Strukturähnlichkeiten zwischen den Inhalations- und alimentären Allergenen angesehen. Von einer Kreuzreaktivität spricht man, wenn die vom Organismus sezernierten Antikörper mit zwei oder mehreren Allergenen unterschiedlicher Herkunft interagieren. Sie gilt bei einer Aminosäuresequenzhomologie von mindestens 60 % als bewiesen (CALKHOVEN et al. 1987; DREBORG 1988; EBNER et al. 1991; HELBING 1997).

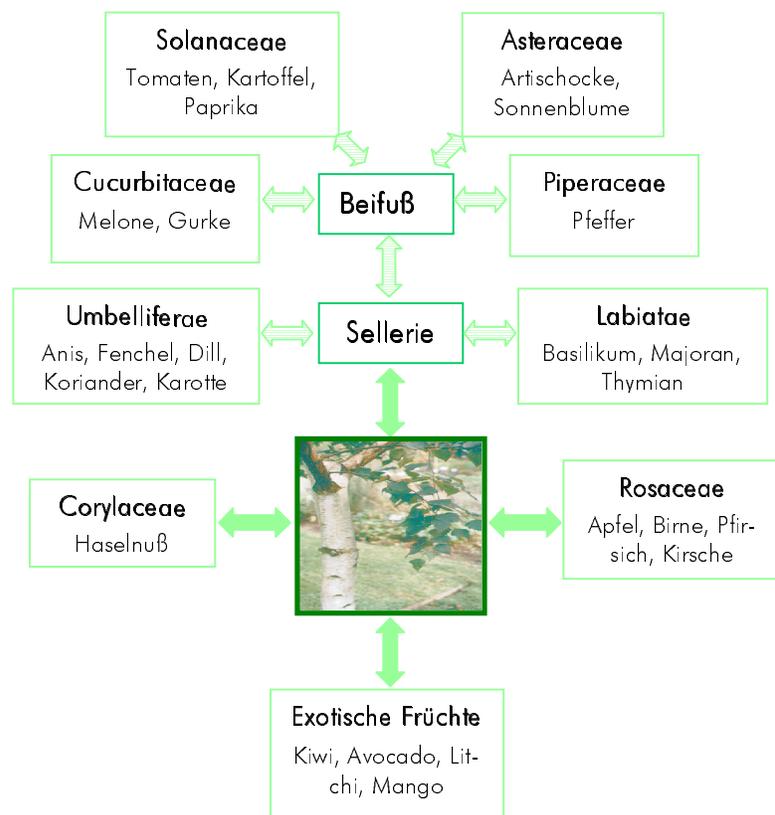
Bei der respiratorischen Allergie auf Birkenpollen wird in 25-75 % der Fälle auch eine assoziierte Nahrungsmittelallergie diagnostiziert (ORTOLANI et al. 1993; PICHLER & STICH 1993). 50-93 % der Birkenpollenallergiker reagieren auch auf Äpfel und Haselnüsse (BJØRKSTEN et al. 1980; THIEL 1988; VIETHS et al. 1993a), zusätzlich werden auch Sensibilisierungen gegen Kiwi, Kirschen, Birnen, Steinobst sowie gegen Sellerie, Karotten oder exotische Früchte beobachtet (HALMEPURO et al.

Abb. 1-V: Pollenassoziierte LM

Eine große Zahl der LMA basieren auf einer Kreuzreaktivität mit Inhalationsallergenen, wobei den Birken- und Beifußpollen eine besondere Bedeutung zukommt.

Von den kreuzreaktiven Allergenen leiten sich sogenannte „Syndrome“ ab:

- ⇒ Sellerie-Beifuß-Karotten-Gewürz-Syndrom
- ⇒ Sellerie-Beifuß-Birkenpollen-Syndrom
- ⇒ Birkenpollen-Nuß-Kernobst-Syndrom



1984; CALKHOVEN et al. 1987; WELLHAUSEN et al. 1996; HELBING 1997; CABALLERO & MARTIN-ESTEBAN 1998). Während bei ca. 10 % der Beifußallergiker auch eine Unverträglichkeit gegen Sellerie, Karotten und Umbelliferen auftritt, kann bei Gräserpollenallergikern nur selten eine Sensi-

bilisierung gegen Nahrungsmittel beobachtet werden (PICHLER & STICH 1993; BOCCAFOGLI et al. 1994; CABALLERO & MARTIN-ESTEBAN 1998). Seit M'RAHI et al. (1991) von einer Kreuzreaktivität zwischen Latex und Bananen berichteten, wurde die Assoziation von Latexallergenen zu diversen Obstproteinen eingehend verifiziert (HELBING 1997). Das Spektrum der von Pollenallergikern nicht tolerierten Lebensmittel ist sehr groß, wobei auch häufig taxonomische Grenzen überschritten werden (z.B. ORTOLANI et al. 1993). Abbildung 1-V gibt einen Überblick über häufig beobachtete Kreuzreaktivitäten.

Für die pollenassoziierten LMA zeigen sich im wesentlichen drei Strukturen verantwortlich. Das für die Kreuzreaktivität zwischen Birkenpollen und vielen Lebensmitteln maßgebliche Protein ist das Bet v 1, das Hauptallergen der Birkenpollen mit einem MG von 17 kDa. Homologe, meist niedermolekulare pflanzliche Allergene, z.B. aus der Petersilie, Kartoffel, Sellerie, Haselnuß sowie aus Kernobst, zeigen eine hohe Sequenzhomologie zum Bet v 1 auf (VIETHS et al. 1993a; SCHÖNING et al. 1995; EBNER et al. 1995).

Als weiteres kreuzreagierendes Protein wurde von VALENTA et al. (1991b) das in sämtlichen eukaryontischen Organismen ubiquitär vorkommende Profilin beschrieben. Dieses als Panallergen identifizierte zweite Hauptallergen der Birke (Bet v 2) besitzt ein MG von 14 kDa, ist Bestandteil des Zytoskeletts und zeigt sich an der Depolymerisation von Actin beteiligt. Während das Bet v 2 zu anderen pflanzlichen Profilinen eine > 75 %ige Sequenzhomologie zeigt, können zu nicht pflanzlichen Profilinen wie z.B. aus menschlichen Thrombozyten erhebliche Abweichungen beobachtet werden. Nachgewiesen wurden Profiline beispielsweise in Hasel-, Lieschgras- und Beifußpollen sowie in Sellerie, Weizen, Mais, Haselnuß und Karotte. Obwohl diese Proteine häufig zu den Minorallergenen gezählt werden, besitzen schätzungsweise 20 % der Pollenallergiker IgE-Antikörper gegen diese Panallergene (VALENTA et al. 1991a & 1991b; VAN REE et al. 1992; VALENTA et al. 1992a & 1992b; MARTINEZ et al. 1995; VALENTA & KRAFT 1996).

Eine dritte kreuzreaktive Struktur im Bereich von 60 kDa wurde von HEISS et al. (1996) in Beifußpollen identifiziert und konnte auch in Pollen der Birke und anderer Bäume sowie in Gräsern und Kräutern, Früchten und Gemüsen nachgewiesen werden.

1.5 Lebensmittelallergien gegen Mango und Litchi

RUBIN et al. beschrieben 1965 erstmals das Auftreten einer Typ I-Reaktion nach dem Verzehr von **Mangos**. Seitdem wurden zahlreiche Fallbeispiele einer Mangoallergie mit diversen klinischen Symptomen publiziert (DANG & BELL 1967; IPPEN 1983; WÜTHRICH & HOFER 1984; JANSEN et al. 1992; GORITSA et al. 1998). Einen besonders schweren Fall einer allergischen Reaktion dokumentieren MIELL et al. (1988). Als Symptome traten nach der Exposition der Mangofrucht Atemnot, Urticaria und Erytheme im Gesicht auf. In der von ANDRÉ et al. 1994 durchgeführten epidemiologischen Studie an einem aus 580 Probanden bestehenden Patientenkollektiv mit einer nachgewiesenen Lebensmittelallergie reagierten 6 % allergisch auf Mangofrüchte. Diese relativ hohe Zahl sensibilisierter Individuen deutet auf eine starke Kreuzreaktivität der Frucht mit anderen Lebensmitteln sowie Pflanzenpollen hin. WÜTHRICH und HOFER (1984) berichten beispielsweise von zwei Probanden, die ohne vorherige Sensibilisierung nach dem Genuß einer Mango allergische Reak-

tionen zeigten und postulieren eine Kreuzreaktion zwischen Mango und Sellerie bzw. Beifußpollen. WELLHAUSEN et al. (1996) wiesen mittels EAST- und Immunoblot-Inhibition eine Kreuzreaktion zwischen einem 35 kDa Minorallergen der Birkenpollen und einem ähnlich schweren Allergen der Mango nach. Ferner untersuchten FERNANDEZ et al. (1995) und FUNES et al. (1999) mittels Hauttests und RAST-Inhibitionstests eine Kreuzsensibilisierung zwischen den Anacardiaceae Pistazie, Cashewnuß und Mango. Beide Studien konnten diverse Allergene (mit MG zwischen 10 und 80 kDa) nachweisen, die teilweise untereinander kreuzreagieren. Auch HENZGEN et al. (1998) dokumentierten Fälle einer beifußpollenassoziierten Mangoallergie. Neben diesen pollenassoziierten Phänomenen scheinen Mangoallergene auch beim Latex-Obst-Syndrom eine wichtige Rolle zu spielen (DUQUE et al. 1999). DIAZ-PERALES et al. (1999) konnten z.B. mittels Immunoblot-Inhibition ein kreuzreaktives 45 kDa Allergen identifizieren; BREHLER et al. (1997) bestätigten die bestehende Kreuzreaktivität durch eine Studie an 136 Patienten.

Weiterhin wird in der Literatur vermehrt von der Kontaktdermatitis im Sinne einer Typ IV-Reaktion gegen die in der Mangofrucht enthaltenen Verbindungen wie Uroshiol, β -Pinen, Cardol und Limonen berichtet (GEROSO & ELPERN 1992; CALVERT et al. 1996; TUCKER & SWAN 1998; FOLSTER-HOLST et al. 2001).

Arbeiten zur Charakterisierung der einzelnen IgE-bindenden Proteine der Mango wurden in der Literatur bisher nur in Ansätzen beschrieben. MÖLLER et al. (1997) gelang der Nachweis von zwei Allergenen mit MG von 30 und 33 kDa. PASCHKE et al. (2001b) konnten ein 30 kDa Allergen sowie ein weiteres mit einem MG von 40 kDa als die Hauptallergene Man i 1 und Man i 2 identifizieren. Des Weiteren wurden sowohl Minorallergene bei 25 kDa, 43 und 67 kDa als auch ein niedermolekulares IgE-bindendes Protein mit einem MG von 14 kDa nachgewiesen, das sowohl mit dem Hauptallergen der Birkenpollen als auch mit pflanzlichen Profilinen kreuzreagiert. In einer Studie von GORITSA et al. (1998) wurde im Immunoblot eine Doppelbande bei 15 kDa und eine weitere bei 38 kDa visualisiert. Auch HENZGEN et al. (1998) befaßten sich mit der Charakterisierung einzelner Mangoallergene und wiesen IgE-bindende Proteine mit MG von 45 und 94 kDa sowie eine Doppelbande bei 15 kDa nach.

Auch wenn der Mangoallergie heutzutage ein steigendes Interesse entgegen gebracht wird, gibt es bisher keine gesicherten Studien über die Stabilität der Allergene gegen technologische Verarbeitungsprozesse, Hitze- und Enzymbehandlung sowie in-vitro Verdauung.

Allergien im Sinne einer Typ-I-Reaktion gegen *Litchi* wurden bisher nicht in einem vergleichbaren Umfang untersucht und dokumentiert. MONTAG et al. (1996) berichten über das Auftreten der klinischen Symptome Urticaria und Erytheme in Verbindung mit Pruritus nach dem Verzehr frischer Litchis. Mittels Hauttestungen und RAST-Inhibitionen konnte zusätzlich eine polyvalente Sensibilisierung gegen verschiedene Baum- und Gräserpollen nachgewiesen werden. Resultierend aus ihren Ergebnissen wird sowohl ein Zusammenhang mit dem Sellerie-Beifuß-Karotten-Gewürz-Syndrom als auch mit einer Kreuzreaktivität zu Birkenpollen und Kiwis postuliert. LEPP et al. (1992) berichten von einer Patientin die nach dem Konsum von Litchis in einem Obstsalat mit generalisiertem Pruritus, Lippen- und Fingerschwellungen, Dyspnoe und Diarrhoe reagierte. Die orale Provokation mit frischen Früchten führte sogar zu Schocksymptomen. Die Haut- und RAST-Tests zeigten ebenfalls

eine Kreuzreaktivität gegen Gras- und Beifußpollen sowie Sesam, Sellerie, Sonnenblumenkerne und Gewürze. FÄH et al. (1995) konnten bei einer nachgewiesenen Pollenallergikerin nach dem Verzehr frischer Litchis eine anaphylaktische Schockreaktion beobachten. Sie konnten mittels Immunoblot (IB) sowie IB- und EAST-Inhibitionen ein Allergen mit einem MG von 16 kDa identifizieren, welches in der Immunfärbung als Doppelbande visualisiert wird. Es scheint sich dabei um das pflanzliche Panallergen Profilin zu handeln, das für die Kreuzreaktionen der Litchi mit verschiedenen Obst- und Gemüsesorten sowie Pollen verantwortlich scheint. WELLHAUSEN et al. (1996) bewiesen unter Nutzung der EAST- und IB-Inhibition die Kreuzreaktivität eines 35 kDa Minorallergens der Birkenpollen mit einem vergleichbar schweren Allergen der Litchi.

Eine durch Litchi ausgelöste Kontaktallergie mit generalisierter Urticaria wurde von GIANNATTASIO et al. (1995) beschrieben.

Detaillierte Charakterisierungen sowie die Identifizierung des Allergenmusters der Litchi wurden bisher nicht dokumentiert. Ebenso besteht ein großer Forschungsbedarf über die Stabilität der Litchiallergene während der technologischen Verarbeitung oder der in-vitro Verdauung sowie über Fragen zur potentiellen Kreuzreaktivität mit anderen Lebensmitteln und Pollen.

1.6 Technologische Verarbeitungsprozesse

Ein Schwerpunkt bei der technologischen Verarbeitung von Lebensmitteln liegt häufig in einer thermischen Behandlung der Rohware. Erhitzen kann beispielsweise das allergene Potential des Lebensmittels sowohl steigern als auch vermindern. Die gängigen technologischen Verfahren wie Autoklavieren, Pasteurisieren, Rösten oder Extrudieren führen zu einer Denaturierung der Proteine, in deren Folge die Epitopstrukturen verändert werden. Wenn die Epitope durch den Erhitzungsprozeß schwerer zugänglich oder abgebaut werden, ist eine Abnahme des allergenen Potentials zu erwarten. Umgekehrt kommt es zu einer Steigerung, wenn vorhandene Epitope frei gelegt werden oder neue allergene Epitope entstehen (VIETHS et al. 1994c). Während die Allergene aus zahlreichen tierischen Lebensmitteln sowie aus Sellerie und Tomaten eine relativ hohe Hitzestabilität aufweisen, sind Allergene von frischen Früchten (zum Beispiel Äpfel) gegen die Einwirkung von Erhitzungsprozessen häufig empfindlich (HAYAKAWA et al. 1999; WIGOTZKI 2001). Sellerie weist nach einer 10 minütigen Mikrowellenbehandlung mit 750 W eine noch recht hohe Allergenität auf, obwohl sich das Api g 1 als eher hitzelabil präsentierte (JANKIEWICZ et al. 1997). Eine Erhitzungsdauer von 3.5 Minuten bei 600 W führt bei Äpfeln dagegen zu einem sehr starken Verlust der allergenen Potenz (VIETHS et al. 1994a). Die nicht-enzymatische Bräunung als wichtigste Folgereaktion einer Hitzebehandlung induziert in einigen Fällen die Bildung von Epitopen, also von Neoallergenen (VIETHS et al. 1997). Die Karotte zeigt nach HELBING et al. (1993) und WÜTHRICH et al. (1990) in einfachen Kochversuchen eine gewisse Hitzelabilität. Diese Ergebnisse konnten von WIGOTZKI (2001) nur bedingt bestätigt werden. Sowohl in Kochversuchen als auch bei der Herstellung verschieden stark erhitzter Saftvarianten konnte stets ein allergenes Restpotential nachgewiesen werden. Auch die Haselnußallergene scheinen gegenüber relativ hohen Rösttemperaturen bis 155 °C weitgehend stabil zu sein. Einen Einfluß auf die allergene Aktivität der IgE-bindenden Proteine zeigten erst Erhitzungstemperaturen über 155 °C (WIGOTZKI et al. 2000).

Mechanische Zerkleinerungsprozesse können durch das Einwirken von Scherkräften Oberflächen-denaturierungen oder Proteinaggregationen hervorrufen (VIETHS et al. 1994c) und somit das allergene Potential beeinflussen. Die Allergenität von Reis wird beispielsweise nahezu vollständig eliminiert, wenn die Körner in Gegenwart eines proteolytischen Enzyms für 24 Stunden bei 37 °C unter Vakuum eingeweicht werden (HAYAKAWA et al. 1999). Eine Enzymierung kann nach VIETHS et al. (1994c) aber auch durch die Strukturveränderung der Proteine eine Zunahme der Allergenität induzieren. Die Laugenschälung bei Pfirsichen und die Ultrafiltration des Saftes sollen nach BRENNAN et al. (2000) einen hypoallergenen, klaren Pfirsichsaft bzw. Pfirsichnektar als Endprodukte ergeben. Neben der Verarbeitung kann auch die Lagerung von Lebensmitteln zu deutlichen Änderungen der Allergenität führen. HSIEH et al. (1995) beobachteten die Zunahme des Hauptallergens des Apfels während einer Kühlung. Dagegen kommt es bei Pekannüssen nach vierwöchiger Lagerung bei 30 °C zur Bildung von Neoallergenen (MALANIN et al. 1995). Dieses hängt vermutlich mit der Synthese von Streßproteinen zusammen (MONERET-VAUTRIN 1998).

In Anbetracht dieser potentiellen Veränderung des allergenen Potentials durch technologische Verarbeitungsprozesse wurden definierte Mango- und Litchierzeugnisse in kleintechnologischem Maßstab hergestellt und produktionsbegleitend untersucht. Diesen Versuchen gingen einfache Erhitzungsversuche im Labormaßstab voran. Bei der Herstellung von Mangopürees und -nektaren werden geschälte und entsteinte Früchte über einen mehrstufigen Passiervorgang zu einem Fruchtmus verarbeitet. Eine anschließende Enzymierung der Pulpe mit Pektinasen bewirkt eine verbesserte Viskosität und erhöht somit die Püreeausbeute von 58 % bei nicht enzymierten Maischen auf 70 % (JOHANN 1987; ASKAR & TREPTOW 1992). Abschließend werden die zuvor entlüfteten Pürees abgefüllt und pasteurisiert. Die Pasteurisation wird entweder bei 90 - 93 °C für 2 min im Röhrenwärmeaustauscher oder durch eine HTST (high temperature short time) Erhitzung für wenige Sekunden bei über 100 °C erzielt (SCHOBINGER 1987; GEIGER 1994). Die anschließende Ausmischung der Halbware zum Nektar erfolgt gemäß FREDSTEDT (1995) durch den Ablauf Homogenisieren, Mischen, Entlüften, Pasteurisieren und Abfüllen. Anhand dieser Produktionsprozesse kann die Stabilität der Mangoallergene gegen Hitzebehandlung, den enzymatischen Gewebeaufschluß und mechanische Beanspruchung evaluiert werden. Die Produktion von Litchi Konserven und Tiefkühl(TK)-Waren mittels gängiger Verfahren ermöglicht die Beurteilung der Auswirkungen thermischer Behandlungen von stückigen Fruchtprodukten auf das allergene Potential. Die eingesetzten Pasteurisationsverfahren werden durch variierende P-Werte charakterisiert, die als prozeßbeschreibende Einheit (HEISS & EICHNER 1995) den mikrobiologischen Abtötungseffekt einer Erhitzung (in min) bei der Bezugstemperatur 93.3 °C (P₀-Wert) angeben. Ein P-Wert von 1 min entspricht dem Abtötungseffekt einer Erhitzung von 1 min bei 93.3 °C. Die Herstellung der TK-Ware erfolgt unter Variation der Gefriereschwindigkeit mittels des IQF-Verfahrens.

1.7 In-vitro Verdauung

Die humane in-vitro Verdauung liegt im Gastrointestinaltrakt lokalisiert und umfaßt den Abbau der vom Menschen aufgenommene Nahrung in eine vom Organismus leicht absorbierbare Form. Proteine und Glycoproteine werden mittels spezifischer Enzyme im Magen- und Darmtrakt zunächst gespalten und anschließend von den Zellen der Darmmucosa unter Beteiligung aktiver Transportvorgänge absorbiert und in die Blutbahn bzw. das Lymphsystem entlassen. Die Verdauung wird bereits im Mundraum eingeleitet und beginnt im Magentrakt durch das Stimulieren der Pepsinproduktion. Die Säure des Magensaftes denaturiert die globulären Proteine und ermöglicht dadurch die enzymatische Hydrolyse. Pepsin spaltet bevorzugt die aminoterminalen Enden aromatischer Aminosäuren. Nach einer Verweildauer von 60 bis 90 Minuten im Magen gelangt der Nahrungsbrei zunächst in den Intestinum tenue (Dünndarm), wo sowohl die enzymatische Spaltung von Nahrungsbestandteilen als auch deren Absorption erfolgt. In einem nun nahezu neutralen Milieu wird der Proteinabbau durch das Einwirken verschiedener Endo- und Exoproteasen fortgeführt. Den letzten Abschnitt der Verdauung bildet der Dickdarm. Hier werden nicht vom Organismus aufgenommene Substanzen hauptsächlich durch Wasserentzug eingedickt. Enzymatische Aktivitäten sind auf die Wirkungsweisen der aus den Darmbakterien stammenden Proteasen beschränkt (LÖFFLER & PETRIDES 1990; LEHNINGER et al. 1994; Gesundheitsweb. 2001).

Eine Sensibilisierung des humanen Immunsystems nach dem Verzehr eines Lebensmittels kann nur gewährleistet sein, wenn bei Eintritt des Chymus in den Darm Proteinfofragmente mit intakten Epitopen vorliegen und die Permeabilität der Darmschleimhaut gewährleistet ist (VIETHS et al. 1999). In Anlehnung an die menschliche Physiologie und die bereits in der Literatur beschriebenen Studien wird eine gastrisch-duodenale Verdauung durchgeführt (KORTEKANGAS-SAVOLAINEN et al. 1993; VIETHS et al. 1999; BURKS 1999). Die Stabilität bisher untersuchter Nahrungsmittelallergene zeigte unter den Bedingungen einer in-vitro Verdauung kein einheitliches Verhalten. In Haselnüssen konnte z.B. im Laufe der enzymatischen Behandlungen eine deutliche Reduktion der Allergenität nachgewiesen werden, während sich die Erdnußallergene relativ persistent zeigen (VIETHS et al. 1999).

2 Material

2.1 Patientenseren

Die für die allergologischen Untersuchungen eingesetzten Blutseren stammen von Patienten mit einer Typ-I-Reaktion oder einer Sensibilisierung gegen Mango bzw. Litchi. Alle rekrutierten Probanden weisen außerdem eine nachgewiesene Birkenpollenallergie mit ausgeprägter Pollinosis auf. Die Allergiker wurden in Zusammenarbeit mit der Hautklinik des Universitätskrankenhauses Eppendorf, Hamburg zu einer Blutentnahme rekrutiert. Nach der Dokumentation ihrer individuellen Anamnese wurde der Gehalt an spezifischen IgE-Antikörpern gegen Mango bzw. Litchi in dem aus dem gespendeten Blut gewonnenen Serum (siehe Anhang 7.1) mittels EAST (siehe Anhang 7.4) bestimmt. Alle eingesetzten Seren weisen EAST-Klassen ≥ 2 auf (Einteilung der EAST-Klassen siehe Anhang 7.4) und werden im Anhang 7.15 detailliert dokumentiert.

Für die immunologischen Untersuchungen wird ein Poolserum, welches ein breites Patientenkollektiv repräsentiert, aus aliquoten Volumina geeigneter Patientenseren zusammengestellt, deren genaue Zusammensetzung den Tabellen 7-VIIA und B in Kapitel 7.15 zu entnehmen ist. Das Blutserum eines nicht atopischen Individuums ohne Lebensmittelunverträglichkeit (EAST-Klasse 0) dient als Kontrolle.

2.2 Mango (*Mangifera Indica* L.)

Die Mango – botanisch *Mangifera Indica* L. – gehört zur Familie der Anacardiaceae und wurde bereits vor 4000 Jahren in Burma und Indien kultiviert. Neben der Mangofrucht gehören die Pistazie und die Cashewnuß zu den bekanntesten Vertretern der Anacardiaceae. Heutzutage werden einige hundert Mangosorten in 87 Ländern der Erde angebaut (KALRA et al.1995; Internet: ‚MANGO fruit facts‘). Der immergrüne Mangobaum kann eine Höhe von 30 m erreichen und trägt



Abb. 2-1: *Mangifera Indica* L.

erstmal nach 4 bis 6 Jahren Früchte, die sich aus einem oberständigen Fruchtknoten entwickeln. Mangos lassen sich grundsätzlich in den philippinischen und in den indischen Typ unterteilen, die sowohl in Größe als auch in Form und Gewicht variieren. Bisher sind über 1000 Sorten, charakterisiert durch differente Form, Textur, Geschmack und Klimaansprüche, bekannt. Abbildung 2-1 zeigt eine Mango der Sorte „Tommy Atkins“ aus Brasilien. Die Form der Steinfrucht läßt sich bei einer Größe von 6 bis 24 cm Länge überwiegend als nierenförmig bezeichnen, kann aber auch eine nahezu runde oder herzförmige Form annehmen. Das Gewicht schwankt zwischen 300 g und 2 kg,

für die Frischvermarktung werden jedoch 8 bis 12 cm lange und 200 bis 400 g schwere Früchte bevorzugt. Die nicht eßbare, ledrige, zuweilen auch rotbäckige Haut zeigt je nach Sorte eine grüne oder gelbe bis orange-rote Grundfärbung und umschließt das gelb-orange saftige Mesokarp. In

dieses Fruchtfleisch ist der große, flache Kern faserig verwachsen, so daß er sich nur schlecht herauslösen läßt. (LIEBSTER 1990; FRANKE 1997; SAULS 1999). Während des Reifungsprozesses finden zahlreiche biochemische Veränderungen statt, die durch eine autokatalytische Synthese von Ethylen initiiert werden. Der daraus resultierende Anstieg der Respiration erreicht 6 bis 10 Tage nach der Ernte ein Maximum. Dieses mit der Zunahme der Atmungsaktivität verbundene als „Klimakterium“ bezeichnete Phänomen bedingt eine schnelle Nachreife und somit eine nur sehr begrenzte Haltbarkeit der Frucht (KALRA et al. 1995). Die Mangos werden demzufolge bereits im unreifen Zustand geerntet und in Spezialgebinden bei 8 - 10 °C und 90 %iger Luftfeuchtigkeit gelagert. Frischfruchtimporte liefern Thailand von Januar bis Mai, Mexiko und Florida von Mai bis September, Kenia von November bis Juni sowie Südafrika von Dezember bis Mai und Indien nahezu ganzjährig (FRANKE 1997; Internet: ‚MANGO fruit facts‘). Das weltweite Produktionsvolumen von Mangofrüchten liegt derzeit bei 24.5 Millionen Tonnen, wobei Indien mit einer Ernte von 12 Millionen Tonnen zu den Haupterzeugerländern gehört. Der fortwährende Anstieg des Importvolumens frischer Mangos von 10.1 (1993) auf 17.4 Tausend Tonnen (1998) in Deutschland dokumentiert den Stellenwert der neben der Banane beliebtesten Tropenfrucht (FAO 2000). Verzehrt werden die Früchte überwiegend im reifen, frischen Zustand, aber auch Naßkonserven, Nektare, Trockenprodukte, Pürees, Konfitüren und Chutneys finden zunehmend größeren Absatz. (LIEBSTER 1990; FRANKE 1997; Internet: ‚MANGO fruit facts‘). In den asiatischen Gebieten gelten die grünen, unreifen Mangos mit einem gurkenähnlichen Geschmack als Delikatesse (JAGTIANI et al. 1988). Der eßbare Anteil der Mango enthält neben 0.6 % Protein und 12.5 % Kohlenhydrate, kaum Fett (0.3 %), dafür aber einen relativ hohen Gehalt an Ballaststoffen (1.7 %), Provitamin A (3 mg/100g) und Vitamin C (40 mg/100g). Weiterhin zeichnet sich die Mango häufig durch einen unangenehmen terpentinartigen Beigeschmack aus, der allerdings durch eine kühle Lagerung vor dem Verzehr reduziert werden kann.

2.2.1 Frische Früchte

Von den über 1000 bekannten Sorten wurden sieben für die Untersuchung ihres allergenen Potentials ausgewählt. Dabei wurde sowohl ein nationaler als auch ein Länder übergreifender Sortenvergleich durchgeführt. Als Untersuchungsmaterial dienten die in Thailand beliebtesten Varietäten „Nam Dok Mai“ („NDM“), „Kaew“, „Choke Anan“ („CA“) und „Nang Klang Wan“ („NKW“), sowie die Sorten „Keitt“ aus Mexiko, „Tommy Atkins“ („TA“) aus Brasilien, „Kent“ aus Brasilien und „Eden“ aus Israel. „TA“ wird in Europa aufgrund ihres angenehmen Geschmacks sehr häufig als Frischfrucht verzehrt. Ebenso werden die Sorten „NDM“, „NKW“ und „Eden“ ausschließlich frisch vermarktet, während die Varietät „Kent“ eher zu den industriell verarbeiteten Sorten zählt. Die von der Konservenindustrie häufig eingesetzte Sorte „Kaew“ wird primär zu ‚Mangoscheiben in Sirup‘ verarbeitet, aber auch zur Püree- und Nektarproduktion eingesetzt. Während diese Sorte nur zur Haupterntezeit (April-Mai) in größerer Menge zur Verfügung steht, ist die Sorte „CA“ ganzjährig verfügbar. Aufgrund ihrer Textur ist sie nur zur Püree- und Nektarproduktion geeignet. Die thailändischen Früchte wurden ertefrisch von der University of Chiang Mai, Thailand zur Verfügung ge-

stellt. Die anderen Sorten wurden unter Angabe der Sorte und des Herkunftslandes entweder vom Großmarkt Stuttgart oder Grindelshop Hamburg bezogen. (siehe Anhang 7.16.1)

Reife

Zur Bestimmung des Einflusses des Reifegrades der Mango auf das allergene Potential wurden vom Erwerb der Früchte bis zum Erreichen der Vollreife Proben der Schale und des Fruchtfleisches der Sorten „TA“ und „Kent“ untersucht und ausgewertet. Die etwa 7 Tage zuvor geernteten Mangofrüchte befanden sich zu Beginn der Untersuchung in einem physiologisch reifen Status mit einer grünfarbenen Schale und fester Konsistenz. Dieser Zustand wird als „mature green“ bezeichnet. Die Früchte wurden während des Untersuchungszeitraums bei 20 ± 1 °C ohne Reifungsbeschleuniger und kontrollierter Atmosphäre gelagert. Die Probenentnahme erfolgte sowohl am Bezugstag (0.Tag), als auch nach 2, 4, 6 und 8 Tagen Lagerung.

Fraktionierung

Der Reifungsprozeß der Mangofrucht ist durch eine ungleichmäßige Erweichung des Fruchtfleischgewebes charakterisiert. Dieses Phänomen läßt sich nach MITCHAM & MCDONALD (1992) auf eine unterschiedlich hohe Aktivität der Polygalacturonase innerhalb der Frucht zurückführen, wodurch eine inhomogene Frucht reife resultiert. Von vollreifen Mangofrüchten der Sorten „TA“, „Kent“ und „Kaew“ wurden separate Bereiche des Fruchtfleisches untersucht, um eine potentiell ungleichmäßige Verteilung der allergenen Proteine im Fruchtfleisch verifizieren zu können. Abbildung 2-II illustriert die untersuchten Bereiche des Mesokarps. Fraktion 1 entspricht dem Fruchtgewebe, welches dem Stiel gegenüberliegt. Aufgrund der asymmetrischen Form der Frucht werden aus dem Oberflächenbereich die zwei Fraktionen 2 und 3 differenziert. Das Fruchtfleisch (=Mesokarp) um den Kernbereich wird als Fraktion 4 klassifiziert. Die Schale (=Perikarp) wurde separat untersucht.

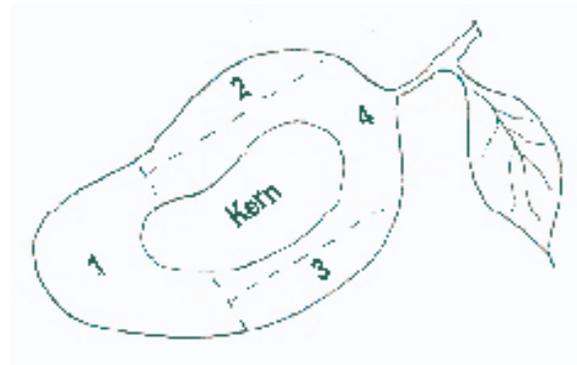


Abb. 2- II: Definition der immunologisch untersuchten Fruchtfleischfraktionen 1-4

„In-vitro Verdauung“

Für die Untersuchungen der simulierten in-vitro Verdauung wurden frische Mangofrüchte der Sorte „TA“ aus Brasilien eingesetzt. Für die Verdauung wurde das gewürfelte Mesokarp der Mango in einer phosphatgepufferten Kochsalzlösung beim jeweiligen pH-Optimum des Enzyms bei 37 °C mit unterschiedlicher Enzymkonzentration über verschiedene Zeiten inkubiert (Durchführung siehe Anhang 7.2.2).

2.2.2 Fluide und feste Mangoerzeugnisse

Im Institut für Lebensmitteltechnologie der UH wurden mittels der industriell üblicherweise eingesetzten technologischen Verfahren zunächst verschiedene Mangopüree-Varianten und daraus abgeleitete Mangonektare im kleintechnologischen Maßstab hergestellt (siehe Anhang 7.1 6.1).

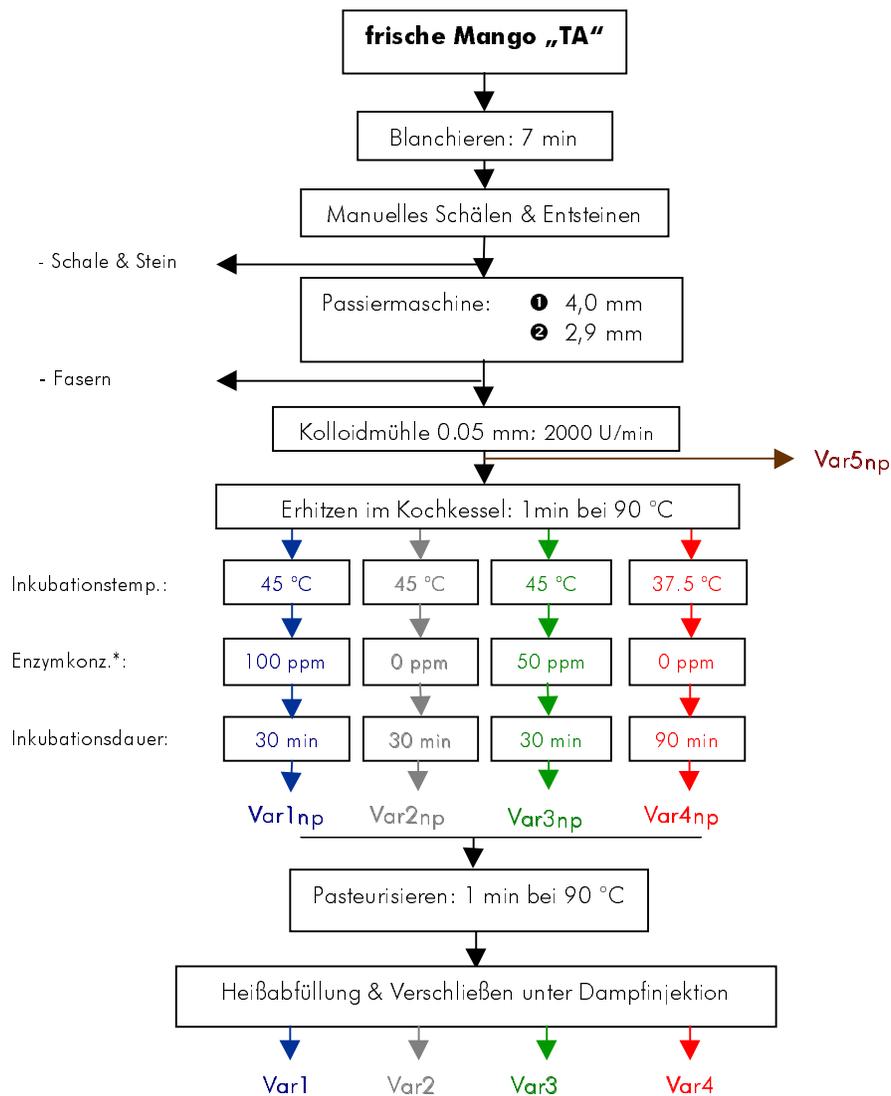


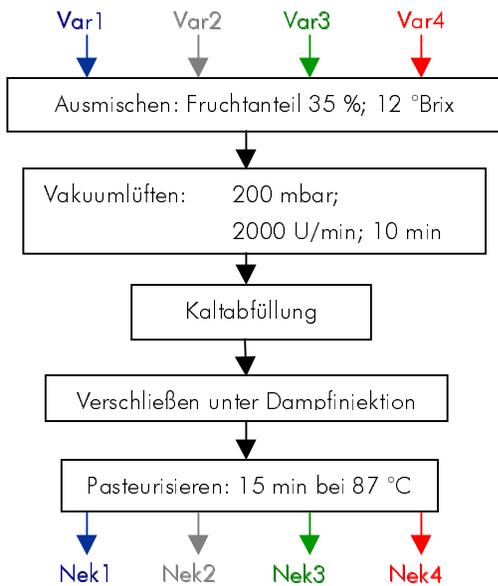
Abb. 2-III: Produktionsablauf der verschiedenen „Mangopüree“-Varianten

* Mischung aus zwei Pektinasen der Fa. Röhm: Rohament PL (Polygalacturonase) und Rohapect PTE (Pektinlyase) im Verhältnis 1:1.5

Als Schwerpunkt der Püree-Herstellung wurde eine Prozeßoptimierung hinsichtlich des enzymatischen Gewebeaufschlußgrades sowie der thermischen Behandlung und deren Auswirkungen auf das allergene Potential der Mango durchgeführt. Abbildung 2-III illustriert den verwendeten Produktionsablauf. Die Varianten 1-4 entsprechen den nach einem statistischen Versuchsplan hergestellten fertigen Mangopürees mit variierenden Enzymierungsparametern (Enzymkonzentrationen, Inkubationsdauer und -temperatur). Die Varianten 1-4np stellen die Zwischenstufen dieser Pürees

vor der abschließenden Pasteurisation dar, während die **Variante 5np** ein unpasteurisiertes Püree unmittelbar nach dem Passiervorgang ohne Enzymbehandlung darstellt und als Kontrolle einzustufen ist.

Die Ausmischung der pasteurisierten Pürees (Var 1-4) zu den jeweiligen Nektaren erfolgte mit einer



Saccharoselösung (65 °Brix) entsprechend den gesetzlichen Bestimmungen nach der Verordnung über Fruchtnektar und Fruchtsirup (i.d.F. vom 17.Feb.1982, Lebensmittelrecht, Stand: 2001) auf einen Fruchtgehalt von 35 % und 12 °Brix. Anhand dieser Verdünnung und der erneuten Pasteurisation können Aussagen über die Stabilität der Mangoallergene bei mehrfacher Hitzeeinwirkung und mechanischer Einflüsse erarbeitet werden. Abbildung 2-IV zeigt das Fließschema zur Herstellung der Mangonektare Nek1-Nek4.

Abb. 2-IV: Produktionsablauf der „Mangonektare“

Die Untersuchung von festen Mangoprodukten erfolgte anhand in der UH definiert hergestellter getrockneter Mangoscheiben aus der Sorte „Keitt“ (Mexiko). Es wurde dabei der Einfluß der Trocknungstemperatur und -dauer (Variante NT), der Schwefelung (Variante S) sowie der Zerkleinerung und des Blanchierens (Variante Leder) auf das allergene Potential der Mango untersucht. Die genauen Produktionsbedingungen sind der Tabelle 2-I sowie dem Anhang 7.16.1 zu entnehmen.

Die Untersuchung von festen Mangoprodukten erfolgte anhand in der UH definiert hergestellter getrockneter Mangoscheiben aus der Sorte „Keitt“ (Mexiko). Es wurde dabei der Einfluß der Trocknungstemperatur und -dauer (Variante NT), der Schwefelung (Variante S) sowie der Zerkleinerung und des Blanchierens (Variante Leder) auf das allergene Potential der Mango untersucht. Die genauen Produktionsbedingungen sind der Tabelle 2-I sowie dem Anhang 7.16.1 zu entnehmen.

Tab. 2-I: Prozeßparameter bei der Herstellung der getrockneten Mangoerzeugnisse

| | Kontrolle | Niedertemperatur | geschwefelt | Leder |
|----------------------|-----------|------------------|--------------------------|---------------------|
| Vorbehandlung | - | - | 5 %ig NaHSO ₃ | püriert, blanchiert |
| Trocknungstemperatur | 5 h | 14 h | 5 h | 9 h |
| Trocknungsdauer | 70 °C | 45 °C | 70 °C | 65 °C |

Abschließend wurden die allergologischen Ergebnisse aller selbst produzierten Erzeugnisse mit handelsüblichen Mangonektaren bzw. Fruchtsaftgetränken sowie mit Mangopürees und Trockenprodukten verglichen. Eine detaillierte Auflistung dieser Produkte findet sich in Anhang 7.16.1.

2.3 Litchi (*Litchi chinensis* SONN.)

Die Litchi - auch bekannt als Litchipflaume oder Chinesische Haselnuß – gehört neben den Früchten Longan und Rambutan zur Familie der Sapindaceae. Die bereits seit ca. 3000 Jahren in Südchina kultivierte Frucht wird heute in vielen trockenen subtropischen Gebieten der ganzen Welt angebaut. Neben Frischfruchtimporten aus Taiwan, Indien, China und Madagaskar sind auch Litchis aus Neuseeland, Brasilien, Südafrika und Florida im Handel erhältlich. Thailand stellt mit seinem Hauptanbaugebiet um Chiang Mai den fünftgrößten Litchiproduzenten dar. Die exotische Frucht wächst büschelweise an 10 bis 12 m hohen mit Fiederblättern besetzten Bäumen. Die bis zu pflaumengroßen Steinfrüchte mit einer dünnen, weinroten, später braunen Schale entwickeln sich aus den oberständigen Fruchtknoten. Die Haut der Litchi ist spröde und scheint aus fünf- oder sechseckigen Feldern zusammengesetzt, die jeweils in ihrer Mitte mit einer kurzen, zipfeligen Spitze enden. Die in Abbildung 2-V dargestellten Früchte der Sorte „Mauritius“ aus Madagaskar zeigen sowohl die noppenartige Struktur der Haut als auch das unter der Schale sitzende, saftreiche Fruchtfleisch. Der fleischig weiße, perlmuttartige durchscheinende Arillus umschließt einen glänzend braunen, ungenießbaren Samen. Die Litchi ist durch ein säuerlich-süßes an Sauerkirschen erinnerndes Aroma mit einem leichten muskatartigen Beigeschmack charakterisiert. Der verzehrbare Fruchtanteil, bestehend aus 80 % Wasser, 0,9 % Eiweiß, 17 % Kohlenhydrate und 0,3 % Fett, zeichnet sich durch seinen hohen Vitamin C- (45 mg/100g) und Eisen-Gehalt (350 µg/100 g) aus (LIEBSTER 1990; FRANKE 1997; www.Fruechte-Kuester 2001). Die Frucht wird sowohl in den Anbaugebieten als auch in den europäischen Länder überwiegend roh verzehrt. In der zweimonatigen Haupternteperiode wird zum Abfangen des saisonalen Obstüberschusses die Herstellung von Konserven, Trockenprodukten und Saftgetränken fokussiert. Die Weltproduktion der Litchis lag 1994 bei 200 000 Tonnen (FAO 2000). Die sehr leicht verderblichen Frischfrüchte werden zwar aufgrund verbesserter Transport- und Lagerbedingungen zunehmend exportiert, eine alternative Verarbeitung zu hochwertigen, export- und konkurrenzfähigen Produkten und Halbwaren ist dennoch unvermeidbar. (FRANKE 1997; KADER 1999).



Abb. 2-V: *Litchi chinensis* SONN.

2.3.1 Frische Früchte

Für die Untersuchung der Abhängigkeit der Sorte auf das allergene Potential wurden sowohl die vier Varietäten „Bai dum“, „Chacapat“, „Hong Huey“ und „Kuan Chao“ aus Thailand als auch die Sorten „Mauritius“ und „Cope“ aus Südafrika und eine weitere Sorte aus Madagaskar eingesetzt. Die vier thailändischen Varietäten wurden direkt aus Thailand durch die Kooperation mit der University of Chiang Mai bezogen. Die anderen eingesetzten Früchte entstammten den Großmärkten Stuttgart bzw. Hamburg. Die Sorte „Mauritius“ sowie die aus Madagaskar stammende Varietät

wurden zusätzlich zur Charakterisierung der Litchiallergene eingesetzt. Diese umfaßte sowohl die Identifizierung des Allergenspektrums und der isoelektrischen Punkte als auch die Sequenzanalyse und die Untersuchungen zur Kreuzreaktivität mit anderen Lebensmitteln. Potentielle Unterschiede der IgE-bindenden Proteinmuster der Schale und des Arillus (Mesokarp) wurden anhand der thailändischen Sorten „Chacapat“ und „Hong Huey“ verifiziert.

„In-vitro Verdauung“

Für die Untersuchungen der simulierten in-vitro Verdauung wurden südafrikanische Litchis der Sorte „Cope“ eingesetzt. Für die Verdauung fand anlag zur Mango (siehe 2.2.1) das gewürfelte Fruchtfleisch Verwendung, welches gemäß der in Anhang 7.2.2 detailliert aufgeführten Vorschrift behandelt wurde.

2.3.2 Verarbeitete Litchierzeugnisse

Zur Untersuchung der thermischen Stabilität der Litchiallergene wurden in Zusammenarbeit mit der UH sowohl Litchikonserven als auch tiefgefrorene Produkte unter verschiedenen Prozeßparametern im Technikumsmaßstab hergestellt. Bei der Konservenproduktion wird der Einfluß der thermischen Belastung durch eine Variation des P-Wertes simuliert. Litchis weisen je nach Sorte vergleichsweise hohe pH-Werte zwischen 3.8 und 5.2 auf (RUNGE et al. 1996), wodurch ihre thermische Konservierung erschwert wird. Eine Pasteurisation (Erhitzung unter 100 °C) ist nur nach vorheriger Ansäuerung (mit Citronensäure) des Aufgusses auf pH 3.5 bzw. auf 4.5 möglich. Die Zuckerkonzentration im Aufguß wird gemäß den Leitsätzen für verarbeitetes Obst des Deutschen Lebensmittelbuchs (i.d.F.vom 17.4.1997, Lebensmittelrecht, Stand: 2001) eingestellt. Demnach werden Litchis überwiegend in der Form „gezuckert“, d.h. mit 17 bis 20 °Brix im Fertigerzeugnis angeboten, was aus der hohen löslichen Trockenmasse erntefrischer, vollreifer Früchte resultiert. Abweichend von den Leitsätzen wurden Litchihälften anstatt ganzer Früchte (ohne Stein) eingedost. Tabelle 2-II beschreibt die hergestellten Varianten. Die jeweilige Chargengröße von 4.5 kg Frucht entsprach 13 Dosen. Die gewaschenen und verlesenen Früchte wurden manuell geschält, entsteint und halbiert. Die Litchihälften wurden in beschichtete Aluminiumdosen (83 x 85.6 mm) gefüllt und anschließend mit Vollaufguß versehen. Beim Verschließen mit einer halbautomatischen Vakuumdosenverschließmaschine wurde durch ein Vakuum von 300 mbar der Sauerstoff aus dem Kopfraum ent-

Tab. 2-I: Hergestellte Konservenvarianten

| Konservenvariante | K-1 | K-2 | K-3 | K-4 | K-5 | K-6 | K-7 | K-8 | K-9 |
|-------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| pH-Wert | 3.5 | 3.5 | 4.3 | 4.5 | | | | | |
| P-Wert SOLL [min] | 1 | 2 | 4 | 6 | 6 | 10 | 15 | 20 | - |
| F-Wert SOLL [min] | - | - | - | - | - | - | - | - | 12 |
| Temperatur [°C] | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 120 |

fernt. Die Pasteurisation (Probenbezeichnung K-1 bis K-8) erfolgte im Rotationsautoklav bei 90 °C unter Rotation der Dosen mit 7 U/min. Die Variante K-9 wurde unter gleichen Rotationsbedingungen bei 120 °C sterilisiert. Nach Beendigung der Abkühlphase wurden die Dosen bis zur Analyse bei 4 °C gelagert. (siehe Anhang 7.16.2).

Da Gefrier-Tau-Prozesse eine Veränderung der Allergenität infolge der Schädigung des Zellgewebes durch die mechanische Wirkung von Eiskristallen und durch osmotisch induzierte Konzentrationsverschiebungen in der Zelle bewirken könnten, wurden vier verschiedene TK-Waren nach dem IQF-Verfahren hergestellt. Bei diesen Verfahren wird jedes einzelne Stück des Gefrierguts während des Gefrierprozesses unmittelbar dem Kühlmedium ausgesetzt und anschließend tiefgefroren verpackt, wodurch im Unterschied zu den für verpacktes Obst anwendbaren Plattengefrierverfahren schüttfähige, frei fließende Ware erzeugt werden kann. Der Vorgang erfolgte batchweise in einer Temperaturtestkammer mit durch flüssigem Stickstoff (LN₂) gekühlter Luft, wobei die Gefriereschwindigkeit durch die Temperatur des Wärmeübertragers variiert wurde. Tabelle 2-III stellt die unterschiedlichen Prozessparameter dar. Zusätzliche Informationen sind dem Anhang 7.16.2 zu entnehmen.

Tab. 2-II: Hergestellte TK-Ware

| Tiefgefriervariante | TK-1 | TK-2 | TK-3 | TK-4 |
|--------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Kühlmedium | Luft / LN ₂ -Gemisch | Luft / LN ₂ -Gemisch | Luft / LN ₂ -Gemisch | LN ₂ [Tauchverfahren] |
| Temperatur [°C] | -25 | -40 | gestuft: 1] -25 2] -40 | -196 |
| Dauer Gefrierphase [min] | 12.3 | 5.0 | 12.9 | - |

Zur Beurteilung der Lagerstabilität dieser generell sehr haltbaren Erzeugnisse wurden die Konservenvarianten K-1 bis K-4 für 9 Monate bei 4 °C und die TK-Ware TK-1 bis TK-4 für 12 Monate bei – 20 °C gelagert.

Ergänzend zu den beschriebenen Studien wurden sowohl in Thailand nach nationalem Know-How definiert hergestellte Litchi-Konserven (Proben K-Thail.) und TK-Produkte (Proben TK-T) als auch kommerziell erhältliche Halbwaren (Konserven und Pürees) aufgearbeitet und auf ihr allergenes Potential untersucht. Die Herstellung der thailändischen Konserven erfolgte aus manuell geschälten und entkernten Litchifrüchten. Die Früchte wurden zunächst 10 bis 15 Minuten mit einer 0.3 %igen Calciumchloridlösung behandelt, anschließend gewaschen, in Dosen gefüllt und mit einem Aufguß (Zuckergehalt 30 °Brix + 0.1 % Citronensäure) versehen. Die Konserven wurden nach einer Vorerhitzung bei 80 - 83 °C für 7 Minuten versiegelt und für 15 Minuten bei 100 °C pasteurisiert. Die Lagerung der abgekühlten Erzeugnisse erfolgte unter Raumtemperatur (25 – 30 °C) für 24 h sowie 2, 4 und 6 Monate (K-Thail.I bis K-Thail.III). Die Beschreibung dieser Erzeugnisse findet sich im Anhang 7.16.2. Die thailändische TK-Ware wurde ebenfalls mittels des IQF-Verfahrens produziert. Abweichend zu den in Hohenheim hergestellten Proben wurden die Früchte zunächst mit einer Na-

triumhypochloridlösung (20 mg/kg) behandelt, gewaschen und getrocknet. Nach einer Kühlung auf 15 °C erfolgte der Gefrierprozeß bei -38 bis -40 °C (Produktendtemperatur:-18 °C) für 1]: 23 Minuten und 2]: 28 Minuten. Die Beschreibung dieser Produkte (TK-T-1/2) ist dem Anhang 7.16.2 zu entnehmen.

Abschließend wurde das Fruchtfleisch zweier mittels unterschiedlicher Verfahren geschälter Litchis vergleichend untersucht. Aufgrund der Form der Frucht und der Konsistenz der Schale werden diese exotischen Früchte in den Herkunftsländern noch manuell geschält und entkernt. Diese zeitaufwendige und mühsame Arbeit könnte durch ein enzymatisches an der UH entwickeltes Schälverfahren ersetzt werden. Es wurden neben den enzymatisch geschälten, frischen Litchiprobe auch manuell geschälte Früchte von der UH zur Verfügung gestellt und auf ihr allergenes Potential untersucht.

2.4 Enzyme

Die Untersuchungen des Einflusses einer simulierten in-vitro Verdauung auf die Stabilität der Allergene der Mango bzw. Litchi erfolgten unter Verwendung folgender charakteristischer Enzyme:

Um die Verdauung im **Magen** nachvollziehen zu können, wurde das Hauptenzym *Pepsin* [EC 3.4.23.1] aus der Schweinemagenschleimhaut mit einer Aktivität von 452 Units/mg (gemessen am Substrat Hämoglobin) und einem pH-Optimum von 2.0 verwendet. Pepsin gehört zur Gruppe der Endopeptidasen und wird aus der inaktiven Vorstufe Pepsinogen im sauren Milieu gebildet. Der dabei entstehende Pepsin-Inhibitor-Komplex zerfällt unterhalb von pH 5.4 in aktives Pepsin (MG: 34.5 kDa) und den Inhibitor (MG: 3.1 kDa). Die Spezifität von Pepsin ist relativ breit, bevorzugt werden die Peptidbindungen am Carboxylende von Phenylalanin, Methionin, Leucin oder Tryptophan gespalten.

Um die Verdauung der Proteine im **Darm** nachzuvollziehen, wurden die Enzyme Trypsin, Chymotrypsin, Carboxypeptidase A, Pancreatin (ein Gemisch aus Trypsin, Chymotrypsin, Elastase, Amylasen und Lipasen) und die Protease K des Pilzes *Tritirarchium album* verwendet:

Bei *Trypsin* [EC 3.4.21.4] handelt es sich um eine Endopeptidase aus dem Sekret des Rinderpancreas mit einer Aktivität von 10900 Units/mg und einem pH-Optimum von 7.6. Das aktive Trypsin (MG: 23.3 kDa) wird in Gegenwart von Calcium durch eine Enterokinase oder durch Autokatalyse aus der Vorstufe Trypsinogen durch Abspaltung eines Hexapeptids gebildet. Trypsin spaltet Peptidbindungen spezifisch am Carboxylende der basischen Aminosäuren Lysin und Arginin. Bindungen mit Prolin am Carboxylende spielen ebenso eine untergeordnete Rolle wie Spaltungen an aromatischen Aminosäuren.

Das eingesetzte *Chymotrypsin* [EC 3.4.21.1] (MG: 25 kDa) entstammt dem Rinderpancreas und weist eine Aktivität von 350 Units/mg (gemessen am Substrat N-Acetyl-L-tyrosin-ethylester) und ein pH-Optimum von 8.0 auf. Die Vorstufe des Chymotrypsins wird durch Trypsin gespalten, so daß

das aktive Zentrum durch eine Konformationsänderung ausgebildet wird. Diese Endopeptidase hydrolysiert Peptidbindungen am Ende der aromatischen Aminosäurereste von Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan. Die Inkubation erfolgte einzeln und in Kombination mit Trypsin.

Pancreatin stellt eine Mischung der im Pankreas-Sekret enthaltenen Verdauungsenzyme Chymotrypsin, Trypsin, Elastase, Amylasen sowie Lipasen dar. Das verwendete Enzym stammt aus dem Schweinepancreas mit einer Aktivität, die dem vierfachen einer USP-Spezifikation entspricht. Eine USP-Spezifikation verdaut mindestens 25-mal des eigenen Enzymgewichts innerhalb von 60 Minuten bei einem pH-Wert von 7.5 (gemessen am Substrat Casein). Es wurde einzeln und in Kombination mit Carboxypeptidase A und Protease K zur Inkubation eingesetzt.

Die Exopeptidase **Carboxypeptidase** [EC 3.4.17.1] zählt zu den Zinkproteinen und weist ein MG von 34 kDa auf. Die aktive Form „A“ zeigt eine bevorzugte Affinität zu aromatischen Aminosäuren und spaltet diese vom Carboxylende ausgehend ab. Eingesetzt wurde eine Carboxypeptidase A in Form einer Suspension aus dem Rinderpancreas mit einer Aktivität von 1058 Units/mL (gemessen am Substrat Hippuryl-L-phenylalanin) und einem pH-Optimum von 7.

Mittels der **Protease K** [EC 3.4.21.14] wurde der Einfluß der Dickdarmflora auf die Verdauung der exotischen Früchte untersucht. Die verwendete Serin-Endopeptidase entstammt dem Pilz *Tritirachium album* und zeigt eine Aktivität von 13.4 Units/mg (gemessen am Substrat Casein). Bei einem pH-Optimum zwischen 7.0 und 8.0 werden bevorzugt die Peptidbindungen am Carboxylende von hydrophoben, N-substituierten Aminosäuren gespalten.

Bei der Herstellung der fluiden Mangoprodukte fanden zwei Pektinasen Verwendung, die üblicherweise zur Klärung und Depektinisierung von Fruchtsäften bzw. zur Gewinnung von fruchtfleischhaltigen Nektaren industriell verwendet werden. Durch die Maischeenzymierung kann die Viskosität und somit das Fließverhalten der Pürees verbessert und eine erhöhte Ausbeute erreicht werden (JOHANN 1987).

Die Polygalacturonase **Rohament PL** [EC 3.2.1.15] ist eine Poly-[1,4- α -D-Galacturonid]-glycanohydrolase mit einem MG von 30 – 46 kDa. Das zu den Endogalacturonasen zählende Enzym spaltet Pektin durch die Hydrolyse der Pektinsäuren im Inneren der Moleküle bei einem pH-Optimum von 4 bis 7.

Die Pektinlyase **Rohapect PTE** [EC 4.2.2.10] ist eine Poly[methoxy-galacturonid]-lyase mit einem MG von ca. 30 kDa. Sie spaltet Pektin eliminativ nach einem Endomechanismus bei einem pH-Optimum von 7.0.

3 Methoden

3.1 Übersicht der eingesetzten Methoden

Für die allergologischen Untersuchungen und die Charakterisierung der Mango- bzw. Litchi-Allergene wurden überwiegend etablierte und in der Literatur bereits hinreichend beschriebene immunologische und chemische Methoden eingesetzt. Während Abbildung 3-1 zunächst einen Überblick über die Zusammenhänge der durchgeführten Analytik vermittelt, werden in den folgenden Abschnitten die Prinzipien der einzelnen Methoden kurz vorgestellt und Modifikationen erläutert. Als Ausgangspunkt ist die Proteinextraktion aus dem jeweiligen Probenmaterial zu sehen. Anschließend wurden je nach Untersuchungsziel Methoden zur Quantifizierung, zur Charakterisierung oder zur Isolierung der Proteine eingesetzt.

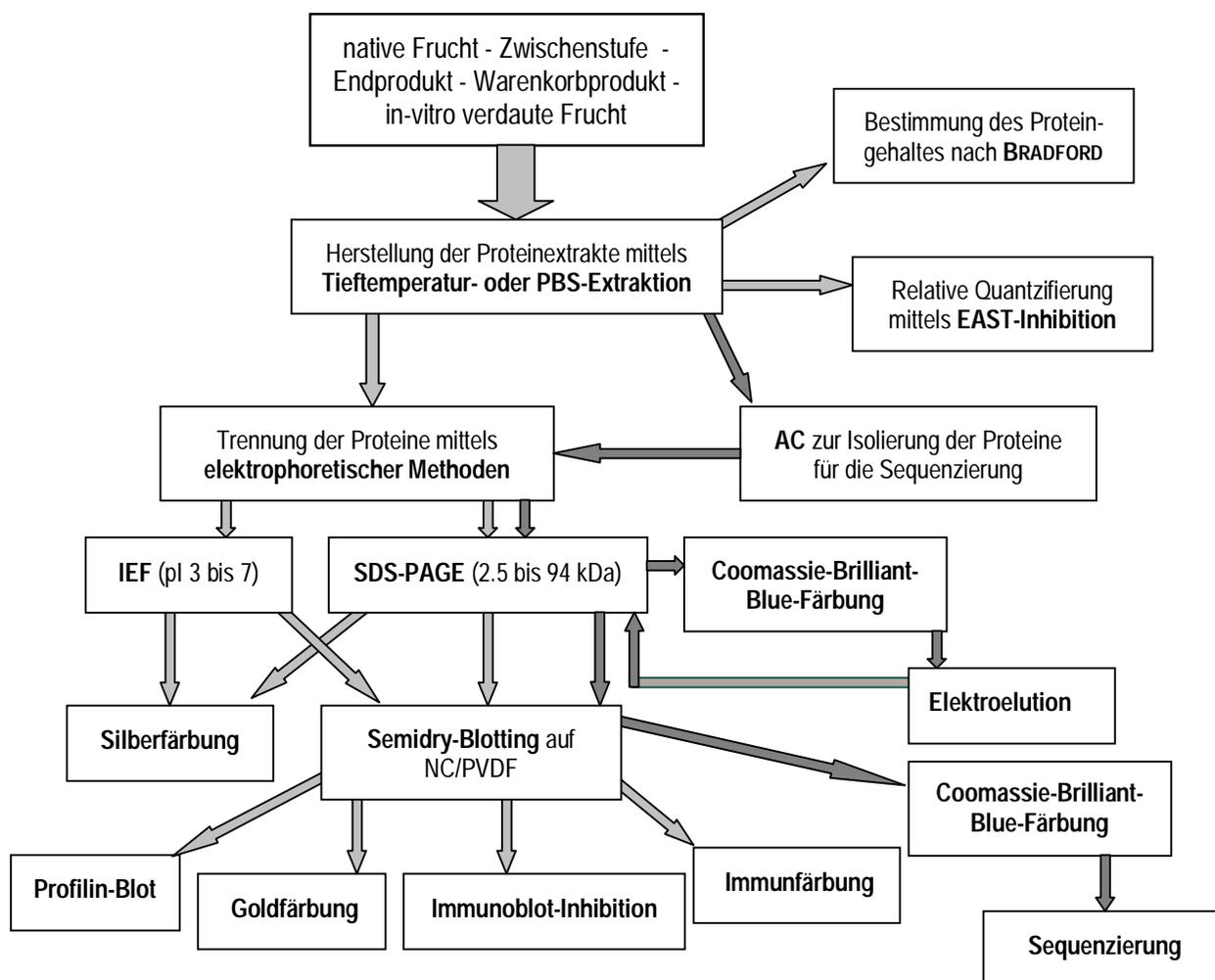


Abb. 3-1: Übersicht der eingesetzten Methoden

3.2 Proteinextraktion

Eine Grundvoraussetzung für repräsentative Untersuchungen von Lebensmittelallergenen ist die reproduzierbare und quantitative Extraktion der globulären Proteine und Glycoproteine aus dem Probenmaterial (AAS et al. 1978). Die Herstellung vergleichbarer Proteinextrakte gestaltet sich aus pflanzlichen Lebensmitteln aufgrund des verhältnismäßig niedrigen Proteingehaltes und des relativ hohen Gehaltes an phenolischen Inhaltsstoffen häufig problematisch (LOOMIS 1974; VIETHS et al. 1998b). Bei dem überwiegend industriell eingesetzten Verfahren wird das zerkleinerte Gewebe mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) bei 4 °C extrahiert. Aufgrund der Zerstörung der Zellkompartimente kommt es zu einer Freisetzung der Phenole, die mittels Phenoloxidasen in Gegenwart von Luftsauerstoff zu Chinonen oxidieren und unter Ausbildung kovalenter Bindungen mit den Proteinen reagieren. Als Folge ist mit einem Allergenitätsverlust während der Extraktion zu rechnen (McEVILY et al. 1992; VIETHS et al. 1992a; VIELUF et al. 1997).

Da sowohl in der Mango als auch in der Litchi phenolische Verbindungen präsent sind (MITRA & BALDWIN 1997), wird die Extraktion der Proteine mit der von CLEMENTS (1965) entwickelten und von VIETHS et al. (1992b) modifizierten Tieftemperaturextraktion durchgeführt. Das native Fruchtgewebe sowie die nicht hitzebehandelten Fruchterzeugnisse wurden zunächst mit Aceton bei -40 °C homogenisiert, die Suspension anschließend filtriert und der gewaschene Rückstand lyophilisiert. Der Vorteil dieser im Anhang 7.2.1 beschriebenen Vorbehandlung liegt sowohl in der Abtrennung der in Aceton löslichen phenolischen Verbindungen als auch in der durch die niedrige Temperatur induzierten Hemmung der Enzymaktivität der Polyphenoloxidasen. Die Proteine wurden anschließend aus dem Lyophilisat (Acetonpulver) mit PBS extrahiert. Die hitzebehandelten Säfte, Nektare oder Püreevarianten wurden direkt lyophilisiert und dann lediglich einer PBS-Extraktion unterworfen. Auch bei der in-vitro Verdauung der Mango und Litchi erfolgte diese verkürzte Proteinextraktion gemäß der im Anhang 7.2.2 dokumentierten Modifikationen.

3.3 Bestimmung des Proteingehaltes

Die Quantifizierung des Proteingehaltes der Allergenextrakte erfolgte photometrisch mit Coomassie Brilliant Blue als Farbreagenz nach der von BRADFORD (1976) beschriebenen Methode. Aus der Anlagerung der negativ geladenen Farbstoffmoleküle an die Aminogruppen der Proteine resultiert ein blau gefärbter Protein-Farbstoff-Komplex, der bei 590 nm vermessen werden kann. Die Lösungen können ohne weitere Aufarbeitung direkt eingesetzt werden. Nach READ und NORTHCOTE (1981) ist die Messung bereits 2 Minuten nach Farbreagenzzugabe durchführbar. Störungen durch eventuell vorhandene Kohlenhydrate und Natriumionen treten nicht auf. Die Nachweisgrenze liegt bei 0.05 µg/mL. Die Quantifizierung erfolgt anhand einer Kalibriergerade mit Rinderserumalbumin (BSA) als Referenzprotein. Aufgrund der unterschiedlichen Responsefaktoren bietet diese Methode allerdings nur die Möglichkeit einer relativen Quantifizierung (Durchführung siehe Anhang 7.3).

3.4 Enzymallergosorbent-Test (EAST)

Der Enzymallergosorbent-Test (EAST) – eine Variante des Radioallergosorbent-Test (RAST) – ist eine enzymimmunologische Methode zur Messung des Gehaltes an freiem, spezifischem IgE im Blutserum und zählt zu den wichtigsten in-vitro Untersuchungen bei der Diagnose einer Lebensmittelallergie. Das Prinzip des EAST geht aus Abbildung 3-II hervor.

Im ersten Schritt erfolgt nach der Methode von CESKA & LUNDKMIST (1972) die kovalente Bindung der entsprechenden Allergene an bromcyanaktivierte Cellulosescheiben (Festphase). Diese werden mit dem zu untersuchenden Patientenserum inkubiert, wobei die IgE-Antikörper des Serums an die festphasengekoppelten Allergene binden. Die Markierung der Antikörper mit mit alkalischer Phosphatase (AP) gelabeltem Anti-IgE ermöglicht eine enzymatische Umsetzung des farblosen Substrates p-Nitro-phenylphosphat (PNPP) zum gelbgefärbten p-Nitrophenolat, welches bei 405 nm photometrisch detektiert wird.

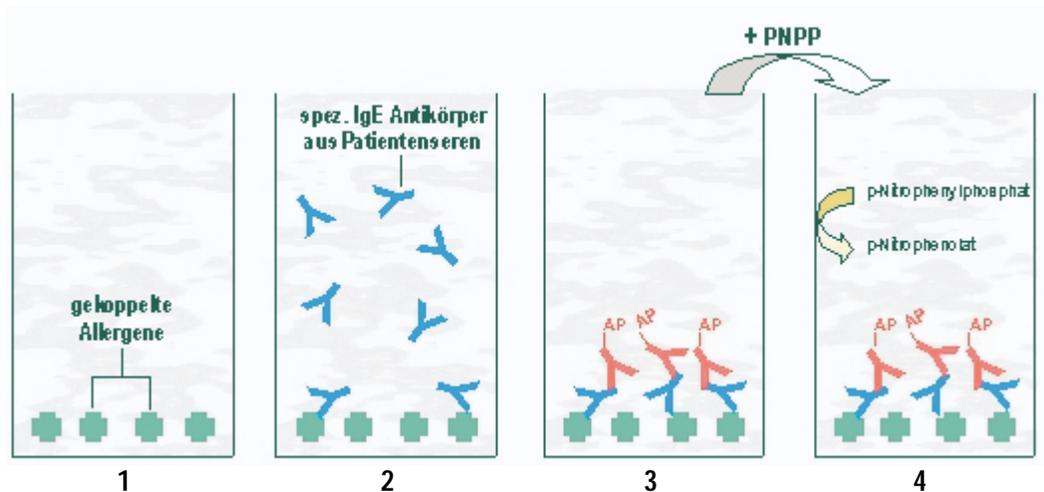


Abb. 3-II: Prinzip des EAST

Die an Cellulosescheiben gekoppelten Allergene (1) werden zunächst mit Patientenserum inkubiert, währenddessen die IgE-Antikörper aus dem Serum spezifisch an die Allergene binden (2). Im nächsten Schritt werden die Antikörper mit mit alkalischer Phosphatase (AP) gelabeltem Anti-IgE markiert (3). Die AP setzt durch eine enzymatische Reaktion das zugegebene Substrat p-Nitrophenylphosphat (PNPP) zum gelbgefärbten p-Nitrophenolat um (4). Die gelb gefärbte Lösung wird abschließend photometrisch vermessen.

Die Auswertung des EAST über Referenzseren mit bekanntem IgE-Gehalt gegen Lieschgras ermöglicht die Einteilung der Patientenserum anhand ihres spezifischen IgE-Gehaltes in die fünf EAST-Klassen 0 bis 4. Dabei definieren die Referenzseren jeweils die untere Klassengrenze; die EAST-Klasse 1 muß einem IgE-Gehalt von 0.35 U/mL, Klasse 2 von 0.7 U/mL, Klasse 3 von 3.5 U/mL und Klasse 4 von 17.5 U/mL aufweisen - $1 \text{ U} \approx 2.4 \text{ ng IgE}$ (Durchführung siehe Anhang 7.4).

3.5 EAST-Inhibition

Die EAST-Inhibition zählt als Variante des EAST zu den kompetitiven Hemmtests und ermöglicht die relative Quantifizierung des allergenen Potentials eingesetzter Proteinextrakte sowie den Nachweis potentieller Kreuzreaktivitäten. Das Prinzip der EAST-Inhibition beruht auf der Inkubation eines Pati-

entenserums mit bekanntem IgE-Gehalt vor der eigentlichen EAST-Bestimmung (siehe 3.4) mit einer Inhibitorlösung (VIETHS et al. 1993a; MÖLLER et al. 1997). Als Inhibitor wird der jeweilige Proteinextrakt eingesetzt, der das auf seine Aktivität zu prüfende Allergen enthält. In der vorliegenden Arbeit werden u.a. Extrakte der unterschiedlichen Fruchtvarietäten, der Warenkorberzeugnisse, der in-vitro Verdauung und der technologisch verarbeiteten Produkte untersucht.

Die festphasengebundenen Allergene der nativen Frucht konkurrieren mit den in der Inhibitorlösung vorliegenden potentiellen Allergenen um das spezifische IgE des Patientenserums. Je größer sich das IgE-Bindungsvermögen der inhibierenden Extrakte zeigt, desto stärker wird das Meßsignal vermindert. Als Serum wird üblicherweise ein aus mehreren Allergikerseren zusammengestelltes Poolserum verwendet. Als Inhibitorlösungen werden Verdünnungsreihen der jeweiligen wäßrigen Proteinextrakte eingesetzt, um sowohl die Proteingehalte, die zu einer 50 %igen Verminderung des Meßsignals führen (C_{50} -Wert), als auch die maximalen Inhibitionen bestimmen zu können.

Die Ermittlung der C_{50} -Werte ermöglicht den Vergleich der allergenen Potenz der verschiedenen Extrakte untereinander. Der C_{50} -Wert einer homologen Inhibition gilt als Bezugsgröße, da die Inhibition mit dem nativen, ebenfalls an die Festphase gekoppelten Proteinextrakt zu einer maximalen Verminderung des Meßsignals führt. Zusätzlich wird durch die homologe Inhibition die korrekte Testdurchführung überprüft. Die Auswertung erfolgt üblicherweise graphisch anhand der Inhibitionskurven, die sich aus der Abhängigkeit der prozentualen Inhibition von der logarithmisch aufgetragenen Proteinkonzentration der Inhibitorextrakte ergeben (Durchführung siehe Anhang 7.5).

3.6 Elektrophorese

Das Prinzip der Elektrophorese basiert auf der Wanderung geladener Moleküle in einem elektrischen Gleichstromfeld zu den Elektroden mit entgegengesetzter Ladung. Die Trennung dieser Moleküle erfolgt aufgrund ihrer unterschiedlichen Ladung oder Massen, wobei die Trennschärfe von der Wanderungsgeschwindigkeit, der Pufferzusammensetzung, der Temperatur, der Feldstärke und dem Trägermaterial abhängt.

3.6.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) beruht auf der Trennung der Proteine nach ihren MG. Die Proteine werden zunächst zur Überdeckung der Eigenladung mit dem anionischen Detergenz SDS beladen. Vorliegende Disulfidbrücken werden mittels 2-Mercaptoethanol reduktiv gespalten, was eine Destruktion der Sekundär- und Tertiärstruktur bedingt. Das resultierende Masse-/Ladungsverhältnis der gebildeten SDS-Protein-Micellen ist für alle Proteine, mit Ausnahme der Glycoproteine, identisch (GUTTMAN 1996). Die Trennung erfolgt in restriktiven Gelen, die aufgrund ihrer geringen Porengröße die Wanderung größerer Micellen stärker behindern als die kleineren Micellen. Daraus resultiert eine zu ihren MG proportionale Wanderungsgeschwindigkeit der Proteinmicellen, die durch den Vergleich mit einem definierten MG-Marker charakterisiert werden. Als Trennmedium kommen Polyacrylamid-Gele zum Einsatz, welche sich durch eine hohe mechanische und chemische Stabilität auszeichnen. Das strapazierfähige Polymer wird durch Copolymerisation von Acrylamid-Monomeren mit dem als Vernetzer fungierenden

N,N`-Methylenbisacrylamid hergestellt. Die für die Trennleistung des Gels verantwortliche Porengröße kann über die Kenngrößen Totalamidkonzentration und Vernetzungsgrad reproduzierbar eingestellt werden.

3.6.1.1 SDS-PAGE von Proteinen mit Molekulargewichten zwischen 14 und 94 kDa

Zur Trennung der Proteine mit MG zwischen 14 und 94 kDa wurden ausschließlich kommerziell erworbene Fertiggele vom Typ Novex™ NuPage der Firma Novex (San Diego, CA, USA) verwendet, die durch eine gute Reproduzierbarkeit und hohe Bandenschärfe charakterisiert sind. Das System basiert auf einem Bis-Tris-HCl gepufferten Polyacrylamid-Gel mit einer Totalamidkonzentration von 10 % unter Verwendung des MES-SDS-Puffers. Die Durchführung der SDS-PAGE sowie die Zusammensetzung des MG-Markers sind in Anhang 7.6 dokumentiert.

3.6.1.2 SDS-PAGE von Peptiden und Proteinen (2.5 bis 94 kDa)

Zur Trennung der Proteine und Proteinfragmente nach der in-vitro Verdauung wurden NuPage-Fertiggele der Firma Novex (San Diego, CA, USA) mit einer Totalamidkonzentration von 12 % verwendet, die eine reproduzierbare Trennung von niedermolekularen Proteinen und Peptiden bis zu 2.5 kDa ermöglichen. Die Durchführung dieser SDS-PAGE-Variante und die Zusammensetzung des Markers sind dem Anhang 7.6 zu entnehmen.

3.6.2 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die isoelektrische Fokussierung (IEF) basiert auf der Trennung der Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI). Die nativen Moleküle wandern in einem pH-Gradientensystem entsprechend ihrer Ladung Richtung Kathode bzw. Anode bis zum Erreichen ihres pI. Bei diesem pH-Wert werden die Proteine fokussiert, da ihre Nettoladung und damit auch ihre Beweglichkeit im elektrischen Feld gleich null ist. Als Trennmedium wird für die IEF ebenfalls das NuPAGE-System der Firma Novex (San Diego, CA, USA) verwendet. Die restriktiven IEF-Fertiggele ermöglichen eine reproduzierbare Trennung im pH-Bereich zwischen 3 und 7 (Gel I) bzw. 3 und 10 (Gel II). Die Auswertung erfolgt visuell anhand eines definierten pI-Markers. Die Durchführung sowie die Zusammensetzung des Markers sind in Anhang 7.7 beschrieben.

3.7 Semidry-Blotting

Der Transfer elektrophoretisch getrennter Proteine aus dem Trägergel auf eine immobilisierende Membran erfolgte mittels Semidry-Blot nach KYHSE-ANDERSEN (1984). Zwischen zwei horizontal angeordneten Graphitelektroden werden mit Puffer getränkte Elektrodenblätter, eine Blotmembran und das Gel platziert. Nach VIETHS et al. (1992b) führt die Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems zu einem effektiven und gleichmäßigen Transfer der Proteine auf Nitrocellulose (NC)-Membranen. Die ohne Denaturierung wahrscheinlich über hydrophobe Wechselwirkungen fest an die Membran haftenden Proteine sind nun für spezifische Bindungen mit Makromolekülen wie IgE-Antikörpern frei zugänglich. Dieser Bindungsmechanismus wird durch die im neutralen Milieu vorliegende negative Ladung der adsorbierten Proteine sowie der NC-Membran erklärt. Die Bin-

dungskapazität der Proteine hängt stark von der Porengröße ab. Der Einsatz einer Membran mit einer Porengröße von 0.2 μm bietet den Vorteil, daß auch kleinere Proteine immobilisiert werden (HANDMAN & JARVIS 1985). Ungeklärt ist bisher, inwieweit die durch die SDS-PAGE denaturierten Proteine während des Semidry-Blotting eine Renaturierung erfahren.

Schließt sich der elektrophoretischen Trennung eine Aminosäuresequenzierung an, erfolgte der Proteintransfer auf eine immobilisierende Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran, da NC gegenüber den zum Edman-Abbau benötigten Reagenzien nicht beständig ist (Durchführung siehe 7.8).

3.7.1 Immunoblot (IB)

Als IB wird nach STOTT (1989) die Kombination des Proteintransfers auf eine immobilisierende Membran mit anschließender Immunfärbung verstanden, wodurch eine Differenzierung zwischen allergenen und nicht-allergenen Proteinen möglich wird.

Die IgE-Antikörper aus dem Patientenserum binden die mittels Semidry-Blotting an die Membran transferierten Allergene (1). Die Antikörper werden nacheinander mit Anti-Human-IgE aus dem Kaninchen (2) und mit mehrfach biotinyliertem Anti-Kaninchen-IgG aus der Ziege (3) inkubiert. An dieses IgG binden mehrere Moleküle Streptavidin-Meerrettichperoxidase (HRP)(4). Durch eine anschließende enzymatische Färbereaktion resultiert eine blau bis grünliche Färbung der Allergenbanden.

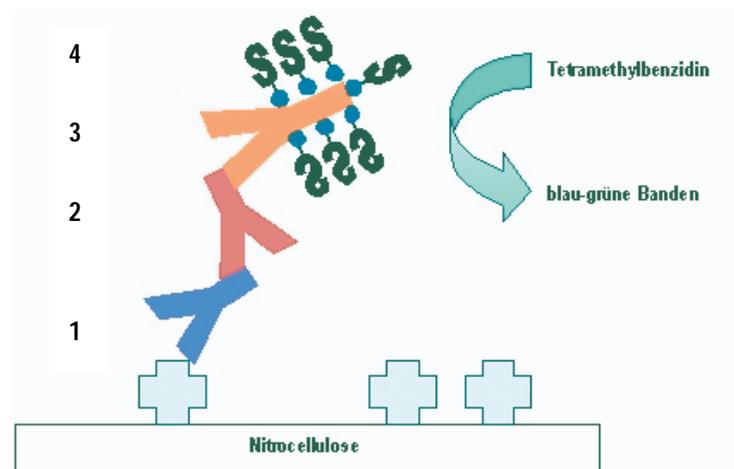


Abb. 3-III: Prinzip des Immunoblots

Die nach dem Semidry-Blotting remanenten freien Bindungsstellen der Nitrocellulosemembran werden zunächst durch Milchproteine blockiert, um Störungen der immunochemischen Detektion zu verhindern (JOHNSON et al. 1984; AHLROTH et al. 1995). Bei der spezifischen Färbung der Allergene wurde zur Erhöhung der Empfindlichkeit (Nachweisgrenze: 0.5 ng Protein/ mm^2 Membran) auf ein von VIETHS et al. (1992b) entwickeltes und in Abbildung 3-III veranschaulichtes Verstärkersystem zurückgegriffen. Dieses System basiert auf einer nacheinander ablaufenden Inkubation mit Anti-Human-IgE vom Kaninchen, mehrfach biotinyliertem Anti-Kaninchen-IgG aus der Ziege und einem Streptavidin-Meerrettichperoxidase (HRP)-Konjugat. Die Visualisierung der IgE-bindenden Proteine erfolgt über eine enzymatische Farbreaktion. Als Substrat fungiert das farblose 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), welches in Gegenwart von Dioctylnatriumsulphosuccinat und Wasserstoffperoxid durch die katalytische Wirkung der HRP zunächst ein blau gefärbtes Radikalkation bildet, das durch Licht zu einem gelb gefärbten 3,3',5,5'-Tetramethyl-1,1'-diphenochinon-4,4'-diimmoniumsalz weiter oxidiert. Daher ist die Färbung der Proteinbanden selbst unter Lichtausschluß nur wenige Tage stabil (GALLATI & PRACHT 1985) (Durchführung siehe 7.9).

3.7.2 Immunoblot (IB) -Inhibition

Das Prinzip der IB-Inhibition entspricht dem der EAST-Inhibition (siehe 3.5) und ermöglicht sowohl die Identifizierung kreuzreaktiver Allergene (VIETHS et al. 1992b) als auch die Charakterisierung der allergenen Potenz diverser Fruchterzeugnisse bzw. behandelter Produkte. Der Vorteil gegenüber der EAST-Inhibition liegt in der Möglichkeit, einzelne Allergenbanden zu detektieren, ein Nachteil ist allerdings in der schlechteren Empfindlichkeit zu sehen (siehe Anhang 7.10).

Zunächst wird der Proteinextrakt der nativen Frucht elektrophoretisch getrennt und auf eine NC-Membran transferiert. Vor der immunologischen Detektion wird das Patientenserum mit dem auf seine allergene Aktivität zu prüfenden Proteinextrakt (Inhibitorlösung) vorinkubiert. Als Inhibitoren werden sowohl die Extrakte der frischen Fruchtvarietäten als auch die der unterschiedlichen Frucht-erzeugnisse und in-vitro verdauten Mangos bzw. Litchis eingesetzt. Die Anwesenheit von aktiven Allergenen im Inhibitorextrakt führt aufgrund der Konkurrenzreaktion zwischen gelöstem und immobilisiertem Allergen um das spezifische IgE aus dem Patientenserum zu einer Schwächung oder Eliminierung der Banden (MÖLLER et al. 1997). Die korrekte Durchführung wird durch eine homologe Inhibition mit dem nativen Fruchtextrakt sowie zur Verifizierung nicht spezifischer Bindungen mit einer Ovalbuminlösung und dem Serum eines Nicht-Allergikers kontrolliert. Auch zur IB-Inhibition werden die jeweiligen Poolseren (siehe Anhang 7.15) zur Detektion eingesetzt.

3.7.3 Profilin-Blot

Der Nachweis von Profilinen erfolgte, wie von VIETHS et al. (1994a) und FÄH et al. (1995) dokumentiert, mit polyklonalen Antikörpern, die nach der Immunisierung von Kaninchen mit Profilinen aus Pollen oder Lebensmitteln gewonnen werden. Dabei nutzt man die starke Homologie in der Struktur der Profileine unterschiedlicher Herkunft aus. Profileine zeigen sich häufig bei Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft untereinander oder in Verbindung mit Pollen als kreuzreaktive Komponenten. Die Identifizierung der Mango- bzw. Litchi-Profiline erfolgte mit einem gegen rekombinantes Birnenprofilin Pyr c 4 gerichteten Antikörper, der vom Paul-Ehrlich-Institut (Langen, Deutschland) zur Verfügung gestellt wurde. Die zu untersuchenden Extrakte werden zunächst mittels SDS-PAGE getrennt und anschließend auf eine NC-Membran geblottet. Nach der Blockierung der freien Bindungsstellen erfolgt eine Inkubation mit dem verdünnten Antikörper. Die weitere Detektion entspricht dem unter 3.7.1 beschriebenen Verfahren (Durchführung siehe 7.11).

3.8 Unspezifische Färbungen

Zur Visualisierung des Gesamtproteinmusters der elektrophoretisch getrennten Proteine stehen für Acrylamidgele zwei unspezifische Methoden zur Wahl: die Silberfärbung nach HEUCKESHOVEN & DERNICK (1986) sowie die Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung nach WARD et al. (1990).

Die **Silberfärbung** zählt mit einer Nachweisgrenze von 0.05 bis 0.1 ng/mm² zu den empfindlichsten unspezifischen Detektionsmethoden. Die Visualisierung basiert auf dem höheren Normalpotential der proteingebundenen Silberionen gegenüber den ins Gel gebetteten. Die durch Zugabe von Formaldehyd beschleunigte Reduktion zu elementarem Silber resultiert in der Braunfärbung der

Proteine, die so im Gel sichtbar werden. Eine nachträgliche Entfärbung der ursprünglich irreversiblen Detektion ist dem Farmer'schen Abschwächer zwar möglich, allerdings stehen die Proteine nur zur erneuten unspezifischen Visualisierung im Gel zur Verfügung. Die **Coomassie-Brilliant-Blue (CBB)-Färbung** ist mit einer Nachweisgrenze von 30 ng/mm² ca. um den Faktor 100 unempfindlicher als die Silberfärbung und beruht auf der reversiblen Anlagerung des Farbstoffes Coomassie-Brilliant-Blue R-250 an die Proteine. Die CBB-Detektion kann sowohl für Acrylamidgele als auch NC- oder PDVF-Membranen eingesetzt werden und bietet aufgrund einer möglichen Entfärbung der Proteine ohne irreversible Schädigungen gerade im Bereich der Proteinisolierung viele Vorteile. Die unspezifische Proteindetektion der auf NC-Membranen transferierten Proteine erfolgt mittels der **kolloidalen Goldfärbung** nach DANSCHER & NOORGARD (1983). Die selektive Anlagerung von H₂AuCl₄-Molekülen an die Proteine ermöglicht eine der Silberfärbung vergleichbare Empfindlichkeit (MOEREMANS et al. 1985). Mit einer Nachweisgrenze von ca. 1 ng/mm² (LI et al. 1989) ist die Färbung um den Faktor 60 sensitiver als die CBB-Detektion. Da die Immunaktivität der Proteine nach EGGER & BIENZ (1987) bei diesem Färbemechanismus erhalten bleibt, steht die Option einer anschließenden Immunfärbung offen (zur jeweiligen Durchführung siehe Kapitel 7.12 im Anhang).

3.9 Methoden zur Proteinisolierung

Zur Proteinisolierung stehen eine Reihe geeigneter, bereits in der Literatur ausführlich dokumentierter, überwiegend chromatographischer Methoden zur Auswahl. Zu den schonenden Techniken zur Trennung von Proteinen und Peptiden zählen die Ionenaustausch- sowie die Größenausschlusschromatographie. Beide Methoden wurden bereits von MÖLLER et al. (1997) und KINDER (1999) zur Isolierung einzelner Mangoproteine ohne ausreichenden Erfolg getestet. Alternativen sind in der Affinitätschromatographie, die auf der spezifischen Antigen/Antikörperbindung beruht und in der Elektroelution, die auf elektrophoretischen Trennmechanismen basiert, zu sehen.

Die **Affinitätschromatographie (AC)** beruht auf der spezifischen und reversiblen Adsorption eines Moleküls an einen individuellen, matrixgebundenen Bindungspartner und stellt damit eine selektive, aber auch empfindliche Methode zur Proteinisolierung aus komplexen Matrices dar. Im Rahmen der Isolierungsversuche der Mango- bzw. Litchiallergene aus den jeweiligen nativen Proteinextrakten, konnte ein an die Methode von VAN SOMMEREN et al. (1993) angelehntes Verfahren modifiziert werden. Da die AC eine sehr aufwendige und empfindliche Methode darstellt, scheint sie für Routineuntersuchungen nur bedingt geeignet.

Zur Isolierung der beiden Litchiallergene reichte die in der Handhabung einfachere und schnellere Elektroelution aus.

Die **Elektroelution (EE)** zählt zu den präparativen elektrophoretischen Methoden und ermöglicht die nahezu quantitative Elution eines Proteins aus dem Trägergel. Die reversibel mit CBB gefärbte Proteinbande wird aus dem Gel geschnitten, zerkleinert und in einer SDS-Lösung äquilibriert. Anschließend wird das Protein aus den Gelstückchen in einer Biotrap™-Elutionskammer der Firma

Schleicher & Schüll (Dassel, Deutschland) elektrophoretisch eluiert und vor einer Trennmembran BT-1 mit der Größenausschlußgrenze von 5 kDa angereichert (HUNKAPILLER et al. 1983).

Mittels der Elektroelution können die Proteine zum einen von niedermolekularen Verunreinigungen und Salzen gereinigt und zum anderen konzentriert werden. Nach der EE wird die Proteinlösung entfärbt und kann zu weiteren Untersuchungen eingesetzt werden (Durchführung siehe Anhang 7.13).

3.10 N-terminale Sequenzanalyse

Ein effizientes Verfahren zur Bestimmung von Peptidsequenz wurde 1950 von Pehr Edman entwickelt und als „Edman-Abbau“ etabliert (EDMAN & BEGG 1967). Das Prinzip dieser Reaktionskaskade ist die stufenweise Abspaltung und Identifizierung einzelner Aminosäuren vom N-terminalen Ende der Peptidkette. Die Reaktion beruht auf der Kopplung von Phenylisothiocyanat an die endständige Aminosäure, deren Abspaltung als Phenylisothiocarbamoylpeptid und anschließende Konvertierung zur stabilen Phenylthiohydantoin-(PHT)-Aminosäure. Diese PHT-Derivate können anschließend mittels RP-HPLC/UV identifiziert werden. Die zyklisch ablaufende Reaktion ermöglicht die Routinebestimmung von Polypeptiden, ist allerdings auf 10 - 20 Aminosäuren limitiert. Bei längeren Peptiden zeigt das Verfahren mit steigenden Reaktionszyklen eine stark erschwerte Auswertung, so daß die Bestimmung häufig nach ca. 25 Zyklen abgebrochen werden muß.

Für die Sequenzanalyse wurden die Proteine wie unter 7.8.2 beschrieben auf eine PVDF-Membran transferiert und anschließend mit Coomassie-Brilliant-Blue unspezifisch gefärbt. Die zu untersuchenden Banden wurden ausgeschnitten und dem Edman-Abbau unterworfen. Die zur Sequenzanalyse benötigte Mindestmenge an Protein liegt bei 80 pmol und ist in der Regel durch die Visualisierbarkeit mit CBB gewährleistet.

Die Durchführung der N-terminalen Sequenzbestimmung wurde in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Biochemie der Universität Hamburg durchgeführt (Anhang 7.14).

4 Ergebnisse

Die Proteingehalte sämtlicher eingesetzter Fruchtextakte – bestimmt nach BRADFORD 1976 sowie die einzelnen Ergebnisse der EAST-Inhibitionen sind im Anhang 7.16 bzw. 7.17 aufgeführt.

4.1 Untersuchungen zur Mango

4.1.1 Charakterisierung der Mangoallergene mittels SDS-PAGE/Immunoblot

Zur Charakterisierung der Mangoallergene wurde zunächst der Proteinextrakt einer nativen Mango der Sorte „TA“ mittels SDS-PAGE elektrophoretisch getrennt und nach dem Semidry-Blotting unter Verwendung der zur Verfügung stehenden Patientenseren immungefärbt. Abbildung 4-I dokumentiert den Immunoblot der 16 Einzelseren, in denen mittels EAST eine Sensibilisierung gegen Mango (EAST-Klassen ≥ 2 ; Ergebnisse siehe Anhang 7.15) nachgewiesen wurde. Zur Negativkontrolle wurde ein Blotstreifen mit dem Serum eines Nicht-Atopikers inkubiert (K). Die Zuordnung der Molekulargewichte der visualisierten Allergene erfolgte anhand des kolloidal goldgefärbten MG-Markers.

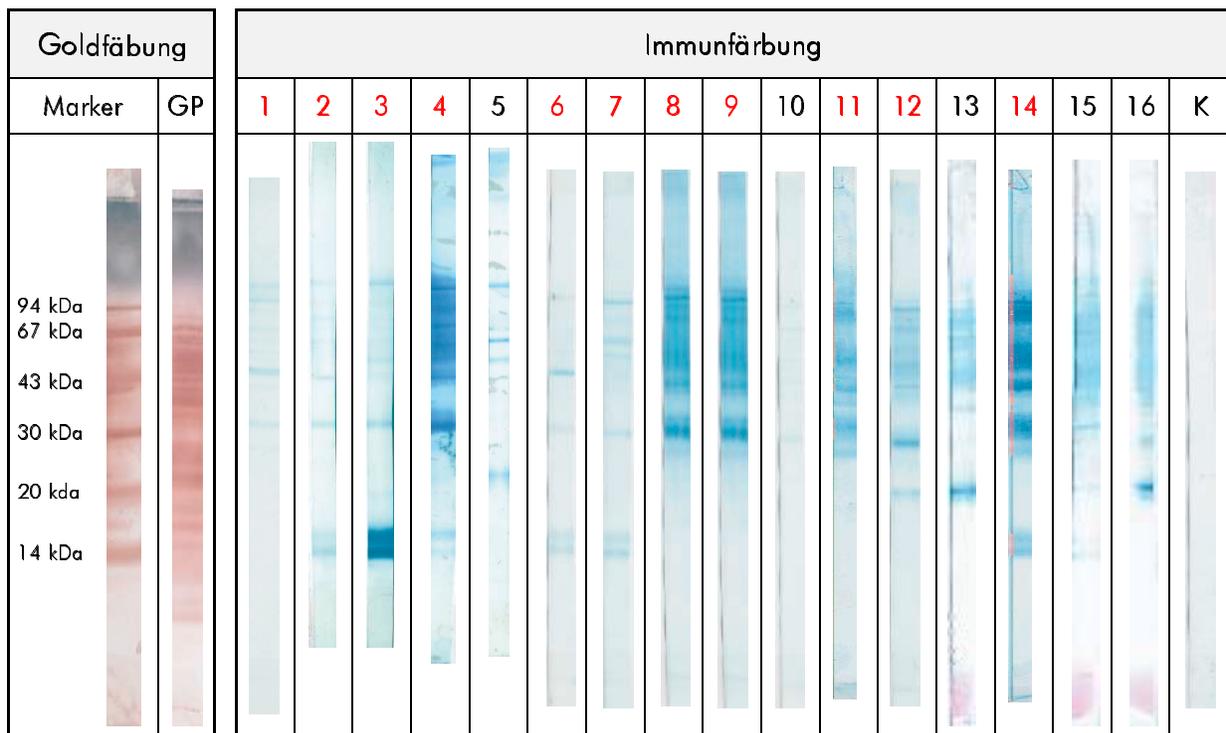


Abb. 4-I: Immunoblot unter Verwendung der Seren von Patienten mit einer Sensibilisierung gegen Mango

Marker: Molekulargewichtsmarker 1: UH 4: FR 7: RD 10: RF 13: NB 16: EP
 GP: Gesamtproteinmuster 2: SW 5: Nu* 8: KDH 11: FS 14: RK K: Kontrolle
 ↳ kolloidale Goldfärbung 3: DS 6: LS 9: UW 12: SK 15: JW

■ Die rot numerierten Seren werden für das Poolserum verwendet (siehe Anhang 7.15)

* Nu = Name unbekannt

14 der 16 Seren detektierten sowohl das 30 kDa Hauptallergen Man i 2 als auch das Majorallergen Man i 1 mit einem MG von 40 kDa. Zusätzlich reagierten 12 der Patienten (1, 3-5, 7-14) auf

das IgE-bindende Protein mit einem MG von 43 kDa. Die häufig schwer zuzuordnenden diffusen Allergenbanden im höhermolekularen Bereich (größer 67 kDa) konnten mit allen Seren visualisiert werden. Ein 50 kDa Protein wurde von neun Seren (3-5, 7-9, 12+13, 16) des gesamten Patientenkollektivs detektiert. Nur jeweils sieben der eingesetzten Blutseren wiesen spezifische IgE-Antikörper gegen die niedermolekularen Proteinbanden bei 14 und 16 kDa (2-4, 5+6, 14+15) sowie bei 25 kDa (4+5, 11-13, 15+16) auf. Ebenso zu den Minorallergenen muß das lediglich von vier Seren visualisierte Allergen mit einem MG von 35 kDa (11, 13-15) gezählt werden. Die Patienten KDH (8), UW (9), SK (12), FR (4) und JW (15) zeigten im IB eine sehr ausgeprägte Detektionskraft, was mit den Ergebnissen der EAST-Klassifizierung (alle \geq Klasse 3) korrelierte. Durch die Inkubation mit dem Nichtallergikerserum (K) konnten unspezifische Bindungen ausgeschlossen werden.

4.1.2 Sortenvergleich

Zur Untersuchung einer potentiellen Sortenabhängigkeit des allergenen Potentials der Mango wurden sowohl vier thailändische Sorten als auch vier weitere Varietäten aus verschiedenen Anbaugebieten (Brasilien, Mexiko, Israel) miteinander verglichen. In der unspezifischen Silber- sowie der kolloidalen Goldfärbung zeigten die Proteinextrakte im Bandenmuster keine signifikanten Unterschiede (nicht dargestellt). Ein nahezu identisches Allergenbandenmuster konnte auch mittels der spezifischen Immunfärbung – dargestellt in Abbildung 4-II – nachgewiesen werden. In allen Varietäten wurden die bereits charakterisierten Hauptallergene Man i 1 und 2 sowie die weiteren Allergene mit MG von 14 und 16 kDa, 25 kDa, 35 kDa, 43 kDa, 50 kDa sowie > 67 kDa unter Verwendung des Poolserums deutlich detektiert.

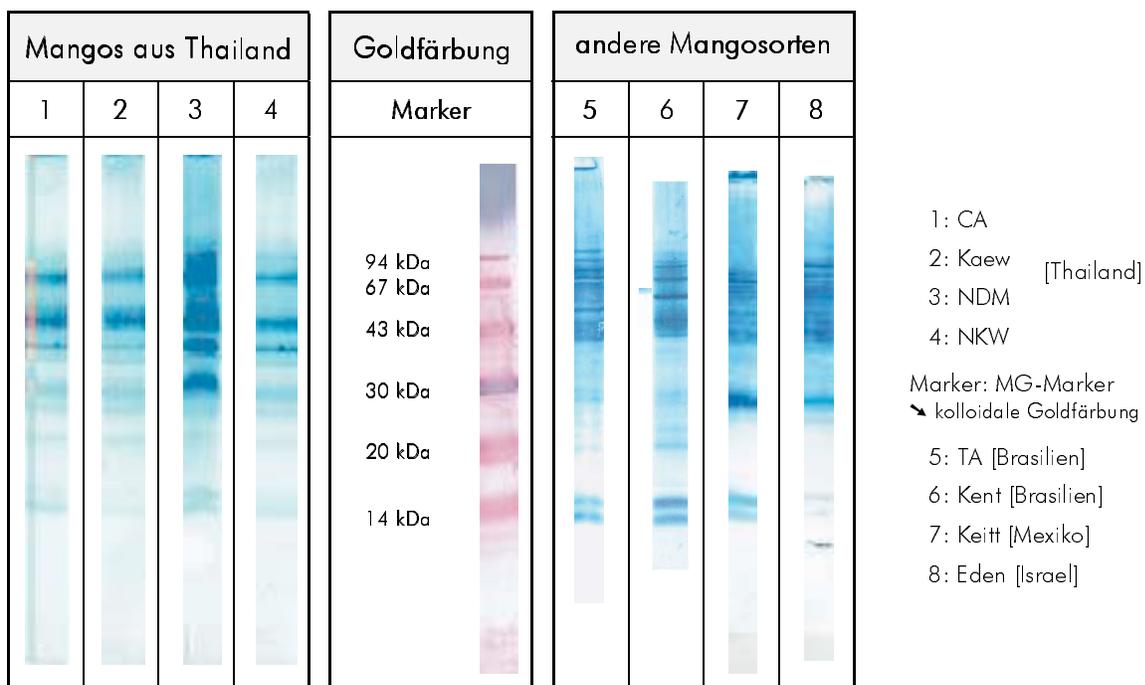


Abb. 4-II: Immunoblot der acht verschiedenen Mangovarietäten (Inkubation mit Poolserum)

Zur Absicherung dieser Ergebnisse wurde eine EAST-Inhibition durchgeführt, wobei die Extrakte aller untersuchten Varietäten zum einen an die Festphase gekoppelt und zum anderen als Inhibitor eingesetzt wurden. Abbildung 4-III zeigt repräsentativ die Inhibitionsgraphen einer Versuchsvariante, bei der der Extrakt „Eden“ als festphasengebundener Proteinextrakt fungierte. Sowohl der nahezu deckungsgleiche Kurvenverlauf als auch die im Vergleich zur homologen Inhibition (C_{50} -Wert= 3.5 mg/L) kaum schwankenden C_{50} -Werte zwischen 1.2 mg/L des Extraktes „NDM“ und 8.4 mg/L des Extraktes „TA“ bestätigten die mittels Immunoblot erzielten Ergebnisse. Abschließend wurde im gleichen Umfang eine IB-Inhibition durchgeführt, bei der alle als Inhibitor eingesetzten Proteinextrakte die identische Schwächung bzw. Eliminierung der Allergenbanden wie die homologe Inhibitorlösung induzierten (Abbildung nicht dargestellt). Zusammenfassend kann keine sortenabhängige allergene Aktivität der Mangoproteine nachgewiesen werden.

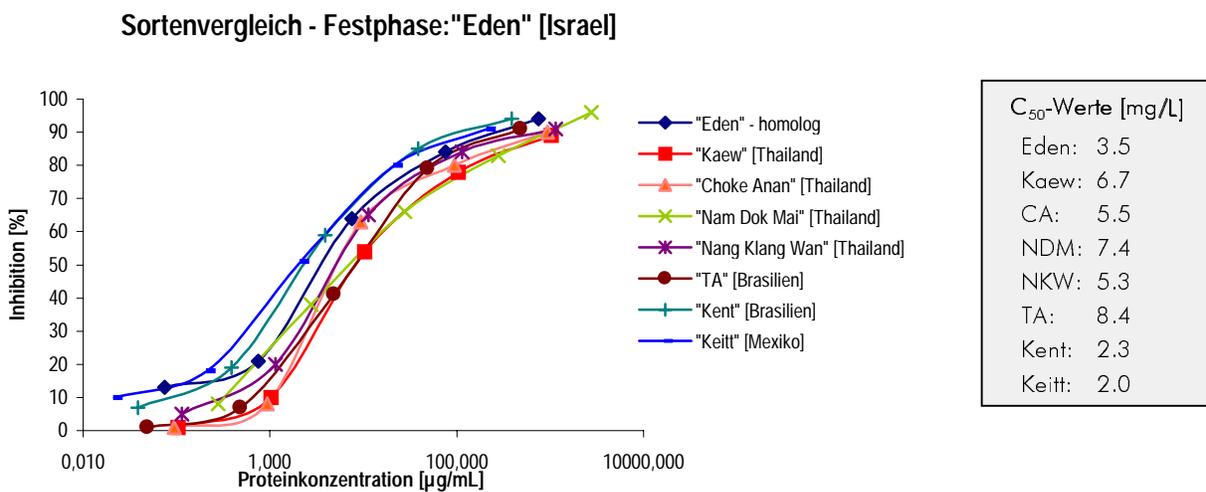


Abb. 4-III: Inhibitionsgraphen & C_{50} -Werte der acht untersuchten Mangosorten mit Mango „Eden“ als festphasengekoppelte Variante

4.1.3 Fraktionen und Fruchtreife

Aufgrund der sehr inhomogenen Fruchtreife und der ungleichmäßigen Verteilung der im Mesokarp der klimakterischen Mango lokalisierten Polygalacturonasen sollte das allergene Potential sowohl in Abhängigkeit des Reifeprozesses als auch der Allergenverteilung anhand drei verschiedener Mangovarietäten („TA“, „Kaew“ & „Kent“) verifiziert werden. Die elektrophoretischen und immunologischen Untersuchungen der an den unterschiedlichen Reifetagen (0.-2.-6.-8. Tag) hergestellten Proteinextrakte aus dem Gesamtfuchtfleisch (Fruchtfll) sowie aus der Schale ergaben bei allen Mango-Sorten ein nahezu identisches Bild. Sowohl in der unspezifischen Silberfärbung als auch im IB konnte weder mit zunehmender Lagerung noch in Abhängigkeit der Sorte eine Veränderung des allergenen Potentials festgestellt werden. Die Proteinbandenmuster aller untersuchten Extrakte gleichen dem der nativen Frucht (Abbildungen nicht dargestellt). In Abbildung 4-IV ist beispielhaft die graphische Auswertung der EAST-Inhibition unter Verwendung der Sorte „TA“ als festphasengebundener sowie homologer Extrakt dargestellt. Die Inhibitionsgraphen der verschiedenen Extrakte

zeigten sowohl untereinander als auch im Vergleich zum nativen Mangoextrakt einen nahezu identischen Kurvenverlauf. Die C_{50} -Werte der Inhibitorextrakte (zwischen 4.2 und 10.6 mg/L) wiesen im Vergleich zu dem C_{50} -Wert der homologen Inhibition (4.9 mg/L) auf eine konstante allergene Aktivität der Proteine während des Reifeprozesses hin. Eine Variation der Allergenität zwischen der Schale (C_{50} -Werte von 10.6 bzw. 6.1 mg/L) und dem Fruchtfleisch der nativen Mango (C_{50} -Wert von 4.2 mg/L) war ebenfalls nicht nachzuweisen. Die relative Quantifizierung des allergenen Potentials der Extrakte der Sorten „Kent“ und „Kaew“ führte zu dem selben Ergebnis (nicht dargestellt). Auch hier wichen z.B. die ermittelten C_{50} -Werte der verschiedenen Extrakte der Sorte „Kent“ (Schwankungen von Fruchtfll-8 2.3 mg/L bis Fruchtfll-6 12.3 mg/L) nur unwesentlich von dem der nativen Frucht (C_{50} -Wert: 2.3 mg/L) ab.

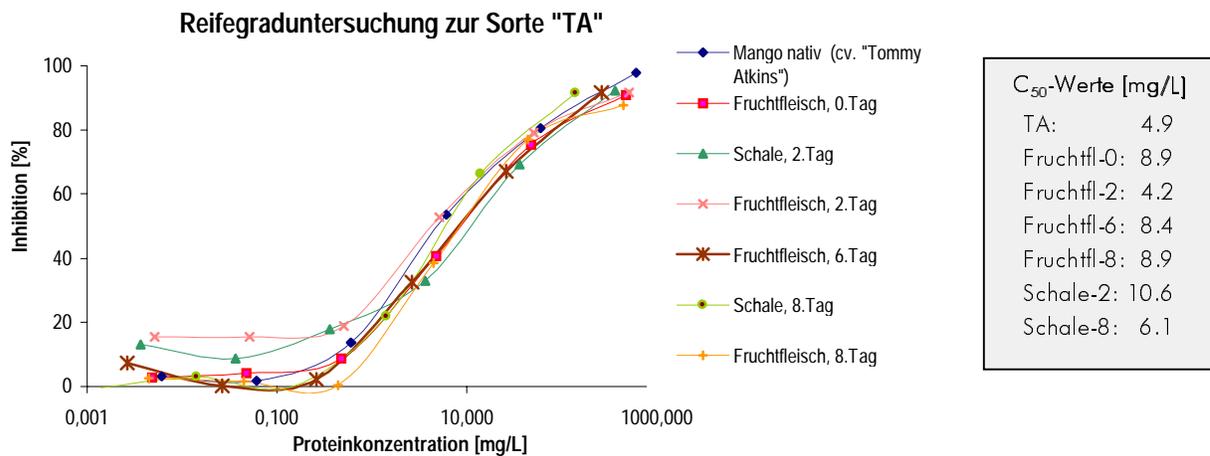


Abb. 4-IV: EAST-Inhibitionsgraphen der Proteinextrakte der Mango „TA“ zu Reifestadien

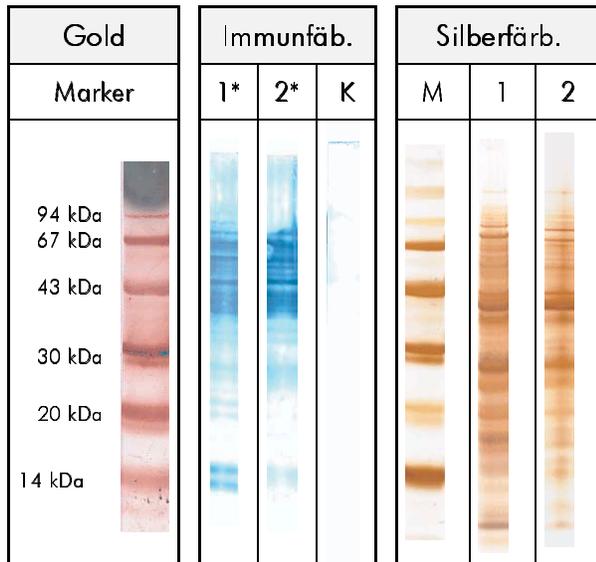


Abb. 4-V: Silber- & Immunfärbung des Peri- und Mesokarps der Mango „Kent“

M = MG- Marker 1: Fruchtfleisch 2: Schale
 K: Kontrollserum * Inkubation: Poolserum

Ein ähnliches Untersuchungsbild ergab sich aus der unspezifischen Silberfärbung und dem IB der Extrakte der unterschiedlichen Fruchtfractionen. In Abbildung 4-V sind zunächst die jeweiligen Extrakte der Schale (2) und des Gesamtfleisches (1) der Sorte „Kent“ sowohl unspezifisch silber- als auch spezifisch immungefärbt abgebildet. Die Detektion des Gesamtproteinmusters sowie auch die Visualisierung der IgE-bindenden Proteine zeigten in beiden Extrakten sämtliche für die Mango charakteristischen Banden und differieren somit nicht. Die Proteinzusammensetzung des Meso- und des Perikarps scheinen somit identisch zu sein.

Die Blotstreifen der ausgewählten Fruchtfleischbereiche F1 bis F4 (Einteilung siehe Kapitel 2.2.1) der drei Varietäten „TA“, „Kent“ und „Kaew“ sind in Abbildung 4-VI zusammengestellt. Die Inkubation der auf eine NC-Membran transferierten Proteine erfolgte jeweils mit dem in Anhang 7.15 beschriebenen Poolserum (1-4) sowie zusätzlich mit dem Serum eines Nichtallergikers (K). Sehr deutlich ist hier zu erkennen, daß weder die Fruchtsorte noch die unterschiedlichen Fruchtfleischfraktionen ein verändertes Allergenbandenmuster aufwiesen. In allen elektrophoretisch getrennten Extrakten waren sowohl die Hauptallergene Man i 1 und 2 sowie die zuvor charakterisierten IgE-bindenden Proteine mit MG von 14 und 16 kDa, 25 kDa, 35 kDa, 43 kDa, 50 kDa und im höhermolekularen Bereich detektierbar. Eine ungleichmäßige Verteilung der Allergene innerhalb der Frucht konnte ebenso wenig nachgewiesen werden wie ein Unterschied im Protein- bzw. Allergenmuster zwischen Perikarp und Mesokarp.

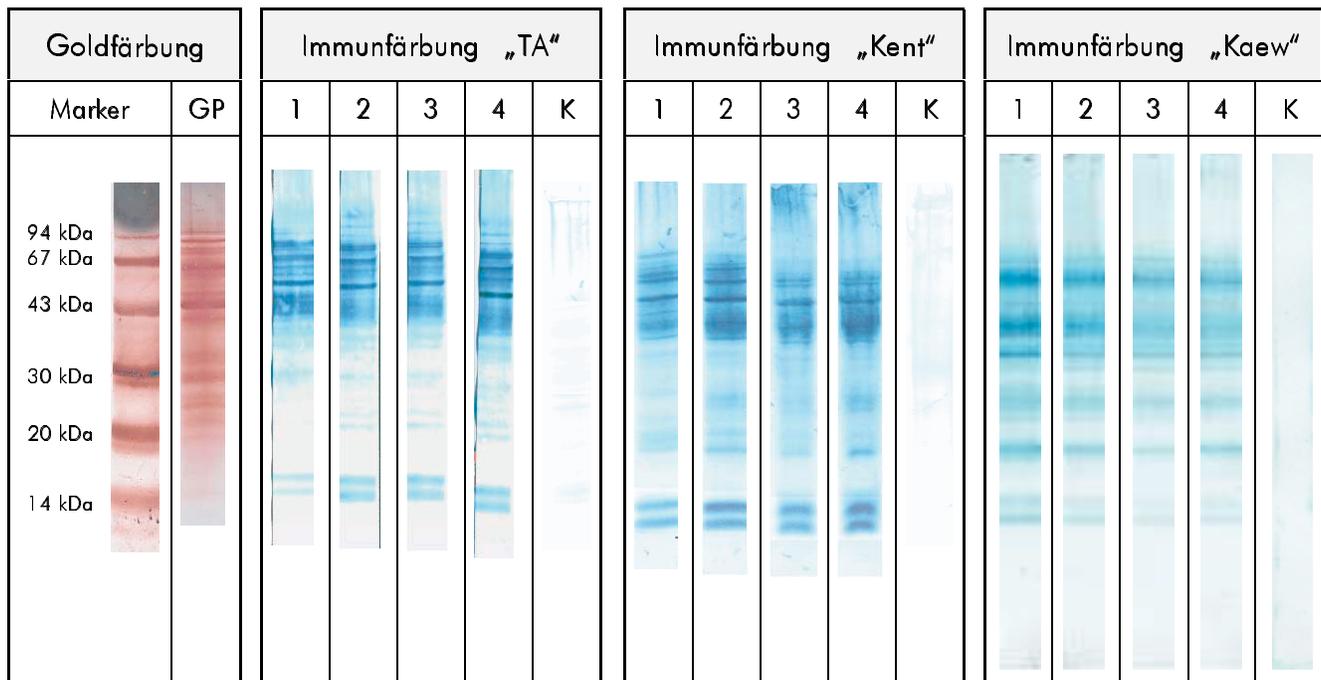


Abb. 4-VI: Immunoblot der verschiedenen Fruchtfleischfraktionen 1-4 der Sorten „TA“, „Kent“ und „Kaew“ – Inkubation mit Poolserum

Marker : Molekulargewichtsmarker

GP : Gesamtproteinmuster der nativen Mango „TA“

1: Fraktion 1

2: Fraktion 2

3: Fraktion 3

4: Fraktion 4

K: Fraktion 4 mit Kontrollserum

Zur Absicherung der mittels IB erhaltenen Ergebnisse erfolgte eine relative Quantifizierung mittels EAST-Inhibition. Die Inhibitionskurven (nicht dargestellt) aller untersuchten Fraktionen verliefen nahezu deckungsgleich. Die ermittelten C_{50} -Werte sowie die maximal erreichten Inhibitionen zeigten sowohl innerhalb einer Sorte als auch im Vergleich der drei Varietäten nur vernachlässigbare Schwankungen. Die erzielten Werte der drei Sorten „TA“, „Kent“ und „Kaew“ können der Tabelle 4-I entnommen werden.

Tab. 4-I: C₅₀-Werte & maximale Inhibitionen der Fraktionen 1-4 der Sorten „TA“, „Kent“ & „Kaew“

| Extrakt | | „TA“ | | | „Kent“ | | | „Kaew“ | |
|---------|--|---------------------|-------------------------------|--|---------------------|-------------------------------|--|---------------------|-------------------------------|
| | | max. Inhibition [%] | C ₅₀ -Wert [µg/mL] | | max. Inhibition [%] | C ₅₀ -Wert [µg/mL] | | max. Inhibition [%] | C ₅₀ -Wert [µg/mL] |
| homolog | | 98 | 4.9 | | 94 | 2.3 | | 88 | 1.1 |
| F1 | | 96 | 4.2 | | 87 | 4.8 | | 94 | 3.6 |
| F2 | | 96 | 4.3 | | 81 | 6.7 | | 89 | 6.6 |
| F3 | | 93 | 5.0 | | 93 | 3.8 | | 92 | 4.2 |
| F4 | | 93 | 2.9 | | 83 | 6.9 | | 86 | 12.4 |

4.1.4 Charakterisierung der Mangoallergene mittels IEF

Die Charakterisierung der Mangoproteine anhand ihrer pI erfolgte mittels IEF sowohl mit anschließender unspezifischer Silberfärbung als auch nach Semidry-Blotting mit spezifischer Immunfärbung. In Abbildung 4-VII sind die Ergebnisse der untersuchten Extrakte aus dem Fruchtfleisch sowie der Schale dokumentiert. Im Gesamtproteinmuster zeigten sich im Extrakt des Mesokarps (2) die gleichen Banden wie im Perikarp (1). In dem verwendeten IEF-Gel 3-7 konnten anhand des Markers 1 insgesamt 8 Proteine mit pI-Werten von 6,8, 6,3, 5,1, 4,8, 4,6, 4,5, 4,0 und 3,5 eindeutig visualisiert werden. Die geblootteten, immungefärbten Extrakte wurden in einem IEF-Gel im pH-Bereich 3 bis 10 getrennt. Im Extrakt des Fruchtfleisches konnten IgE-bindende Proteine mit pI von 7,8, 7,6, 5,5, 5,0, 4,8, 4,6, 4,0, 3,5 und unterhalb 3,5 visualisiert werden. Zusätzlich waren schwache Banden mit pI von 6,8, 6,3 und 5,8 apparent. Im Extrakt des Perikarps konnte ein ähnliches Allergenbandenmuster mit anderer Intensität visualisiert werden. Die im Fruchtfleisch dominante Bande bei einem pH von 7,8 wurde ebenso wie die Banden unterhalb 3,5 nicht detektiert. Die IgE-bindenden Proteine im neutralen Bereich konnten mit abweichender Intensität visualisiert wer-

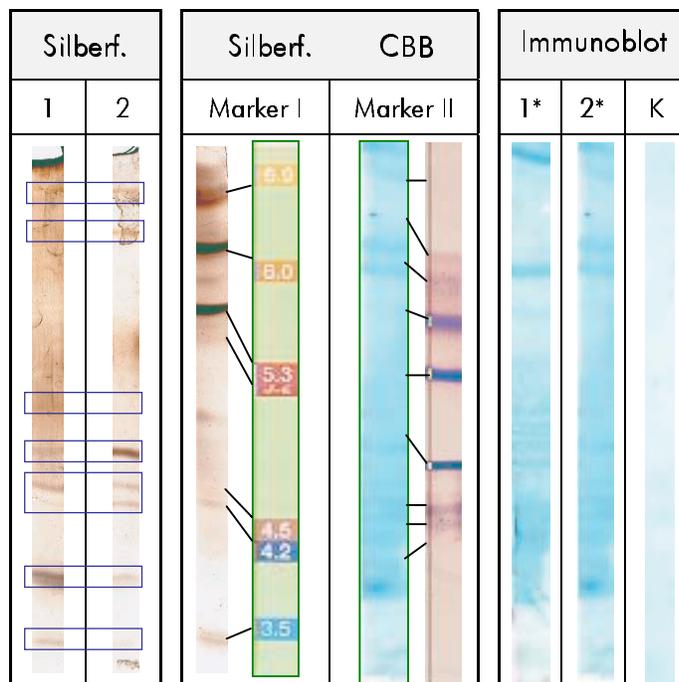


Abb. 4-VII: Silberfärbung & IB der mittels IEF getrennten Proteinextrakte

- 1: Schale der Sorte „Kaew“
- 2: Fruchtfleisch „Kaew“
- K: Kontrollserum
- Marker: Molekulargewichtsmarker (CBB bzw. Silberfärbung)

* Inkubation mit Poolserum

den. Die pI der Mangoproteine scheinen überwiegend im neutralen bis sauren Bereich zu liegen, wobei nur geringe Abweichungen zwischen Meso- und Perikarp festgestellt werden konnten.

4.1.5 Profilin-Nachweis

Wie bereits in den vorherigen Kapiteln ausführlich beschrieben, werden die niedermolekularen Profiline in der Literatur als potentielle Allergene eingestuft, die auch für kreuzreaktive Interaktionen zu anderen Lebensmittel- bzw. Pollenallergenen verantwortlich sein können. Der Profilinnachweis unter Verwendung von Anti-Birnenprofilin-Antikörpern zeigte sowohl für den Proteinextrakt des Mesokarps als auch der Schale ein positives Ergebnis. In Abbildung 4-VIII sind die beiden Extrakte (1: Schale; 2: Fruchtfleisch) der Sorte „Kaew“ sowohl als Profilin- als auch vergleichend als IB dargestellt. Die Immunfärbung zeigt das komplette bisher charakterisierte Allergenbandenmuster im MG-Bereich von 14 bis 94 kDa, wobei keine Unterschiede zwischen Meso- und Perikarp visualisiert werden. Die Doppelbande bei 14 und 16 kDa konnte in beiden Extrakten deutlich detektiert werden. Im Profilinblot wurde lediglich die Doppelbande im unteren MG-Bereich eindeutig visualisiert. Sowohl im MG-Bereich > 20 kDa als auch in der Kontrolle (Inkubation ohne Anti-Profilin-Antikörper) konnten keine zusätzliche Banden nachgewiesen werden. Bei den beiden im Fruchtfleisch und in der Schale vorkommenden IgE-bindenden Proteinen mit MG von 14 und 16 kDa handelt es sich eindeutig um Profiline.

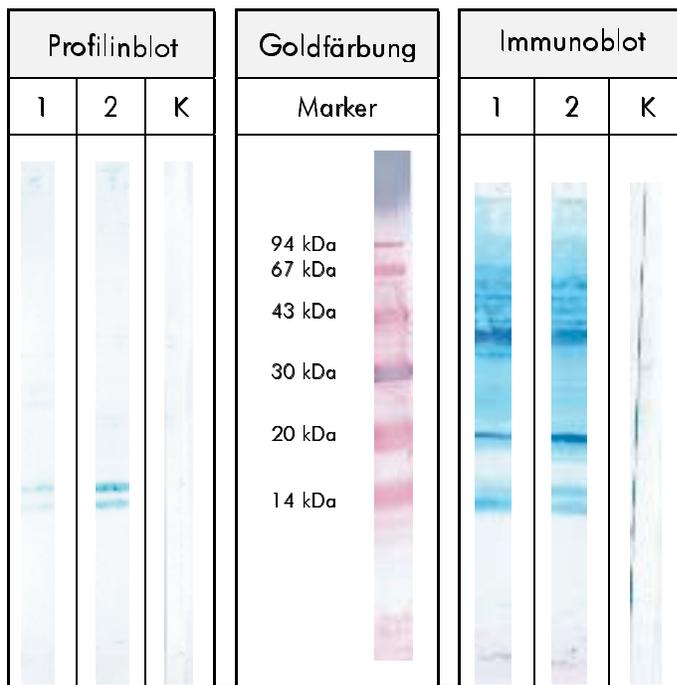


Abb. 4-VIII: Profilin- & IB der Extrakte des Meso- und Perikarps

Inkubation Profilin: Anti-Birnenprofilin
Inkubation IB: Poolserum

1: Schale der Sorte „Kaew“
2: Fruchtfleisch „Kaew“
Marker: Molekulargewichtsmarker
(↘kolloidale Goldfärbung)

4.1.6 Technologische Verarbeitungsprozesse

Zur Untersuchung der Stabilität der Mangoallergene gegenüber technologischen Verarbeitungsprozessen wurde hauptsächlich der Einfluß thermischer und enzymatischer Behandlungen auf das allergene Potential betrachtet. Bevor an der UH im kleintechnologischen Maßstab Püree- und Nektarvarianten produziert wurden, erfolgten verschiedene einfache Erhitzungsversuche mit dem Mangofruchtfleisch der Sorte „TA“ in der Mikrowelle (Mikro), im Trockenschrank (TS) sowie im Autoklaven und Schnellkochtopf (SchnKT). Die Durchführung und Wahl der Parameter sind dem Anhang 7.16.1 zu entnehmen. In Abbildung 4-IX sind die immungefärbten Blotstreifen sowie unspezifisch gefärbten Extrakte einzelner ausgewählter Temperaturbehandlungen dargestellt. Im Gesamt-

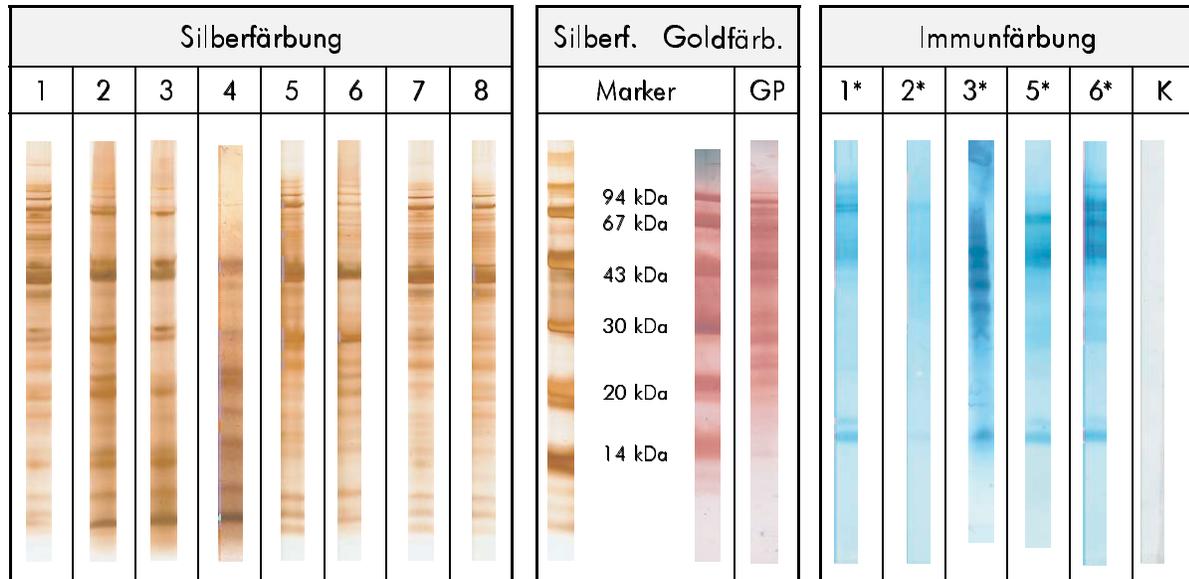


Abb. 4-IX: Silber- & Immunfärbung der durchgeführten einfachen thermischen Behandlungen

Marker: MG-Marker 1: native „TA“ 2: SchnKT-10' 3: SchnKT-30' 4: Autoklav 20'
 GP: Gesamtproteinmuster 5: Mikro-50'' 6: Mikro-1'50'' 7: TS-20' 8: „TA“ 90' bei RT
 K: Inkubation mit Kontrollserum * Inkubation mit Poolserum

muster waren innerhalb eines Erhitzungsversuches mit zunehmender Erhitzungszeit jeweils nur leichte Veränderungen in der Proteinzusammensetzung nachweisbar. Eine Ausnahme stellte das Erwärmen im Schnellkochtopf (2+3) dar. Bei diesem eigentlich schonenden Garvorgang kam es mit zunehmender Kochzeit zur Eliminierung des 25 kDa Proteins sowie einiger diffuser Banden im oberen MG-Bereich (>50 kDa). Weiterhin konnte im niedermolekularen Bereich eine Bande bei ungefähr 6 kDa zunehmend intensiv detektiert werden. Dieses Protein konnte auch in der autoklavierten Frucht nachgewiesen werden (4). Das kurzzeitige, starke Erwärmen in der Mikrowelle bei 900 W (5 +6) führte ebenso wie das Erhitzen im Trockenschrank (7) zu keinem wesentlichen Abbau der Proteine. Als Vergleich diente sowohl der Mangoextrakt einer unbehandelten frischen Frucht (1) als auch der Extrakt einer zerkleinerten, 90 min (≅ maximale Versuchsdauer der Trockenschrankerhitzung) bei RT gelagerten Frucht (8). Die zweite Vergleichslösung wurde untersucht, um eine Veränderung des Proteinmusters durch die aufgrund der Zellwandzerstörung freigesetzten En-

zyme ausschließen zu können. Der Vergleich beider Extrakte (1+8) ergab keine Unterschiede im Proteinmuster. Die Immunfärbung der Extrakte bestätigte zum einen die Veränderungen des Proteinmusters der im Schnellkochtopf (2+3) erwärmten Früchte in Form einer stark geschwächten Detektion des Allergenbandenmusters. Die in der Silberfärbung visualisierte Bande <10 kDa wies keine IgE-bindenden Eigenschaften auf. Zum anderen zeigten die Blotstreifen der anderen Erhitzungsverfahren ein der nativen Frucht vergleichbares Allergenbandenmuster - mit IgE-bindenden Proteinen bei 14 und 16 kDa, 25 kDa, 30 kDa, 35 kDa, 40 kDa, 43 sowie 50 kDa. Eine Veränderung des allergenen Potentials durch thermische Behandlungen konnte somit nicht nachgewiesen werden.

Die zur Verifizierung der Ergebnisse durchgeführte relative Quantifizierung mittels EAST-Inhibition ergab in allen untersuchten Extrakten ein kaum reduziertes allergenes Potential. Alle Inhibitionskurven (nicht dargestellt) zeigten einen nahezu deckungsgleichen Verlauf zu der homologen nativen Frucht. Der Vergleich der C_{50} -Werte, veranschaulicht als Blockdiagramm in Abbildung 4-X, zeigte nur geringe Schwankungen der für eine 80 %ige Inhibition notwendigen, ermittelten Proteinkonzentrationen. Da die Mangoallergene anscheinend eine sehr hohe Hitzestabilität aufweisen, werden weiterführende Versuche zur technologischen Verarbeitung durchgeführt.

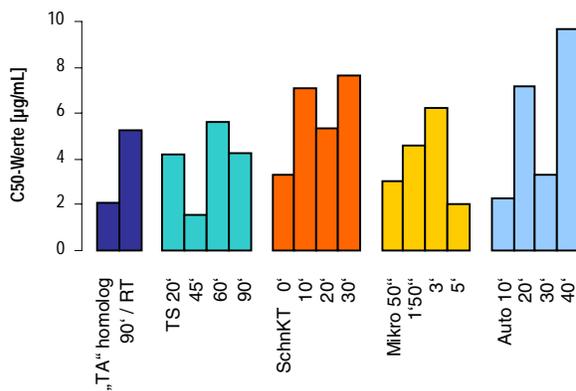


Abb. 4-X: Darstellung der C_{50} -Werte aller Erhitzungsvariationen

ven (nicht dargestellt) zeigten einen nahezu deckungsgleichen Verlauf zu der homologen nativen Frucht. Der Vergleich der C_{50} -Werte, veranschaulicht als Blockdiagramm in Abbildung 4-X, zeigte nur geringe Schwankungen der für eine 80 %ige Inhibition notwendigen, ermittelten Proteinkonzentrationen. Da die Mangoallergene anscheinend eine sehr hohe Hitzestabilität aufweisen, werden weiterführende Versuche zur technologischen Verarbeitung durchgeführt.

⇒ Herstellung verschiedener Püreevarianten

Zunächst wurden fünf verschiedene Pürees nach einem statistisch ermittelten Versuchsplan unter Variation der zugesetzten Enzymmenge (0-100 mg/kg), der Inkubationsdauer (30 bzw. 90 min) und -temperatur (37.5 bzw. 45 °C) im Institut der UH definiert hergestellt und sowohl vor der Pasteurisation (Var1-4 np) als auch nach dem Erhitzen (Var1-4) auf ihr allergenes Potential untersucht (Produktionsverlauf siehe 2.2.2). Die Variante 5np stellte ein „Kontrollpüree“ nach dem Passieren vor der Pasteurisation und ohne Enzymierung dar. In Abbildung 4-XI sind die Gesamtproteinmuster aller Püree-Extrakte zusammengestellt. Sowohl die pasteurisierten (7-10) als auch die nicht erhitzten Varianten (2-6) wiesen ein der nativen Frucht (1) nahezu identisches Proteinmuster auf. Besonders intensiv wurden die Banden bei 30 und 40 kDa sowie bei 25 kDa, 43 und 50 kDa detektiert.

Im Immunoblot – dargestellt in Abbildung 4-XII – zeigte sich ein ähnliches Bild. In den Extrakten der verschiedenen Püreevarianten konnten die gleichen IgE-bindenden Proteine wie in der nativen Frucht visualisiert werden. Unabhängig von den Enzymierungsparametern erschien das Hauptallergen Man i 1 bei 40 kDa besonders intensiv gefärbt, während das Man i 2 (30 kDa) generell nur schwach detektiert wurde. Die Extrakte der Var1 und 2 (3+5) zeigten im Gegensatz zu den

Frucht identisches Allergenbandenmuster visualisiert, wodurch ein Einfluß der mechanischen Zerkleinerung auf das allergene Potential ausgeschlossen werden konnte. Trotz der differierenden Enzymierung und Hitzebehandlung konnten in allen Püreevarianten die Profiline mit einem MG von 14 und 16 kDa nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Ergebnisse scheinen die Mangoallergene sowohl gegen Temperatureinflüsse als auch gegen den enzymatischen Zellaufschluß stabil zu sein.

Zum Verifizieren der elektrophoretisch erzielten Ergebnisse wurde eine relative Quantifizierung des allergenen Potentials mittels EAST-Inhibition durchgeführt, deren graphische Auswertung in Abbildung 4-XIII dokumentiert ist. Der mit der homologen Inhibition nahezu identische Kurvenverlauf der nicht pasteurisierten Varianten, sowie die berechneten C_{50} -Werte bestätigten die mittels Immunfärbung postulierte Stabilität der allergenen Aktivität der Mangoallergene gegenüber technologischen Verarbeitungsprozessen. Sowohl die Variation der eingesetzten Enzymmenge bei gleicher Inkubationsdauer und- temperatur (Vergleich Var 1np- 3np) als auch die Erhöhung der Enzymierungszeit (Var 4np) beeinflussten die allergene Potenz der Mango. Die beiden im IB schwächer detektierten Extrakte der pasteurisierten Varianten 1 und 2 zeigten mit 10.0 und 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ im Vergleich zur nativen Frucht (4.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$) nur leicht erhöhte C_{50} -Konzentrationen. Die eine 50 %ige Inhibition induzierenden Proteinkonzentrationen der ebenfalls hitzebehandelten Varianten 3 und 4 wichen mit 21.3 und 19.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ etwas stärker von der homologen Inhibition ab. In diesen Fällen kann von

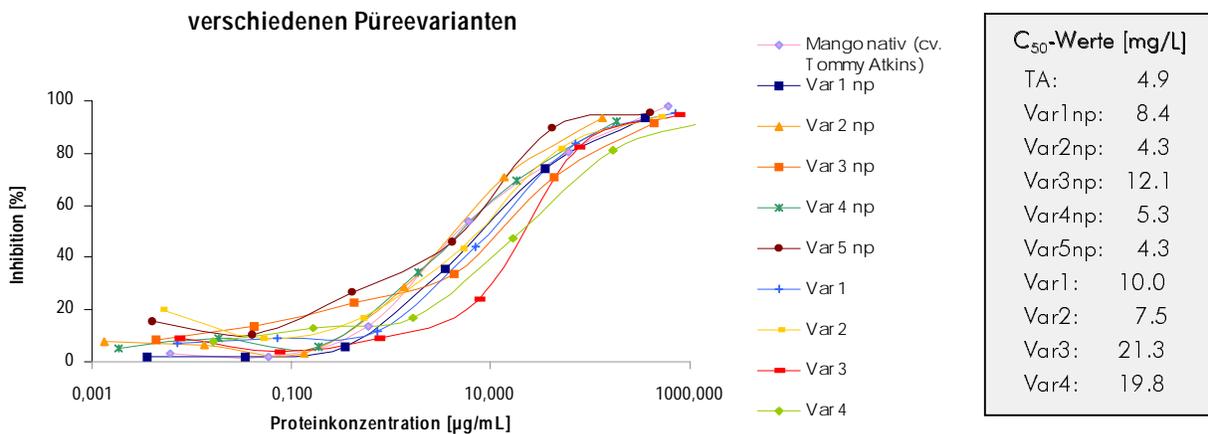


Abb. 4-XIII: EAST-Inhibitionskurven der hergestellten Püreevarianten

einer leichten Reduzierung des allergenen Potentials durch die Pasteurisation ausgegangen werden. Von einer Eliminierung der Allergenität durch die Verarbeitung frischer Früchte zum pasteurisierten Püree kann jedoch nicht gesprochen werden.

⇒ Herstellung verschiedener Nektare

Aus den pasteurisierten Püreevarianten wurden vier verschiedene Nektare ausgemischt und untersucht. In Abbildung 4-XIV sind sowohl das Gesamtprotein- als auch das Allergenmuster der hergestellten Proteinextrakte zusammengestellt. Trotz der vorgenommenen Verdünnung und weiteren Pa-

steurisation zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der unspezifisch silbergefärbten Proteine (rechts) in den Nektaren im Vergleich zur Frischfrucht (1) bzw. zu den jeweiligen Püreevarianten (siehe vorherigen Abschnitt). In allen Extrakten (2-5) konnten die beiden Hauptallergene bei 30 und 40 kDa sowie diverse Minorallergene nachgewiesen werden. Im IB konnten in allen Extrakten der Nektare (2-5) weiterhin IgE-bindende Proteine detektiert werden, wobei das 40 kDa Hauptallergen besonders intensiv gefärbt hervortrat. Ebenso eindeutig wurden die Banden bei einem MG von 35 und 60 kDa sowie die Profilinbanden bei 14 und 16 kDa visualisiert. Unspezifische Bindungen wurden durch die Inkubation des nativen Extraktes mit dem Serum eines Nicht-Atopikers (6) ausgeschlossen. Das bestehende allergene Restpotential der Nektare wurde abschließend durch die EAST-Inhibition überprüft. In Abbildung 4-XV sind neben den Inhibitionskurven der

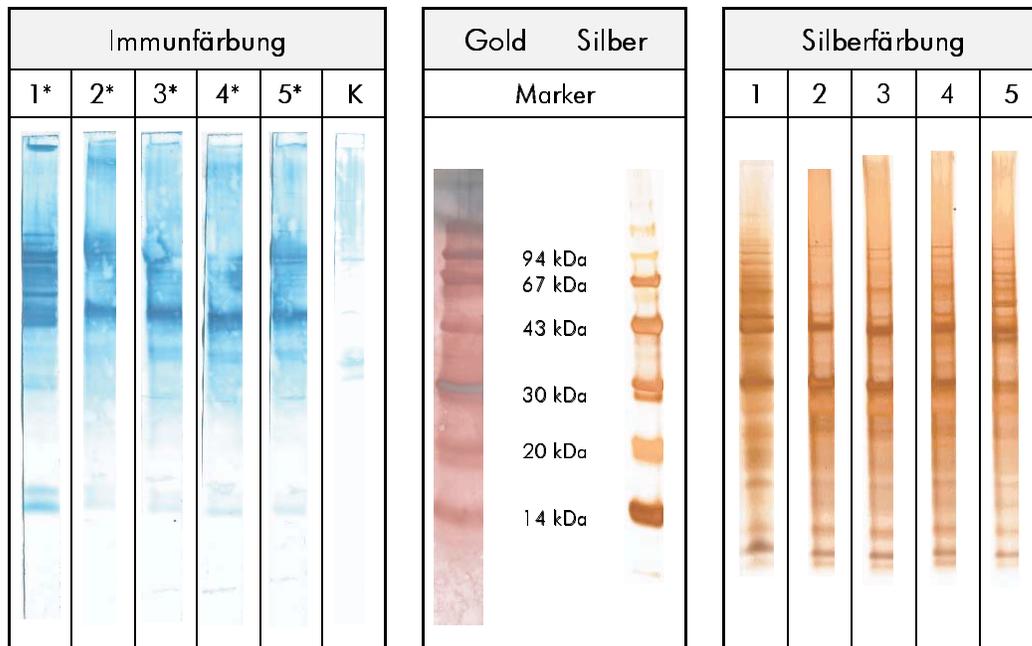


Abb. 4-XIV: Immun- & Silberfärbung der Proteinextrakte der ausgemischten Nektare

Marker: Molekulargewichtsmarker 1: native Frucht „TA“ 2: Nek 1 3: Nek 2
 K: Kontrollserum 4: Nek 3 5: Nek 4
 *: Inkubation mit Poolserum

Nektare 1-4 auch die zum enzymatischen Gewebeaufschluß eingesetzten Pektinasen (Rohapect PTE und Rohament PL) dargestellt. Da diese Enzyme keine wesentliche Inhibition (maximale Inhibition: 12 bzw. 38 %) induzierten, konnte deren Einfluß auf das allergene Potentials der Mango ausgeschlossen werden. Die Inhibitionsgraphen der Nektarextrakte zeigten einen der homologen Inhibitionskurve ähnlichen allerdings etwas in den höheren Proteinkonzentrationsbereich verschobenen Verlauf. Dieses spiegelte sich deutlich in den erhöhten C_{50} -Werten von 14.6 bis 30.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ und der maximalen Inhibition von 88 % im Vergleich zur nativen Frucht (C_{50} -Wert: 4.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$; max. Inhibition: 98 %) wider. Trotz der für eine 50 %ige Inhibition notwendigen zunehmenden Proteinkonzentrationen zeigten alle Nektare noch eine deutliche allergene Restaktivität.

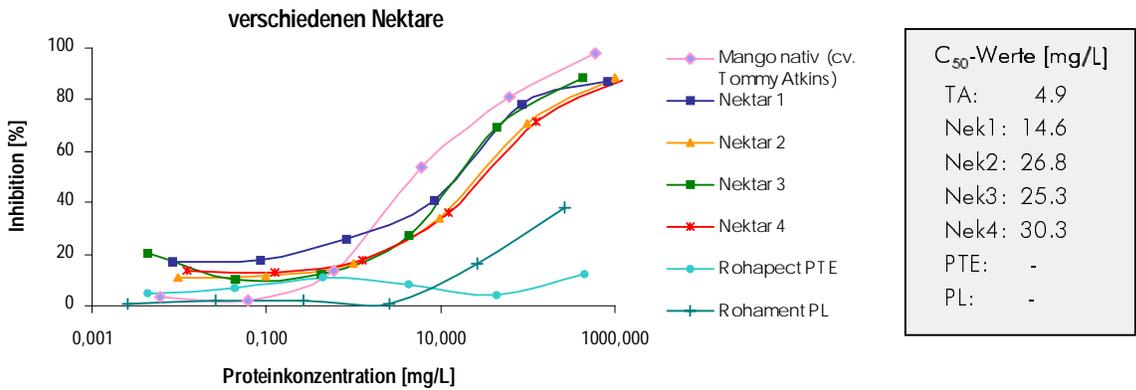


Abb. 4-XV: EAST-Inhibition der Extrakte der Nektare und der zur Enzymierung eingesetzten Fermente

⇒ *Herstellung verschiedener Trockenprodukte*

Abschließend wurden an der UH produzierte getrocknete Mangofruchtscheiben untersucht. Es wurden auch hier zum einen das Gesamtproteinmuster sowie das potentielle Allergenspektrum betrachtet. Abbildung 4-XVI zeigt die Ergebnisse aus der SDS-PAGE mit anschließender spezifischer bzw. unspezifischer Detektion. Mittels Silberfärbung konnte in allen Extrakten das charakteristische

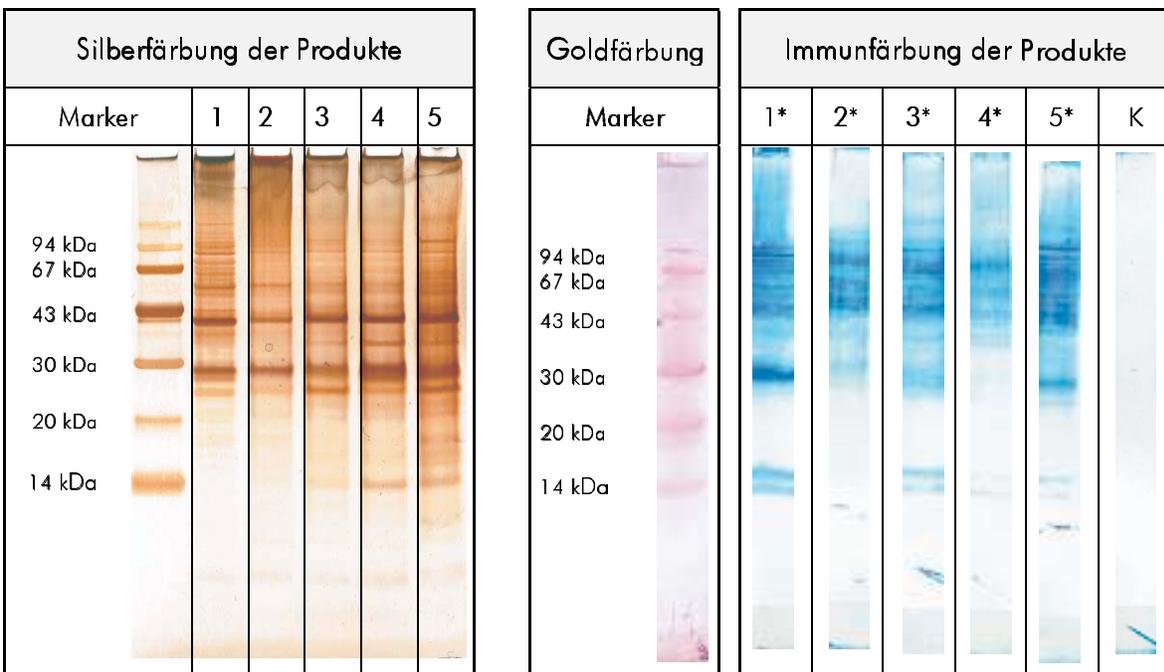


Abb. 4-XVI: Silber- & Immunfärbung der Extrakte der Trockenprodukte

Marker: Molekulargewichtsmarker 1: native Frucht „Keitt“ 2: Mangoleder 3: Scheiben Kontrolle
 K: Kontrollserum 4: Scheiben geschwefelt 5: Scheiben NT 45 °C
 *: Inkubation mit Poolserum
 [NT: Niedertemperaturerhitzung]

Mangoproteinmuster nachgewiesen werden. Lediglich im höhermolekularen Bereich (>50 kDa) erschienen die Banden der getrockneten Produkte (2-5) etwas schwächer als die der nativen Frucht (1) visualisiert. Signifikante Unterschiede konnten jedoch nicht beobachtet werden. Auch im IB waren die Hauptallergene Man i 1 und 2 sowie diverse Minorallergene apparent. Eine im Vergleich zur Frischfrucht leicht geschwächte Detektion des Allergenspektrums zeigten lediglich das stark verarbeitete Mangoleder (2) im höhermolekularen Bereich sowie die geschwefelten Mangoscheiben (4), in denen das 30 kDa Protein deutlich geschwächt visualisiert wurde. Die ungeschwefelte Kontrollvariante der Mangoscheiben (3) wies dagegen ein der nativen Frucht nahezu identisches Allergenmuster auf. Ein schwacher Einfluß der Schwefelung auf das allergene Potential ließ sich somit nicht ausschließen, obwohl auch in diesen Produkten sämtliche IgE-bindenden Proteine nachweisbar waren. Ebenso wurden in allen Extrakten mit Ausnahme des Mangoleders (2) die Profiline bei 14 und 16 kDa detektiert, die anscheinend sowohl gegen Hitze, mechanische Zerkleinerung als auch gegen das Schwefeln resistent sind.

Die relative Quantifizierung der Extrakte mittels EAST-Inhibition bestätigte die hohe Stabilität der Mangoallergene gegen technologische Verarbeitungsprozesse. Alle Inhibitionskurven zeigten einen nahezu deckungsgleichen Verlauf zur homologen Inhibition (Kurven nicht abgebildet). Die maximalen Inhibitionen lagen zwischen 89 und 93 %, lediglich die geschwefelten Mangoscheiben induzierten nur eine 80 %ige Inhibition. Der Vergleich der in Tabelle 4-II aufgeführten C_{50} -Werte deutete allerdings auf keine signifikanten Veränderungen des allergenen Potentials während der Verarbeitung hin, zumal die ungeschwefelte Kontrolle mit $8.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ die höchste eine 50 %ige Inhibition induzierende Proteinkonzentration aufwies. Somit scheint auch die Herstellung getrockneter Mangoprodukte keine Reduzierung des allergenen Potentials zu bewirken.

Tab. 4-II: C_{50} -Werte und maximale Inhibitionen der Extrakte der Trockenprodukte

| Extrakt | C_{50} -Wert [$\mu\text{g}/\text{mL}$] | max. Inhibition [%] |
|-------------------------------------|--|---------------------|
| Homolog - Mango „Keitt“ | 4.9 | 91 |
| ungeschwefelte Scheiben - Kontrolle | 8.0 | 90 |
| geschwefelte Scheiben | 3.0 | 80 |
| NT 45 °C | 6.5 | 93 |
| Mangoleder | 2.7 | 89 |

⇒ Vergleich mit handelsüblichen Produkten

Die anhand der an der UH im kleintechnologischen Maßstab produzierten Mangoerzeugnisse postulierte Stabilität der Allergene gegenüber Hitze, Enzymierung und mechanischer Beanspruchung wurde abschließend in handelsüblichen Produkten verifiziert. In Anhang 7.1.6.1 sind sowohl die Herkunft als auch die Zusammensetzung der analysierten Erzeugnisse aufgelistet. Es wurden aus sechs verschiedenen fluiden Mangoerzeugnissen, zwei Pürees und zwei getrockneten Mangoscheiben Proteinextrakte hergestellt und analog zu den anderen Produkten auf ihr allergenes Potential untersucht. Abbildung 4-XVII zeigt die Immunfärbung der entsprechenden Extrakte unter Verwen-

dung des Poolserums. Während im Proteinextrakt der nativen Mango der Sorte „TA“ (1) das gesamte Allergenbandenmuster zwischen 14 und 94 kDa apparent war, konnten in den Extrakten der Handelsprodukte nur schwach Banden detektiert werden. Die fluiden Mangoerzeugnisse (2-6) ergaben ein sehr differentes Bild. In dem Mangonektar „Dietz“ (2) schien eine starke Reduzierung der allergenen Potenz nachweisbar, da das gesamte Allergenbandenmuster kaum visualisiert werden konnte. In dem Fruchtsaftgetränk (FSG) „Jefi“ (3) wurde dagegen das IgE-bindende Protein mit einem MG von 43 kDa sehr intensiv gefärbt, während die Hauptallergene nur schwach zu erkennen waren. Die von der UH zur Verfügung gestellten FSG mit einem Mangofruchtgehalt von 25 % (5) bzw. 10 % (6) zeigten die 35 kDa Bande sehr intensiv, dagegen das 43 kDa nur schwach gefärbt.

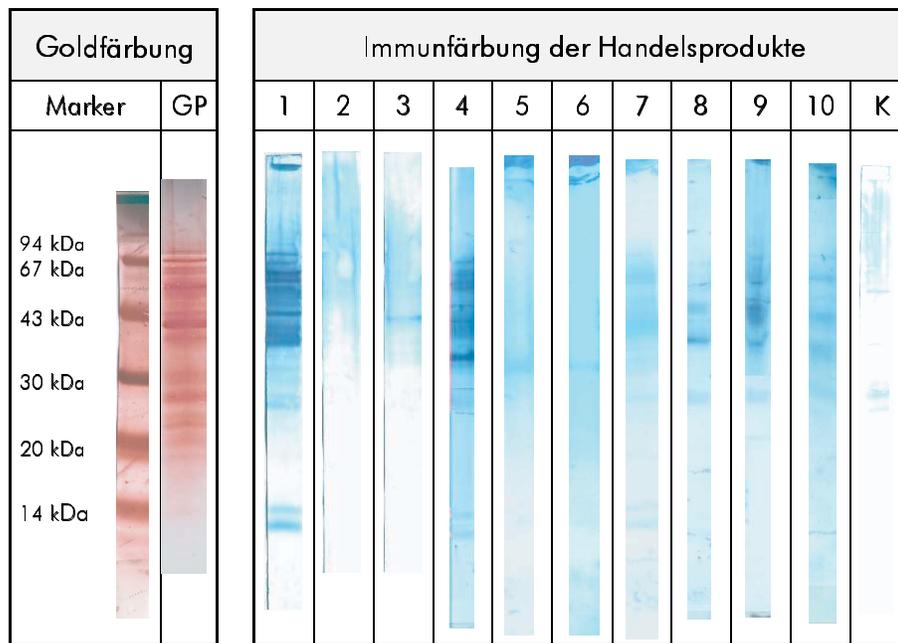


Abb. 4XVII: Immunoblot der Handelsprodukte (Inkubation mit Poolserum)

Marker: MG-Marker
 GP: Gesamtproteinextrakt
 ↳ kolloidale Goldfärbung

1: native Frucht „TA“
 2: Nektar „Dietz“
 3: Fruchtsaftgetränk „Jefi“
 4: FSG „Gina“
 5: Fruchtsaftgetränk 25 %
 6: Fruchtsaftgetränk 10 %
 7: Halbware Püree
 8: Vollfrucht
 9: Scheiben 1
 10: Scheiben2,„Spinnrad“
 K: Kontrollserum

Lediglich im Extrakt des FSG „Gina“ (4) ließen sich beide Hauptallergene Man i 1 und 2 sowie die Profiline und mehrere IgE-bindende Proteine mit MG von 35 kDa, 43 kDa, 50 und >67 kDa detektieren. In den untersuchten Pürees (7+8) konnte analog zu den in Hohenheim produzierten Varianten das komplette Allergenbandenmuster detektiert werden. Im Produkt Vollfrucht (9) waren lediglich die Profiline nicht mehr apparent. Diese industriell hergestellten Erzeugnisse schienen somit ein kaum verändertes allergenes Potential aufzuweisen. Abschließend wurden zwei getrocknete Mangoerzeugnisse (9+10) auf ihre allergene Aktivität geprüft. In den Extrakten beider Produkte konnten ein der nativen Frucht ähnliches, jedoch etwas schwächer gefärbtes Allergenmuster visualisiert werden. Im Gegensatz zur Frischfrucht und den an der UH produzierten Mangoscheiben ließen sich in den Handelswaren die Profiline nicht oder nur sehr schwach nachweisen.

Eine signifikante Reduzierung des allergenen Potentials schien somit nur bei den fluiden Mango-
produkten vorzuliegen. Da diese Ergebnisse nicht mit denen der selbst produzierten Nektare über-
einstimmten, wurde zur Absicherung ein IB der drei Erzeugnisse „Dietz“, „Gina“ und „Jefi“ unter
Verwendung des jeweiligen Serums der Probanden FR, DS und LS (EAST-Klassen: 4, 3 und 2)
durchgeführt. Abbildung 4-XVIII zeigt die immungefärbten Blotstreifen der entsprechenden Extrakte.
Der Extrakt der nativen Frucht der Sorte „TA“ (1) wurde als Vergleich mit Poolserum inkubiert. Un-
ter Verwendung der Seren stark sensibilisierter Probanden (2+4) mit EAST-Klassen > 3 ließen sich
deutlich Allergene im gesamten MG-Bereich detektieren, wobei besonders die Hauptallergene und
die Profileline apparent waren. Weiterhin wurde unter Verwendung des Serums FS (2) im Extrakt des
Nektars „Dietz“ eine Bande bei etwa 45 kDa sehr gut detektiert, während im Extrakt des FSG
„Gina“ eine Bande bei etwa 35 kDa gut visualisiert wurde. Das Serum LS mit EAST-

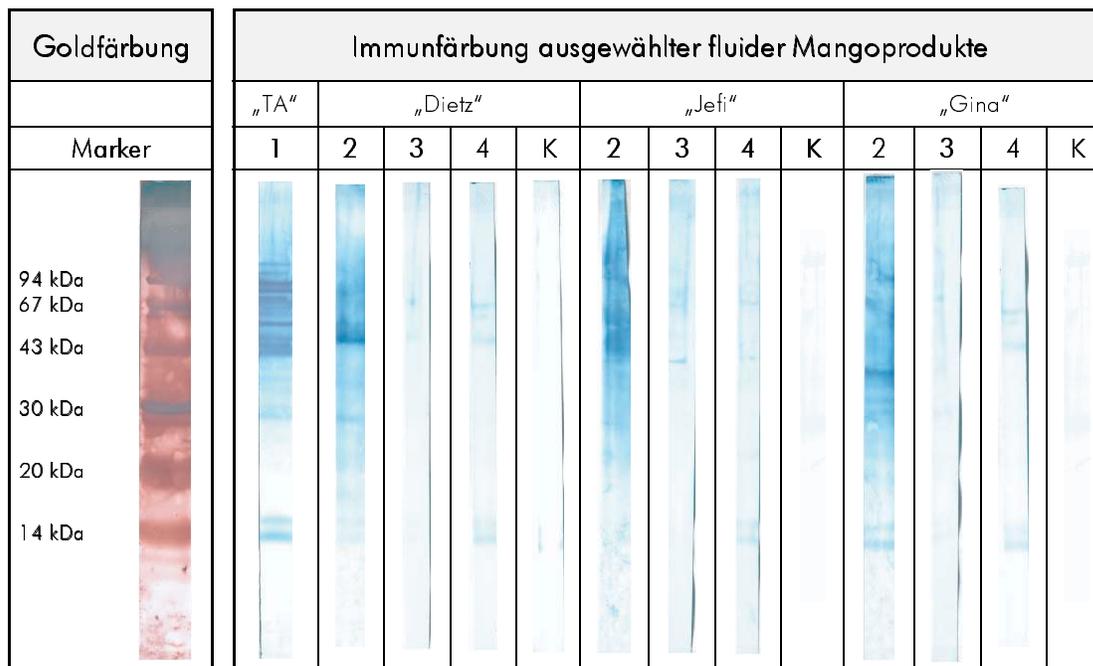


Abb. 4-XVIII: Immunoblot dreier ausgewählter fluider Mangoprodukte (Inkubation mit Einzelseren)

Marker: MG-Marker 2: Inkubation mit dem Serum FR 3: Inkubation mit dem Serum LS
1: native Frucht „TA“ 4: Inkubation mit dem Serum DS K: Inkubation mit dem Kontrollserum

Klasse 2 vermochte dagegen nur im FSG „Jefi“ das 40 kDa Hauptallergen sowie allgemein sehr
schwach höhermolekulare IgE-bindende Proteine zu visualisieren. In den jeweils mit dem Serum ei-
nes Nicht-Allergikers inkubierten Extrakten (5) waren keine Banden nachweisbar, wodurch unspezi-
fische Bindungen ausgeschlossen werden konnten. Die Ergebnisse dieser Immundefärbung mit Ein-
zelseren deuten auf eine Restallergenität der fluider Mangoprodukte aus dem Handel hin.

Abschließend erfolgte die relative Quantifizierung aller untersuchten Handelsproduktextrakte mittels
EAST-Inhibition, deren graphische Auswertung in Abbildung 4-XIX dargestellt ist. An die Festphase
wurde der Extrakt der nativen „TA“ gebunden, der ebenfalls zur homologen Inhibition eingesetzt
wurde. Aus dem sehr ähnlichen Verlauf der Inhibitionskurven und dem Vergleich der C₅₀-Werte, die

zwischen 4.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ des FSG „Gina“ und 20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ der Halbware „Püree“ schwanken, resultierte ein sehr ähnliches allergenes Potential der Mangoerzeugnisse im Vergleich zur Frischfrucht. Auch in der IB-Inhibition (nicht abgebildet) konnte eine Inhibition der beiden Hauptallergene sowie der 35 und 43 kDa Proteinbande nachgewiesen werden, lediglich die Profiline und das 50 kDa Protein wurden nur sehr schwach inhibiert. Dieses Ergebnis bestätigt die anhand der produzierten Mangopürees, -nektare und Trockenprodukte postulierte Stabilität der Mangoallergene gegen technologische Verarbeitungsprozesse.

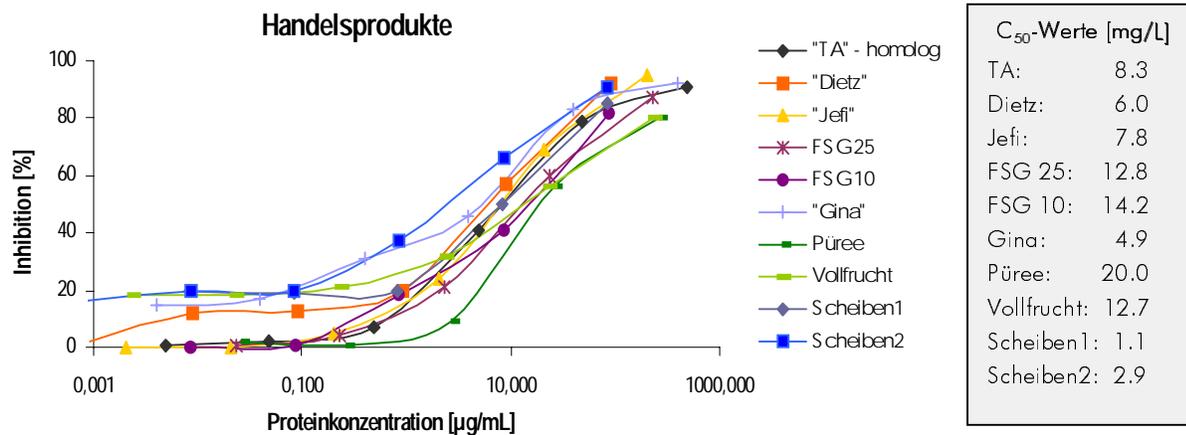


Abb. 4-XIX: EAST-Inhibition der untersuchten Handelsprodukte

4.1.7 In-vitro Verdauung

Die potentielle Persistenz der Mangoallergene gegen proteolytische Enzyme im sauren Milieu wurde unter Imitation der humanen Verdauung möglichst realitätsnah untersucht. Zunächst wurde der verzehrbare Anteil einer Mangofrucht der Sorte „TA“ dem in-vitro Magenverdau unterworfen, indem das stückige Mesokarp bei einem pH-Wert von 2.0 über variierende Inkubationszeiten verschiedenen Pepsinkonzentrationen bei 37 °C ausgesetzt wird. Der Abbildung 4-XX sind sowohl das unspezifisch gefärbte Gesamtproteinmuster als auch die immungefärbten Blotstreifen der Extrakte der unterschiedlich behandelten Mangos zu entnehmen. Das Proteinmuster der nativen Frucht (1) zeigte alle charakteristischen Proteinbanden, wobei die Banden bei 25 kDa, 30 kDa, 40 und 43 kDa besonders gut visualisiert wurden. Im IB konnte ebenfalls das mangospezifische Allergenbandenmuster detektiert werden. Die Inkubation der Mangostücke mit Salzsäure ohne Pepsinzusatz führte bereits zu einem Abbau der Proteine >50 kDa sowie zu einem veränderten Proteinmuster im niedermolekularen Bereich (2). Mittels Immunfärbung konnten allerdings sowohl die Profiline als auch die Hauptallergene und Banden bei 35 und ca. 50 kDa detektiert werden. Die entstandenen Proteine im Bereich von 3 -14 kDa wiesen keine allergene Potenz auf. In den Spalten 3 und 4 sind die unspezifisch gefärbten Extrakte der mit gleicher Pepsinkonzentration ($1.36 \cdot 10^7$ Units/L) und unterschiedlicher Inkubationsdauer (60 und 120 min) verdauten Mangostücke dargestellt. Analog zur Salzsäurebehandlung (2) wurden keine Proteine >50 kDa visualisiert, dafür aber diverse neue Proteinbanden unterhalb 17 kDa sowie eine weitere bei 35 kDa, die wahrscheinlich dem Pepsin

(Pe) zuzuordnen ist. Auch eine Erhöhung der Pepsinkonzentration auf $2.26 \cdot 10^7$ Units/L führte zu keiner weiteren Veränderung des Gesamtproteinmusters (5). Dem IB läßt sich entnehmen, daß der Zusatz von Pepsin unabhängig von der Konzentration und Inkubationsdauer einen Abbau der Profiline sowie aller IgE-bindenden Proteine oberhalb 50 kDa (3^*-5^*) bewirkte. Lediglich die Haupt-

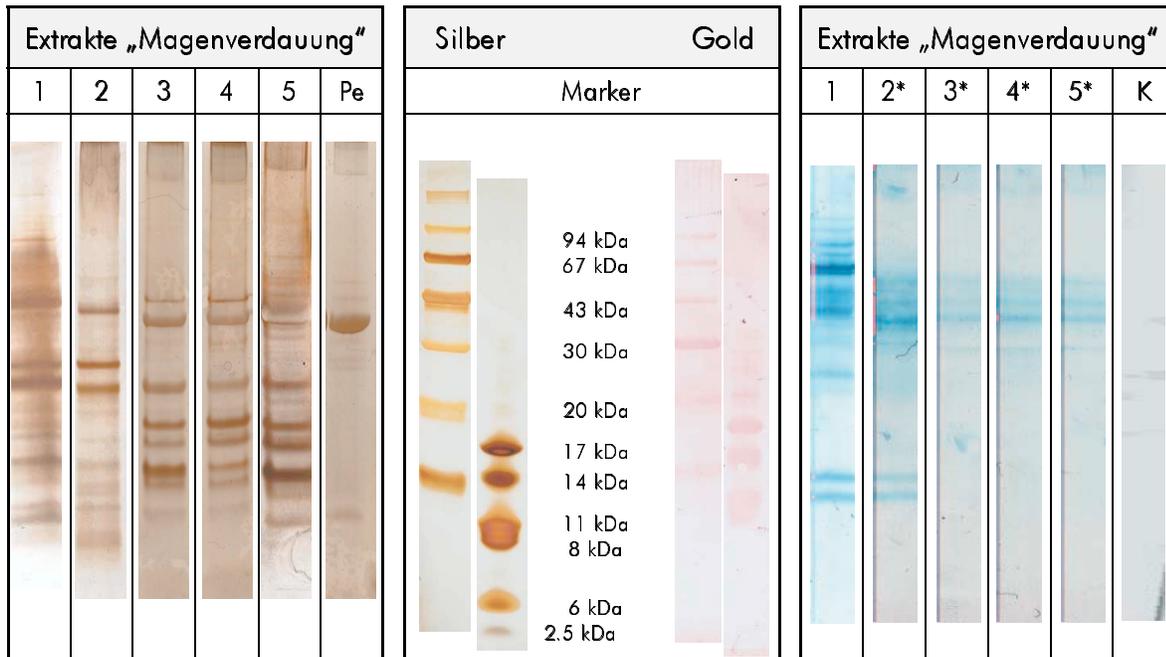


Abb. 4-XX: Gesamtproteinmuster und Immunfärbung der Extrakte des in-vitro Magenverdauung

Marker: MG-Marker 2: pH:2.0 – t: 120 min – ohne Pepsin 4: pH:2.0 – t: 120 min – $1.36 \cdot 10^7$ Units/L
 1: native Frucht „TA“ 3: pH:2.0 – t: 60 min – $1.36 \cdot 10^7$ Units/L 5: pH:2.0 – t: 120 min – $2.26 \cdot 10^7$ Units/L
 Pe: Pepsin *: Inkubation mit Poolserum K: Inkubation mit dem Kontrollserum

allergene Man i 1 und 2 sowie die IgE-bindenden Proteine mit MG von 43 und 50 kDa zeigten sich gegen die Pepsininkubation persistent. Im unteren MG-Bereich konnten analog zur Salzsäurebehandlung mit dem verwendeten Poolserum keine neuen Allergenbanden detektiert werden. Das Pepsin mit einem MG von 35 kDa wurde nicht visualisiert, ebenso ließen sich unspezifische Bindungen durch die Inkubation mit dem Serum eines Nichtallergikers ausschließen (K).

Im nächsten Schritt erfolgte der in-vitro Darmverdau gemäß der in Kapitel 3 und im Anhang 7.2.2 beschriebenen Vorgehensweise. Nach erfolgter Pepsininkubation (pH: 2.0; $1.36 \cdot 10^7$ Units/L für 120 min) wurde die Darmverdauung unter Verwendung der charakteristischen Enzyme Chymotrypsin, Trypsin, Pancreatin, Carboxypeptidase A und Protease K simuliert. In Abbildung 4-XXI sind beispielhaft die unspezifisch gefärbten Extrakte einiger Inkubationen sowie der einzelnen Enzyme zusammengestellt. In Spalte 1 ist das Gesamtproteinmuster der nativen Mango mit allen charakteristischen Banden dargestellt. Die Inkubation der vorverdauten Mangostücke mit Chymotrypsin (2+3) führte zu einem weiteren Abbau der Proteine, wobei die Detektion niedermolekularer Banden <14 kDa besonders auffällig erscheint. Ebenso deutlich wurden die Proteine mit MG von 25 kDa, 30 kDa, 40 und 43 kDa visualisiert. Inwieweit diese Proteine den eingesetzten Enzymen Pepsin und Chymotrypsin zuzuordnen sind, konnte erst im IB verifiziert werden. Eine Verdopplung

dete die Inkubation mit dem Dickdarmenzym Protease K (9). In dem Extrakt einer 120 minütigen Inkubation mit 13400 Units/L Enzym waren keine Mango spezifischen Proteine mehr apparent. Eine nähere Charakterisierung der potentiellen IgE-bindenden Proteine erfolgte mittels Immunfärbung nach erfolgtem Semidry-Blotting. Die gefärbten Blotstreifen der ausgewählten Extrakte sind Abbildung 4-XXII zu entnehmen.

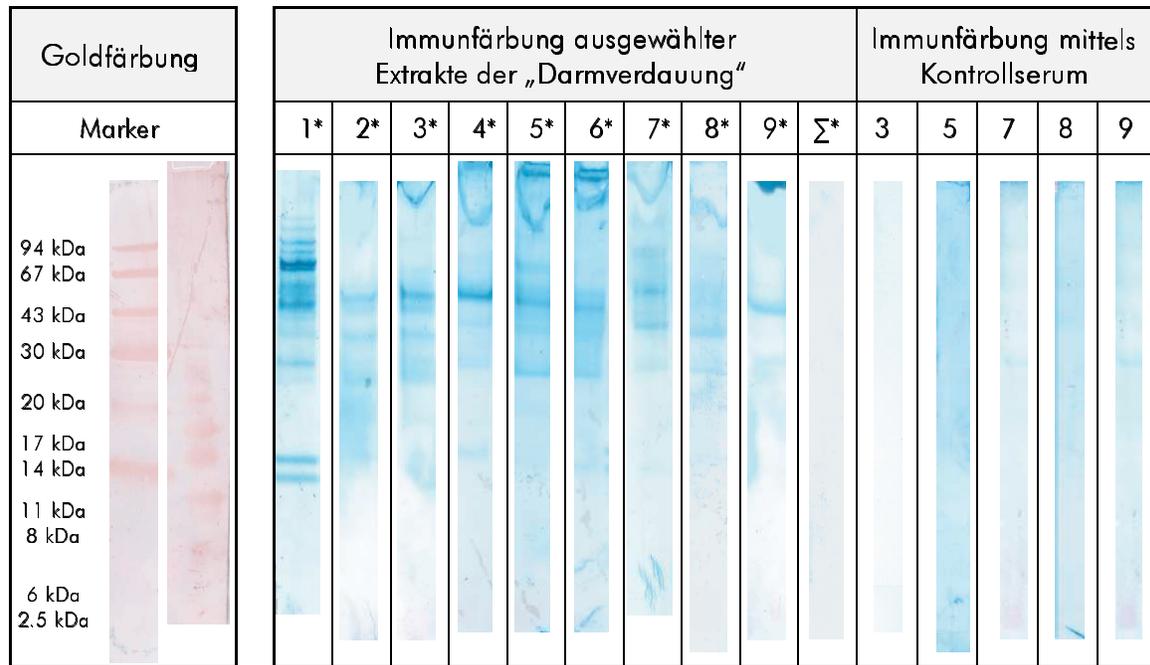


Abb. 4-XXII: Immunfärbung der ausgewählten Extrakte nach simuliertem Darmverdauung

Marker: MG-Marker
 1: native Frucht „TA“

| | |
|--|---|
| 2: Chymotryp. – t: 60 min – $7 \cdot 10^5$ Units/L | 3: Chymotryp. – t: 120 min – $7 \cdot 10^5$ Units/L |
| 4: Trypsin – t: 60 min – $109 \cdot 10^5$ Units/L | 5: Trypsin – t: 120 min – $109 \cdot 10^5$ Units/L |
| 6: Chymotryp+Trypsin – t: 120 min | 7: Pancreatin – t: 60 min – 1 :50 |
| 8: Carboxy.A – t: 120 min – 29095 Units/L | 9: Protease K – t: 120 min – 13400 Units/L |

Σ: Enzymgemisch

In allen Extrakten (2*-9*) konnten unter Verwendung des Poolserums die beiden Hauptallergene bei 30 und 40 kDa detektiert werden, die sich somit als sehr stabil gegenüber der proteolytischen Hydrolyse erwiesen. Zusätzlich wurde in allen Extrakten - mit Ausnahme der Inkubation mit Protease K - das 35 kDa Protein visualisiert. Insgesamt schien weder die Enzymkonzentration noch die Inkubationsdauer den enzymatischen Abbau dieser Proteine signifikant zu beeinflussen. Weiterhin wies keines der verwendeten Enzyme ein nachweisbares allergenes Potential auf (Σ*), ebenso konnten unspezifische Bindungen durch die Inkubation der einzelnen Extrakte (3, 5, 7-9) mit dem Serum eines Nichtallergikers ausgeschlossen werden. Die potentielle Persistenz der einzelnen Mangoallergene wurde sowohl mittels EAST-Inhibition als auch mittels IB-Inhibition verifiziert. Bei der IB-Inhibition wurde zunächst der Extrakt einer nativen Mango (Proteingehalt ca. 400 µg/mL) elektrophoretisch getrennt und mit ausgewählten Extrakten der einzelnen Versuchsreihen unterschiedlich verdauter Mangos sowie der nativen Mango inhibiert. Sämtliche zunächst auf einen Proteingehalt von ca. 200 µg/mL eingestellte Inhibitorlösungen bewiesen die Persistenz der beiden Hauptallergene Man i 1 und 2 sowie des 35 kDa-Allergens. Diese Banden wurden durch die jeweiligen Inhi-

bitorextrakte vollständig inhibiert (4-8). Alle weiteren IgE-bindenden Proteine mit den MG von 14 und 16 kDa, 25 kDa sowie größer 50 kDa wurden durch die proteolytisch wirkenden Enzyme abgebaut und ließen sich somit mittels der Immunfärbung detektieren (siehe Abbildung 4-XXIII). Lediglich das Pepsin (3) scheint neben den Hauptallergenen sowie dem 35 kDa-Protein auch die Profilin nicht vollständig zu hydrolysieren, so daß nach der Magenverdauung diese noch ein allergenes Restpotential aufwiesen. Die beiden Banden bei 14 und 16 kDa waren nach der Inhibition mit dem Extrakt einer pepsinbehandelten Mango zwar apparent, aber im Vergleich zum Extrakt der nativen Frucht (TA) deutlich geschwächt. In Spalte 1 ist der Blotstreifen der unspezifische Inhibition unter Verwendung einer Ovalbuminlösung, in Spalte 2 die zur vollständigen Inhibition des Allergenbandenmusters führende homologe Inhibition dargestellt. Als Kontrolle wurde ein Streifen mit dem Serum eines Nicht-Atopikers inkubiert, um unspezifische Bindungen ausschließen zu können.

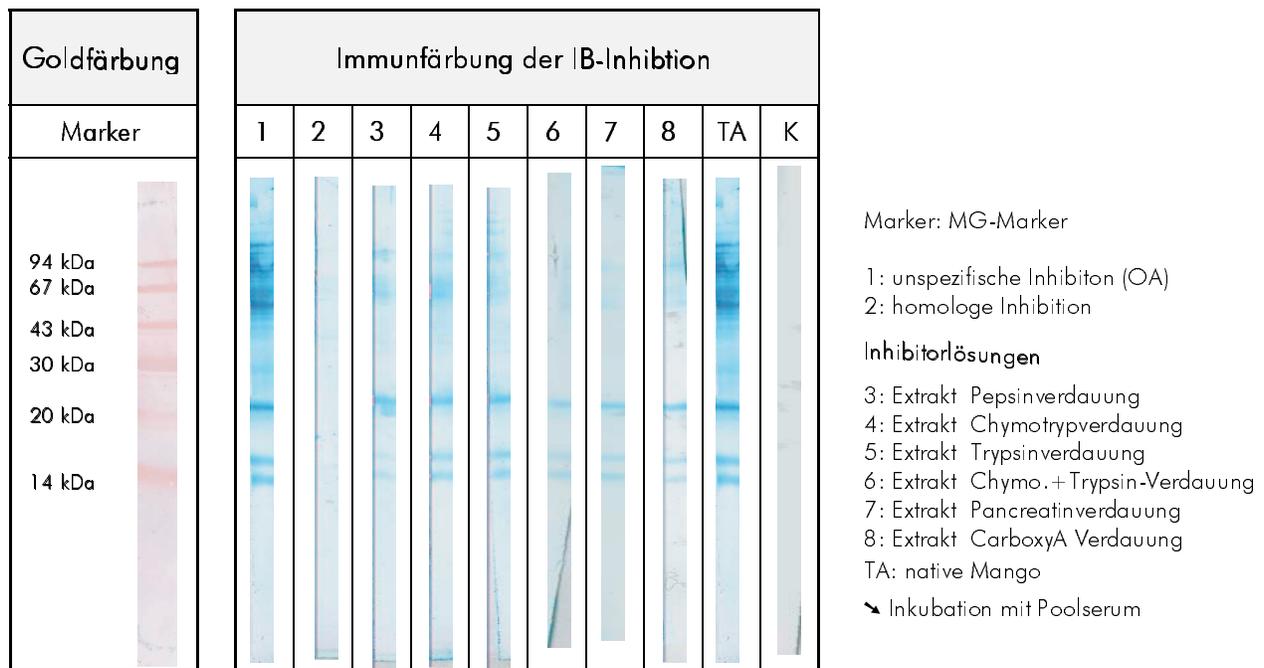


Abb. 4-XXIII: Immunoblot-Inhibition mit ausgewählten Extrakten nach erfolgtem Darmverdauung als Inhibitorlösungen und elektrophoretisch getrennter nativer Mango

Mittels EAST-Inhibition ließ sich aufgrund der Verläufe der Inhibitionskurven (nicht abgebildet), der erzielten maximalen Inhibitionen und der in Tabelle 4-III zusammengefaßten, errechneten C_{50} -Werte ein bestehendes allergenes Restpotential nachweisen. Die für eine 50 %ige Inhibition notwendigen Proteinkonzentrationen (C_{50} -Werte zwischen 7.1 und 15.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) wichen nur geringfügig von dem der homologen Inhibition ab. Die Ausnahme bildete der Extrakt der Trypsininkubation mit einem C_{50} -Wert von 22.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ im Gegensatz zu 7.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ des nativen Proteinextraktes.

Tab. 4-III: C₅₀-Werte und maximale Inhibitionen ausgewählter Extrakte nach in-vitro Verdauung

| Enzym | Extrakt | C ₅₀ -Wert [µg/mL] | max. Inhibition [%] |
|---------------|------------------------------|----------------------------------|------------------------|
| | native Mango | 7.6 | 94 |
| Pepsin: | 2.26·10 ⁷ Units/L | 7.1 | 96 |
| Chymotrypsin: | 7·10 ⁵ Units/L | 13.9 | 100 |
| Trypsin: | 109·10 ⁵ Units/L | 22.1 | 94 |
| Chymo.+Tryp | | 10.3 | 89 |
| Pancreatin: | 1:50 | 7.8 | 92 |
| Carboxy. A: | 29095 Units/L | 15.6 | 70 |
| Protease K: | 13400 Units/L | 7.6 | 98 |

| Extrakt | C ₅₀ -Wert [µg/mL] | max. Inhibition [%] |
|-----------------|----------------------------------|------------------------|
| | | |
| reine Enzymlsg. | - | 18 |
| reine Enzymlsg. | - | 26 |
| reine Enzymlsg. | - | 16 |
| | | |
| reine Enzymlsg. | - | 19 |
| reine Enzymlsg. | - | 23 |
| reine Enzymlsg. | - | 20 |

4.2 Untersuchungen zur Litchi

4.2.1 Charakterisierung der Litchiallergene mittels SDS-PAGE/Immunoblot

Zur Charakterisierung der Litchiallergene wurden in Zusammenarbeit mit dem Universitätskrankenhaus Eppendorf zunächst Seren von insgesamt 38 Probanden mit einer Sensibilisierung gegen Litchi zusammengestellt und zur Detektion der IgE-bindenden Proteine eingesetzt. Diese Patientenzahl läßt zwar keine sichere Klassifizierung der Allergene in Haupt- und Nebenallergene zu, allerdings können Aussagen über die tendenziöse Prägnanz der nachgewiesenen IgE-bindenden Proteine getroffen werden. Es wurde der Extrakt der nativen Litchi - Sorte „Mauritius“ – elektrophoretisch getrennt und nach dem Transfer auf eine NC-Membran mit den einzelnen Seren inkubiert. Alle eingesetzten Blutseren wiesen gegen Litchi EAST-Klassen ≥ 2 auf (Ergebnisse siehe Anhang 7.15), mit Ausnahme des Kontrollserums (K) eines Nicht-Atopikers. Die Zuordnung der MG der visualisierten Allergene erfolgte anhand des kolloidal gefärbten MG-Markers. Die Abbildungen 4-XXIV und 4-XXV dokumentieren die immungefärbten Blotstreifen aller eingesetzten Einzelseren. In der Spalte P ist ein mit Poolserum inkubierter immungefärbter Litchi-Extrakt dargestellt. Der unter Verwendung des Kontrollserums (K) auf unspezifische Bindungen getestete Extrakt wies keine detektierbaren Banden auf. Im Extrakt der nativen Litchi (P; mit Poolserum inkubiert) ließen sich IgE-bindende Pro-

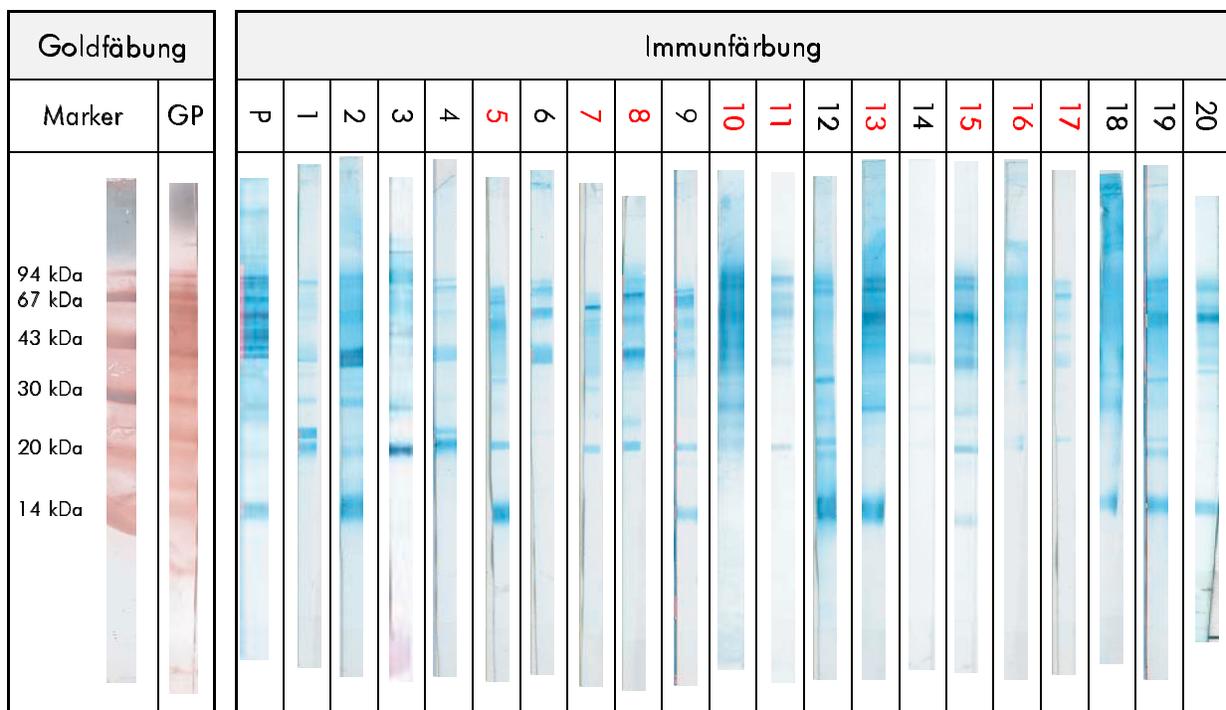


Abb 4-XXIV: Immunoblot unter Verwendung der Seren 1-20 von Patienten mit einer Sensibilisierung gegen Litchi

Marker: Molekulargewichtsmarker P: Poolserum 1: JA 2: GB 3: NB 4: JB 5: RD 6: CE
 GP: Gesamtproteinmuster 7: RF 8: CF 9: MF 10: KDH 11: UH 12: IH 13: RK
 ↳ kolloidale Goldfärbung 14: PK 15: SK 16: KL 17: CL 18: IM 19: MM 20: Nu*

■ Die rot nummerierten Seren sind Bestandteile des Poolserums (siehe Anhang 7.15)

* Nu: Name unbekannt

häufig als pflanzliche Profiline identifiziert werden, so daß eine Anwesenheit dieser Panallergene in der Litchi vermutet wird.

Tab. 4-IV: Zusammenstellung der charakterisierten Litchi-Allergene

| | 14 kDa | 20 kDa | 24 kDa | 30 kDa | 35 kDa | 40 kDa | 42 kDa | 55 kDa | 67 kDa | 94 kDa | >67 kDa |
|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|
| Seren | 21 | 18 | 23 | 19 | 10 | 28 | 9 | 34 | 32 | 23 | 16 |
| Anteil* [%] | 55 | 47 | 61 | 50 | 26 | 74 | 24 | 90 | 84 | 61 | 42 |

* Anteil der positiv reagierenden Seren von den insgesamt 38 eingesetzten Seren

4.2.2 Sortenvergleich

Die Untersuchung eines potentiellen Einflusses der Sorte auf das allergene Potential der Litchi wurde anhand sieben verschiedener Varietäten unterschiedlicher Herkunft durchgeführt. Die unter Verwendung des Poolserums immungefärbten nativen Extrakte der jeweiligen Frucht sind in Abbildung 4-XXVI dargestellt. Sowohl in der nicht abgebildeten unspezifischen Silberfärbung als auch im Immunoblot zeigten alle Extrakte ein nahezu identisches Proteinmuster. Die IgE-bindenden Proteine mit MG von 14 kDa und >30 kDa, insbesondere die Banden bei 35 kDa, 40 kDa, ca. 42 kDa, 55 und 67 kDa, konnten in allen Sorten (1-7) deutlich visualisiert werden. Lediglich die Allergene mit MG von 20 sowie ca. 25 kDa wurden unterschiedlich intensiv detektiert. In den Extrakten der Sorten Kuang Chao (1), Chacapat (3) und Cope (6) trat die 20 kDa Proteinbande deutlich hervor,

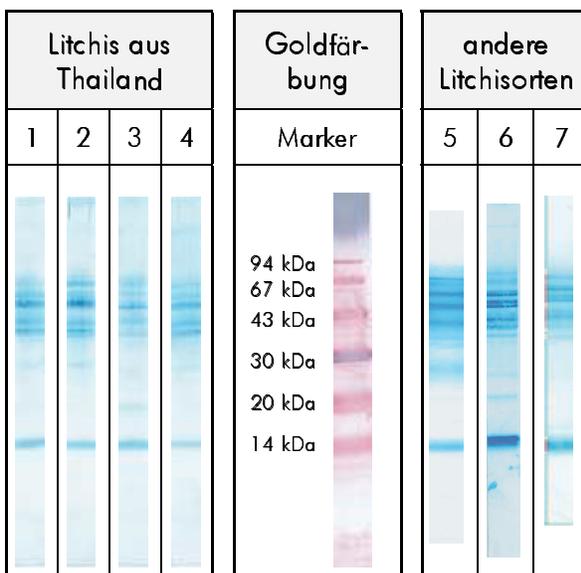


Abb. 4-XXVI: Immunoblot der sieben untersuchten Litchivarietäten

Marker: MG-Marker (kolloidale Goldfärbung)

- 1: Kuang Chao
- 2: Bai Dum
- 3: Chacapat
- 4: Hong Huey
- 5: Mauritius [Südafrika]
- 6: Cope [Südafrika]
- 7: unbekannte Sorte [Madagaskar]

während sie in den anderen Varietäten nur schwach zu erkennen war. Die 25 kDa Bande war in allen Extrakten, insbesondere aber bei den Sorten Chacapat (3) und Cope (6), nur schwach nachweisbar. Die Ergebnisse des Immunoblots sowie der unspezifischen Silberfärbung (nicht dargestellt) zeigten keine Unterschiede im Protein/Allergenbandenmuster in Abhängigkeit der Litchivarietät. Zur

Absicherung dieser Ergebnisse und zum Vergleich der sortenspezifischen allergenen Aktivität der IgE-bindenden Proteine wurden sowohl EAST- als auch IB-Inhibitionen durchgeführt, wobei jeder Extrakt einmal festphasengebunden mit den sieben Extrakten der Litchisorten inhibiert wurde. Abbildung 4-XXVII zeigt beispielhaft die Inhibitionsgraphen der EAST-Inhibition mit der Litchi „Mauritius“ als festphasengebundene Komponente. Der nahezu deckungsgleiche Verlauf der Inhibitionskurven sowie die maximalen Inhibitionen von über 90 % und die kaum schwankenden C_{50} -Werte bestätigten die Ergebnisse des Immunoblots. Die für eine 50 %ige Inhibition benötigten Proteinkonzentrationen der Inhibitorextrakte zwischen 3.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ und 8.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ wichen kaum von der des homologen Extraktes (5.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ab. Die IB-Inhibitionen ergaben eine identische inhibierende Wirkung der sieben Proteinextrakte (nicht dargestellt). Alle auf eine ähnliche Proteinkonzentration von ca. 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ eingestellten Extrakte vermochten analog des homologen Extraktes die Detektion des kompletten Allergenbandenmuster der jeweiligen festphasengebundenen Sorte zu hemmen. Zusammenfassend können sortenabhängige Variationen des allergenen Potentials der Litchi ausgeschlossen werden.

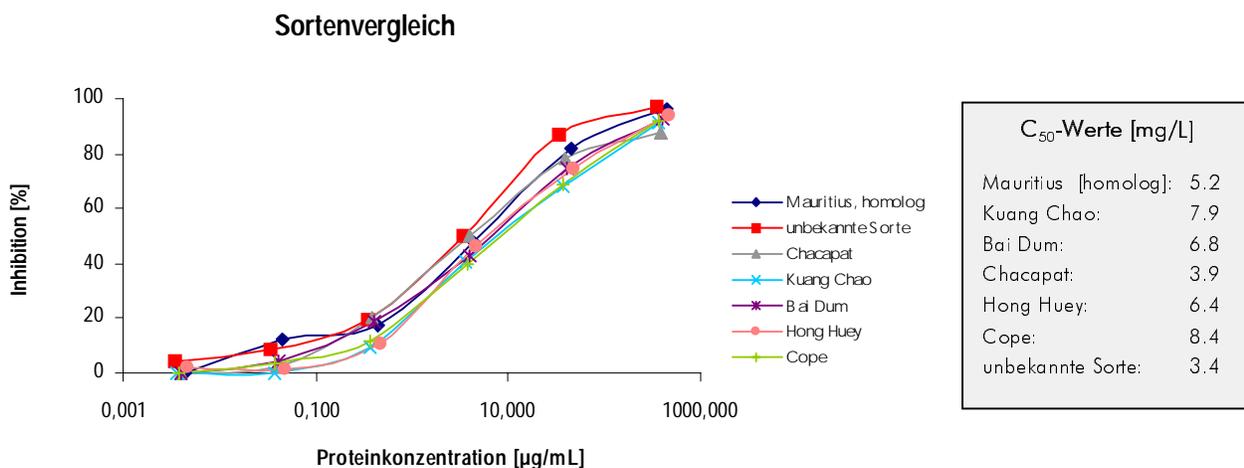


Abb. 4-XXVII: EAST-Inhibitionsgraphen & C_{50} -Werte der sieben Litchivarietäten mit der Sorte „Mauritius“ als festphasengebundene Variante

4.2.3 Arillus und Perikarp

Zur umfassenden Charakterisierung der Litchi-Allergene wurde sowohl das Fruchtfleisch (Arillus) als auch die Schale der exotischen Frucht untersucht. Die mittels Tieftemperaturextraktion hergestellten Proteinextrakte von Litchis der thailändischen Sorte „Chacapat“ wurden für den Vergleich der Allergenität von Perikarp und Mesokarp sowie auch für die in den nachfolgenden Kapiteln beschriebenen Untersuchungen mittels IEF, für den Profilin-Nachweis und die Sequenzierung verwendet. Die jeweiligen Proteingehalte sind dem Anhang 7.16.2 zu entnehmen. Zunächst wurden beide Extrakte mittels SDS-PAGE getrennt und sowohl unspezifisch als auch immungefärbt. Die visualisierten Proteinmuster sind der Abbildung 4-XXVIII zu entnehmen. Während das Gesamtproteinmuster

sowie das Allergenmuster des Arillus (2) alle charakteristischen Banden zeigte, unterschied sich die Proteinzusammensetzung des Perikarps (1) hiervon deutlich. In der unspezifischen Silberfärbung konnte gerade im MG-Bereich oberhalb 30 kDa ein differentes Bild beobachtet werden. Der Extrakt der Litchischale zeigte eine Proteinbande bei 40 kDa, eine sehr breite, intensiv detektierte Bande bei 50 kDa und zwei weitere Proteine bei ca. 80 und 100 kDa. Im niedermolekularen Bereich wurden ähnlich wie im Fruchtfleischextrakt Proteine bei 10 kDa, 16 kDa, 18 kDa, 22 und 25 kDa visualisiert. Die Immunfärbung unter Verwendung des Poolserums verdeutlichte allerdings signifikante Unterschiede. Während im Mesokarp die Proteine bei 14 kDa, 20 und 25 kDa IgE-bindende Eigenschaften aufwiesen, zeigten im Perikarp nur die Proteine mit MG von 16 kDa (sehr schwach), 18 und 22 kDa eine allergene Aktivität. Die vier höhermolekularen Proteine konnten auch im IB als sehr intensive Banden visualisiert werden. Zur weiteren Untersuchung des allergenen Potentials beider Extrakte im Vergleich wurden eine IB-Inhibition sowie eine EAST-Inhibition durchgeführt. Die Ergebnisse der IB-Inhibition sind in Abbildung 4-XXIX dokumentiert. Elektrophoretisch getrennt wurde der auf 400 µg/mL Proteingehalt eingestellte Extrakt des Fruchtfleisches und anschließend homolog (2) und mit dem Extrakt der Schale (1) – Proteingehalte jeweils ca.

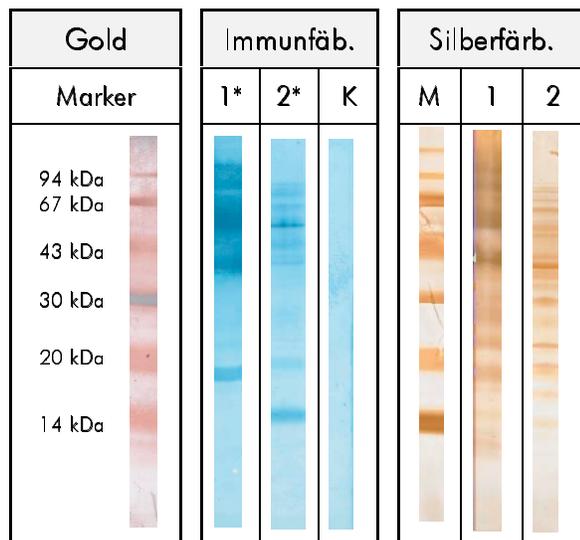


Abb. 4-XXVIII: Silber- & Immunfärbung des Peri- & Mesokarps der Litchi „Chacapat“

Marker: MG- Marker 1: Schale 2: Fruchtfleisch
 K: Kontrollserum * Inkubation: Poolserum

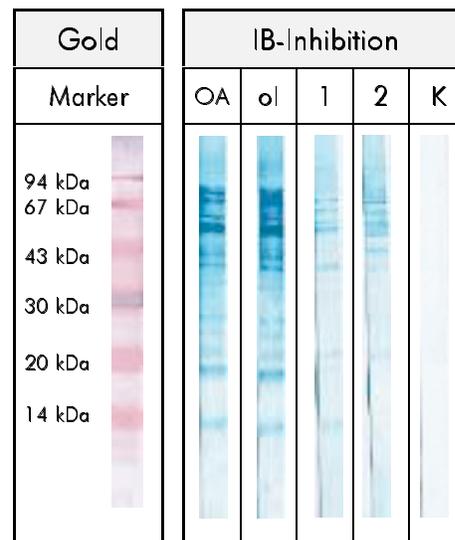


Abb. 4-XXIX: IB-Inhibition (inkubiert mit Poolserum)
 Festphase: Mesokarp „Chacapat“

Marker: MG-Marker OA: unspezifische Inhibition
 ol: ohne Inhibitor
 K: Kontrollserum 1: Schale „Chacapat“
 2: homolog Mesokarp

200 µg/mL - inhibiert. Die Inhibition mit dem Extrakt des Fruchtfleisches induzierte keine vollständige Löschung des Allergenbandenmusters. Die IgE-bindenden Proteine mit MG von 24 kDa, 43 kDa, 55 und ≥ 67 kDa waren weiterhin apparent. Eine ähnlich starke Inhibition des Allergenmusters zeigte der Extrakt der Schale, jedoch mit leichten Abweichungen. Das durch die homologe Inhibition nicht mehr detektierte Profilin konnte von den Allergenen der Schale nicht inhibiert werden und bleibt somit visualisierbar. Das 24 kDa Protein war analog der homologen Inhibition schwach sichtbar, so daß eine vergleichbare allergene Aktivität vermutet werden konnte. Im Ge-

gensatz zur Inhibition mit dem Fruchtfleischextrakt bewirkte der Extrakt der Schale eine vollständige Hemmung des 43 kDa Allergens. Die Schale scheint somit ein vergleichbares Allergen mit einer höheren allergenen Potenz aufzuweisen. Des weiteren konnte das 40 kDa Allergen vom Fruchtfleischextrakt nicht vollständig inhibiert werden, während es nach der homologen Inhibition nicht mehr apparent war. Die Detektionsintensität der höhermolekularen Allergene war bei beiden Inhibitor-extrakten identisch, ebenso konnte das IgE-bindende Allergen mit einem MG von 20 kDa von beiden Proteinlösungen vollständig gehemmt werden. Diese Ergebnisse bestätigten die bereits postulierten Unterschiede in der Allergenzusammensetzung der Litchischale und des Fruchtfleisches. Im Perikarp war im IB kein IgE-bindendes Protein mit einem MG von 14 kDa apparent, woraus die unterbleibende Inhibition des Profilins in der IB-Inhibition resultiert. Das intensiv im Schalenextrakt detektierte Allergen bei 40 kDa induziert ebenfalls keine Inhibition des vergleichbar schweren Allergens aus dem Fruchtfleisch, eine ähnliche Struktur beider Proteine scheint damit ausgeschlossen.

Die relative Quantifizierung mittels EAST-Inhibition, deren graphische Auswertung Abbildung 4-XXX zu entnehmen ist, deutete auf eine stärkere allergene Potenz der Litchischale hin. Obwohl ein ähnlicher Kurvenverlauf der Extrakte zu beobachten war, erschienen die Graphen der Fruchtfleischextrakte deutlich zu höheren Proteinkonzentrationen verschoben. Der Vergleich der für eine 50 %ige Inhibition benötigten Proteinkonzentrationen ergab einen fast sechsfach höheren mittleren C_{50} -Wert von 15.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ als für den Schalenextrakt (C_{50} -Wert von 2.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

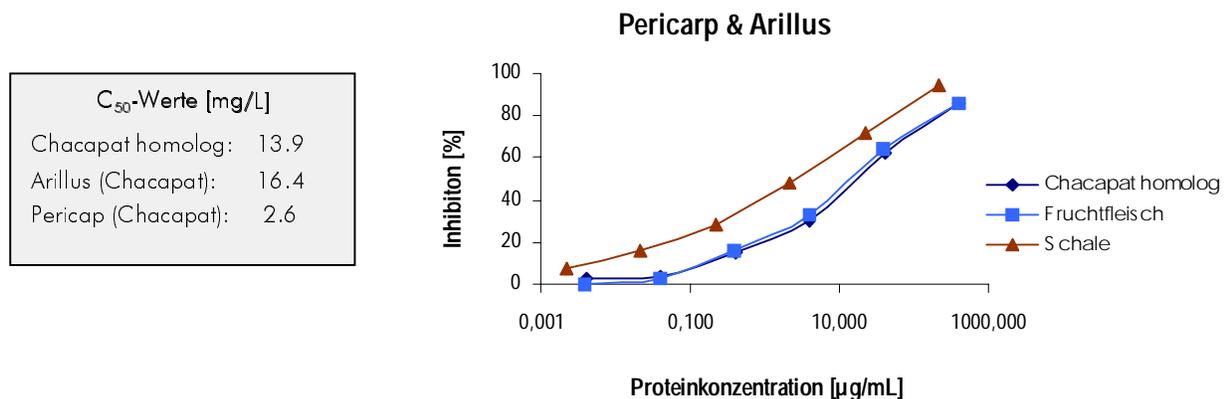


Abb. 4-XXX: Inhibitionsgraphen & C_{50} -Werte der Extrakte des Meso- und Perikarps mit dem Fruchtfleischextrakt als festphasengekoppelte Variante

Zusammenfassend kann nicht nur ein Unterschied im Gesamtprotein- sowie im Allergenbandenmuster zwischen Arillus und Perikarp festgestellt, sondern auch ein höheres allergenes Potential der Litchischale nachgewiesen werden.

4.2.4 Charakterisierung der Litchiallergene mittels IEF

Die Charakterisierung der Litchiallergene anhand ihrer pI erfolgte mittels IEF sowohl mit anschließender Silberfärbung als auch im Immunoblot. In Abbildung 4-XXXI sind die Ergebnisse beider Färbungen dargestellt. Wie in Kapitel 4.2.3 bereits erwähnt, wurden die Extrakte des Meso- und Perikarps der Sorte „Chacapat“ sowie zusätzlich ein Extrakt des Fruchtfleisches der Sorte „Mauritius“ untersucht, wobei zwei verschiedene IEF-Gele (Gel I pH-Bereich 3-7 und Gel II pH-Bereich 3-10) Verwendung fanden. In dem Extrakt der Litchischale (1) waren ca. 6 Proteinbanden mit pI unterhalb 5.0 apparent. Sehr intensiv wurden die Banden bei pI von 4.7, 4.4, 3.5, 3.4 und 3.3, etwas schwächer bei 3.2 visualisiert. Proteine mit neutralen isoelektrischen Punkten konnten bei ca. 6.0, 5.8 und 5.5 schwach nachgewiesen werden. Im IB zeigten die Proteine mit pI <3.5 starke IgE-bindende Eigenschaften, die Proteine mit pI von 5.5, 5.8 und 6.0 konnten nur schwach detektiert werden. Die Extrakte des Litchifruchtfleisches (2a bzw. 2b) wurden zunächst im Gel II getrennt. Auch hier zeigten sich überwiegend Proteine mit sauren pI apparent, wobei keine Unterschiede zwischen den beiden Sorten beobachtet werden konnten. Es wurden Banden bei pH-Werten von 6.5, 5.7, 5.6, 5.4, 4.7, 4.2, 3.5, 3.4, 3.3, 3.1 und 3.0 visualisiert. Alle Banden sowie eine zusätzliche bei pH 6.9 konnten auch im IB deutlich detektiert werden, wobei sowohl die Immun- als auch die unspezifische Färbung der IgE-bindenden Proteine mit pI von 3.3 und 3.4 als breite Banden sehr intensiv erfolgte. Der Fruchtfleischextrakt der Litchi „Chacapat“ wurde zusätzlich in einem IEF-Gel 3-7 getrennt, um die Zuordnung der Proteine mit pI unterhalb 6.0 zu verifizieren. Die Proteinbanden bei den pH-Werten 6.5, 5.7, 5.6 sowie 5.4 konnten deutlich visualisiert werden und bestätigten die erzielten Ergebnisse. Da in dem IEF-Gel I Proteine unterhalb pH 5.3 stärker ge-

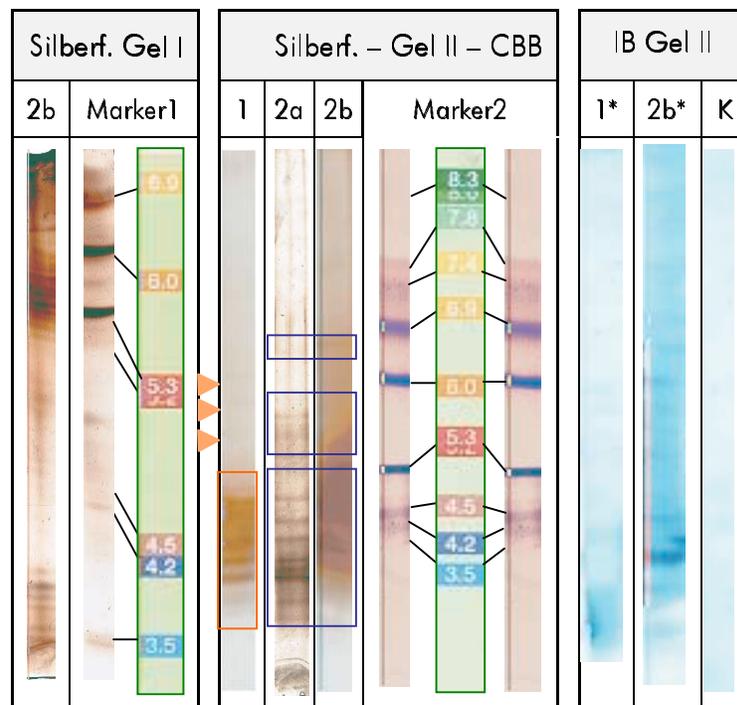
Abb. 4-XXXI: Silberfärbung & IB der mittels IEF getrennten Proteinextrakte

Verwendet wurden zwei verschiedene IEF-Gele: Gel I → pH 3-7
Gel II → pH 3-10

1: Schale – Sorte „Chacapat“
2a: Fruchtfleisch – Sorte „Mauritius“
2b: Fruchtfleisch – Sorte „Chacapat“
K: Kontrollserum

Molekulargewichtsmarker:
Marker1: getrennt in IEF-Gel II
Marker2: getrennt in IEF-Gel I

* Inkubation mit Poolserum



trennt werden, konnten in diesem Bereich zusätzliche Banden visualisiert werden. Zunächst waren zwei Banden mit pI 5.2 und 5.3 apparent, die in Gel II nicht erkannt wurden. Das Protein mit einem pI bei 4.7 konnte bestätigt werden, zusätzlich traten Banden bei pH 4.8 und schwach bei 4.6 bzw. 4.65 auf. Die zuvor einem pI von 4.2 zugeordnete Proteinbande war im Gel I nur schwach apparent, dafür konnten die sehr intensiv gefärbten Banden im pH -Bereich um 3.5 weiter aufgetrennt werden, so daß nun 6 Proteine detektiert werden konnten. Die pI lagen bei 3.5, 3.6, 3.7, 3.75, 3.8 und 3.9. Proteine unterhalb 3.5 konnten in diesem Gel nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Litchiproteine sowohl der Schale als auch des Fruchtfleisches überwiegend pI unterhalb 6.0 aufweisen, wobei vermehrt Proteine im pH -Bereich zwischen 3.0 und 4.0 apparent sind.

4.2.5 Profilin-Nachweis

Die Identifizierung potentieller Profiline sowohl im Fruchtfleisch als auch im Perikarp der Litchi erfolgte ebenfalls aus den jeweiligen Extrakten der Sorte „Chacapat“ unter Verwendung eines Anti-Birnenprofilin-Antikörpers. Abbildung 4-XXXII sind die Ergebnisse des Profilinblots im Vergleich zu immungefärbten Extrakten zu entnehmen. Im Extrakt der Schale (1) konnte kein Profilin nachgewiesen werden. Die im IB detektierten Proteinbanden bei 16 und 18 kDa sind demnach keine pflanzlichen Profiline. Der Extrakt des Fruchtfleisches (2) ergab ein sehr differentes Bild. Neben dem potentiellen Profilin mit einem MG von 14 kDa wurden drei weitere Banden deutlich detektiert, die im IB nicht apparent sind. Daraus resultiert, daß in dem Litchimesokarp neben dem häufig verbreiteten 14 kDa Profilin noch weitere mit MG von 13 kDa und ca. 8 und 10 kDa vorkommen. Unspezifische Färbungen konnten durch die Durchführung einer Kontrolle (K; Inkubation ohne Antikörper) ausgeschlossen werden.

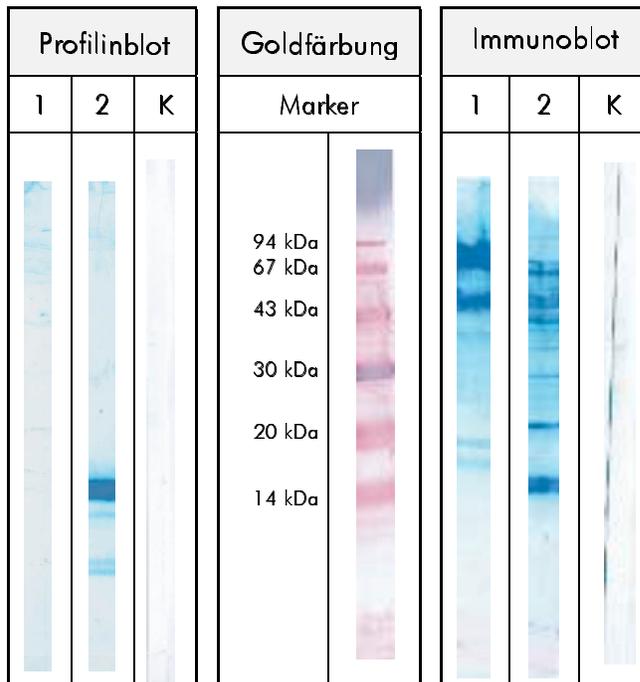


Abb. 4-XXXII: Profilinblot & IB der Extrakte des Meso- und Perikarp

Inkubation Profilin: Anti-Birnenprofilin
Inkubation IB: Poolserum

1: Schale der Sorte „Chacapat“
2: Fruchtfleisch „Chacapat“

Marker: Molekulargewichtsmarker
(↘ kolloidale Goldfärbung)

K: Kontrolle (inkubiert ohne Anti-Profilin-Antikörper)



4.2.6 Sequenzierung

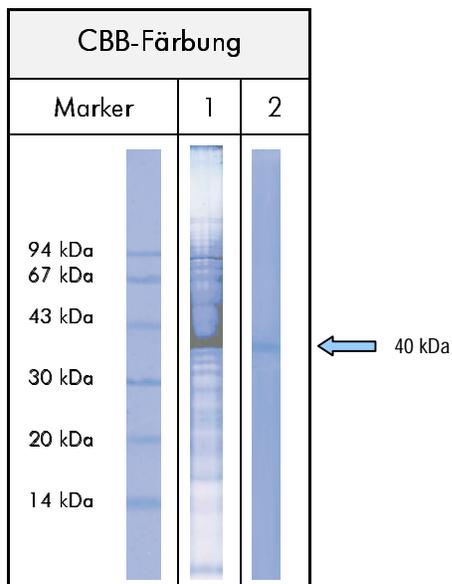


Abb. 4-XXXIII: CBB-Färbung der mittels EE isolierten Banden

Marker: MG- Marker 1: native Litchi
 2: isoliertes 40 kDa Protein

Für die N-terminale Sequenzanalyse nach Edman wurden Proteinextrakte der nativen Litchi zunächst elektrophoretisch mittels SDS-PAGE getrennt und mit CBB unspezifisch gefärbt. Es wurde repräsentativ die intensiv detektierte Bande bei ca. 40 kDa ausgeschnitten und mittels EE isoliert. Das erhaltene Isolat wurde mittels Ultrazentrifugation sowohl gereinigt als auch konzentriert und elektrophoretisch getrennt. Abbildung 4-XXXIII zeigt die CBB-Färbung des auf eine PVDF geblotteten Proteinisolates (2). Die im Isolat detektierte einzelne Bande wurde ausgeschnitten und direkt zur N-terminalen Aminosäuresequenzanalyse eingesetzt. In Spalte 1 ist zum Vergleich der ebenfalls CBB gefärbte Extrakt eines mittels SDS-PAGE getrennten nativen Litchiextraktes dargestellt.

Die Sequenzanalyse ergab die in Tabelle 4-V dargestellte Aminosäureabfolge. Die Proteinkonzentration der 40 kDa Bande reichte für eine Analyse von 20 Cyclen aus und ergab eine recht eindeutige Aminosäuresequenz. Der Vergleich mit bereits bekannten in der Proteindatenbank SWISSPROT dokumentierten Aminosäuresequenzen zeigte eine 87 %ige Übereinstimmung mit der Glycerinaldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase des weißen Senfs (G3PC-Sinal).

Tab. 4-V: Aminosäuresequenz der analysierten Proteinbanden

| | 1 | 5 | 10 | 15 | 20 | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------|---|---|----|----|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 40 kDa-Bande | A | K | D | K | V | I | K | I | G | I | N | G | F | G | - | I | G | A | L | V |
| | | | | | K | | | N | | F | | | I | | R | | V | | S | |
| G3PC-Sinal | | A | D | K | K | I | K | I | G | I | N | G | F | G | R | I | G | R | L | V |

Übereinstimmende Aminosäuren sind grau gekennzeichnet. Die in der 2. Zeile stehenden Aminosäure sind Alternativvorschläge geringere Priorität.

4.2.7 Kreuzreaktivitäten

In der Literatur wird die Litchiallergie als pollenassoziierte Lebensmittelallergie postuliert. Gemeinsam mit anderen exotischen Früchten wird zwar eine Kreuzreaktivität zu Birkenpollen, Sellerie, Beifuß und anderen Früchten vermutet, aber bisher noch nicht eingehend untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun die potentielle Kreuzreaktivität zu den birkenpollenassoziierten Lebensmitteln Apfel, Karotte, Haselnuß und Sellerie sowie zur Mango und Kartoffel untersucht werden. Zusätzlich wurde auf eine Assoziation zu Beifußpollen getestet. Zur Überprüfung und Absicherung der Metho-

de wurden die Untersuchungen mit dem nicht kreuzreagierenden tierischen Lebensmittel Hühnerei ergänzend durchgeführt. Zunächst wurden alle eingesetzten Proteinextrakte der zu prüfenden Früchte, Gemüse und Pollen mittels SDS-PAGE getrennt und sowohl das jeweilige Gesamtproteinmuster als auch das Allergenmuster charakterisiert. Zur Immunfärbung wurde ein Poolserum eingesetzt, welches aus Patientenseren mit hohem spezifischen IgE-Gehalt gegen Birkenpollen und EAST-Klassen ≥ 2 gegen einzelne der verwendeten Früchte, Gemüse bzw. Beifußpollen zusammengestellt wurde. Zusätzlich wurden die EAST-Klassen des Poolserums für alle Extrakte bestimmt. Diese Ergebnisse sind der Tabelle 7-VIIB im Anhang 7.14 zu entnehmen. Zur Detektion der Hühnereiallergene stand ein Einzelerum eines Ei-Allergikers mit einer EAST-Klasse von 4 zur Verfügung. Abbildung 4-XXXIV illustriert die zunächst mittels unspezifischer Silber- und spezifischer Immunfärbung charakterisierten Extrakte. In der Silberfärbung konnte in allen Extrakten ein breites Gesamtproteinmuster detektiert werden. Im Immunoblot zeigte das eingesetzte Poolserum IgE-bindende Eigenschaften gegen alle bekannten Hauptallergene der jeweiligen Extrakte. Im Mangoextrakt (1) waren die beiden Hauptallergene bei 30 und 40 kDa schwach apparent (PASCHKE et al. 2001b). Weitere Allergene bei 43 kDa und im höhermolekularen MG-Bereich sowie die Profiline bei 14 und 16 kDa konnten ebenfalls visualisiert werden. Das in der Literatur beschriebene Hauptallergen der Karotte Dau c 1 bei 16 kDa (HOFFMANN-SOMMERGRUBER et al.1999), sowie

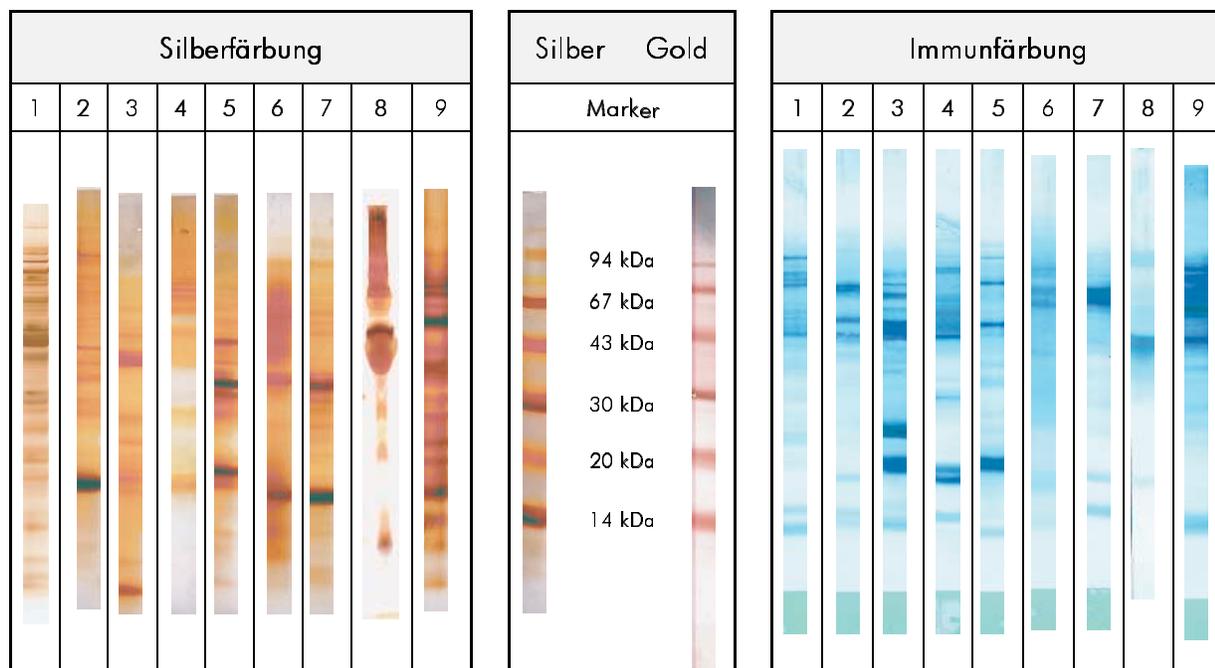


Abb. 4-XXXIV: Silber- & Immunfärbung der für die Untersuchungen eingesetzten Proteinextrakte

Marker: Molekulargewichtsmarker 1: Mango 2: Karotte 3: Kartoffel 4: Haselnuß 5: Apfel
 6: Beifuß 7: Sellerie 8: Ei 9: Litchi

weitere Allergene im MG-Bereich von 18 kDa und 36 bis 87 kDa (HELBING et al. 1994; QUIRCE 1997) konnten eindeutig im Extrakt des nativen Gemüses (2) visualisiert werden. In der Kartoffel (3) wurden bisher Allergene mit MG von 16 und 30 kDa sowie zwischen 43 und 60 kDa (WAHL et al.

1990) und zwischen 14 und 40 kDa (CASTELLS et al. 1986) identifiziert. Im untersuchten Extrakt wurden diverse Banden visualisiert, besonders intensiv jedoch bei 14 kDa, 20 kDa, 24 kDa, 43 und 60 kDa. Im Extrakt der immungefärbten Haselnuß (4) waren sowohl das Hauptallergen bei 18 kDa (HIRSCHWEHR et al. 1992) als auch die in der Literatur beschriebenen Minorallergene bei 14 kDa und im Bereich zwischen 40 und 69 kDa (CABALLERO et al. 1997) apparent. Im Extrakt des Apfels (5) konnte das Hauptallergen Mal d 1 (EBNER et al. 1991; FAHLBUSCH et al. 1995) bei 18 kDa besonders intensiv visualisiert werden. Zusätzlich wurden weitere in der Literatur beschriebene (z.B. WADEE et al. 1990; VIETHS et al. 1993b) Allergenbanden bei 14 kDa, 35 kDa, 50 und 67 kDa nachgewiesen. Die beiden Hauptallergene Art v 1 und 2 mit MG von 60 bzw. 35 kDa (NEDERGAARD-LARSEN & LOEWENSTEIN 1999) konnten neben einem weiteren Allergen bei ca. 70 kDa eindeutig im Beifußpollenextrakt (6) detektiert werden. Im Proteinextrakt des Selleries wurden vermutlich bei ca. 14 kDa das Api g 1 mit einem eigentlichen MG von 16 kDa und eindeutig das Api g 2 bei 17 kDa visualisiert. Zusätzlich konnte besonders intensiv ein Allergen bei 60 kDa detektiert werden (z.B. BAUER et al. 1996, JANKIEWICZ et al. 1998). Unter Verwendung des Serums des Ei-Allergikers konnte im Extrakt des Eiklars (7) besonders stark das Hauptallergen Ovalbumin bei 43 kDa und etwas schwächer das Ovomucoid bei 28 kDa (BESLER et al. 1997) visualisiert werden. Zusätzlich waren zwei schwache Banden bei 18 und ca. 90 kDa apparent. Im Litchiextrakt (7) konnten alle zuvor charakterisierten Allergenbanden detektiert werden.

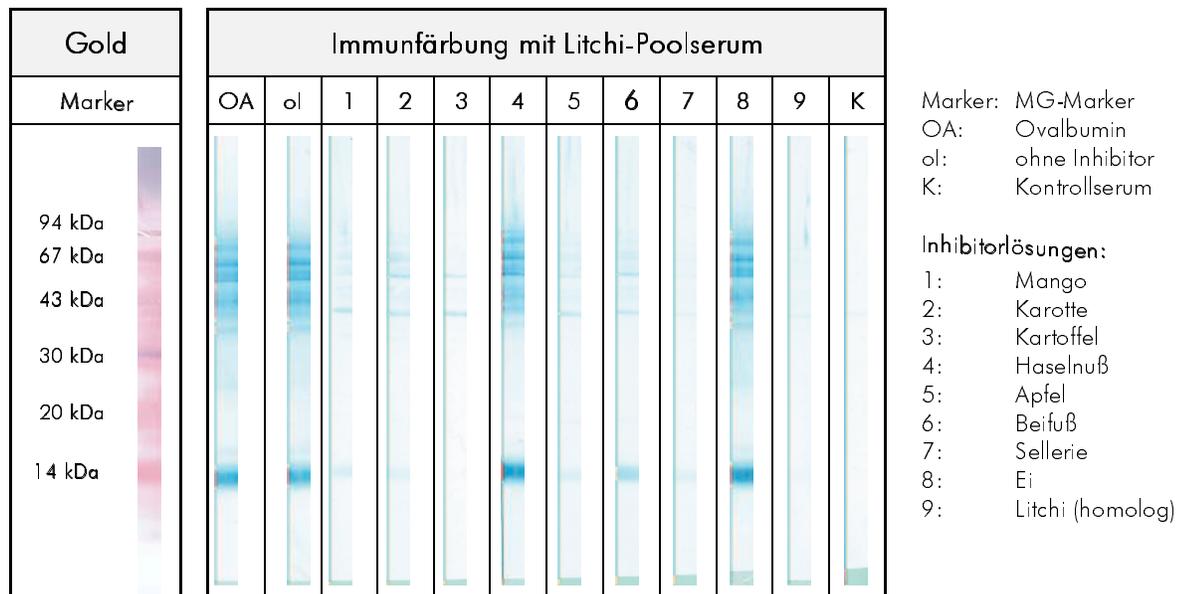


Abb. 4-XXXV: IB-Inhibition mit den verschiedenen Extrakten als Inhibitorlösungen und elektro-phoretisch getrenntem Litchiextrakt

In Abbildung 4-XXXV ist die IB-Inhibition eines mittels SDS-PAGE getrennten und auf NC-Membran transferierten Litchiextraktes mit einem Proteingehalt von ca. 400 µg/mL dokumentiert. Als Inhibitorlösungen dienten die zuvor auf einen Proteingehalt von ca. 200 µg/mL eingestellten Extrakte von Mango, Karotte, Kartoffel, Haselnuß, Apfel, Beifuß, Sellerie und Hühnerei. Zusätzlich wurde eine Immunfärbung ohne Inhibitorlösung, eine homologe Inhibition sowie zum Prüfen einer unsp-

zifischen Inhibition eine Immunfärbung mit einer Ovalbuminlösung als Inhibitor durchgeführt. Die Inhibition mit der Ovalbuminlösung (OA) führte zu keiner Schwächung des Allergenbandenmusters der Litchi, sondern zeigte eine mit der ohne Inhibitor (ol) durchgeführten Immunfärbung identische Detektion. Die homologe Inhibition (9) führte zu einer kompletten Hemmung der Bandenvisualisierung, lediglich das 40 kDa Allergen war noch schwach erkennbar. Der Mangoextrakt (1) bewirkte eine ähnlich ausgeprägte Inhibition wie der Litchiextrakt, wobei das Profilin zusätzlich noch schwach immungefärbt werden konnte. Der Proteinextrakt der Karotte (2) führte ebenso wie die Extrakte der Beifußpollen (6), des Apfels (5) und Selleries (7) zu einer starken Inhibition des Allergenbandenmusters. Lediglich das Profilin sowie die IgE-bindenden Proteine bei 40 und 55 kDa konnten noch schwach visualisiert werden. Der als Inhibitor eingesetzte Extrakt der Kartoffel (3) bewirkte eine der nativen Litchi analoge Hemmung der Bandenvisualisierung. Im Gegensatz zu den noch schwach erkennbaren Banden bei 40 und 55 kDa, konnte das Profilin vollständig inhibiert werden. Der mit dem Hühnereiextrakt (8) inhibierte Blotstreifen zeigte wie erwartet das der nativen Litchi identische komplette Allergenbandenmuster. Der Haselnußextrakt (4) bewirkte ebenfalls keine signifikante Inhibition der Litchiallergene. Lediglich das Protein mit einem MG von 35 kDa konnte inhibiert werden. Somit wurde nur das 35 kDa Allergen der Litchi von allen Extrakten (mit Ausnahme des Hühnereis) vollständig inhibiert.

Im nächsten Schritt wurden die Extrakte aus Mango, Karotte, Kartoffel, Apfel, Beifuß, Sellerie und Hühnerei (Kontrolle) auf einen Proteingehalt von ca. 400 µg/mL eingestellt, mittels SDS-PAGE getrennt und auf NC-Membranen transferiert. Da die Haselnuß zu keiner signifikanten Inhibition der

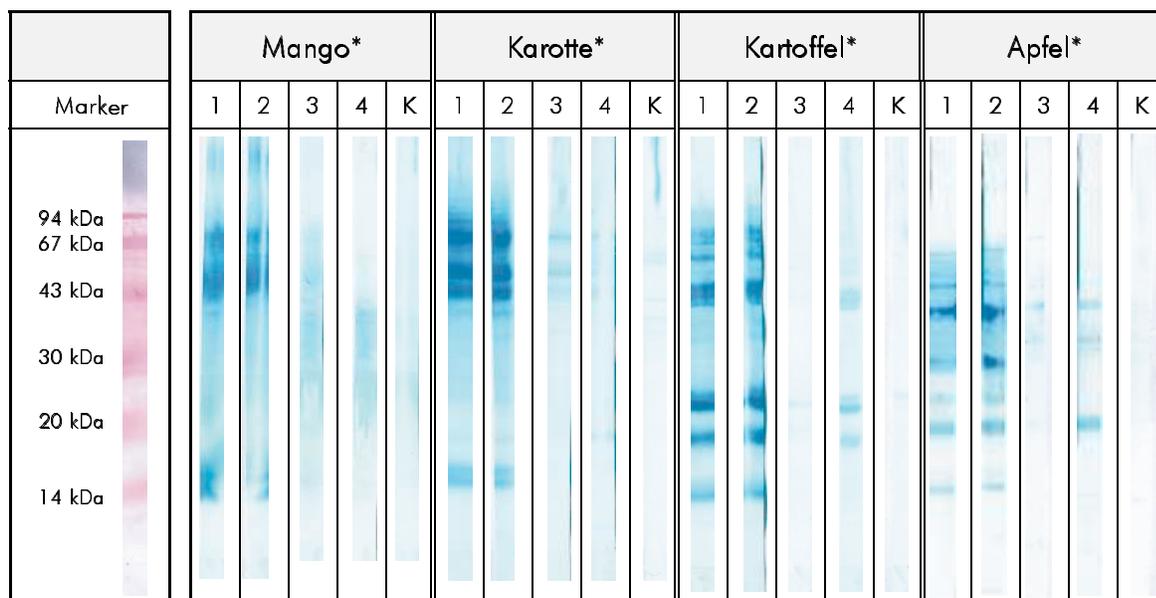


Abb. 4-XXXVI: IB-Inhibitionen mit Litchi als Inhibitorextrakt und Mango, Karotte, Kartoffel und Apfel elektrophoretisch getrennt

Marker: MG-Marker 1: Ovalbumin 2: ohne Inhibitor 3: homologe Inhibition 4: Litchi K: Kontrollserum

*: elektrophoretisch getrennter Extrakt

Litchiallergene führte, wurde auf diese Variante der IB-Inhibition verzichtet. Die Abbildungen 4-XXXVI und 4-XXXVII dokumentieren die Ergebnisse. In den Spalten 1 und 2 sind jeweils die Durchführung ohne Inhibitor sowie mit OA als Inhibitorlösung abgebildet. Unspezifische Bindungen wurden durch den Einsatz eines Kontrollserums (K) ausgeschlossen. Die Streifen der Spalte 3 zeigen die jeweilige homologe Inhibition, die der Spalte 4 die Inhibition des Litchiextraktes.

Die Litchiallergene vermögen analog der homologen Inhibition das komplette Allergenmuster der Mango zu inhibieren. Es konnten im gesamten MG-Bereich keine Banden mehr detektiert werden. Eine nahezu vollständige Inhibition unter Verwendung des Litchiextraktes konnte auch bei der Karotte beobachtet werden. Lediglich ein IgE-bindendes Protein bei 18 kDa war noch schwach apparent. Die im nativen Extrakt der Kartoffel besonders intensiv visualisierten Allergene mit MG von 20 kDa, 24 und 43 kDa konnten durch den Litchiextrakt nur teilweise inhibiert werden und waren somit noch deutlich erkennbar. Die Untersuchungen am Apfelproteinextrakt ergaben eine vollständige sowie eine deutliche Inhibition der Apfelallergene mit Ausnahme des Hauptallergens Mal d 1 bei 18 kDa. Während beispielsweise das Profilin gar nicht mehr apparent war, konnte das Mal d 1 in voller Intensität detektiert werden.

Sowohl der Inhibitionsversuch der Beifuß- als auch der Sellerieallergene mit dem Litchiextrakt führten zu der homologen Inhibition analogen Ergebnisse. Lediglich das Api g 2 bei 17 kDa konnte nicht vollständig inhibiert und folglich noch schwach visualisiert werden. Das im IB sehr intensiv gefärbte Allergen mit einem MG von 60 kDa wurde der homologen Inhibition entsprechend fast vollständig inhibiert. Der Kontrollversuch mit dem elektrophoretisch getrenntem Hühnereiextrakt ergab das erwartete Ergebnis. Der Litchiextrakt vermochte das hauptsächlich detektierte Ovalbumin nicht zu inhibieren und induzierte somit keine Veränderung in der Detektion der Banden.

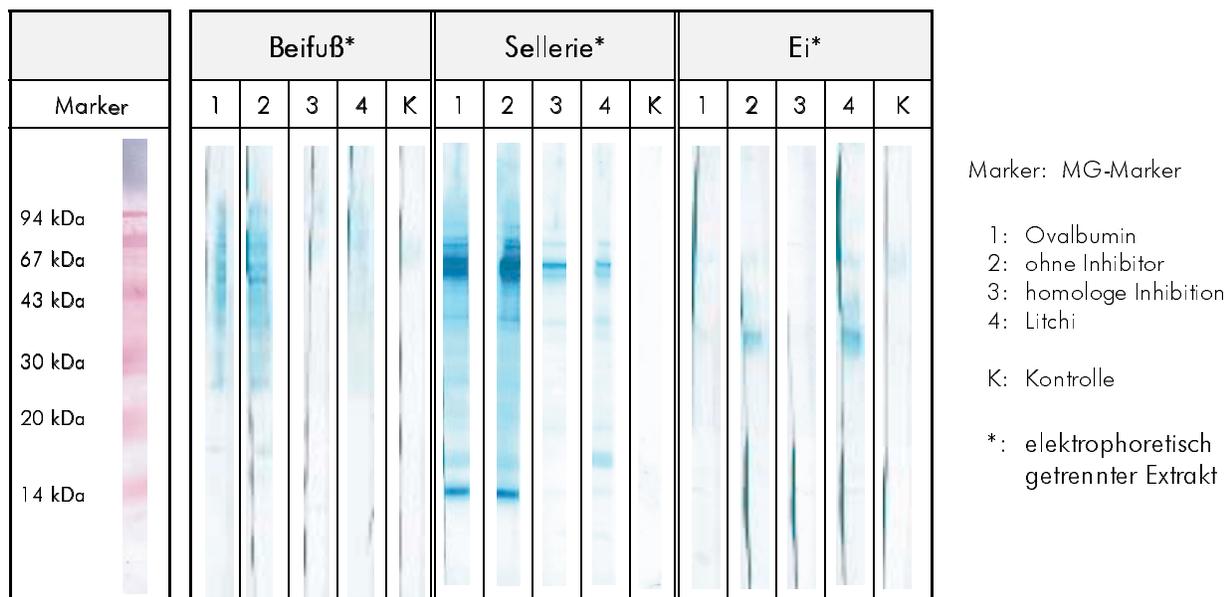


Abb. 4-XXXVII: IB-Inhibitionen mit Litchi als Inhibitorextrakt und Beifuß, Sellerie und Ei elektrophoretisch getrennt

Abschließend erfolgte eine relative Quantifizierung der allergenen Aktivität mittels EAST-Inhibition. Da alle Extrakte sowohl festphasengekoppelt als auch als Inhibitorlösungen eingesetzt wurden, konnten potentielle Kreuzreaktivitäten verifiziert werden. Die Proteingehalte der verwendeten Lösungen sind dem Anhang 7.16.2 zu entnehmen. Abbildung XXXVIII zeigt zunächst die Inhibitionsgraphen aller verwendeten Obst-/Gemüse-/Pollenextrakte mit festphasengekoppeltem Litchiextrakt. Die Inhibitionskurven von Apfel, Karotte, Mango, Sellerie und Beifuß zeigten einen ähnlichen, allerdings leicht zu höheren Proteinkonzentrationen verschobenen Verlauf. Die ermittelten C_{50} -Werte lagen zwischen $8.5 \mu\text{g/mL}$ beim Apfel und $40 \mu\text{g/mL}$ bei der Mango und waren gegenüber der homologen Inhibition - C_{50} -Wert $6.8 \mu\text{g/mL}$ - leicht erhöht. Der Haselnußextrakt benötigte die ca. 7-fach höhere Proteinkonzentration von $205 \mu\text{g/mL}$ um eine 50 %ige Inhibition zu induzieren. Der Hühnereiextrakt als Inhibitor zeigte wie erwartet keine Kreuzreaktivität.

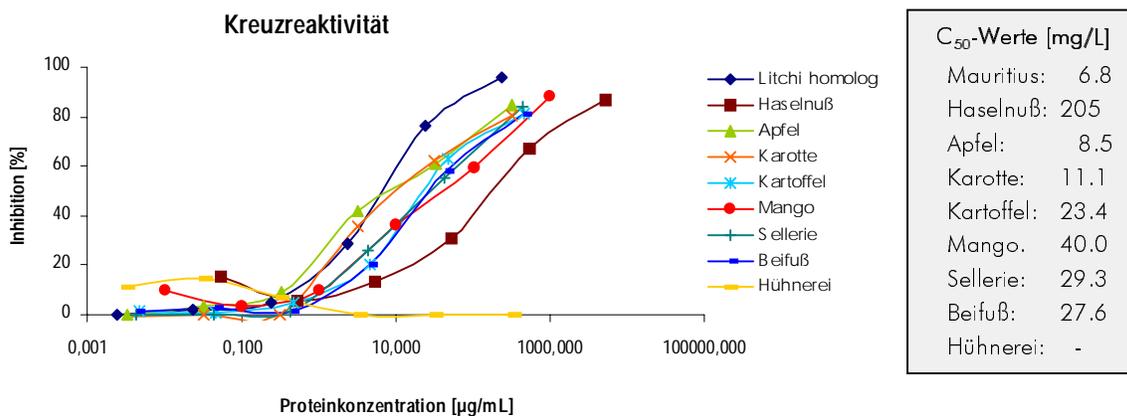


Abb. 4-XXXVIII; EAST-Inhibitionskurven zur Untersuchung der „Kreuzreaktivität“ mit der Litchisorte „Mauritius“ als festphasengekoppelte Variante

Die acht in Abbildung 4-XXXIX zusammengestellten Graphiken spiegeln die Kurvenverläufe der EAST-Inhibitionen mit Litchi als Inhibitorlösung wieder. Die Meßwerte sind im Anhang 7.16.2 dokumentiert. Die Inhibitionsgraphen der homologen Haselnuß (❶) und der Litchi zeigten zunächst einen sehr ähnlichen Verlauf. Während der C_{50} -Wert von $15.1 \mu\text{g/mL}$ der nativen Haselnuß nur gering von der für eine 50 %ige Inhibition benötigten Proteinkonzentration von $5.9 \mu\text{g/mL}$ der Litchi abwich, bewirkte die Litchi mit 78 % eine deutlich niedrigere maximale Inhibition als der homologe Haselnußextrakt (max. Inhibition 98 %). Dieses könnte in den unterschiedlichen Proteinkonzentrationen der unverdünnten Inhibitorlösungen begründet sein.

Die EAST-Inhibitionen mit den festphasengekoppelten Extrakten der Mango (❷), des Selleries (❸) und der Kartoffel (❹) ergaben einen jeweils ähnlichen Verlauf der Inhibitionskurven von Litchi und homologem Extrakt. Sowohl die C_{50} -Werte als auch die maximalen Inhibitionen (Mango 97 % - Litchi 97 %; Sellerie 88 % - Litchi 67 %; Kartoffel 85 % - Litchi 81 %) zeigten eine gute Übereinstimmung, wobei die Litchi im Vergleich zur Mango (C_{50} -Wert: $10.1 \mu\text{g/mL}$) mit einem C_{50} -Wert von $1.1 \mu\text{g/mL}$ etwas niedriger lag. Bei diesen Versuchen kann von einer Kreuzreaktivität der jeweiligen Extrakt-Paare ausgegangen werden.

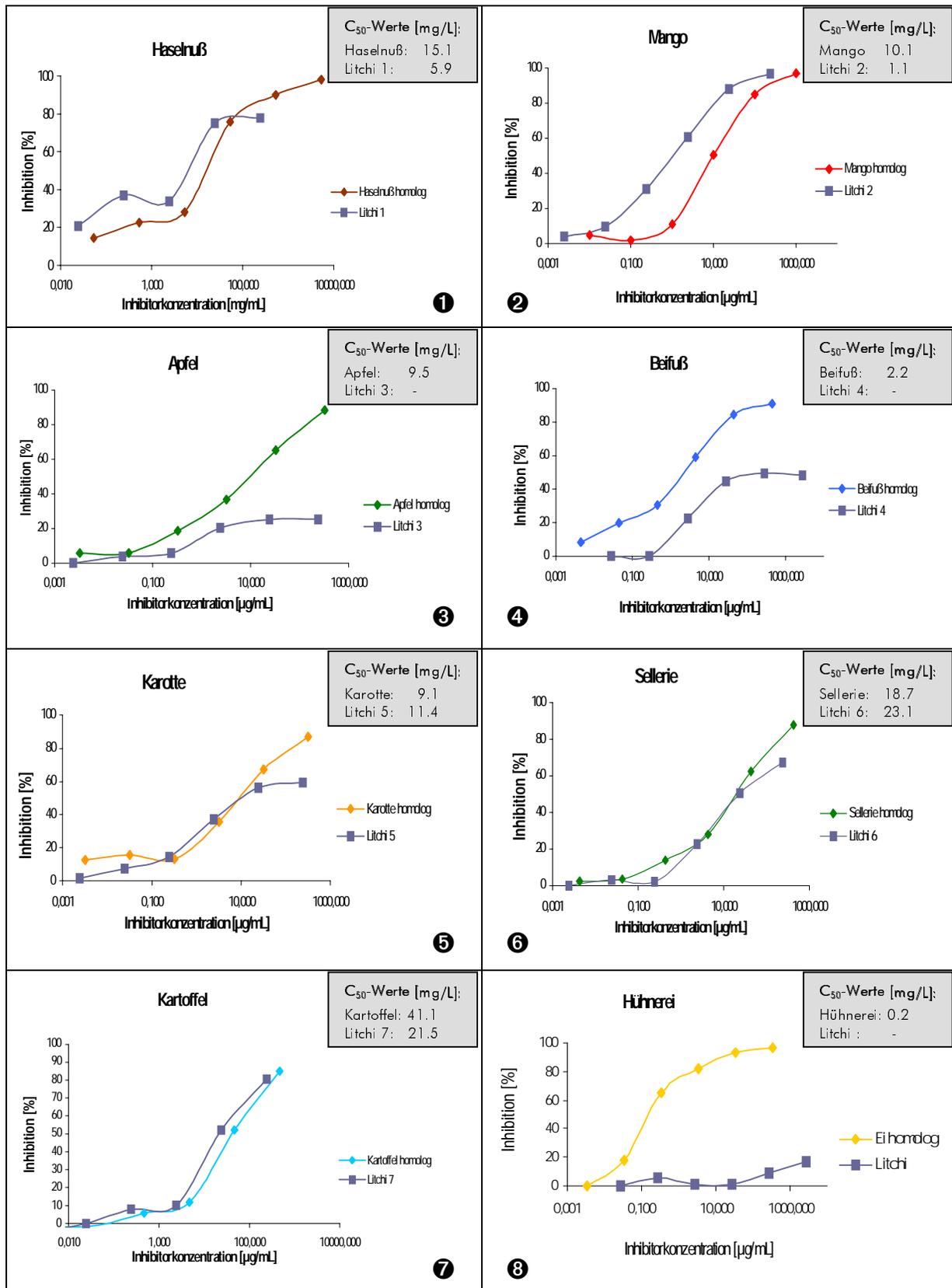


Abb. 4-XXXIX: EAST-Inhibitionskurven zur Untersuchung der „Kreuzreaktivität“ mit ①: Haselnuß, ②: Mango, ③: Apfel, ④: Beifuß, ⑤: Karotte, ⑥: Sellerie, ⑦: Kartoffel, ⑧: Hühnerei als festphasengekoppelte Extrakte und Litchi als Inhibitor

Die Auswertung der EAST-Inhibition mit festphasengebundenem Apfelextrakt (3) ergab eine maximale homologe Inhibition des Apfels von 88 % mit einem C_{50} -Wert von $9.5 \mu\text{g/mL}$. Im Gegensatz dazu zeigte der Litchiextrakt eine maximale Inhibition von 25 %. Eine 50 %ige Inhibition wurde folglich nicht erreicht. Zu einem ähnlichen Ergebnis führte der Versuch mit immobilisiertem Beifußextrakt (4). Die Litchi erreichte mit einer maximalen Inhibition von 49 % keine 50 %ige Inhibition und zeigte somit einen deutlich differenten Kurvenverlauf zum homologen Beifußpollenextrakt.

Die Inhibitionskurven der homologen Karotte und des Inhibitors Litchi (5) zeigten zunächst einen nahezu deckungsgleichen Verlauf, was in sehr ähnlichen C_{50} -Werten von $9.1 \mu\text{g/mL}$ bei der Karotte und $11.4 \mu\text{g/mL}$ bei der Litchi resultiert. Im Gegensatz zur Karotte (max. Inhibition 87 %) induzierte der Litchiextrakt nur eine maximale Inhibition von 59 %.

Bei der zur Kontrolle durchgeführten EAST-Inhibition mit festphasengekoppeltem Hühnereiextrakt (6) zeigte der Litchiextrakt mit einer maximalen Inhibition von 17 % keine Kreuzreaktivität zum Ei.

4.2.8 Technologische Verarbeitungsprozesse

Die Stabilität der Litchiallergene gegen Hitzebehandlung wurde in der Literatur bisher noch nicht beschrieben. Aus diesem Grund sollten umfassende Versuche zur technologischen Verarbeitung der Litchi zum einerseits stark erhitzen Produkt „Konserve“ und andererseits zum gekühlten Produkt „TK-Ware“ durchgeführt werden. Den in Zusammenarbeit mit der UH hergestellten definierten Litchierzeugnissen gingen Autoklavierungsversuche im Labormaßstab voraus, mit denen erste Aussagen über die Hitzebeständigkeit der Litchiallergene getroffen werden sollten. Abbildung 4-XL zeigt

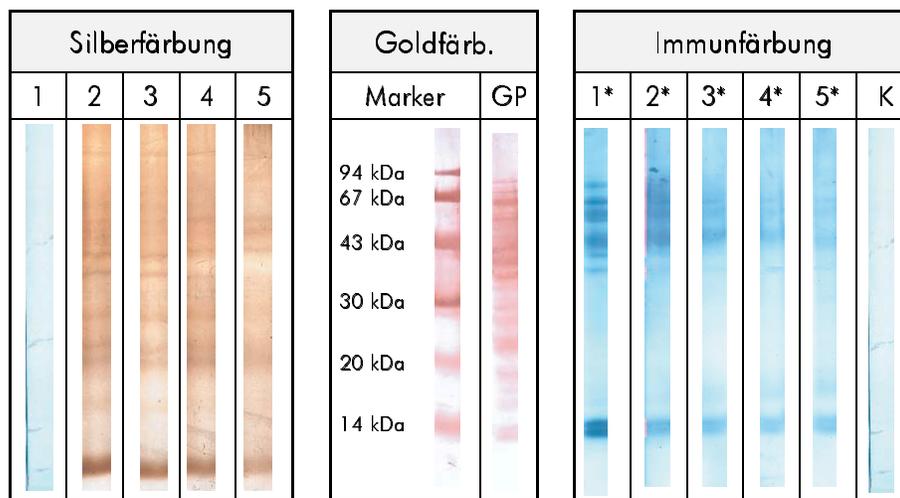


Abb. 4XL: Silber- & Immunfärbung der durchgeführten Erhitzungen im Autoklaven

Marker: MG-Marker 1: native Litchi 2: Autoklav 5' 3: Autoklav 10' 4: Autoklav 20' 5: Autoklav 30'
 GP: Gesamtproteinmuster K: Inkubation mit Kontrollserum * Inkubation mit Poolserum

die sowohl silber- als auch immungefärbten Extrakte der für 5, 10, 20 und 30 Minuten bei $121 \text{ }^\circ\text{C}$ und 1 bar Überdruck autoklavierten Litchifruchtfleischwürfel. Während weder das Gesamtprotein-

noch das Allergenbandenmuster signifikante Veränderungen mit zunehmender Erhitzungsdauer zeigten, waren die Litchis nach dem Erhitzen für 30 Minuten stark rosa gefärbt, matschig und ungenießbar. Die IgE-bindenden Proteine mit MG von 14 kDa, 35 kDa, 40 und 55 kDa konnten in allen Extrakten deutlich visualisiert werden, wobei die Intensität der Färbung mit zunehmender Erhitzungsdauer leicht abnimmt (Spalten 2 bis 5). Aufgrund dieser Ergebnisse wird von einer hohen Temperaturresistenz der Litchiallergene ausgegangen.

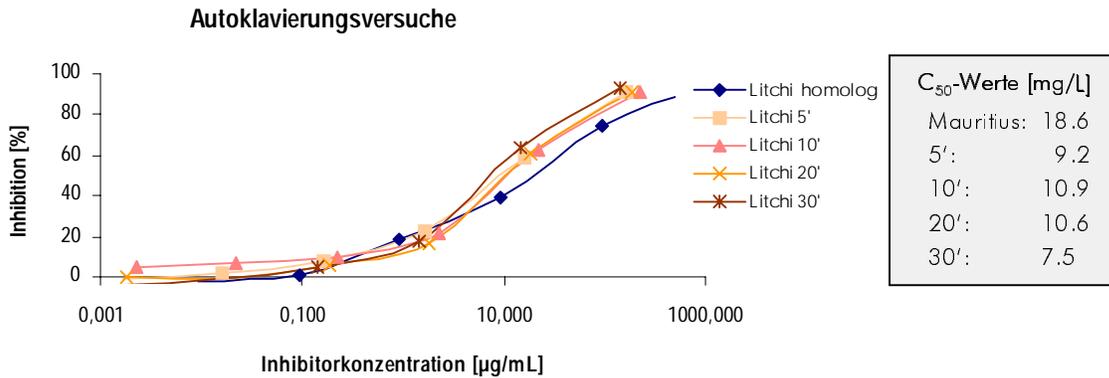


Abb. 4-XLI: EAST-Inhibition der Extrakte der unterschiedlich autoklavierter Litchistücke

Abbildung 4-XLI zeigt die graphische Auswertung der relativen Quantifizierung des allergenen Potentials mittels EAST-Inhibitionsversuchen. Als festphasengebundene Komponente wurde die native Litchi der Sorte „Mauritius“ eingesetzt. Der nahezu deckungsgleiche Verlauf der Inhibitionskurven der Extrakte der erhitzten Litchis mit dem der nativen Frucht, sowie die kaum abweichenden C₅₀-Werte (zwischen 7.5 µg/mL der Litchi 30' und der 18.6 µg/mL der nativen Frucht) wiesen auf ein unverändertes allergenes Potential hin. Die Litchiallergene scheinen sich durch eine hohe Hitzestabilität auszuzeichnen.

⇒ Herstellung verschiedener Konservenvarianten

In Zusammenarbeit mit der UH wurden insgesamt neun verschiedene Litchi-Konserven definiert hergestellt und auf ihr allergenes Potential untersucht. Die Varianten K-1 bis K-4 mit Pasteurisationszeiten von 1, 2, 4 und 6 min bei 90 °C wurden sowohl 24 h nach der Produktion als auch nach einer Lagerung von 9 Monaten bei 4 °C aufgearbeitet. Die Varianten K-5 bis K-8 zeichneten sich durch verlängerte Pasteurisationszeiten (bis zu 20 Minuten) aus, während das Erzeugnis K-9 einer Sterilisation unterzogen wurde. Die genauen Produktionsbedingungen sind dem Anhang 7.15.2 zu entnehmen. Der Einfluß der Lagerung der Konserven auf das allergene Potential wurde durch vier in Thailand produzierte Varianten (K-Thail. bis K-Thail. III), die in Kooperation mit der University of Chiang Mai nach einem dort üblichen Verfahren hergestellt wurden, ergänzt. Abbildung 4-XLII zeigt die Immunfärbung der Extrakte K-1 bis K-9 und K-1, 9m bis K-4, 9m (nach der

Lagerung) sowie die thailändischen Varianten (K-Thail. bis K-Thail. III). Auf Position 1 ist die Immunfärbung der zur Herstellung der Konserven eingesetzten frischen Litchi dargestellt, in der das gesamte Allergenbandenmuster (zwischen 14 und 97 kDa) apparent war. In den Extrakten der in Hohenheim hergestellten pasteurisierten Varianten K-1 bis K-8 (2-9) konnten durchgängig die IgE-bindenden Proteine mit MG von 14 kDa, 40 kDa, 42 kDa, 55 und 97 kDa sowie schwach die 67 kDa Bande unabhängig von der Pasteurisationszeit detektiert werden. Die Allergene mit MG von 20 kDa, 24 kDa, 30 und 35 kDa konnten dagegen nicht mehr nachgewiesen werden. Lediglich in dem Extrakt der sterilisierten Früchte (10) konnte nur noch die 55 kDa Bande schwach visualisiert werden. Diese Ergebnisse bestätigten die anhand der Autoklavierungsversuche postulierte hohe Temperaturbeständigkeit fast aller Litchiproteine. In den Extrakten der gelagerten Konserven (11-14) waren diese Allergene ebenfalls apparent, wobei die Banden bei 55 und 97 kDa sowie das Profilin besonders intensiv hervortraten. Im Extrakt der thailändischen Konserven 24 Stunden nach der Pasteurisation (15; K-Thail.) konnte nur die 14 und 55 kDa Bande deutlich sowie die 40 kDa Bande schwach visualisiert werden. Mit zunehmender Lagerung nimmt die Intensität der Färbung der 55 kDa Bande ab, allerdings ist das Allergen auch nach 6 monatiger Lagerung bei 25-30 °C noch apparent. Das Profilin sowie das IgE-bindende Protein mit einem MG von 40 kDa konnte bereits ab der 2 monatigen Lagerung (16; K-Thail. I) nur noch schwach nachgewiesen werden.

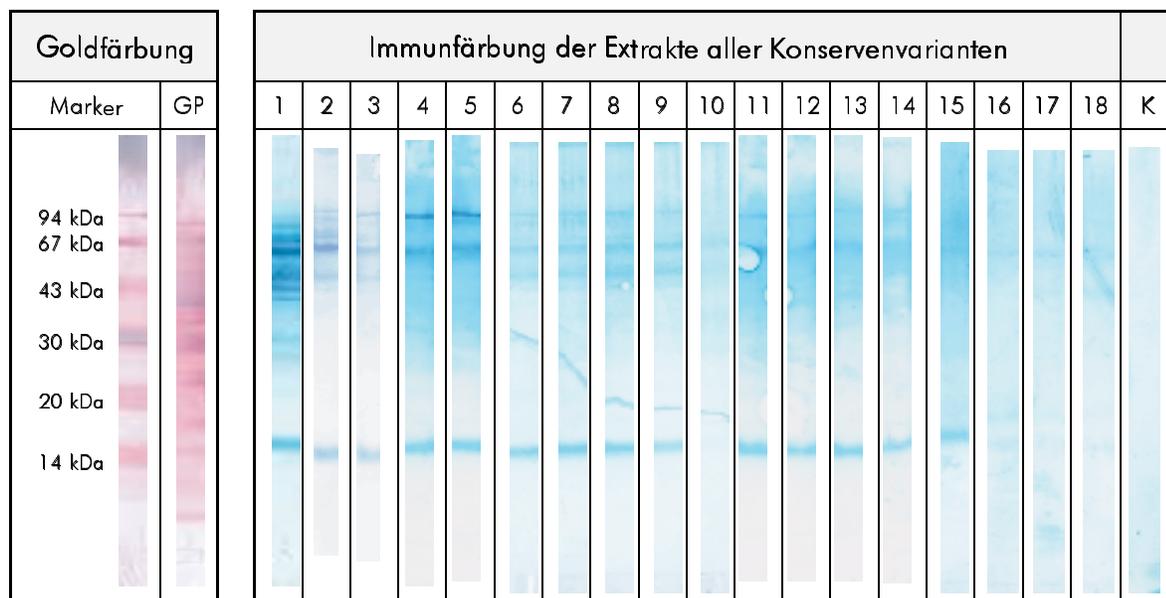


Abb. 4-XLIII: Immunoblot der Extrakte aller hergestellten und gelagerten Konservenvarianten (Inkubation mit Poolserum; m = Monate Lagerzeit)

| | | | | | |
|---------------------------------|------------------|----------------|-----------------|------------------|---------|
| Marker: Molekulargewichtsmarker | 1: native Litchi | 2: K-1 | 3: K-2 | 4: K-3 | 5: K-4 |
| GP: Gesamtproteinextrakt | 6: K-5 | 7: K-6 | 8: K-7 | 9: K-8 | 10: K-9 |
| K: inkubiert mit Kontrollserum | 11: K-1; 9m | 12: K-2; 9m | 13: K-3; 9m | 14: K-4; 9m | |
| | 15: K-Thail. | 16: K-Thail. I | 17: K-Thail. II | 18: K-Thail. III | |

Die Ergebnisse der zur relativen Quantifizierung des allergenen Potentials durchgeführten EAST-Inhibitionen sind in Abbildung 4-XLIII und 4-XLIV illustriert. Die Lagerstabilität wurde anhand der

Konservenvarianten K-1 bis K-4 aus Hohenheim repräsentativ dargestellt. Sowohl der ähnliche Verlauf der Inhibitionskurven als auch eine von allen Extrakten bewirkte maximale Inhibition über

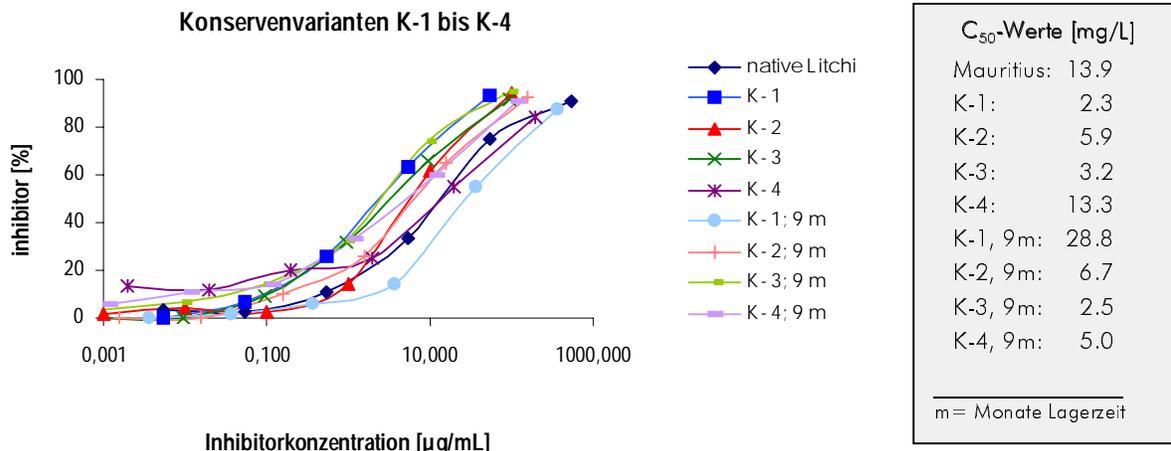


Abb. 4-XLIII: EAST-Inhibitionsgraphen der Extrakte der frischen und gelagerten Konservenvarianten K-1 bis K-4

88 % deuteten auf eine hohe Restallergenität der Litchi unabhängig von der Lagerungsdauer hin. Die C₅₀-Werte der Extrakte der Litchi-Erzeugnisse wichen nur geringfügig von dem der nativen Frucht ab. Die für eine 50 %ige Inhibition notwendigen Proteinkonzentrationen zwischen 2.3 µg/mL (K-1) und 28.3 µg/mL (K-1, 9m) differierten vom C₅₀-Wert der homologen Inhibition (13.9 µg/mL) sowohl nach oben als auch nach unten. Die Ergebnisse der EAST-Inhibition der thailändischen, ebenfalls gelagerten Konserven (nicht abgebildet) bestätigten das bisher nachgewiesene hohe allergene Restpotential der verarbeiteten Litchis. Die C₅₀-Werte der 2, 4 und 6 Monate gelagerten

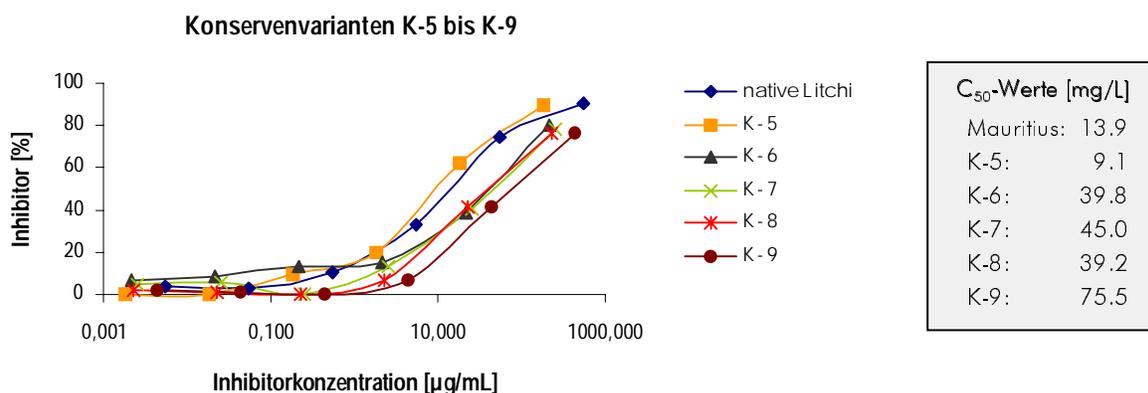


Abb. 4-XLIV: EAST-Inhibitionsgraphen der Extrakte der Konservenvarianten K-5 bis K-9

Konserven wurden alle mit ungefähr 1 µg/mL bestimmt und stimmten mit dem der nativen Frucht (3 µg/mL) sehr gut überein. Alle Extrakte induzierten eine nahezu 100 %ige maximale Inhibition

und zeigten einen der homologen Inhibition identischen Kurvenverlauf. Einen nachweisbaren Einfluß auf das allergene Potential der Litchi bewirkten dagegen die Sterilisation sowie längere Pasteurisationszeiten (Abbildung 4-XLV).

Die Extrakte der Varianten K-6 bis K-8 ergaben im Vergleich zur nativen Frucht ($13.9 \mu\text{g/mL}$) und zu der nur kurz erhitzten Variante K-5 ($9.1 \mu\text{g/mL}$) erhöhte C_{50} -Werte von ca. $40 \mu\text{g/mL}$. Die Inhibitionsgraphen zeigten somit einen leicht zu höheren Proteinkonzentrationen verschobenen Kurvenverlauf. Der Extrakt der sterilisierten Litchis benötigte bereits eine Proteinkonzentration von $75.5 \mu\text{g/mL}$ für eine 50 %ige Inhibition. Trotz dieser leichten Reduzierung des allergenen Potentials weisen die Litchiallergene eine hohe Temperaturstabilität auf und stellen auch als sterilisiertes bzw. bis zu 20 Minuten pasteurisiertes Erzeugnis eine potentielle Gefahr für den Allergiker dar.

⇒ Herstellung verschiedener Tiefkühlwaren

Da sich die Litchiallergene gegen Hitzebehandlungen sehr stabil zeigten, sollte zusätzlich der Einfluß des Gefrierprozesses auf die allergene Aktivität der exotischen Frucht untersucht werden. An der UH wurden vier Varianten an TK-Ware mittels dem IQF-Verfahren hergestellt, die in der Temperaturführung während des Gefrierprozesses differierten. Die Erzeugnisse wurden direkt nach der Produktion als auch nach 12 Monaten Lagerung bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ untersucht. Diese Versuchsreihe wurde durch zwei unterschiedlich in Thailand produzierte TK-Waren direkt nach der Herstellung sowie nach 2, 4 und 6 monatiger Lagerung ergänzt (siehe auch Anhang 7.15.2).

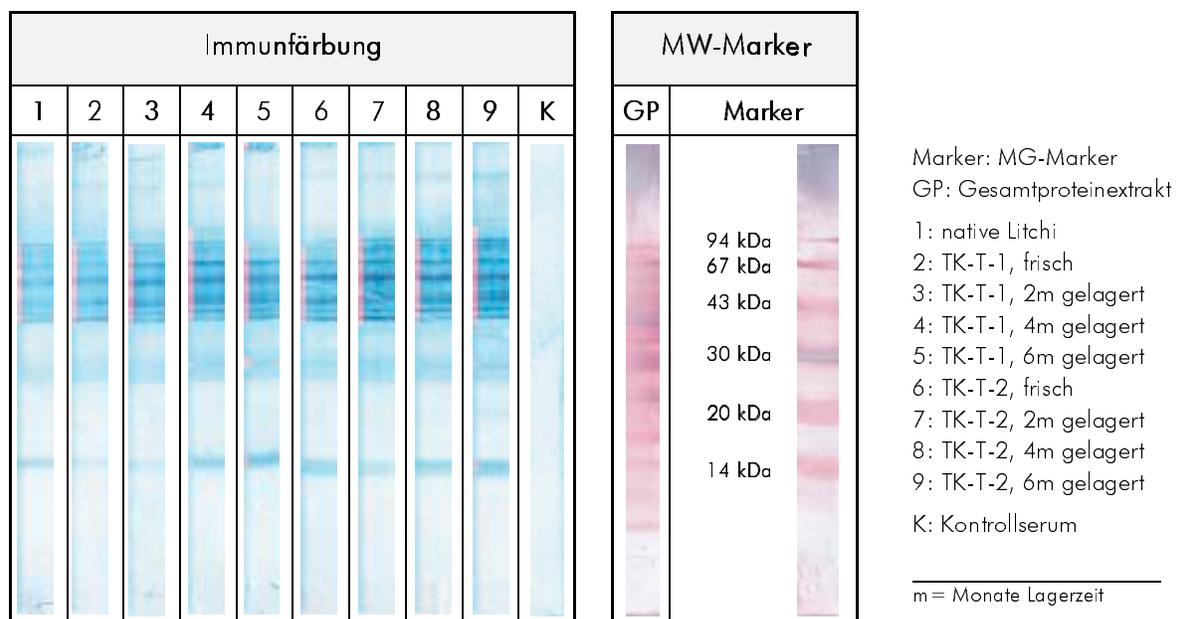


Abb. 4-XLV: Immunoblot der verschiedenen Extrakte aus den in Thailand produzierten TK-Produkte

Abbildung 4-XLV dokumentiert die Immunfärbung der Extrakte der in Thailand hergestellten TK-Produkte. Der Blotstreifen des getrennten Extraktes der nativen Litchi (1) wies das gesamte Allergenbandenmuster der Litchi mit Ausnahme der nur sehr schwach visualisierten 20 bzw. 24 kDa Allergene auf. In den Extrakten der Variante 1 (Gefrierdauer 23 min) war das der nativen Litchi identische Allergenbandenmuster apparent. Auch mit zunehmender Lagerung (2 bis 5) ist keine signifikante Veränderung in der Detektion erkennbar. Besonders intensiv wurden die höhermolekularen Allergene mit MG von 42 kDa, 55 kDa, 67 und 94 kDa gefärbt. Ein analoges Bild zeigte die Immunfärbung der Extrakte der Erzeugnisse der Variante 2 (Gefrierdauer 28 min; 6-9). Es konnten alle in der nativen Frucht apparenten Allergenbanden detektiert werden, wobei ebenfalls die IgE-bindenden Proteine mit MG von 42 kDa, 55 kDa, 67 und 94 kDa besonders deutlich zu erkennen waren. Ebenfalls wies das 14 kDa Profilin eine hohe Stabilität gegen tiefe Temperaturen auf.

Die unspezifische Silber- sowie die Immunfärbung der Extrakte der in Hohenheim produzierten TK-Waren sind in Abbildung 4-XLVI dokumentiert. Unabhängig von der Gefriertemperatur (TK-1: -25 °C; TK-2: -40 °C; TK-3: -25°C/-40 °C; TK-4: -196 °C) konnte auch in dieser Versuchsreihe in allen Extrakten (2-5) ein der nativen Frucht (1) identisches Allergenbandenmuster nachgewiesen werden. Auch im Gesamtproteinmuster konnten keine signifikanten Veränderungen im Vergleich

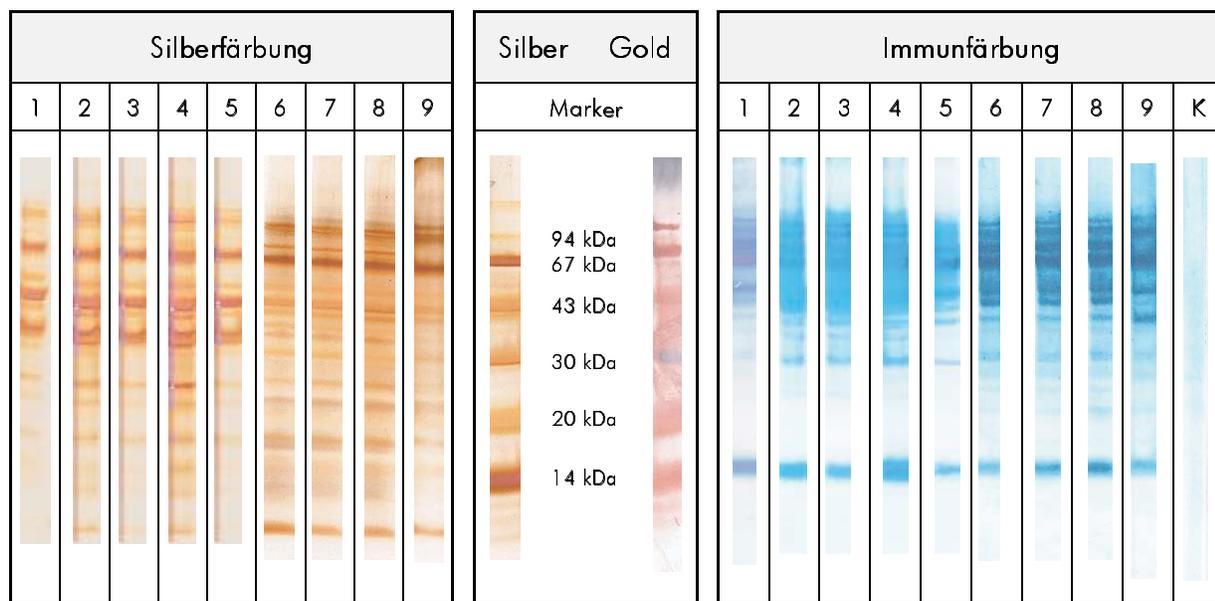


Abb. 4-XLVI: Silberfärbung & IB der Extrakte der Litchi TK-Ware TK-1 bis 4 frisch und 12 Monate gelagert (Inkubation mit Poolserum; m = Monate Lagerzeit)

Marker: MG-Marker 1: native Litchi 2: TK-1 3: TK-2 4: TK-3 5: TK-4
 K: Inkubiert mit Kontrollserum 6: TK-1, 12m 7: TK-2, 12m 8: TK-3, 12m 9: TK-4, 12m

zur Frischfrucht visualisiert werden. Eine Lagerung der Erzeugnisse für 12 Monate bei -20 °C hatte ebenfalls keinen Einfluß auf die allergene Aktivität der IgE-bindenden Litchiproteine. Die Allergene mit MG von 55 und 67 kDa sowie das 14 kDa Profilin konnten besonders intensiv immungefärbt werden. Im Gegensatz zur Hitzebehandlung scheinen alle Allergene den Tiefkühlprozeß unbeschadet zu überstehen.

Die EAST-Inhibitionen der TK-Waren (nicht abgebildet) bestätigten die postulierte Stabilität der Allergene gegen Gefrieren. Sowohl der Kurvenverlauf als auch die maximal erreichten Inhibitionen und C_{50} -Werte zeigten kaum Abweichungen zur nativen Frucht.

⇒ Vergleich mit handelsüblichen Produkten

Abschließend wurden sowohl handelsübliche Litchikonserven als auch industriell verwendete Halbwaren (Litchipüree und –konzentrat) aufgearbeitet und untersucht. Der Vergleich mit diesen Produkten erlaubt eine Beurteilung der im kleintechnologischen Ansatz produzierten Erzeugnisse. Insgesamt dienten vier Konserven unterschiedlicher Hersteller (siehe auch Anhang 7.15.2) sowie jeweils zwei von der UH zur Verfügung gestellte Pürees und Konzentrate als Vergleichsgut. In Abbildung 4-XLVII ist der Immunoblot sämtlicher unter Verwendung des Poolserums gefärbten Extrakte zusammengestellt. In den industriell produzierten Konserven (2-5; siehe auch Anhang 7.16.2) konnten analog zu den Ergebnissen der eigens hergestellten Produkte K-1 bis K-8 IgE-bindende Proteine mit MG von 14 kDa, 40 kDa, 42 kDa, 55 und 67 kDa visualisiert werden. Somit scheint die Hitzestabilität dieser Allergene eindeutig bestätigt. In den untersuchten Halbwaren „Püree“ (6+7) und „Konzentrat“ (8+9) konnten nur sehr schwache Banden bei 40 kDa, 42 bzw. 55 kDa detektiert werden. Profiline waren, ebenso wie die 67 und 94 kDa Allergene, in keinem Extrakt ap-

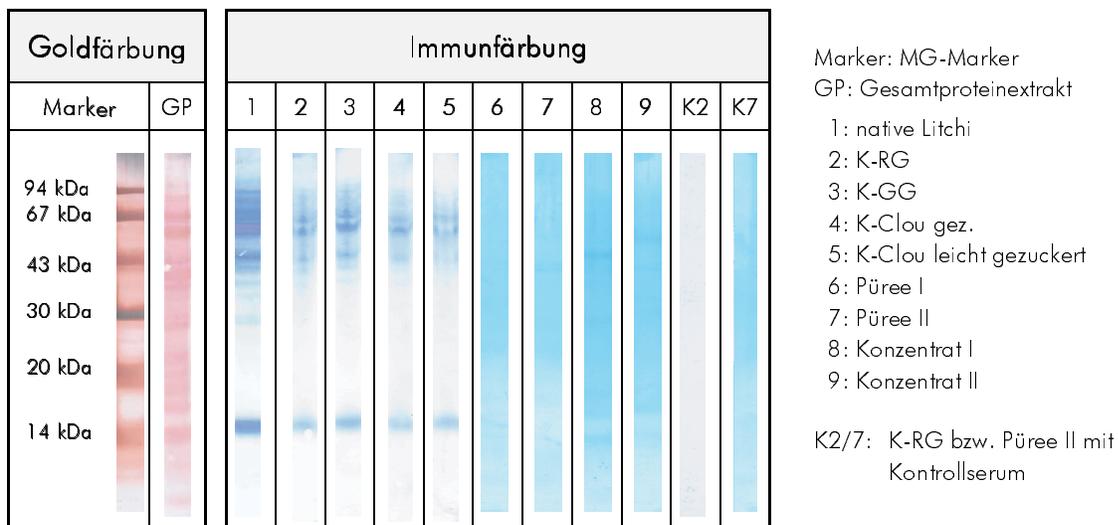


Abb. 4-XLVII: IB der untersuchten Handelsprodukte und Halbwaren (Inkubation mit Poolserum)

parent. Banden im mittleren MG-Bereich wurden ebenfalls nicht visualisiert. Nähere Informationen zu dem anscheinend deutlich reduzierten allergenen Potential der Halbwaren sollte durch die EAST-Inhibition (nicht abgebildet) erhalten werden. Die als Inhibitor eingesetzten Extrakte der verschiedenen Konserven zeigten einen der homologen Inhibition analogen Kurvenverlauf. Die C_{50} -Werte wichen kaum von dem der nativen Frucht ab (siehe Tabelle 4-V). In den handelsüblichen Konserven war somit ein deutliches allergenes Restpotential nachweisbar. Die Inhibitionsgraphen der Halbwaren verliefen bis auf den des Konzentrates II ähnlich dem der homologen Inhibition. Die Kurve des Konzentrates II lag zu höheren Proteinkonzentrationen verschoben, woraus auch der er-

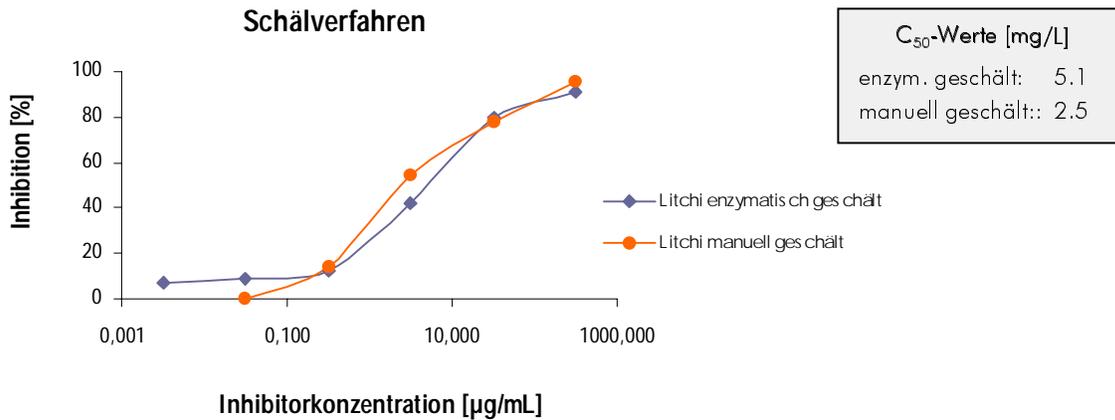


Abb. 4-IL: EAST-Inhibitionsgraphen & C₅₀-Werte der unterschiedlich geschälten Litchis

4.2.9 In-vitro Verdauung

Die Untersuchung der Stabilität der Litchiallergene gegen proteolytische Spaltungen sollte anhand einer simulierten in-vitro Verdauung untersucht werden. Zunächst wurden frische, geschälte und entkernte Litchis gewürfelt und bei einem pH-Wert von 2.5 mit unterschiedlichen Pepsinkonzentrationen für 30, 60, 120 und 210 min inkubiert. Abbildung 4-L zeigt beispielhaft drei elektrophoretisch getrennte und anschließend sowohl unspezifisch silber- als auch immungefärbte Extrakte. In Spalte 1 ist das Gesamtprotein- bzw. das Allergenbandenmuster einer nativen Litchi zum Vergleich dargestellt. Die reine Inkubation der Litchistücke mit Salzsäure ohne Enzymzusatz (2) bewirkte schon einen deutlichen Abbau der höhermolekularen Proteine mit MG >30 kDa. In den Extrakten der mit Pepsin versetzten Litchis konnte in der Silberfärbung das zugesetzte Enzym bei 35 kDa intensiv visualisiert werden. Weiterhin waren unabhängig von der Inkubationsdauer (3-5) nur Proteine bis 30 kDa apparent, wobei das 14 und 24 kDa Allergen recht persistent erschienen sowie zusätzliche Banden bei 8 und 28 kDa visualisiert werden konnten. In der Immunfärbung bestätigte sich die Proteolyse der Litchiproteine. Sowohl im Extrakt der ohne Enzym als auch in denen mit einer Pepsinkonzentration von $1.36 \cdot 10^7$ Units/L unterschiedlich lang inkubierten Litchis waren lediglich zwei IgE-bindende Proteine apparent. Während die Allergene unabhängig von ihrem MG anscheinend proteolytisch gespalten wurden, zeigten sich nur das 55 kDa Allergen sowie das Profilin stabil.

Die zur relativen Quantifizierung durchgeführte EAST-Inhibition (siehe Abbildung 4-LI) ergab eine deutliche Reduzierung des allergenen Potentials während der simulierten Magenverdauung. Die C₅₀-Werte nach einer Inkubationszeit von 120 min von 29.6 µg/mL sowie nach 240 min von 45.2 µg/mL dokumentieren eine von der Inkubationsdauer abhängige Abnahme der Allergenität. Trotz dieses offensichtlichen Einflusses des Pepsins auf die allergene Potenz der Litchi blieb jedoch eine deutliche Restallergenität bestehen.

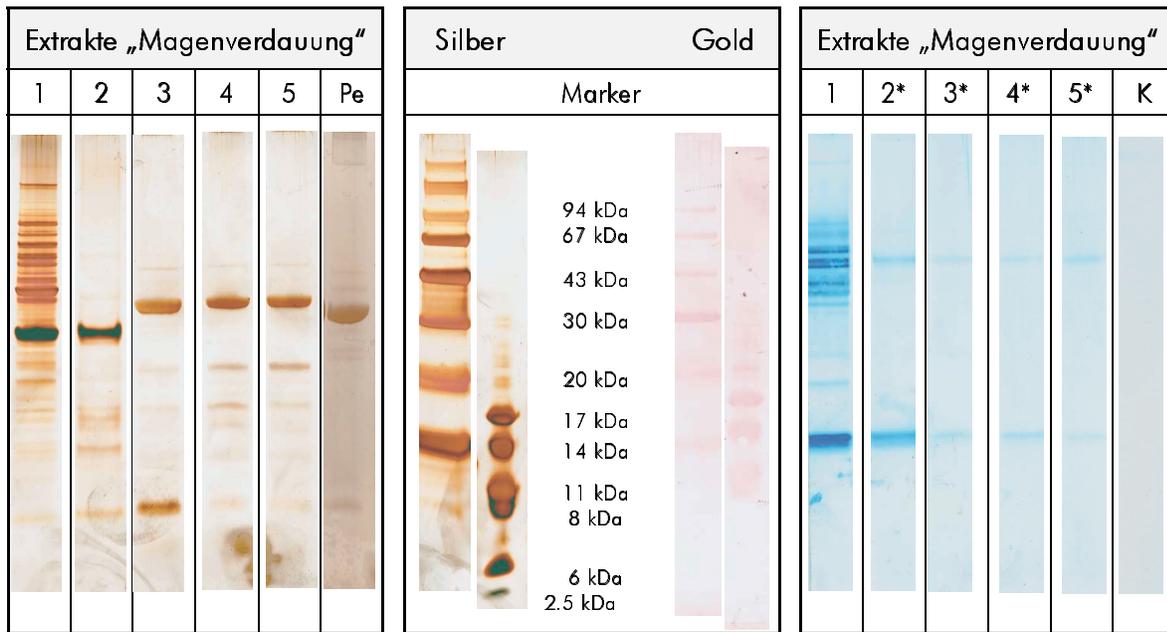


Abb. 4-L: Gesamtproteinmuster & IB der Extrakte der in-vitro Magenverdauung

Marker: MG-Marker
 1: native Frucht
 Pe: Pepsin
 2: pH:2.0 – t: 120 min – ohne Pepsin
 3: pH:2.0 – t: 60 min – $1.36 \cdot 10^7$ Units/L
 *: Inkubation mit Poolserum
 4: pH:2.0 – t: 30 min – $1.36 \cdot 10^7$ Units/L
 5: pH:2.0 – t: 120 min – $1.36 \cdot 10^7$ Units/L
 K: Inkubation mit dem Kontrollserum

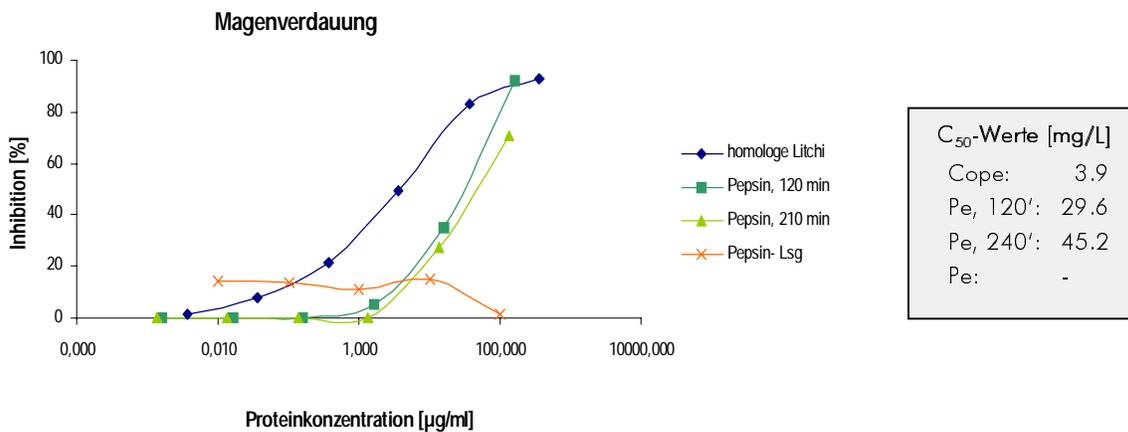


Abb. 4-LI: EAST-Inhibitionsgraphen & C_{50} -Werte ausgesuchter Extrakte der Magenverdauung

Im nächsten Schritt wurden die zuvor pepsinverdauten Litchis mit den einzelnen Enzymen des Darmtraktes inkubiert – die genaue Vorgehensweise ist dem Kapitel 3 sowie dem Anhang 7.2.2 zu entnehmen. Analog zu den Versuchen mit der Mango fanden die Enzyme Chymotrypsin, Trypsin, Pancreatin, Carboxypeptidase A und Protease K Verwendung. In Abbildung 4-LII sind die unspezifischen Silberfärbungen ausgesuchter Extrakte zusammengestellt. In Spalte 1 ist das Gesamtproteinmuster der unbehandelten Litchi dargestellt, welches aus allen bekannten Proteinen zwischen

14 und 94 kDa besteht. In den Extrakten der mit Chymotrypsin inkubierten Litchi (3+4) konnten bereits nach einer Inkubationsdauer von 60 Minuten keine spezifischen Litchiproteine mehr visualisiert werden. Eine 2-stündige Verdauung mit einer höheren Enzymkonzentration zeigte keine weiteren signifikanten Änderungen. Die stark visualisierten Banden bei 35 kDa entstammten dem Pepsin, die im Bereich von 40 - 50 kDa wahrscheinlich dem Chymotrypsin. Bei den nicht getrennten, diffusen Banden unterhalb 10 kDa konnte es sich entweder um Proteinfragmente oder Bestandteile des Chymotrypsins handeln. Die Inkubation mit Trypsin (5+6) führte bereits bei geringeren Enzymkonzentrationen unabhängig von der Inkubationszeit zu einer weitgehenden Proteolyse der Allergene. Lediglich das 24 kDa Protein sowie mehrere Banden unterhalb 14 kDa waren noch apparent (4). Eine Verdopplung der Enzymkonzentration bewirkte den Abbau des 24 kDa Proteins und eine Schwächung der niedermolekularen Proteine (5). Eine kombinierte Chymotrypsin/Trypsin-Verdauung (6) führte im Extrakt zu einer Visualisierung diverser neuer Proteinbanden im MG-Bereich von 6 bis 10 kDa, sowie bei 13 und 15 kDa. In den unter Verwendung des Enzymgemisches Pancreatin in-vitro verdauten Litchis konnten keine fruchtspezifischen Proteine mehr visualisiert werden. In Spalte 7 ist beispielhaft der Extrakt nach einer 1-stündigen Inkubation abgebildet. Während die Banden im oberen MG-Bereich wahrscheinlich dem Pancreatin entstammten, schienen die Proteine bei 7 und 12 kDa aus der proteolytischen Spaltung hervorzugehen. Auch die Inkubation mit Carboxypeptidase A (8) und Protease K (9) bewirkten einen Abbau der Litchiproteine und wiesen nur potentielle niedermolekulare Spaltprodukte im MG-Bereich von 3 bis 12 kDa auf. Die visualisierbaren Proteinbanden der einzelnen Enzyme können der Abbildung entnommen werden.

Die anschließende Immunfärbung dieser Extrakte brachte Aufschluß über persistente Allergene, neu entstandene Proteinfragmente mit intaktem Epitop sowie aus den einzelnen Enzymen stammenden Proteinen. Abbildung 4-LIII zeigt die immungefärbten Extrakte der Chymotrypsin- und Trypsininkubation. In den Extrakten der mit den anderen Enzymen behandelten Litchis konnten keine IgE-bindenden Proteine mehr nachgewiesen werden.

Die in-vitro Verdauung mit Chymotrypsin führt innerhalb einer Stunde zu einem Abbau des nach der Pepsininkubation noch apparenten 14 kDa Allergens. Lediglich das IgE-bindende Protein mit einem MG von 55 kDa konnte unabhängig von der Enzymkonzentration (2+3) noch schwach detektiert werden. Nach einer 2-stündigen Inkubationszeit (nicht dargestellt) war diese Bande nicht mehr nachweisbar. Die zur Absicherung durchgeführte Immunfärbung unter Verwendung von drei einzelnen Seren stark sensibilisierter Patienten (nicht abgebildet) bestätigte diese Ergebnisse. Im Extrakt der mit Trypsin verdauten Litchi konnten nach einer Inkubationsdauer von 60 Minuten (4) zwei allergene Banden bei 55 und 20 kDa detektiert werden. Das IgE-bindende Protein mit einem MG von 20 kDa schien ein Fragment eines höhermolekularen Allergens mit intaktem Epitop zu sein, da es nach der Pepsininkubation nicht apparent war. Eine Verdopplung der Inkubationszeit bewirkte wahrscheinlich eine weitere Proteolyse, da nun keine Banden mehr visualisiert werden konnten. In den Extrakten der mit Chymotrypsin und Trypsin kombinierten Inkubation der Litchi konnten keine IgE-bindenden Proteine oder Peptide mehr nachgewiesen werden. Die Behandlung der Litchi mit proteolytisch wirkenden Enzymen führt offensichtlich zu einer deutlichen Reduzierung der allergenen Aktivität.

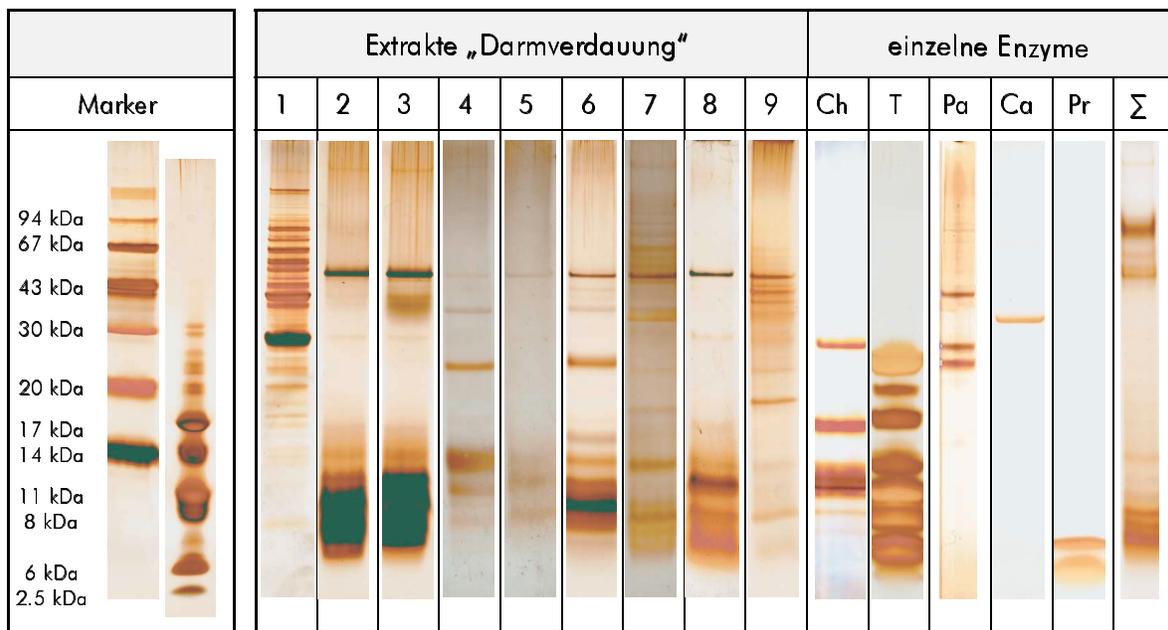


Abb. 4-LII: Silberfärbung ausgesuchter Extrakte unterschiedlich verdauter Litchis sowie der einzelnen Enzyme

Marker: MG-Marker
 1: native Frucht
 2: Chymotryp. – t: 60 min – $3.5 \cdot 10^5$ Units/L
 3: Chymotryp. – t: 120 min – $7 \cdot 10^5$ Units/L
 4: Trypsin – t: 120 min – $109 \cdot 10^5$ Units/L
 5: Trypsin – t: 120 min – $218 \cdot 10^5$ Units/L
 6: Chymotryp + Trypsin – t: 120 min
 7: Pancreatin – t: 60 min – 1 :25
 8: Carboxy.A – t: 120 min – 29095 Units/L
 9: Protease K – t: 120 min – 13400 Units/L
 Ch: Chymotrypsin T: Trypsin Pa: Pancreatin Ca: Carboxypeptidase A Pr: Protease K Σ: Enzymgemisch

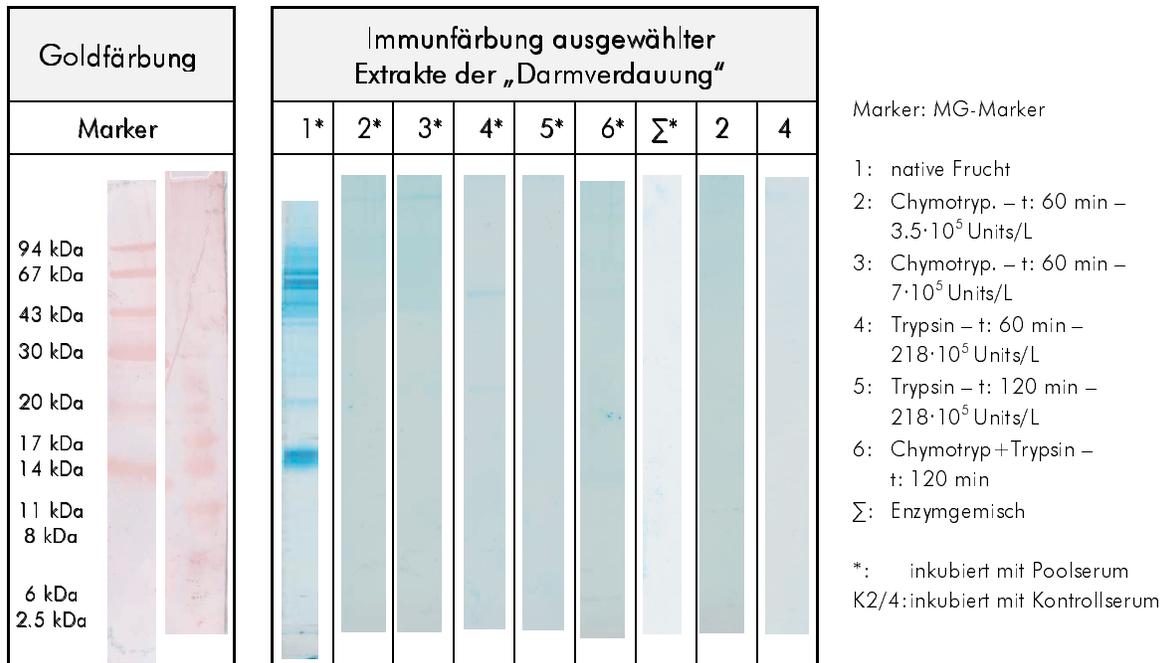


Abb. 4-LIII: Immunfärbung ausgesuchter Extrakte unterschiedlich verdauter Litchis (Inkubation mit Poolserum)

Abschließend wurde eine EAST-Inhibitor mit ausgesuchten Extrakten der unterschiedlich verdauten Litchis durchgeführt. In Abbildung 4-LIV sind die Inhibitionsgraphen und die ermittelten C_{50} -Werte dokumentiert. Alle dargestellten Extrakte wurden für 60 Minuten mit dem jeweiligen Enzym inkubiert. Am Verlauf der insgesamt nach rechts verschobenen Inhibitionskurven der Extrakte im Vergleich zur nativen Litchi sowie anhand der deutlich abweichenden C_{50} -Werte konnte die im Immunoblot beobachtete Abnahme des allergenen Potentials bestätigt werden. Während bei der nativen Frucht eine Proteinkonzentration von ca. 4 $\mu\text{g/mL}$ eine 50 %ige Inhibition induzierte, lagen die Konzentrationen der enzymatisch behandelten Litchis deutlich höher (zwischen 30 und 90 $\mu\text{g/mL}$). Alle Extrakte bewirkten allerdings noch maximale Inhibition von mindestens 60 %. Dieses deutet auf eine noch vorhandene Restallergenität der in-vitro verdauten Litchis hin, was aus im Immunoblot nicht nachweisbaren Allergenfragmenten mit intaktem Epitop resultieren kann.

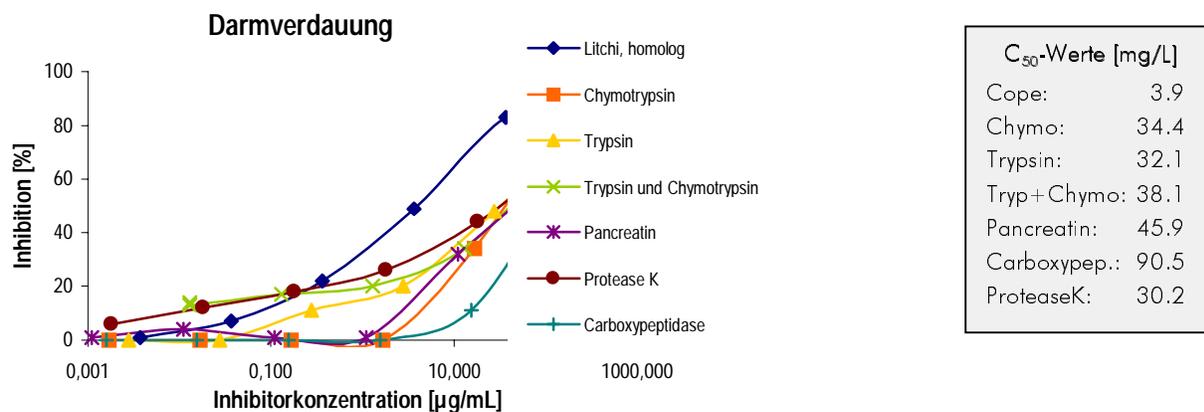


Abb. 4-LIV: EAST-Inhibitionsgraphen & C_{50} -Werte ausgesuchter Extrakte der Darmverdauung

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die umfassende Charakterisierung der IgE-bindenden Proteine der Mango und Litchi sowie die Untersuchung der Einflüsse technologischer Verarbeitungen und proteolytischer Spaltungen auf deren allergenes Potential.

5.1 Mango

Zunächst erfolgte die **Charakterisierung der Mangoallergene** mittels SDS-PAGE und anschließend dem Immunoblot unter Verwendung von 16 Seren gegen Mango sensibilisierter Probanden. Nahezu alle Patientenseren wiesen spezifische IgE-Antikörper gegen zwei Allergene mit MG von 40 und 30 kDa auf. Diese *Majorallergene* wurden bereits in der Studie von PASCHKE et al. (2001b) als Hauptallergene Man i 1 und 2 charakterisiert. Auch MÖLLER (1997) beschrieb ein 30 kDa Hauptallergen, während GORITSA et al. (1998) ein 38 kDa Allergen nachwies. Weiterhin konnten von fast allen Patientenseren IgE-bindende Proteine mit MG von 43 kDa sowie ≥ 67 kDa visualisiert werden. 47 % der Probanden wiesen spezifisches IgE gegen ein 50 kDa Allergen und 43 % gegen Allergene mit einem MG von 14 und 16 kDa sowie von 25 kDa auf. Ein weiteres Minorallergen wurde mit einem MG von 35 kDa identifiziert. Diese Ergebnisse entsprechen weitgehend den in der Literatur dokumentierten Studien. FERNANDEZ et al. (1995) und FUNES et al. (1999) konnten in ihren Untersuchungen diverse Allergene im MG-Bereich zwischen 10 und 80 kDa nachweisen. Im höhermolekularen Bereich fanden HENZGEN et al. (1998) ein IgE-bindendes 94 kDa Protein sowie KINDER et al. (1999) diverse Banden ≥ 67 kDa. Bei dem von DIAZ-PERALES et al. (1999) und HENZGEN et al. (1998) charakterisierten 45 kDa Allergen könnte es sich um das 43 kDa Protein handeln, welches ebenfalls von PASCHKE et al. (2001b) nachgewiesen werden konnte. WELLHAUSEN et al. (1996) beschreiben ein Allergen mit einem MG von 35 kDa, das vom Patientenkollektiv als Nebenallergen detektiert wurde. Bei dem von MÖLLER (1997) gefundenen 33 kDa Allergen könnte es sich ebenfalls um dieses IgE-bindende Protein handeln. Die von 43 % der Probandenseren detektierten Banden bei 14 und 16 kDa wurden bereits in vielen anderen Studien beschrieben (GORITSA et al. 1998; HENZGEN et al. 1998; PASCHKE et al. 2001b). Dieser Vergleich mit den in der Literatur dokumentierten Mangoallergenen zeigt, daß die Charakterisierung der IgE-bindenden Proteine stark von den zur Verfügung stehenden Patientenseren abhängt und repräsentative Ergebnisse nur mit einem Poolserum eines ausreichend großen Patientenkollektivs möglich sind.

Der anhand von acht verschiedenen Mangovarietäten durchgeführte Vergleich des allergenen Potentials ergab keine signifikante **Sortenabhängigkeit**. Es wurden die vier thailändischen Sorten „Choke Anan“, „Kaew“, „Nam Dok Mai“ und „Nan Klang Wang“ sowie vier in den Ländern Brasilien („Tommy Atkins“ und „Kent“) Mexiko („Keitt“) bzw. Israel („Eden“) kultivierte Varietäten miteinander verglichen. Sowohl die Ergebnisse der unspezifischen Silberfärbung als auch die IB-Untersuchungen zeigten in allen acht Sorten ein identisches Protein- bzw. Allergenspektrum. Mittels der EAST- und IB-Inhibitionen, bei denen jede Sorte sowohl festphasengebunden als auch als Inhibitor eingesetzt wurde, konnte eine vergleichbar hohe allergene Aktivität aller Varietäten nachgewiesen werden. Auf ein sortenabhängiges allergenes Potential der Mango konnte somit nicht geschlossen werden. Bereits KINDER et al. (1999) untersuchten einen potentiellen Einfluß der Sorte auf die Aller-

genität der Mango anhand der vier Varietäten „Osteen“, „Eden“, TA“ und „Ngowe“. Sowohl im Immunoblot als auch in den EAST- und Immunoblot-Inhibitionen konnten keine Unterschiede im Allergenmuster bzw. in der allergenen Aktivität nachgewiesen werden. Im Gegensatz hierzu fanden VIETHS et al. (1993b,1994a) und HSIEH et al. (1995) starke Differenzen der allergenen Potenz zwischen verschiedenen Apfelsorten. So zeigten die Sorten „Granny Smith“ und „Golden Delicious“ eine höhere Allergenität als die Sorten „Boskoop“, „Gloster“ und „Jamba“, was auf unterschiedliche Konzentrationen des Hauptallergens Mal d 1 zurückgeführt wurde. Eine Sortenabhängigkeit des allergenen Potentials vier verschiedener Haselnußsorten konnte dagegen von WIGOTZKI et al. (2000) nicht nachgewiesen werden.

Eine potentielle Abhängigkeit der Allergenität vom **Reifegrad** der Mango sowie eine inhomogene **Verteilung der Allergene innerhalb des Fruchtfleisches** wurde anhand der drei Mangosorten „TA“, „Kent“ und „Kaew“ verifiziert. VIETHS et al. (1994a) konnten in Untersuchungen am Apfel eine Zunahme der Konzentration des Hauptallergens Mal d 1 während der Lagerung beobachten. Bei Pekannüssen wiesen MALANIN et al. (1995) nach einer Lagerungszeit von vier Wochen bei 30 °C die Bildung von Neoallergenen nach. Ebenso schienen in Tomaten neue Allergene durch die während der Reife ablaufende Maillard-Reaktionen gebildet zu werden, die eine Zunahme der Allergenität induzieren (BLEUMINK et al.1967). Dagegen zeigten die IgE-bindenden Proteine der Haselnuß auch nach 19 Wochen bei Raumtemperatur ein unverändertes allergenes Potential (WIGOTZKI et al. 2000). PASCHKE et al. (2001b) beobachteten keine Veränderungen der Allergenität der Mango nach 5, 12, 21, 35 und 40 Tagen Lagerung bei 4 °C. Die Ergebnisse der durchgeführten immunologischen Untersuchungen ergaben eine über die gesamte Versuchszeit gleichbleibende allergene Aktivität. In dieser Studie wurden Mangos des Reifestadiums „mature green“ bezogen, welches durch eine grüne Schale und festes Mesokarp charakterisiert ist. Die Lagerung erfolgte ohne reifeverzögernde Maßnahmen bei 20 °C. Die Reife der klimakterischen Frucht erfolgt ungleichmäßig von innen nach außen und resultiert aus der sehr inhomogenen Verteilung der pektinspaltenden Enzyme Pectinesterase und Polygalacturonase (ABU-SARRA & ABU-GOUKH 1992). Die untersuchten Extrakte entstammen jeweils den 0, 2, 6 und 8 Tage gelagerten Früchten, die am 8. Tag bereits die Vollreife erlangt hatten. Der Reifeprozess wurde anhand von Texturmessungen bzw. über das Zucker/Säureverhältnis überprüft. Die Lagerungszeit wurde im vollreifen Stadium abgebrochen, da die Früchte über diesen Zeitpunkt hinaus nicht mehr verzehrt werden. Es konnte sowohl innerhalb einer Varietät als auch im Vergleich der drei Sorten untereinander keine Veränderung des Protein- bzw. Allergenmusters mit zunehmender Reife festgestellt werden. Auch die mittels EAST-Inhibition untersuchte allergene Aktivität zeigte keine Abweichungen zur frischen Frucht. Der Reifeprozess scheint somit das allergene Potential der Mango nicht zu beeinflussen. Ferner wurde die Verteilung der Mangoallergene anhand vier verschiedener Fruchtfleischfraktionen der drei Mangosorten im vollreifen Stadium verifiziert. Neben den in Kapitel 2.2.1 definierten Fraktionen wurde auch das allergene Potential der Schale der Sorte „Kent“ mit dessen Mesokarp verglichen. FERNANDEZ-RIVAS & CUEVAS (1999) dokumentierten eine höhere allergene Potenz der Schale von Früchten der Familie der Rosaceae (wie Apfel, Pfirsich, Birne) gegenüber dem Fruchtfleisch. FUNES et al. (1999) identifizierten in der Schale von Früchten der Familie Anacardiaceae hinsichtlich ihrer MG unterschied-

liche IgE-bindende Proteine als im Fruchtfleisch. Sie fanden unter Verwendung von Patientenserum mit einer Sensibilisierung gegen Pistazien in der Mangoschale Allergene mit MG von 10 kDa, 12 kDa, 43 und 45 kDa und im Fruchtfleisch von 9 kDa, 41 kDa, 43 kDa, 70 und 80 kDa. In den Extrakten der drei untersuchten Mangosorten konnte dagegen ein identisches Allergenmuster unabhängig von der Fraktion und der Varietät nachgewiesen werden. Auch die Ergebnisse des IB der Schale im Vergleich zum Gesamtfleisch zeigten keine Unterschiede im Allergenspektrum. Die relativen Qualifizierungen der allergenen Potenz mittels EAST-Inhibition ergaben eine gleichbleibende allergene Aktivität. Die IgE-bindenden Proteine der Mango scheinen somit homogen im Mesokarp lokalisiert. Ebenso ist eine Differenzierung der Schale und des Fruchtfleisches aufgrund des Allergenspektrums und dessen Aktivität nicht möglich.

Die Charakterisierung der Allergene des **Meso- und Perikarps** erfolgte zusätzlich anhand ihrer pl. Für diese Methode wurden Fertiggele der Firma Novex eingesetzt, die eine repräsentative Trennung der Proteine gewährleisten. Die in einem pH-Bereich zwischen 3 und 7 bzw. 3 und 10 elektrophoretisch getrennten Proteine wurden sowohl unspezifisch silbergefärbt als auch nach dem Semidry-Blot unter Verwendung des Poolserums immunologisch detektiert. Ein Vergleich der Extrakte aus Schale und Fruchtfleisch ergab eine Übereinstimmung der ermittelten pl der jeweiligen Proteine, wobei die Banden in ihrer detektierten Intensität etwas differierten. Im Immunoblot zeigten sich Proteine im Mesokarp mit pl von 7.8, 7.6, 5.5, 5.0, 4.8, 4.6, 4.0, 3.5 und <3.5 apparent sowie schwach visualisierte Banden bei pH-Werten von 6.8, 6.3 und 5.8. Im Perikarp konnten bis auf die Proteine mit einem pl von 7.8 und <3.5 weitere Allergene mit ähnlichen pl wie im Mesokarp nachgewiesen werden. In der Literatur wurden bisher noch keine vergleichbaren Studien veröffentlicht. Lediglich PASCHKE et al. (2001b) wiesen zwei IgE-bindende Proteine mit pl von 4.6 und 5.2 nach. Da ein anderes Trennsystem eingesetzt wurde, könnte es sich bei dem Allergen mit pl 5.2 um eines der bei pl 5.0 bzw. 5.5 nachgewiesenen Allergene handeln. Das IgE-bindende Protein mit einem pl von 4.6 konnte in dieser Studie ebenfalls visualisiert werden. Ferner konnten auch HENZGEN et al. (1998) in ihrer Studie ein Mangoprotein mit einem pl von 4.6 beobachten. Die Proteine der Mango weisen sowohl in der Schale als auch im Mesokarp überwiegend pl im sauren Bereich auf.

Abschließend wurden die in der Schale sowie im Fruchtfleisch nachgewiesenen IgE-bindenden Proteine mit einem MG von 14 und 16 kDa näher untersucht. VALENTA et al. (1991a, 1991b) beschrieben niedermolekulare **Profiline** als ubiquitär in eukaryontischen Organismen vorkommende Proteine, die unabhängig von ihrer Herkunft eine hohe Sequenzhomologie aufweisen. Ihr MG von ca. 14 kDa ist für alle Pflanzen nahezu identisch. Profiline konnten bisher meistens als *Minorallergene* beispielsweise in Birkenpollen (Bet v 2), Lieschgras (Phl p 11), Sellerie (Api g 4), Weizen, Mais, Karotte, Apfel, Kartoffel und Beifußpollen identifiziert und größtenteils auch sequenziert werden. Aufgrund ihrer ähnlichen Struktur gelten sie als potentiell kreuzreaktive Allergene und sind somit von besonderem Interesse (VALENTA et al. 1991a, 1991b; 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. 1998; DÍEZ-GÓMEZ et al. 1999). Sowohl im Extrakt der Schale als auch in dem des Fruchtfleisches zeigte der

Nachweis mit gegen rekombinantes Birnenprofilin gerichteten Antikörpern eine eindeutige Detektion einer Doppelbande bei 14 und 16 kDa. Unspezifische Bindungen wurden durch eine Kontrollfärbung ohne vorherige Inkubation mit dem Anti-Profilin-Antikörper ausgeschlossen. Bei den beiden im Meso- und Perikarp lokalisierten Proteinen scheint es sich somit um Profiline zu handeln. 43 % der zur Verfügung stehenden Patientenserum konnten diese Panallergene detektieren. Dieses stimmt mit den in der Literatur angegebenen Schätzungen, daß nur etwa 20 % der Pollenallergiker spezifisches IgE gegen Profiline aufweisen (MARTINEZ et al. 1995), nicht überein. Allerdings scheinen Profiline gelegentlich auch als Hauptallergene präsent zu sein (HELBING et al. 1997). Die Detektionshäufigkeit eines Allergens ist stark von den eingesetzten Patientenserum abhängig und somit nur schwer zu vergleichen. KINDER (1999) identifizierte ein IgE-bindendes Protein mit einem MG von 14 kDa als Profilin, welches Kreuzreaktivitäten zu Birkenpollen und Sellerie zeigte. HENZGEN et al. (1998) postulieren anhand verschiedener IB- Inhibitionsversuche, daß es sich bei der 15 kDa Doppelbande um ein Profilin handeln könnte, welches Kreuzreaktivitäten zum Sellerie zeigte.

Die Untersuchungen zum Einfluß der **technologischen Verarbeitung** auf das allergene Potential der Mango erfolgten in drei Abschnitten. Zunächst wurden Erhitzungsversuche mit dem Mangofruchtfleisch im Trockenschrank, Schnellkochtopf, Autoklaven sowie in der Mikrowelle im Labormaßstab durchgeführt. Durch eine Hitzebehandlung und die daraus resultierenden strukturellen Veränderungen verlieren hitzelabile Allergene häufig ihre allergene Aktivität (BESLER et al. 2001). Solche IgE-bindenden Proteine besitzen häufig Konformationsepitope, die durch die Entfaltung der Peptidketten und Aufbrechen der Disulfidbrücken zerstört werden. Hierzu zählen viele pflanzliche Lebensmittelallergene z.B. aus der Kiwi (GALL et al. 1993) und dem Apfel (VIETHS et al. 1994c). Allergene mit Sequenzepitopen werden dagegen durch thermische Behandlungen nicht beeinflusst (KREFT et al. 1995). Zu den thermostabilen Allergenen zählen hauptsächlich tierische Lebensmittel wie Ei und Milch (TAYLOR et al. 1997), aber auch pflanzliche Produkte wie Erdnuß (BURKS et al. 1991, 1992) und Soja (TAYLOR et al. 1987). In sämtlichen unterschiedlichen Erhitzungsversuchen konnte ein der nativen Frucht ähnliches Allergenspektrum nachgewiesen werden. Unabhängig vom Verfahren scheinen die Mangoallergene ihre allergene Aktivität beizubehalten. Diese Erkenntnisse leiten sich aus den Ergebnissen der EAST-Inhibitionen ab, in denen alle Extrakte eine der frischen Mango analoge allergene Potenz aufwiesen, was sich in ähnlichen C_{50} -Werten und maximalen Inhibitionen äußerte. Vergleichbare Untersuchungen in Sellerie von VIETHS et al. (1997) zeigten ebenfalls IgE-aktive Komponenten nach dem Erhitzen in der Mikrowelle (10 und 30 min bei 750 W) und Kochen (20 min bei 100 °C), wobei sich das Api g 1 als das hitzelabilste Protein zeigte. Ähnliche Ergebnisse erzielten auch JANKIEWICZ et al. (1996, 1998). In der exotischen Kiwifrucht konnte nach dem Erhitzen auf 40, 60, 80 und 90 °C eine Abnahme der allergenen Potenz mit zunehmender Temperatur beobachtet werden (GALL et al. 1993). Studien über die thermische Behandlung von Karotten führten zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen. HELBING et al. (1993) wiesen in Extrakten aus 10 Minuten bei 100 °C gekochten Karotten zwar diverse Proteine nach, allerdings konnte im IB lediglich das Hauptallergen detektiert werden. Auch GOMEZ et al. (1996) und QUIRCE et al. (1997) beobachteten eine deutliche Abnahme des allergenen Potentials durch den Erhitzungsprozeß. WIGOTZKI (2001) konnte dagegen sowohl in gekochten als auch in autoklavier-

ten Karotten noch ein erhebliches allergenes Restpotential feststellen. Diverse Untersuchungen am Apfel belegten die eindeutige Hitzelabilität der Apfelallergene. Erhitzungen von 30 min bei 175 °C bzw. 100 °C führten zu einem Abbau der IgE-bindenden Proteine (DREBORG & FOUCARD 1983; VIETHS et al. 1996, 1998a). Eine hohe Hitzestabilität der Erdnuß konnte dagegen von BURKS et al. (1992) nachgewiesen werden. Die Mango scheint aufgrund der Ergebnisse der einfachen Erhitzungsversuche zu den hitzestabilen pflanzlichen Lebensmitteln zu zählen.

Auf diese Ergebnisse aufbauend wurden in Zusammenarbeit mit der Universität Hohenheim definierte Mangopüree-Varianten hergestellt, aus denen anschließend Nektare ausgemischt wurden. In den Extrakten der unterschiedlich produzierten Pürees konnte im IB ein der nativen Mango analoges Allergenspektrum nachgewiesen werden, wobei das Hauptallergen mit einem MG von 40 kDa sowie die Profiline bei 14 und 16 kDa besonders intensiv detektiert werden konnten. Die EAST-Inhibitionen ergaben eine nahezu unveränderte allergene Aktivität unabhängig von den variierenden Prozeßparametern. So zeigte während der Enzymierung weder die Enzymkonzentration noch die Inkubationsdauer oder -temperatur einen Einfluß auf das allergene Potential (Var 1np-5np). Nach VIETHS et al. (1994b) könnte der Zusatz von Enzymen zu Strukturveränderungen der Lebensmittelproteine führen. Auch die abschließende Pasteurisation (Var1-4) induzierte keine Reduktion der Allergenität der Mangoallergene. Die anschließende Ausmischung der pasteurisierten Pürees zu Nektaren bedeutete eine Verdünnung sowie einen zusätzlichen Pasteurisationsschritt. Trotz dieser Behandlungen wiesen alle 4 Nektarextrakte noch ein den Püreevarianten bzw. der frischen Frucht analoges Allergenmuster auf, wobei ebenfalls das 40 kDa Hauptallergen besonders intensiv visualisiert wurde. In der EAST-Inhibition konnte eine schwache Abnahme der allergenen Aktivität der Extrakte festgestellt werden. Durch die Herstellung von Mangotrockenprodukten konnte der Einfluß zweier Trocknungsverfahren sowie der Schwefelung auf das allergene Potential betrachtet werden. Eine ungeschwefelte Kontrolle zeigte ebenso wie eine mittels Niedertemperatur hergestellte Variante ein der nativen Mango identisches Allergenspektrum. Lediglich die Schwefelung führte zu einer schwächeren Detektion des 30 kDa Allergens. Die Herstellung des „Mangoleder“ (≙ getrocknetes Mangopüree) induzierte eine Abnahme der Detektionsintensität des 30 kDa Allergens sowie der Profiline. In der EAST-Inhibition zeigten jedoch alle Produkte eine gleichbleibend hohe allergene Aktivität, so daß auch das Trocknen, Schwefeln bzw. die mechanische Zerkleinerung keine Eliminierung mangospezifischer IgE-bindender Proteine bewirkt. BRENNNA et al. (2000) zeigten in ihrer Studie am Pfirsich eine hohe Hitzestabilität der Pfirsichallergene bei Temperaturen von 121 °C für 10 und 30 Minuten. Die Herstellung eines hypoallergenen, klaren Saftes gelang nur durch eine abschließende Ultrafiltration, nicht durch Variation der üblichen Prozeßparameter. Da in der Literatur keine vergleichbaren Studien zur Mango beschrieben wurden, sollte die Verifizierung dieser Ergebnisse anhand verschiedener Handelsprodukte durchgeführt werden. Auf diese Weise konnten produktionsbedingte Unterschiede zu industriellen Verfahren der Püree- bzw. Nektarherstellung berücksichtigt werden. Die Untersuchungen der fünf fluiden Mangoprodukte, zwei Pürees sowie der beiden Trockenprodukte bestätigten die zuvor ermittelten Ergebnisse. In allen handelsüblichen Erzeugnissen konnte mittels EAST-Inhibition eine Restallergenität nachgewiesen werden. Die IB-Untersuchungen zeigten dagegen Veränderungen im Allergenmuster der fluiden Produkte. Während in

drei Produkten nur noch einzelne Allergene visualisiert werden konnten, wies ein Fruchtsaftgetränk das gesamte Allergenspektrum und ein Nektar nur noch sehr schwach detektierte IgE-bindende Proteine auf. Unter Verwendung von Einzelseren konnte in diesen Produkten ein allergenes Restpotential bestätigt werden. Die von den Untersuchungen der selbst produzierten Produkten abweichenden IB-Ergebnisse sind vermutlich auf die in den Handelsprodukten zum Teil niedrigeren Proteingehalte zurückzuführen, zumal die EAST-Inhibitionen zu ähnlichen maximalen Inhibitionen und C₅₀-Werten führten. Die industriell hergestellten Pürees und Trockenprodukte zeigten ein nahezu unverändertes Allergenspektrum und eine korrespondierende gleichbleibende allergene Aktivität. Lediglich in einem Püree und den Trockenscheiben waren die Profiline nicht mehr apparent. Zusammenfassend kann nach diesen umfangreichen Betrachtungen eine hohe Stabilität der Mangoallergene gegen technologische Verarbeitungsprozesse postuliert werden, die vermutlich auf konformationelle Epitopstrukturen zurückzuführen ist. Somit zählt die Mango nicht zu den von HAYAKAWA (1999) in der Regel als hitzelabil eingestuft pflanzlichen Allergenen. Lediglich die Stabilität der Profiline ist nicht eindeutig zu belegen, da sie in den eigenen Produkten apparent waren, aber in den handelsüblichen Püree- und Trockenprodukten nicht mehr visualisiert werden konnten. JANKIEWICZ et al. (1996, 1998) beschrieben u.a. eine Stabilität des Sellerieprofilins gegenüber Erhitzungen bis zu 30 Minuten bei 100 °C, während das Apfelprofilin eher hitzelabil erschien (VIETHS et al. 1994b).

Abschließend wurde die Stabilität der Mangoallergene gegenüber proteolytischen Enzymen anhand einer **in-vitro Verdauung** untersucht. Die potentielle Persistenz der Allergene ist sowohl für die Sensibilisierungsphase des Immunsystems als auch für die Manifestation der klinischen Symptome einer Lebensmittelallergie eine wesentliche Voraussetzung (VIETHS et al. 1999). ASTWOOD et al. (1996) postulierten, daß nur Allergene, die die Magenverdauung intakt passieren, von der Mucosa absorbiert werden können. Eine direkte Sensibilisierung des Organismus sei sonst nicht denkbar.

In der Literatur werden diverse Studien mit einer einfachen Pepsinbehandlung beschrieben, wodurch lediglich die Magenverdauung simuliert wird (ISHIZAKA et al. 1960; MATSUDA et al. 1983; ASTWOOD et al. 1996). FRAZER et al. (1959) verwendeten neben Pepsin noch das Enzym Trypsin. Um jedoch eine umfassende, möglichst realistische, humane Verdauung zu simulieren, wurden neben dem Pepsin auch die darmspezifischen Enzyme Chymotrypsin, Trypsin, Pancreatin, Carboxypeptidase A und Protease K eingesetzt. Die Untersuchungen erfolgten in Anlehnung an die Arbeiten von VIETHS et al. (1999) und BURKS et al. (1999) als eine simulierte kombinierte gastrisch-duodenale Verdauung. Die Wahl der Pepsinkonzentrationen lehnte sich an die von ASSELIN et al. (1989), ASTWOOD et al. (1996) und MATSUDA et al. (1983) gewählten Bedingungen an und wurde ebenso wie die Inkubationsdauer variiert. Die Konzentrationen der Darmenzyme entsprachen in etwa den von ASSELIN et al. (1989) verwendeten Ansätzen. Auf eine unverhältnismäßig lange Inkubationsdauer (max. 210 min) wurde verzichtet, da MAHMOUD et al. (1992) anhand der Veränderung von Molkeproteinen nach einer Pancreatinspaltung zeigen konnten, daß die größte Abnahme der Allergenität innerhalb der ersten 10 % der benötigten Gesamthydrolysezeit erfolgt. Die in-vitro Magenverdauung beginnt bereits bei Eintritt der Nahrung in den Gaster durch die Inkubation mit Salzsäure. Während im Extrakt der nur mit Salzsäure behandelten Mango keine IgE-bindenden Protei-

ne im höheren MG-Bereich >50 kDa mehr apparent waren, konnten neue Banden im Bereich zwischen 3 und 14 kDa visualisiert werden. Der starke Einfluß des pH-Mediums auf die allergene Potenz wurde bereits von KORTEKANGAS-SAVOLAINEN et al. (1993) in ihren Studien über Hefeallergene beobachtet. Die Inkubation der Mango mit Pepsin führte zu einem zusätzlichen Abbau des 30 kDa Proteins. Im IB konnte ein im Vergleich zur nativen Frucht sowie zur reinen Inkubation mit Salzsäure differentes Allergenspektrum visualisiert werden. Schon die niedrigste Enzymkonzentration induzierte eine Hydrolyse der 14 kDa, 16 und 25 kDa Allergene, lediglich die Allergene mit MG zwischen 30 und 45 kDa zeigten sich resistent. Mit steigender Pepsinkonzentration nahm die Detektionsintensität dieser Banden leicht ab, eine Verlängerung der Inkubationsdauer zeigte dagegen keinen Einfluß auf das allergene Potential. Mittels der EAST-Inhibition konnte eine deutliche Restallergenität nachgewiesen werden. ASTWOOD et al. (1996) untersuchten in ihrer Studie die Stabilität von Erdnuß-, Sojabohnen-, Senf-, Milch- und Eiallergenen gegenüber einer Pepsinverdauung. Sie konnten im Gegensatz zu nicht allergieauslösenden Proteinen eine Persistenz der Allergene während einer 60 minütigen Inkubation zeigen. VAN REE et al. (2000) beobachteten eine gleichbleibende allergene Aktivität von Pfirsichallergenen während einer einstündigen Pepsinverdauung bei einem pH-Wert von 2.0. Im Apfel wurde dagegen von JENSEN-JAROLIM et al. (1999) ein Abbau des Mal d 1 bereits nach wenigen Sekunden unter physiologischen Bedingungen nachgewiesen. Damit ein Allergen effizient von der Darmschleimhaut absorbiert werden kann, muß es die Magenverdauung überstehen (ASTWOOD et al. 1996) und eine ausreichende Permeabilität aufweisen (TAYLOR et al. 1987). Diese ist vermutlich nur bis zu einem MG von 70 kDa gegeben. Die gegenüber einer Pepsineinwirkung resistenten Mangoallergene haben MG bis 50 kDa, so daß sie die Bedingungen einer potentiellen Absorption durch die Mucosa erfüllen und eine mögliche Sensibilisierung des Immunsystems einleiten könnten.

Die Inkubation der zuvor mit Pepsin verdauten Mango mit den Enzymen des Intestinaltraktes führte zu einer weiteren Hydrolyse der Allergene. Nach der Chymotrypsin-, Trypsin- und Pancreatinbehandlung konnten im IB neue Banden mit MG zwischen 3 und 14 kDa sowie neue Banden bei 15 kDa, 25 und 27 kDa detektiert werden. Zusätzlich zeigten sich die beiden Hauptallergene Man i 1 und 2 persistent. Bei den neu gebildeten IgE-bindenden Proteinen scheint es sich um Fragmente höhermolekularer Allergene zu handeln, die ein noch intaktes Epitop präsentieren. Während die Detektionsintensität der einzelnen Banden im IB geschwächt erschien, konnte mittels EAST-Inhibition nur eine leichte Reduzierung der allergenen Aktivität nachgewiesen werden. MAHMOUD et al. (1992) postulierten nach ihren Studien an in-vitro verdautem Casein, daß für die Aktivität eines Allergens nicht das gesamte Molekül, sondern nur die Stabilität des Epitops von Bedeutung ist. ASSELIN et al. (1989) nennen in diesem Zusammenhang das mögliche Auftreten von Peptid-Peptidcrosslinking und die Plastein-Reaktion als mögliche Ursache für eine steigende Allergenität. Wird beispielsweise das Hydrolysat eines zuvor enzymatisch gespaltenen Proteins mit proteolytischen Enzymen inkubiert, kann eine Umkehr der Hydrolyse erfolgen und sich eine proteinähnliche Verbindung (Plastein) mit höherem MG bilden (ERIKSON & FAGERSON 1976). Die in-vitro Verdauung der Mango führte vermutlich eher zu einer Hydrolyse der Allergene verbunden mit einer leichten Reduktion der allergenen Potenz. Während in den Extrakten der mit Carboxypeptidase A verdauten Mangos noch allergene Banden im MG-Bereich zwischen 7 und 15 kDa sowie die beiden

Hauptallergene apparent waren, wies der IB der mit Pancreatin und Protease K behandelten Mangos keine IgE-bindenden Proteine mehr auf. In den jeweiligen EAST-Inhibitionen konnte jedoch nur eine geringe Abschwächung der Allergenität beobachtet werden. Diese Diskrepanz ist zum einen mit der höheren Empfindlichkeit der EAST-Inhibition im Vergleich zum Immunoblot zu erklären und zum anderen mit der Bildung niedermolekularer Fragmente (<5 kDa) mit intaktem Epitop, die im IB nicht visualisiert werden können. ASSELIN et al. (1989) konnten vergleichbare Ergebnisse bei der Verdauung von Molkenproteinen mittels Pepsin, Chymotrypsin, Trypsin und Pancreatin beobachten. Sie fanden, daß der Grad der Hydrolyse nicht entscheidend für das Maß der Allergenität ist.

Die Mangoallergene zeigten in der gastrisch-duodenalen in-vitro Verdauung, die durch den Einsatz der ganzen Frucht auch Matrixeinflüsse berücksichtigt und somit realistischen Bedingungen entspricht, eine recht hohe Persistenz. Im Gegensatz dazu wiesen YAMADA et al. (2000) nach einer Spaltung von Ovomuroid mit Pepsin, Chymotrypsin und Trypsin eine Labilität der Epitope nach. Daraus folgerten sie, daß die Ausbildung der Urtikaria nicht durch Ingestionsallergene induziert wird. Eine der Mango entsprechende weitgehende Stabilität von Erdnußallergenen gegenüber der in-vitro Verdauung konnten VIETHS et al. (1999) zeigen. Die in-vitro Darmverdauung mit Trypsin, Chymotrypsin, Elastase, Endo- und Exopeptidasen sowie Carboxypeptidase A und B erfolgte nach vorheriger Pepsininkubation und führte zu einer leichten Abnahme, aber nicht zur Elimination des allergenen Potentials der Erdnußallergene. Die in-vitro Verdauung von Haselnüssen resultierte dagegen in einer starken Schwächung der allergenen Aktivität. Weiterhin fanden BURKS et al. (1991) eine signifikante Reduzierung des allergenen Potentials in verdauten Sojaprodukten, während DOMINGUEZ et al. (1990) eine hohe Persistenz der Senfallergene gegenüber proteolytischen Enzymen beobachteten. Aus diesen differierenden Ergebnissen läßt sich ableiten, daß die einzelnen Lebensmittelallergene eine sehr unterschiedliche Stabilität gegenüber der in-vitro Verdauung zeigen. Dieses scheint in der unterschiedlichen Epitopstruktur begründet.

Die eingesetzten Enzyme bzw. Enzymmischungen wurden ebenfalls auf ihr allergenes Potential mittels EAST-Inhibition unter Verwendung des Poolserums untersucht. Keines der Enzyme zeigte eine allergene Aktivität.

5.2 Litchi

Zur **Charakterisierung** der Litchiallergene wurde ein Extrakt der nativen Frucht „Mauritius“ elektrophoretisch getrennt und mittels Semidry-Blot auf eine NC-Membran transferiert. Die einzelnen Blotstreifen wurden mit 38 Seren gegen Litchi sensibilisierter Patienten inkubiert und anschließend immungefärbt. 34 der 38 Probandenserien wiesen spezifische IgE-Antikörper gegen ein 55 kDa Allergen auf. Nach DREBORG et al. (1994) wird unter einem Hauptallergen eine Substanz verstanden, die bei über 50 % der Patienten eine IgE-Antwort induziert, wenn diese der Allergenquelle ausgesetzt sind. Das eingesetzte Patientenkollektiv sollte möglichst groß sein, damit repräsentative Ergebnisse erzielt werden können. In dieser Arbeit standen lediglich 38 Seren zur Verfügung, so daß die anhand obiger Definition mögliche eindeutige Charakterisierung des 55 kDa Allergens als Hauptallergen nicht gesichert erscheint. Neben diesem IgE-bindenden Protein konnten 84 % der Allergikerseren ein 67 kDa, 74 % ein 40 kDa, 61 % ein 24 kDa und 50 % ein 30 kDa Allergen visualisieren. Das potentielle Profilin mit einem MG von 14 kDa wurde von 21 der 38 Seren detek-

tiert. FÄH et al. (1995) identifizierten mit dem Serum einer Pollenallergikerin eine Doppelbande bei 16 kDa. WELLHAUSEN et al. (1996) beobachteten eine Kreuzreaktivität zwischen einem 35 kDa *Minorallergen* der Birkenpollen und einem vergleichbar schweren Allergen der Litchi. 10 der 38 zur Verfügung stehenden Seren wiesen spezifisches IgE gegen ein 35 kDa Protein auf. Zusätzlich wurden noch *Minorallergene* mit MG von 20 kDa (47 % der Seren), 42 kDa (24 % der Seren) sowie diverse diffuse Banden >67 kDa nachgewiesen. In der Literatur wurden bisher keine vergleichbaren Untersuchungen zur Identifizierung und Charakterisierung von Litchiallergenen durchgeführt, so daß kein Vergleich mit anderen Studien möglich ist. Eine eindeutige Einteilung der detektierten IgE-bindenden Proteine sollte deshalb unter Verwendung eines größeren Patientenkollektivs verifiziert werden.

Analog zur Mango wurde das allergene Potential von sieben verschiedenen **Litchisorten** verglichen. Sowohl die Varietäten „Kuang Chao“, „Bai Dum“, „Chacapat“ und „Hong Huey“ eines Anbaugebietes (Thailand) als auch die unterschiedlicher Herkunft („Mauritius“ – Südafrika, „Cope“ – Südafrika, unbekannte Sorte aus Madagaskar) zeigten keine signifikanten Unterschiede im Protein- bzw. Allergenspektrum. Ebenso ergaben die vorgenommenen EAST-Inhibitionen, bei denen Extrakte jeder Sorte sowohl festphasengekoppelt als auch als Inhibitor eingesetzt wurden, eine analoge allergene Aktivität. In den IB-Inhibitionen induzierten alle Varietäten eine der jeweils homologen Inhibition entsprechende Auslöschung des Allergenbandenmusters. Diese Ergebnisse stimmen mit denen der Mango überein. Bei der Litchi ist im Gegensatz zum Apfel (VIETHS et al. 1993b, 1994a) keine Sortenabhängigkeit der Allergenität nachweisbar. Bisher wurden zur Litchi noch keine vergleichbaren Untersuchungen in der Literatur dokumentiert.

Die umfassende Charakterisierung der Litchiallergene erfolgte weiterhin durch einen Vergleich der **Litchischale** und des Arillus. Ein Extrakt der Sorte „Chacapat“ wurde mittels SDS-PAGE getrennt und anschließend sowohl unspezifisch silbergefärbt als auch im Immunoblot untersucht. Im Gegensatz zur Mango ergab sich ein unterschiedliches Proteinmuster, insbesondere im MG-Bereich oberhalb 30 kDa. Die signifikanten Differenzen konnten im IB bestätigt werden. Während im Fruchtfleisch sämtliche zuvor charakterisierten Allergene apparent waren, konnten im Perikarp IgE-bindende Proteine mit MG von 16 kDa, 18 und 22 kDa sowie im höhermolekularen Bereich von 40 kDa, 50 kDa, 80 und ca. 100 kDa detektiert werden. Die IB-Inhibition zeigte, daß der Extrakt der Schale im Vergleich zur homologen Inhibition sowohl das 14 kDa Allergen als auch das 40 kDa Allergen nicht inhibierte. Dagegen konnten die IgE-bindenden Proteine des Arillus bei 42 kDa sowie bei 50 und 67 kDa durch die Schale stärker gehemmt werden. Diese Ergebnisse bestätigten zum einen die Unterschiede im Allergenmuster, da nicht alle IgE-bindenden Proteine inhibiert wurden. Zum anderen deuteten sie auf eine höhere allergene Potenz der Schale hin, da die höhermolekularen Proteine des Mesokarps durch den Extrakt des Perikarps stärker als durch die homologe Inhibition gehemmt wurden. Da die Inhibition des 14 kDa Profilins durch die Schale nicht erfolgte, scheint in dieser das Panallergen nicht lokalisiert zu sein. Durch die relative Quantifizierung mittels EAST-Inhibition konnte eine höhere allergene Aktivität des Perikarps bestätigt werden. Dieses Phänomen konnten bereits FERNANDEZ-RIVAS & CUEVAS (1999) bei ihren Untersuchun-

gen an Früchten der Familie der Rosaceae beobachten. Auch sie wiesen eine erhöhte allergene Potenz der Schale gegenüber dem Fruchtfleisch nach.

Des Weiteren wurden die Extrakte der Schale und des Arillus mittels **isoelektrischer Fokussierung** untersucht. Analog zu den durchgeführten Versuchen an der Mango konnten auch in der Litchi überwiegend Proteine mit sauren oder schwach sauren pI nachgewiesen werden. Allerdings zeigten sich bei dieser exotischen Frucht abermals Unterschiede zwischen Schale und Fruchtfleisch, wobei zwischen den beiden Sorten keine Differenzen auftraten. Der IB der mittels IEF getrennten Extrakte ergab, daß die Schale hauptsächlich Allergene mit pI <3.5 aufweist, während im Fruchtfleisch zusätzlich IgE-bindende Banden im pH-Bereich bis 7.0 apparent waren. In der Literatur sind bisher noch keine vergleichbaren Untersuchungen beschrieben, so daß die Bewertung der Ergebnisse nicht eingehender erfolgen kann.

Die Identifizierung des 14 kDa IgE-bindenden Proteins als **Profilin** erfolgte unter Verwendung eines gegen rekombinantes Birnenprofilin gerichteten Antikörpers. Während in der Litchischale keine Profiline detektiert werden konnten, reagierten aus dem Fruchtfleischextrakt Proteine mit MG von 14 kDa sowie von 12 kDa mit dem Anti-Profilin-Antikörper. Zusätzlich zeigte sich eine Doppelbande bei ca. 7 kDa. Während das 14 kDa Profilin ebenfalls im IB unter Verwendung des Poolserums detektiert werden konnte, wies das Patientenkollektiv kein spezifisches IgE gegen die Profiline mit MG von 12 und 7 kDa auf. Die von VALENTA et al. (1991a) erstmals beschriebenen pflanzlichen Panallergene weisen überwiegend ein MG von 14 kDa auf. Abweichungen des MG werden allerdings nicht ausgeschlossen. Insgesamt wiesen 55 % der zur Verfügung stehenden Seren spezifische IgE-Antikörper gegen das 14 kDa Profilin auf. Diese stimmt mit den Untersuchungen zur Mango (43 % der Patientenserum detektierten die Profiline) überein, nicht aber mit den Angaben von MARTINEZ et al. (1995), daß etwa 20 % der Pollenallergiker spezifisches IgE gegen Profiline aufweisen. Die sieben Pollenallergiker SW, DS, FR, LS, RD, RK und JW, die IgE-Antikörper gegen die Panallergene der Mango aufwiesen, visualisierten auch in der Litchi das 14 kDa Profilin. Diese spricht für die Zuordnung des IgE-bindenden Proteins als Profilin, da die hohe Sequenzhomologie eine universelle Detektion, unabhängig der pflanzlichen Herkunft, induziert. FÄH et al. (1995) identifizierten in ihrer Studie unter Verwendung eines gegen Sellerie- sowie eines gegen Beifußprofilin gerichteten Antikörpers in der Litchi ein 16 kDa Profilin, bei dem es sich vermutlich um das in dieser Arbeit identifizierte 14 kDa Profilin handelt. Exakte Charakterisierungen der Litchiprofiline wurden bisher in der Literatur nicht beschrieben. Anhand der parallel durchgeführten Kontrolle konnten unspezifische Bindungen ausgeschlossen werden, so daß es sich bei den im Vergleich zu FÄH et al. (1995) zusätzlich nachgewiesenen Banden bei 12 und 7 kDa wahrscheinlich auch um Profiline handelt. Zur Verifizierung dieser Ergebnisse sollten die Untersuchungen allerdings mit gegen andere pflanzliche Profiline gerichteten Antikörpern ergänzt werden. Im Rahmen dieser Arbeit standen jedoch nur Anti-Birnenprofilin-Antikörper zur Verfügung. Während in der Mango unter Verwendung des gleichen Antikörpers in der Schale und dem Fruchtfleisch jeweils zwei Profilinbanden bei 14 und 16 kDa nachgewiesen wurden, zeigten die Extrakte des Litchi-Mesokarps und Perikarps differente Ergebnisse.

Die Ergebnisse der N-terminalen Aminosäuresequenzanalyse des 40 kDa Proteins aus dem Arillus wurde mit Einträgen der Proteindatenbank SWISSPROT verglichen. Es konnte eine 87 %ige Homologie zu der Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase aus weißem Senf (G3PC-Sinal) nachgewiesen werden. Dieses an der Glycolyse beteiligte Enzym kommt außer im Senf auch in sämtlichen Pflanzen vor. Die Sequenz der 37 kDa „G3PC-Sinal“ wurde bereits 1986 von MARTIN & CERFF beschrieben. In der Literatur wurde bisher noch keine vergleichbare Studie zur Sequenzierung von Litchiallergenen durchgeführt und somit sind keine weiteren Informationen zu einem möglichen allergenen Potential der Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase bekannt. SANDER et al. (2001) konnten allerdings mittels 2D-Elektrophorese Allergene im Weizen nachweisen, deren Massen mit den 2 Isoformen der G3PC aus *Hordeum vulgare* (Gerste) übereinstimmten.

Das Phänomen der **Kreuzreaktivität** zwischen Inhalations- und Ingestionsallergenen wurde in der Literatur bereits eingehend untersucht. Die Litchi wird zu den birkenpollenassoziierten Lebensmitteln gezählt. MONTAG et al. (1996) untersuchten die Kreuzreaktivität der asiatischen Litchifrukt mit Beifuß-, Wegerich-, Birken- und Gräserpollen. Zur RAST-Inhibition wurden Allergenscheiben mit festphasengekoppelten Litchiproteinen und Inhibitorlösungen der Baum- und Gräserpollen eingesetzt. Sie konnten eine Kreuzreaktivität zu Birkenpollen sowie zu Beifuß, Wegerich- und Gräserpollen feststellen. WELLHAUSEN et al. (1996) fanden in ihren Inhibitionsstudien eine neue Kreuzreaktivität, die auf einem 35 kDa Protein aus Birkenpollen beruht. Das isolierte Birkenpollenallergen wurde an Allergenscheiben gebunden in den EAST-Inhibitionen eingesetzt und mit Extrakten aus Litchi, Mango, Banane, Orange, Apfel, Birne und Karotte inhibiert. Das vom Bet v 1 immunologisch unabhängige Allergen zeigte Kreuzreaktivitäten zu Proteinen von Früchten mit vergleichbarem MG. Auch VIETHS et al. (1998a) beschrieben eine Kreuzreaktivität eines 35 kDa Proteins aus Birkenpollen mit einem 34 bzw. 35 kDa Allergen aus Äpfeln, Pfirsichen, Bananen, Karotten und exotischen Früchten. In einem Bericht von LEPP et al. (1992) wurde eine Pollenassoziation der Litchi zu Beifuß und Gräsern sowie eine Kreuzreaktivität zu den Lebensmitteln Sesam, Sellerie, Sonnenblumenkerne und Gewürzen postuliert. FÄH et al. (1995) identifizierten in der Litchi ein 16 kDa Profilin als kreuzreaktives Panallergen zu 11 verschiedenen Pflanzen (Birken-, Beifuß-, Gräserpollen sowie Sellerie, Sonnenblumenkerne, Anis, Kartoffel, Tomaten, Apfel und Erdbeeren) mit hohem Profilin Gehalt. Basierend auf diesen Studien wurde eine umfassende Untersuchung zur Kreuzreaktivität der Litchi mit den birkenpollenassoziierten Lebensmitteln Apfel, Karotte, Haselnuß, Kartoffel, Sellerie und Mango sowie mit Beifußpollen durchgeführt. Zur Kontrolle der erzielten Ergebnisse wurde das nicht kreuzreagierende tierische Lebensmittel Hühnerei gewählt. Zunächst erfolgte eine Charakterisierung der hergestellten Extrakte mit dem zur Verfügung stehenden Poolserum. In sämtlichen Pollen- und Lebensmittelextrakten konnten die jeweiligen Hauptallergene sowie die in der Literatur beschriebenen *Minorallergene* identifiziert werden. Das zusammengestellte Poolserum wies EAST-Klassen ≥ 2 gegen alle Obst/Gemüse/Pollenextrakte auf. Die IB-Inhibition des elektrophoretisch getrennten Litchiextraktes mit den Extrakten aus Apfel, Karotte, Haselnuß, Kartoffel, Sellerie, Mango sowie Beifußpollen ergab, daß bis auf die Haselnuß alle eingesetzten Inhibitorlösungen eine Inhibition der Litchiallergene induzierten. Die Kartoffel zeigte dabei eine der homologen Inhibition identische allergene Aktivität. Die Mango, der Apfel, die Karotte, der Sellerie sowie die Beifußpollen wie-

sen ebenfalls stark inhibierende Allergene auf, lediglich die Detektion des Profilin der Litchi wurde nicht vollständig gehemmt. Der Extrakt der Haselnuß zeigte dagegen nur eine inhibierende Wirkung auf das 35 kDa Allergen der Litchi. Der Hühnereiextrakt induzierte keine Kreuzreaktivität zur Litchi und bestätigte somit die störungsfreie Durchführung der Methode. Das 35 kDa Allergen der Litchi konnte somit als einziges IgE-bindendes Protein von allen Extrakten inhibiert werden. Dieses bestätigt die von WELLHAUSEN et al. (1996) postulierte Kreuzreaktivität eines Litchiproteins mit dem vergleichbar schweren 35 kDa Allergen der Birkenpollen. Die IB-Inhibitionen mit dem Litchiextrakt als Inhibitor ergaben eine vollständige Inhibition der elektrophoretisch getrennten Extrakte der Mango, Karotte und Beifußpollen. In diesen Fällen kann von einer stark ausgeprägten Kreuzreaktivität ausgegangen werden. Während die Detektion der Profileine der Mango sowie der Karotte durch die Litchi komplett eliminiert werden konnte, erfolgte die Inhibition des 14 kDa Litchiprofilins mit den Extrakten aus Karotte und Mango nicht vollständig. Dieses deutete auf eine stärkere allergene Aktivität des Litchiprofilins hin. Der getrennte Kartoffelextrakt zeigte eine durch die Litchi induzierte Inhibition der Allergene >43 kDa sowie des potentiellen Profilins mit einem MG von 14 kDa. Die sehr intensiv gefärbten Banden bei MG von 20 kDa, 24 und 43 kDa konnten durch den Litchiextrakt nur geschwächt werden. Ähnlich verlief die Inhibition des Apfelextraktes durch die Litchi. Während das Profilin sowie nahezu alle Apfelallergene der homologen Inhibition entsprechend geschwächt wurden, konnte das Hauptallergen Mal d 1 durch die Litchi nicht inhibiert werden. Das gesamte Allergenspektrum des Selleries wurde durch die Litchi zwar geschwächt, aber nicht vergleichbar der homologen Inhibition inhibiert. Verifiziert wurden diese Ergebnisse durch die EAST-Inhibitionen. Die Versuche mit der festphasengebundenen Litchi zeigten eine signifikante Kreuzreaktivität aller Extraktes mit Ausnahme der Haselnuß. Dieses bestätigten die IB-Inhibitionen mit dem elektrophoretisch getrennten Litchiextrakt. Auch hier erfolgte durch die Haselnuß die schwächste Inhibition. Die EAST-Inhibitionen mit Litchi als Inhibitor bestätigten die anhand der IB-Inhibition postulierte höhere allergene Aktivität der Litchiallergene im Vergleich zu denen der Mango. Anhand des Kurvenverlaufes der Inhibitionsgraphen und des daraus resultierenden niedrigeren C_{50} -Wertes der Litchi kann die starke Kreuzreaktivität zwischen den beiden exotischen Früchten abgeleitet werden. Etwas abweichend zur entsprechenden IB-Inhibition der Kartoffel konnte in der EAST-Inhibition ein der homologen Inhibition analoger Kurvenverlauf der Litchi beobachtet werden. Dieses ist wahrscheinlich auf den geringer eingestellten Proteingehalt des Litchiextraktes für die IB-Inhibition zu erklären. Somit scheint zwischen der Kartoffel und der Litchi ebenfalls eine Kreuzreaktivität zu bestehen. Bei der Karotte bzw. der Haselnuß als gekoppelte Komponenten zeigte die Litchi bei niedrigen Proteinkonzentrationen einen der homologen Inhibition ähnlichen Kurvenverlauf. Die für eine 50 %ige Inhibition notwendigen Proteinkonzentrationen schwanken nur gering. Allerdings wurden von der Litchi nur maximale Inhibitionen von 59 % bzw. 78 % erreicht. Die kreuzreaktive Potenz der Litchi scheint geringer als die der Karotte zu sein, da die Karotte die Litchiallergene zu inhibieren vermochte. Das Paar Haselnuß und Litchi scheint nur eine bedingte Kreuzreaktivität aufzuweisen, wobei hauptsächlich das 35 kDa der Litchi beteiligt war. Die Ergebnisse der IB-Inhibition des elektrophoretisch getrennten Apfelextraktes ergaben keine Kreuzreaktivität der Litchiallergene mit dem Hauptallergen Mal d 1. Diese nur teilweise zwischen der Litchi und den Apfelnebenallergenen bestehende Kreuzreaktivität konnte mittels der EAST-Inhibition bestätigt werden. Der Lit-

chiextrakt bewirkte lediglich eine maximale Inhibition von 25 %, da das Hauptallergen mit der stärksten allergenen Aktivität nicht inhibiert wurde. Ähnlich sind die Ergebnisse der EAST-Inhibition mit festphasengebundenen Beifußextrakt zu bewerten. Die Litchi scheint keine ausreichend kreuzreaktiven Allergene zu den IgE-bindenden Proteinen der Beifußpollen aufzuweisen, obwohl in der IB-Inhibition eine der nativen Inhibition vergleichbare Schwächung des Allergenbandenspektrums erfolgte. Die EAST-Inhibition des Hühnereiextraktes zeigte keine Kreuzreaktivität der Litchiallergene, womit abermals die Richtigkeit der Testdurchführung bestätigt wurde. In der Literatur wurden bisher keine vergleichbaren Studien beschrieben. Die von MONTAG et al. (1996) postulierte Kreuzreaktivität zu Beifußpollen konnte mittels der EAST-Inhibition des gekoppelten Litchiextraktes bestätigt werden. Eine Inhibition des immobilisierten Beifußextraktes mit Litchiallergenen wurde dem Arbeitskreis jedoch nicht durchgeführt. Weiterhin konnte das Litchiprofilin mit einem MG von 14 kDa als sehr potentes kreuzreaktives Protein identifiziert werden. Das Panallergen vermochte die Profiline der jeweiligen Obst/Gemüse/Pollenextrakte zu inhibieren, während die Hemmung des Litchiprofilins durch die Extrakte aus Apfel, Karotte, Haselnuß, Kartoffel, Sellerie, Mango sowie Beifußpollen nicht in allen Fällen vollständig erfolgte. Dieses stimmt mit den Ergebnissen von FÄH et al. (1995) überein, die eine Kreuzreaktivität des Litchiprofilins mit dem aus Beifußpollen, Sellerie, Kartoffel und Apfel beobachteten.

Die exotische Litchifrukt zeigte eine ausgeprägte Kreuzreaktivität zu einheimischen Pollen und Lebensmitteln, wodurch die Gefahr einer Sensibilisierung (aufgrund der Pollenassoziation bzw. der Kreuzreaktivität zu birkenpollenassoziierten Lebensmitteln) als sehr bedeutend eingeschätzt werden muß.

Die Untersuchungen der **Stabilität** der Litchiallergene gegenüber der technologischen Verarbeitung erfolgte hauptsächlich unter dem Gesichtspunkt der thermischen Behandlung. Da diese Früchte überwiegend frisch oder als Konserven verzehrt werden, wurden in Zusammenarbeit mit der UH definierte Litchikonserven produziert. Dieser Versuchsreihe gingen Erhitzungsversuche im Autoklaven voraus, die eine hohe Temperaturstabilität der Litchiallergene ergaben. Auch nach einem Autoklavieren von 30 Minuten war noch eine hohe Restallergenität nachweisbar. Die IgE-bindenden Proteine mit MG von 35 kDa, 40 und 55 kDa sowie das Profilin mit einem MG von 14 kDa zeigten sich sehr resistent. Analoge Ergebnisse konnten bereits bei den Erhitzungsversuchen der Mango erzielt werden, so daß auch die Litchiallergene neben den Mangoallergenen zu den thermostabilen pflanzlichen Lebensmittelallergenen zählen. Die im kleintechnologischen Maßstab hergestellten Konserven wurden sowohl 24 h nach der Produktion als auch nach einer Lagerung von 9 Monaten auf ihr allergenes Potential untersucht. Zusätzlich wurden die Ergebnisse durch einen Vergleich mit Handelsprodukten und an der University of Chiang Mai in Thailand definiert hergestellten Produkten abgesichert. Die in Hohenheim produzierten Konserven zeichneten sich durch unterschiedlich lange Pasteurisationszeiten aus. Als Extrembehandlung wurde ein sterilisiertes Erzeugnis angefertigt, welches aufgrund der sensorischen Eindrücke als nicht mehr verkehrsfähig einzuschätzen war. Durch die neunmonatige Lagerung sollte eine mögliche Veränderung des allergenen Potentials industrieller Konserven während ihrer Umschlagszeit im Handel berücksichtigt werden. Die thailändischen Produkte spiegelten das Know-How der in den Anbauländern üblichen Herstellungsverfahren

wider, wodurch Einflüsse verschiedener Produktionsverfahren erfaßt werden konnten. In allen untersuchten Produkten waren die IgE-bindenden Proteine mit MG von 40 kDa, 42 kDa, 55 und 67 kDa bzw. 94 kDa sowie das 14 kDa Profilin apparent. Das 35 kDa Allergen wurde lediglich in den Erzeugnissen K-1 bis K-5 schwach bzw. in den Produkten K-6 bis K-9 sowie in K-Thail nicht detektiert. Zusätzlich erfolgte in den thailändischen Konserven die Detektion durchgehend schwächer. Im Extrakt des sterilisierten Produktes war im IB nur noch die 55 kDa Bande apparent. Die Ergebnisse der EAST-Inhibition bestätigten diese Tendenzen. Die selbst produzierten Konserven K-1 bis K-5 sowie die gelagerten und thailändischen Produkte zeigten eine im Vergleich zur nativen Frucht nahezu unveränderte allergene Aktivität. Mit zunehmender Pasteurisationsdauer wurde das allergene Potential geschwächt, wobei die sterilisierte Konserve die höchste Reduzierung der Allergenität aufwies. Ebenso wie in den untersuchten Handelsproben konnte in allen Erzeugnissen eine deutliche Restallergenität nachgewiesen werden. Aufgrund der unterschiedlichen Versuchsreihen kann von einer ausgeprägten Hitzestabilität der Litchiallergene gesprochen werden. Auch die Sterilisation führte nur zu einer Schwächung der Allergenität, so daß durch eine Hitzebehandlung keine ausreichende Inaktivierung oder Eliminierung der Litchiallergene erzielt werden kann. Die Untersuchungen der Halbwaren (Pürees und Konzentrate) zeigten in den mittels SDS-PAGE getrennten und silber- sowie immungefärbten Extrakten nur ein sehr schwach detektiertes Protein/Allergenmuster. Dieses kann auf den sehr hohen Zuckergehalt in den Extrakten zurückgeführt werden, der nach MARTINEZ et al. (1997) zu Störungen bei der elektrophoretischen Trennung führen kann. In den EAST-Inhibitionen konnte dagegen ein allergenes Restpotential nachgewiesen werden. Die ermittelten Ergebnisse belegen eine der Mangoallergene vergleichbare Hitzestabilität der Litchiallergene.

Ergänzend zur Hitzebehandlung wurde auch die Stabilität der Litchiallergene gegen den Gefrierprozeß untersucht. Mittels des IQF-Verfahrens wurden Litchihälften unter Variation der Gefriertemperatur tiefgekühlt und sowohl direkt nach der Herstellung als auch nach einer Lagerung von 12 Monaten untersucht. Beim IQF-Verfahren wird jedes einzelne Stück des Gefrierguts während des Gefrierprozesses unmittelbar dem Kühlmedium ausgesetzt und anschließend tiefgekühlt verpackt. Mittels der produzierten TK-Erzeugnisse sollte eine durch Gefrier-Tau-Prozesse induzierte potentielle Veränderung der Allergenität infolge der Schädigung des Zellgewebes durch die mechanische Wirkung von Eiskristallen und osmotisch induzierten Konzentrationsverschiebungen in der Zelle betrachtet werden. Zusätzlich dienten zwei Versuchsreihen aus Thailand zur Absicherung der Ergebnisse, da diese nach dem dort üblichen Verfahren hergestellt wurden. Bevor die Früchte analog den Versuchen in Hohenheim mittels des IQF-Verfahrens tiefgekühlt wurden, erfolgte eine Vorbehandlung mit einer Natriumhypochloridlösung. Alle Extrakte der TK-Waren zeigten unabhängig von der Herstellung und Lagerzeit ein der nativen Frucht identisches Protein- bzw. Allergenspektrum. Die zuvor charakterisierten Allergene konnten mit nahezu identischer Intensität detektiert werden. Mittels der EAST-Inhibitionen konnte eine unverändert hohe allergene Aktivität nachgewiesen werden. In der Literatur wurden bisher keine vergleichbaren Studien zur Litchi durchgeführt. Die Litchiallergene zeichnen sich durch eine hohe Thermostabilität aus.

Abschließend erfolgte der Vergleich zwischen einer manuell und einer enzymatisch geschälten Fruchtcharge. Die Litchis wurden nach einem von der UH entwickelten Verfahren geschält und zur Verfügung gestellt. Sowohl im Immunoblot als auch in der EAST-Inhibition konnten keine signifikanten Unterschiede im Allergenspektrum sowie in der allergenen Aktivität festgestellt werden. Vergleichbare Studien zur Litchi wurden bisher in der Literatur nicht dokumentiert. BRENNAN et al. (2000) stellten bei einer chemischen Laugenschälung des Pfirsichs eine Reduktion der Allergenität fest. Enzymatische Schälverfahren wurden nicht durchgeführt.

Die Litchiallergene sind ähnlich wie die der Mango durch eine hohe Resistenz gegen technologische Verarbeitungsprozesse charakterisiert.

Parallel zur Mango wurde auch die Stabilität der Litchiallergene gegenüber proteolytischen Enzymen anhand einer **gastrisch-duodenalen Verdauung** untersucht. Wie bereits zuvor erwähnt schien die Pepsinverdauung gefolgt von einer Inkubation mit den Darmenzymen Chymotrypsin, Trypsin, Pancreatin, Carboxypeptidase A bzw. Protease K die humane Verdauung am realistischsten zu simulieren. Die in-vitro Magenverdauung zeigte bereits nach einer Inkubation der Frucht mit Salzsäure einen Abbau der höhermolekularen Proteine. Im IB konnten lediglich zwei IgE-bindende Proteine mit MG von 55 und 14 kDa detektiert werden. Der Zusatz von Pepsin führte zu einer schwächeren Detektion des 14 kDa Allergens. In der EAST-Inhibition ließ sich lediglich eine Abnahme der allergenen Potenz mit zunehmender Inkubationsdauer beobachten. Somit passieren zwei IgE-bindende Proteine aus der Litchi die Magenverdauung und könnten nach der Hypothese von ASTWOOD et al. (1996) von der Darmschleimhaut effektiv absorbiert werden. Im Vergleich zu den Ergebnissen der in-vitro Verdauung der Mango wies die Litchi eine geringere Stabilität gegenüber der Pepsininkubation auf.

Die in-vitro Verdauung der Litchi mit Chymotrypsin zeigte bereits nach 60 min einen Abbau des 14 kDa Allergens, während das 55 kDa Allergen erst nach einer Inkubationszeit von 120 Minuten nicht mehr visualisiert werden konnte. Die EAST-Inhibition zeigte dagegen im Vergleich zur nativen Frucht ein nur leicht geschwächtes allergenes Potential. Die Behandlung der Litchi mit Trypsin führte zur Bildung eines neuen IgE-bindenden Protein mit einem MG von 20 kDa, bei dem es sich vermutlich um ein Fragment eines höhermolekularen Proteins mit intaktem Epitop handelt. MAHMOUD et al. (1992) beobachteten in ihrer Studie – ebenso wie nach der in-vitro Verdauung der Mango mit Trypsin, Chymotrypsin und Pancreatin – ebenfalls die Bildung von Proteinfragmenten mit allergener Aktivität. Zusätzlich war in der Litchi das 55 kDa Allergen apparent, welches mit zunehmender Enzymkonzentration nicht mehr detektiert werden konnte. Eine Schwächung des allergenen Potentials konnte in der EAST-Inhibition bestätigt werden. Nach den Inkubationen der Litchi mit Pancreatin, Carboxypeptidase A bzw. Protease K konnten im IB keine allergenen Banden mehr visualisiert werden. Die Ergebnisse der EAST-Inhibitionen zeigten die stärkste Reduktion des allergenen Potentials nach der Carboxypeptidase A Inkubation, während die Behandlungen mit Pancreatin und Protease K zu einer der Trypsin bzw. Chymotrypsin analogen Schwächung der allergenen Aktivität führten. Die differenten Ergebnisse aus EAST-Inhibition und IB wurden ebenfalls bei den Versuchen der in-vitro verdauten Mango beobachtet und sind auf die unterschiedliche Empfindlichkeit der beiden immunologischen Methoden zurückzuführen. Vergleichbare Beobach-

tungen wurden auch von VIETHS et al. (1999) in ihrer Studie zur in-vitro Verdauung von Lebensmittelallergenen dokumentiert. Sie wiesen mittels IB in einem enzymatisch behandelten Erdnußextrakt eine auf ein Minimum reduzierte Allergenität nach, während die EAST-Inhibition ein deutlich höheres allergenes Potential ergab.

Die Litchi zeigte während der in-vitro Verdauung unter Bedingungen des Intestinaltraktes eine Instabilität der IgE-bindenden Proteine sowie eine Abnahme der allergenen Aktivität. BURKS et al. (1999) konnten analog zu diesen Ergebnissen eine Veränderung der Allergenität von Sojaallergenen während einer kombinierten Magen- und Darmverdauung beobachten. Ebenfalls zeigten das Ovomuroid (YAMADA et al. 2000) sowie die Hefeallergene (KORTEKANGAS-SAVOLAINEN et al. 1993) einen Rückgang bzw. eine Eliminierung der Allergenität infolge einer enzymatischen Spaltung. Die Litchiallergene zeigten sich im Gegensatz zur Mango nur bedingt stabil gegen die Inkubation mit proteolytischen Enzymen. Eine Sensibilisierung des Organismus durch die Litchiallergene ist dennoch denkbar, da zwei IgE-bindende Proteine die Pepsinspaltung unbeschadet überstehen. Bei Untersuchungen an der ebenfalls birkenpollenassoziierten Haselnuß konnten VIETHS et al. (1999) eine weitgehende Zerstörung der Allergenität nachweisen und folgerten daraus eine Sensibilisierung über die Kreuzreaktivität zu den Birkenpollen.

5.3 Ausblick

In der Literatur wurden bisher noch keine umfassenden Studien zum allergenen Potential exotischer Früchte beschrieben. In dieser Arbeit wurden Beiträge sowohl zur Charakterisierung der jeweiligen Allergene als auch über deren Stabilität gegenüber technologischen Verarbeitungsverfahren sowie der in-vitro Verdauung erarbeitet. Da in der Literatur bisher keine vergleichbaren Erkenntnisse vorliegen, sind weitergehende Untersuchungen zum Verifizieren der Ergebnisse notwendig. Insbesondere sollte die Charakterisierung der Litchiallergene in Major- und Minorallergene anhand eines größeren Patientenkollektivs sowie die Bestätigung der nachgewiesenen Profilin der Litchi unter Verwendung differenter Anti-Profilin-Antikörper erfolgen. Des weiteren sollten die ermittelten pl der Mango- und Litchiallergene näher charakterisiert werden, wozu sich beispielsweise die 2D-Elektrophorese anbieten könnte. Die Untersuchungen zur Kreuzreaktivität der Litchi könnten durch weitere pflanzliche sowie birkenpollenassoziierte Lebensmittel erweitert werden. Anhand von isolierten oder rekombinanten Hauptallergenen der Birken- sowie Beifußpollen oder anderer Lebensmittel könnten direkte kreuzreaktive Verwandtschaften zu diesen Majorallergenen aufgedeckt werden. In diesem Zusammenhang sollten sowohl von der Litchi als auch von der Mango einzelne Allergene isoliert und anschließend einer Sequenzanalyse unterzogen werden. Zur Proteinisolierung konnte die EE bzw. die Kombination der AC und EE (nicht näher beschrieben) erfolgreich eingesetzt werden. Weiterhin ist auch eine direkte N-terminale Sequenzanalyse nach einer 2D-Elektrophorese denkbar. Gerade die Strukturaufklärung der hitzestabilen Mango- bzw. Litchiallergene sowie der sehr kreuzreaktiven Profilin ist von besonderem Interesse. Aufgrund der ausgeprägten Kreuzreaktivität der beiden exotischen Früchte zu einheimischen Baum-, Gräser- und Kräuterpollen sowie zu einheimischem Obst und Gemüse besteht für Pollen- und Lebensmittelallergiker eine nicht unerhebliche Gefahr einer allergischen Reaktion nach dem Verzehr von Mangos und/oder Litchis auch ohne vorherige Sensibilisierung durch die Frucht. Eine Eliminierung des allergenen Potentials

konnte bei beiden Früchten mittels thermischer sowie mechanischer oder enzymatischer Behandlungsverfahren nicht erzielt werden. Hypoallergene fluide Erzeugnisse könnten im Fall der Mango eventuell durch Ultrafiltration des fertigen Nektars analog zu der von BRENNAN et al. (2000) beschriebenen Methode hergestellt werden. Litchikonserven mit stark reduziertem allergenen Potential können anscheinend nur durch eine vorherige Eliminierung der Allergenität im nativen Ausgangsprodukt erreicht werden. In diesem Zusammenhang stellt die gentechnische Veränderung bzw. konventionelle Züchtung allergenreduzierter Früchte einen interessanten Aspekt dar. Die auf diese Weise manipulierten Proteinmoleküle bergen jedoch wie auch die klonierten Proteine durch ihre strukturellen Veränderungen eine potentielle Allergenität für ein anderes Individuum. Ein Restrisiko wird somit niemals auszuschließen sein.

6 Zusammenfassung - Summary

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war eine umfassende Studie über das allergene Potential der Mango und der Litchi. Beide exotischen Früchte finden beim europäischen Verbraucher eine kontinuierlich steigende Akzeptanz und werden aufgrund ihrer ganzjährigen Verfügbarkeit zunehmend verzehrt.

Das allergene Potential der aus nativen sowie aus behandelten Früchten gewonnenen Proteinextrakte erfolgte mittels etablierter elektrophoretischer und immunologischer Verfahren. Zur immunochemischen Detektion wurde ein Poolserum eines Patientenkollektivs, bestehend aus Probanden mit einer Sensibilisierung gegen Mango und/oder Litchi (EAST-Klasse ≥ 2), zusammengestellt.

Als Hauptallergene der **Mango** konnten die bereits in der Literatur beschriebenen IgE-bindenden Proteine mit MG von 40 und 30 kDa (Man i 1 und 2), diverse Minorallergene im MG-Bereich zwischen 25 und 94 kDa sowie bei 14 und 16 kDa charakterisiert werden.

Die Untersuchungen der thailändischen Mangovarietäten „Choke Anan“, „Kaew“, „Nam Dok Mai“, „Nang Klang Wan“ sowie der Sorten „Tommy Atkins“ und „Kent“ aus Brasilien, „Keitt“ aus Mexiko und „Eden“ aus Israel ergaben unabhängig von ihrer Herkunft ein nahezu identisches Allergenmuster mit einem vergleichbaren allergenen Potential.

Die Untersuchung von vier verschiedenen Fruchtfleischfraktionen aus drei unterschiedlichen vollreifen Mangosorten ergab eine homogene Verteilung der IgE-bindenden Proteine mit ähnlicher allergener Aktivität. Ferner wurden die Früchte im Verlauf ihres Reifeprozesses über einen Zeitraum von acht Tagen (Reifestadium: „mature green“ bis „vollreif“) untersucht, wobei kein Einfluß des Reifegrades auf das allergene Potential beobachtet werden konnte. Sowohl im IB als auch mittels EAST-Inhibition konnten keine signifikanten Veränderungen der Allergenität nachgewiesen werden.

Die Charakterisierung der Allergene aus dem Meso- und Perikarp der Mango ergaben ein identisches Protein- bzw. Allergenmuster. Mittels EAST-Inhibition konnte eine vergleichbare allergene Potenz der IgE-bindenden Proteine nachgewiesen werden. Die pI der Allergene aus der Schale sowie des Fruchtfleisches lagen überwiegend im sauren pH-Bereich. Ferner konnten die niedermolekularen Allergene mit MG von 14 und 16 kDa in beiden Fruchtteilen unter Verwendung eines gegen rekombinantes Birnenprofilin gerichteten Antikörpers als Profiline identifiziert werden.

Die Mangoallergene wiesen gegenüber technologischen Verarbeitungsprozessen eine sehr hohe Stabilität auf. In den Extrakten der im Trockenschrank (bis zu 90 min bei 105 °C), im Autoklaven (bis zu 30 min bei 121°C), im Schnellkochtopf (bis zu 30 min) sowie in der Mikrowelle (bis zu 5 min bei 900 W) erhitzten Mangos konnte kein signifikanter Allergenitätsverlust festgestellt werden. In den an der UH hergestellten fluiden und festen Mangoerzeugnissen konnte unabhängig von den Prozeßparametern Erhitzungszeit und -temperatur, Enzymierung und mechanischer Zerkleinerung ein allergenes Restpotential verifiziert werden. Insbesondere zeigten die beiden Hauptallergene sowie die Profiline eine hohe Thermostabilität. Lediglich im „Mangoleder“ – ein getrocknetes

Mangopüree – wurde sowohl im IB als auch in der EAST-Inhibition eine leichte Abnahme der Allergenität gefunden. Diese Ergebnisse wurden durch die Untersuchung handelsüblicher Produkte (Fruchtsaftgetränke, Pürees & Trockenprodukte) bestätigt.

Die in-vitro Verdauung der Mango ergab unter Verwendung von Enzymen des Gastrointestinaltraktes einen Abbau der IgE-bindenden Proteine mit MG >50 kDa. Parallel hierzu konnte durch die Inkubation der zuvor pepsinverdauten Früchte mit Chymotrypsin, Trypsin sowie Pancreatin eine Bildung von Proteinfragmenten mit allergener Aktivität beobachtet werden. Die Hauptallergene Man i 1 und 2 zeigten sich gegenüber der in-vitro Verdauung persistent.

34 von 38 der zur Verfügung stehenden Patientenseren wiesen spezifisches IgE gegen ein Protein der Litchi mit einem MG von 55 kDa auf. Neben diesem vermutlich als Hauptallergen einzuordnenden IgE-bindenden Protein konnten weitere Allergene mit MG von 14 kDa, 20 kDa, 24 kDa, 30 kDa, 35 kDa, 40 kDa, 42 sowie ≥ 67 kDa charakterisiert werden.

Die Untersuchung der sieben Litchivarietäten „Kuang Chao“, „Bai Dum“, „Chacapat“, „Hong Huey“ (alle aus Thailand), „Mauritius“, „Cope“ (beide Südafrika) und einer unbekanntem Sorte aus Madagaskar ergaben keine Sortenabhängigkeit des allergenen Potentials. Sowohl im IB als auch in den IB- und EAST-Inhibitionen konnte ein analoges Spektrum der IgE-bindenden Proteine mit vergleichbarer allergener Aktivität verifiziert werden.

Die eingehende Charakterisierung der Allergene des Meso- und Perikarps verdeutlichte signifikante Unterschiede zwischen beiden Fruchtteilen. Die Schale zeigte im Gegensatz zum Fruchtfleisch im Allergenmuster IgE-bindende Proteine mit MG von 16 kDa, 18 kDa, 22 kDa, 40 kDa, 50 kDa, 80 und 100 kDa. Mittels IB- bzw. EAST-Inhibitionen konnten diese Differenzen bestätigt sowie eine höhere allergene Aktivität der Schale gegenüber dem Fruchtfleisch nachgewiesen werden. Die pI der visualisierten Allergene lagen ähnlich der Mango im sauren pH-Bereich, wobei in der Litchischale hauptsächlich pI-Werte unterhalb 3.5 gefunden wurden. Ferner wurden im Mesokarp der Litchi unter Verwendung eines Anti-Birnenprofilin-Antikörpers vier potentielle Profiline nachgewiesen. Im Profilinblot konnten Banden bei 14 und 12 kDa sowie eine Doppelbande bei 7 kDa detektiert werden. In der Schale wurde kein Profilin identifiziert.

Weiterhin konnte eine 89 %ige Sequenzhomologie des isolierten 40 kDa Allergens aus dem Arillus mit der Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase aus weißem Senf ermittelt werden.

Die Untersuchungen zur Kreuzreaktivität der Litchi zu einheimischen Baum- und Gräserpollen sowie zu birkenpollenassoziierten Lebensmitteln erfolgte anhand von Extrakten aus Apfel, Karotte, Kartoffel, Haselnuß, Sellerie und Mango sowie Beifußpollen. Das 35 kDa Allergen sowie das 14 kDa Profilin zeigten in den IB- und EAST-Inhibitionen ein besonders prägnantes kreuzreaktives Potential. Sämtliche Obst/Gemüse/Pollen-Extrakte vermochten das Allergenspektrum der Litchi eindeutig zu inhibieren, lediglich die Haselnuß zeigte eine ausschließliche Inhibition des 35 kDa Allergens. Die Litchiallergene implizierten durch ihr Inhibitionsverhalten eine starke kreuzreaktive Potenz zur Mango, Kartoffel sowie zum Sellerie, dagegen eine etwas schwächer ausgeprägte

Kreuzreaktivität zur Haselnuß, zur Karotte sowie zu den Beifußpollen. Ferner konnte keine Kreuzreaktivität der Litchi mit dem Hauptallergen des Apfels nachgewiesen werden.

Analog zu den Ergebnissen der Mango zeigten auch die Litchiallergene eine hohe Stabilität gegenüber thermischen Behandlungen. Die Erhitzung im Autoklaven für 30 Minuten bei 121 °C führte zu keiner Veränderung des Protein- bzw. Allergenmusters sowie zu keiner Abnahme der allergenen Potenz im Vergleich zur nativen Frucht. Die an der UH definiert hergestellten Konserven mit Pasteurisationszeiten bis 20 Minuten wiesen eine Stabilität der IgE-bindenden Proteine mit MG von 14 kDa, 40 kDa, 42 kDa, 55 und 94 kDa auf, die auch gegenüber einer Lagerung von 12 Monaten unverändert blieb. In den EAST-Inhibitionen konnte eine leichte Abnahme der allergenen Aktivität ab einer Pasteurisationsdauer von 10 Minuten festgestellt werden. In einer sterilisierten Variante konnte lediglich das 55 kDa Allergen detektiert und eine korrelierende Schwächung des allergenen Potentials beobachtet werden. In den Handelsprodukten sowie den thailändischen Konserven wurde ebenfalls ein allergenes Restpotential ermittelt. Ferner konnte kein Einfluß des Gefrier-Tau-Prozesses auf die Allergenität der Litchis nachgewiesen werden. Sämtliche untersuchten TK-Waren wiesen ein der nativen Frucht vergleichbares IgE-bindendes Proteinmuster mit unveränderter allergener Potenz auf. Weiterhin zeigte sich die Aktivität der Litchiallergene resistent gegenüber einem enzymatischen Schälverfahren.

Die proteolytische Behandlung des Litchifruchtfleisches führte bereits unter Inkubation mit Pepsin zu einer Hydrolyse der Allergene. Lediglich zwei IgE-bindende Proteine mit MG von 14 und 55 kDa überstanden die simulierte Magenverdauung. Die Inkubation mit Enzymen des Intestinaltraktes führten zu einem vollständigen Abbau des Allergenspektrums sowie zur Bildung niedermolekularer Proteinfragmente. Während im Immunoblot keine Banden mehr detektiert wurden, konnte mittels EAST-Inhibition noch ein allergenes Restpotential nachgewiesen werden.

Sowohl die Mango- als auch die Litchiallergene zeigten eine hohe Stabilität gegenüber der technologischen Verarbeitung insbesondere gegen thermische Einflüsse. Die Untersuchungen der in-vitro Verdauung ergaben eine im Vergleich zu den Litchiallergenen höhere Persistenz der Mangoallergene gegenüber proteolytischen Enzymen. Während bei der Litchi signifikante Unterschiede zwischen den IgE-bindenden Proteinen des Perikarps und des Arillus beobachtet wurden, konnte in der Mango in beiden Fruchtteilen ein ähnliches allergenes Potential nachgewiesen werden. Eine Sortenabhängigkeit der Allergenität konnte weder bei der Mango noch bei Litchi gefunden werden. Zusätzlich zeigt die Litchi eine ausgeprägte Kreuzreaktivität mit einheimischen Gräserpollen und birkenpollenassoziierten Lebensmitteln.

The aim of the present study was a detailed investigation of the allergenicity of mango and lychee. Both exotic fruits are increasingly accepted by the consumer due to their continuous availability over the whole season.

The allergenic potentials of native and treated fruit protein extracts were determined by means of common electrophoretic and immunologic methods. The immunochemical detection was carried

out using a pooled serum from patients with a sensitisation to mango and/or lychee (EAST-classes ≥ 2).

Two proteins with molecular weights (MW) of 40 and 30 kDa (Man i 1 and 2) were characterised as the major allergens of mango fruit, furthermore various minor allergens with MWs between 25 and 94 kDa as well as between 14 and 16 kDa were detected.

The investigation of eight mango cultivars - "CA", "Kaew", "NDM", "NKW" from Thailand as well as the varieties "TA" and "Kent" from Brazil, "Keitt" from Mexico and "Eden" from Israel - resulted in an almost identical allergenic potential.

To study the potential connection between the allergenicity and the edible part resp. the peel, four different pulp fractions from three ripe mango cultivars were investigated. The results revealed a homologous distribution of the IgE-binding proteins with a similar allergenic activity. Additionally the fruits were examined during their ripening process for a period of eight days. Neither by immunoblotting nor by means of EAST-inhibition could any influence of the ripe stage on the allergenicity be observed. The characterisation of the protein and allergen patterns from mango extracts of meso- and pericarp revealed no significant differences. The isoelectric points of the allergens from the peel and pulp are located predominantly in the acid pH area.

Furthermore the two low molecular allergens with MW of 14 and 16 kDa were identified as profilines in both fruit sections (peel and pulp) using an antibody against recombinant pear profilin.

The mango allergens showed a very high stability against technological processing. No significant loss of the allergenicity could be determined in extracts of mangoes, which were heated in a drying furnace (up to 90 min at 105 °C), in an autoclave (up to 30 min at 121 °C), in a pressure cooker (up to 30 min), and in the microwave (up to 5 min at 900 W). In fluid and dried mango products produced at the University of Hohenheim (UH) a remaining allergenic potential could be verified independently of the process variables heating time, temperature, enzymatic treatment and mechanical cutting. In particular the two major allergens and the profilines showed a high thermal stability. Only for the product "Mangoleder" (a dried puree) was a slight decrease of the allergenicity detected by immunoblotting as well as by EAST-inhibition. These results were confirmed by investigation of commercial mango products (e.g. beverages, purees and dried slices).

The in-vitro digestion of fresh mangoes resulted in a reduction of all IgE-binding proteins with MWs over 50 kDa. After the incubation of mango pieces with chymotrypsine, trypsin, and pancreatine some new allergen fragments were obtained. For the major allergens Man i 1 and 2 a high resistance to proteolytic enzymes was observed.

34 of 38 available patients' sera revealed specific IgE against a protein of lychee with a MW of 55 kDa. Besides this potential major allergen further IgE-binding proteins with molecular weights of 14 kDa, 20 kDa, 30 kDa, 40 kDa, 42, and ≥ 67 kDa were characterized.

The investigation of seven different lychee varieties - "KC", "BD", "C", "HH" from Thailand, "Mauritius" and "Cope" from South Africa as well as an unknown cultivar from Madagascar - resulted in no observable relationship between variety and allergenicity. A similar spectrum of the IgE-binding proteins with comparable allergenic activity could be verified both in immunoblotting and in immunoblotting- and EAST-inhibition.

The detailed characterisation of the meso- and pericarp's allergens showed significant differences between the two fruit sections. The peel revealed IgE-binding proteins with MWs of 16 kDa, 18 kDa, 22 kDa, 40 kDa, 50 kDa, 80 and 100 kDa. By means of immunoblotting- and EAST-inhibition different allergen patterns were found for aril and peel, whereas the pericarp showed a higher allergenic activity. The isoelectric points of the visualised allergens are located in the acid range, which equal to the results of the mango. In the peel mainly allergens with pI below 3.5 were found. Furthermore, by using the anti-pear-profilin-antibody in the aril of the lychee four potential low molecular profilins were identified. No profilins were found in the peel.

Additionally, a sequence homology of 89 % between the isolated 40 kDa allergen from the aril and the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from white mustard could be determined.

Investigations of the cross reactivity between lychee fruit and tree and grass pollen as well as birch pollen associated foodstuffs were carried out using extracts from apple, carrot, potato, hazelnut, celery, mango and mugwort pollen. The 35 kDa allergen and the 14 kDa profilin showed a significant cross reactive potential. All fruit/vegetable/pollen extracts were able to inhibit the lychee allergens. Only hazelnut extracts showed an exclusive inhibition of the 35 kDa allergen. Because of their inhibition ability the lychee allergens showed a particular cross reactivity to mango, potato and celery as well as a weaker cross reactivity to hazelnut, carrot and mugwort pollen. In addition, lychee allergens showed no cross reactivity to the major apple allergen.

A high stability to thermal treatment was observed for lychee allergens similar to the results of the mango. The autoclaving process for 30 min at 121 °C led neither to a modification of both the protein and allergen pattern nor to a decrease of the allergenic potential compared to the native fruit. The canned lychee produced at the UH with pasteurisation times up to 20 min revealed a stability of IgE-binding proteins with MWs of 14 kDa, 40 kDa, 42 kDa, 55 and 94 kDa, which remained unchanged even after a storage time up to 12 months.

The EAST-inhibitions resulted in a slight decrease of the allergenic activity after 10 min pasteurisation time. In the sterilised variation only the 55 kDa allergen was detected. In commercial products as well as in canned lychees from Thailand an allergenic potential could be determined. Furthermore no influence of the freezing-melting-process on the allergenicity of the lychees could be proved. All examined frozen products showed an equal IgE-binding protein pattern and a similar allergenic activity compared to the native fruit. Also the lychee allergens were resistant to an enzymatic peeling technique.

Just after incubation with pepsin the proteolytic treatment of the lychee aril led to a hydrolysis of most allergens. Only two IgE-binding proteins with MWs of 14 and 55 kDa were resistant to the simulated gastric digestion. The incubation with enzymes of the intestinal tract led to a complete reduction of the allergen spectrum and a formation of low molecular protein fragments. While in the immunoblot no more bands were visible, a remaining allergic potential could be proven by EAST-Inhibition.

Both mango and lychee allergens showed a high stability to technological processing, in particular against thermal influences. In mango fruit a higher resistance of the allergens to in- vitro digestion than in lychee fruit could be observed. While in the lychee significant differences between the IgE-binding proteins of peel and aril could be obtained, in both sections of the mango a similar allergen pattern could be visualized. A variety dependence of the allergenicity could be detected neither in mango nor in lychee. Additionally the lychee shows a strong cross reactivity with grass pollen and birch pollen associated foodstuffs.

7 Anhang

7.1 Gewinnen der Patientenserum

Durchführung

- ✎ 10 mL Blut werden dem Probanden mit einer Monovette abgenommen
- ✎ Blut mindestens 30 min abkühlen lassen, ab- und zu umschwenken
- ✎ 10 min bei 4 °C und 3000 g zentrifugieren
- ✎ überstehendes Serum (3-4 mL) in Eppendorftubes abfüllen
- ✎ Seren bei -80 °C lagern

7.2 Extraktion der Proteine

7.2.1 Tieftemperaturextraktion

Die Tieftemperaturextraktion erfolgt modifiziert nach VIETHS et al. (1992a):

Gewinnen des Acetonpulvers

- ✎ 1000 mL Aceton sowie ein Stahlbecherglas bei -80 °C über Nacht kühlen
- ✎ 200 g des Untersuchungsguts (frische Früchte bzw. Mango/Litchi-Produkte) einwiegen und langsam zu 400 mL kaltem Aceton geben
- ✎ erneut bei -80 °C kühlen bis $T < -40$ °C
- ✎ Gemisch mit Ultraturrax im gekühlten Stahlbecherglas homogenisieren
- ✎ Homogenat in 1000-mL-Glasflasche überführen, Stahlbecherglas und Turrax mit wenig gekühltem Aceton abspülen und Waschlösung ebenfalls in die Glasflasche geben
- ✎ Homogenat in Tiefkühltruhe über Nacht bei -20 °C äquilibrieren lassen
- ✎ Homogenat am folgenden Tag über Büchnertrichter mittels Wasserstrahlpumpe absaugen
- ✎ 3 x mit je ca. 100 mL Aceton ($T = -80$ °C) waschen
- ✎ 3 x mit je ca. 100 mL Diethylether/Aceton (1:1, $T = -80$ °C) waschen
- ✎ Rückstand trockensaugen, Filtrat verwerfen
- ✎ Rückstand in einen Rundkolben überführen und über Nacht lyophilisieren
- ✎ Lyophilisat = Acetonpulver
- ✎ das Acetonpulver bei -20 °C lagern

eingesetzte Lösungen:

| | | |
|-----------------------------|-----------|--------------|
| Diethylether/Aceton-Gemisch | 1:1 (v:v) | $T = -80$ °C |
|-----------------------------|-----------|--------------|

Extraktion aus dem Acetonpulver

- ✎ ca. 1-3 g Acetonpulver werden - je nach zu erwartender Proteinkonzentration - mit 15 bis 30 mL PBS versetzt
- ✎ pH-Wert mit 1 mol/L NaOH auf ca. 7 zurückbringen
- ✎ 1 Stunde unter Eiskühlung rühren lassen
- ✎ Homogenat bei 10000 U/min und 4 °C 60 min zentrifugieren
- ✎ Lösung filtrieren und 2 bzw. 3 mL in 4-mL-Vials portionieren
- ✎ Vials über Nacht lyophilisieren
- ✎ Lyophilisat bei -20 °C lagern
- ✎ zur Herstellung von Proteinextrakten wird der Rückstand mit 2 bzw. 3 mL bidest. Wasser rekonstituiert

eingesetzte Lösungen

| | |
|-----------------------|----------------------------|
| PBS-Lösung - pH 7,4 | 1 PBS – Tablette ad 200 mL |
| 0.01 mol/L K_2HPO_4 | |
| 0.15 mol/L NaCl | |

Modifizierungen

Die oben beschriebene Tieftemperaturextraktion wird bei allen frischen Früchten, halbfesten und festen Mango/Litchiprodukten sowie bei allen halbfesten und festen Produkte der Warenkorbbuntersuchung angewendet. Ist der Proteingehalt der extrahierten Lösungen nicht ausreichend für die elektrophoretischen Untersuchungen, erfolgt eine Konzentrierung, indem das erhaltene Lyophilisat in einem geringeren Volumen Wasser als die Ausgangslösung rekonstituiert wird.

Bei den fluiden Mango- und Litchiprodukten ist eine Gewinnung des Acetonpulvers nicht erforderlich, da sie während ihrer Produktion bereits einer Hitzebehandlung (Pasteurisation bzw. Sterilisation) unterzogen wurden. Diese fluiden Produkte werden einer vereinfachten Proteinextraktion unterzogen: Zunächst werden die Proben lyophilisiert, aus dem Lyophilisat erfolgt die Proteinextraktion analog der oben beschriebenen Methode!

7.2.2 Extraktion der in-vitro verdauten Mangos/Litchis

Die Proteinextraktion der enzymatisch behandelten Mangos und Litchis erfolgt nicht mittels Tieftemperaturextraktion, sondern direkt aus den verdauten Lösungen:

in-vitro Magenverdauung:

- ✎ 20 g geschälte, vom Kern befreite, frische Mango bzw. Litchi werden in Würfel (0.5 cm³) geschnitten und in eine Braunglasflasche eingewogen
- ✎ pH-Wert mit 0.1 mol/L HCl auf 1.2 einstellen Zugabe einer definierten Menge des Enzyms Pepsin (siehe Tabelle 7-I)
- ✎ bei 37 °C im Umlufttrockenschrank unter Umschwenken für verschiedene Zeiten (siehe Tabelle 7-I) inkubieren
- ✎ Suspension mit 0.1 mol/L NaOH auf 7.5 bringen
- ✎ bei 10000 U/min und 4 °C 1 h zentrifugieren
- ✎ Lösung abfiltrieren und 2.5 mL in 4 mL-Vials portionieren
- ✎ über Nacht lyophilisieren
- ✎ Lyophilisat bei -20 °C lagern

in-vitro Darmverdauung:

- ✎ 20 g geschälte, vom Kern befreite, frische Mango bzw. Litchi werden in Würfel (0.5 cm³) geschnitten und in eine Braunglasflasche eingewogen
- ✎ pH-Wert mit 0.1 mol/L HCl auf 1.2 einstellen
- ✎ Zugabe von $1.356 \cdot 10^7$ Units/L Pepsin
- ✎ bei 37 °C im Umlufttrockenschrank unter Umschwenken für 120 min inkubieren
- ✎ Suspension mit 0.1 mol/L NaOH auf das pH-Optimum des jeweiligen Darmenzym einstellen (siehe Tabelle 7-II A&B)
- ✎ Zugabe des jeweiligen Enzyms (siehe Tabelle 7-II A&B)
- ✎ bei 37 °C im Umlufttrockenschrank unter Umschwenken für verschiedene Zeiten (siehe Tabelle 7-II A&B) inkubieren
- ✎ Suspension für 20 min im Wasserbad auf 90 °C erhitzen
- ✎ bei 10000 U/min und 4 °C 1 h zentrifugieren

Mango:

- ✎ Lösungen abfiltrieren und 2.5 mL in 4 mL-Vials portionieren
- ✎ über Nacht lyophilisieren, Lyophilisat bei -20 °C lagern

Litchi:

- ✎ Lösungen abfiltrieren und für kurze Zeit bei -80 °C lagern

Blindwert:

- ✎ es werden alle eingesetzten Enzyme der in-vitro Verdauung unterzogen :
1.356·10⁷ Units/L Pepsin + 20 mL → 37 °C für 120 min bei pH: 2.5
+ Chymotrypsin (35·10⁴ Units/L) - Trypsin (218·10⁵ Units/L) - Pancreatin (Enzym:Frucht 1:25) - Carboxypeptidase A (29095 Units/L) - Protease (13400 Units/L) → 37 °C für 120 min bei pH: 7.5 – anschließend für 20 min auf 90 °C erhitzen

eingesetzte Lösungen

PBS-Lösung - pH 7,4
 0,01 mol/L K_2HPO_4
 0,15 mol/L NaCl

1 PBS – Tablette ad 200 mL

Tab. 7-I: Bedingungen der in-vitro Magenverdauung

| | | Pepsinkonz. [Units/L] | Inkubationszeiten [min] |
|--------|------------------|-----------------------|-------------------------|
| Mango | M _M 1 | $2.712 \cdot 10^5$ | 120 |
| | M _M 2 | $5.424 \cdot 10^5$ | 120 |
| | M _M 3 | $1.356 \cdot 10^7$ | 30, 60, 120, 210 |
| | M _M 4 | $2.260 \cdot 10^7$ | 120 |
| | M _M K | - | 120 |
| Litchi | M _L 1 | $1.356 \cdot 10^7$ | 30, 60, 120, 210 |
| | M _L K | - | 120 |

M_MK + M_LK: Kontrollversuch → es wird die Frucht ohne Zusatz von Enzym aufgearbeitet

Tab. 7-II A&B: Bedingungen der in-vitro Darmverdauung „Mango“ und „Litchi“

Tab. 7-IIA: Mango

| | | pH-Wert | Enzymkonzentrationen | Inkubationszeiten [min] |
|---------------------------------|-------------------|---------|---|-------------------------|
| Chymotrypsin | D _M 1 | 8.0 | $35 \cdot 10^4$ Units/L | 60, 120 |
| | D _M 2 | | $7 \cdot 10^4$ Units/L | |
| Trypsin | D _M 3 | 7.6 | $109 \cdot 10^5$ Units/L | 60, 120 |
| | D _M 4 | | $218 \cdot 10^5$ Units/L | |
| Chymotrypsin + Trypsin | D _M 5 | 7.7 | $7 \cdot 10^5 + 218 \cdot 10^5$ Units/L | 60, 120 |
| Pancreatin | D _M 6 | 7.5 | Enzym:Frucht 1:100 | 30, 60, 120 |
| | D _M 7 | | Enzym:Frucht 1:50 | |
| | D _M 8 | | Enzym:Frucht 1:25 | |
| Carboxypeptidase A | D _M 9 | 7.5 | 29095 Units/L | 120 |
| Pancreatin + Carboxypeptidase A | D _M 10 | 7.5 | 1:25 + 29095 Units/L | 120 |
| Protease | D _M 11 | 7.5 | 13400 Units/L | 120 |
| | D _M 12 | | 26800 Units/L | |
| Pancreatin + Protease | D _M 13 | 7.5 | 1:25 + 13400 Units/L | 120 |
| ohne Enzym | D _M K | 7.5 | - | 120 |

Tab. 7-IIb: Litchi

| | | pH-Wert | Enzymkonzentration | Inkubationszeiten [min] |
|---------------------------------|-------------------|---------|---|-------------------------|
| Chymotrypsin | D _L 1 | 8.0 | 35·10 ⁴ Units/L | 60, 120 |
| | D _L 2 | | 7·10 ⁴ Units/L | |
| Trypsin | D _L 3 | 7.6 | 109·10 ⁵ Units/L | 60, 120 |
| | D _L 4 | | 218·10 ⁵ Units/L | |
| Chymotrypsin + Trypsin | D _L 5 | 7.7 | 7·10 ⁵ + 218·10 ⁵ Units/L | 60, 120 |
| Pancreatin | D _L 6 | 7.5 | Enzym:Frucht 1:50 | 60 120 |
| | D _L 7 | | Enzym:Frucht 1:25 | |
| Carboxypeptidase A | D _L 8 | 7.5 | 29095 Units/L | 120 |
| Pancreatin + Carboxypeptidase A | D _L 9 | 7.5 | 1:25 + 29095 Units/L | 120 |
| Protease | D _L 10 | 7.5 | 13400 Units/L | 120 |
| | D _L 11 | | 26800 Units/L | |
| Pancreatin + Protease | D _L 12 | 7.5 | 1:25 + 13400 Units/L | 120 |
| ohne Enzym | D _L K | 7.5 | - | 120 |

D_MK; D_LK: Kontrollversuche → es werden die Früchte ohne Enzymzusatz aufgearbeitet

7.3 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgt photometrisch nach der Methode von BRADFORD (1976).

Durchführung

- ✎ Proteinextrakte in bidest. Wasser aufnehmen – ggf. verdünnen
- ✎ 50 μ L Standard- bzw. Probelösung in je eine Kavität einer Mikrotiterplatte geben (für den Blindwert 50 μ L bidest. Wasser einsetzen)
- ✎ 200 μ L der Lösung II hinzu pipettieren
- ✎ im ELISA-Reader 10 s schütteln, anschließend bei 590 nm gegen den Blindwert vermessen
- ✎ Die Auswertung erfolgt anhand linearer Regression der Kalibriergeraden.

eingesetzte Lösungen

| | | |
|---|---------------------------------------|--|
| Lösung I | Ethanol (96 %) | 10 mL |
| | H ₃ PO ₄ (85 %) | 20 mL |
| | Coomassie-Brilliant-Blau G-250: | 35 mg |
| Lösung II Bei RT unter Lichtausschluß aufbewahren | Lösung I | 3 mL |
| | H ₃ PO ₄ (85 %) | 3 mL |
| | Ethanol (96 %) | 1.5 mL |
| | Bidest. Wasser | 42.5 mL |
| Standardlösungen | 400 μ g BSA / mL | ☞ 20 mg BSA ad 50 mL bidest. H ₂ O (ST) |
| | 300 μ g BSA / mL | ☞ 18.75 mL ST ad 25 mL bidest. H ₂ O |
| | 200 μ g BSA / mL | ☞ 12.50 mL ST ad 25 mL bidest. H ₂ O |
| | 100 μ g BSA / mL | ☞ 6.25 mL ST ad 25 mL bidest. H ₂ O |
| | 50 μ g BSA / mL | ☞ 3.125 mL ST ad 25 mL bidest. H ₂ O |
| | 20 μ g BSA / mL | ☞ 1.25 mL ST ad 25 mL bidest. H ₂ O |
| | 10 μ g BSA / mL | ☞ 0.625 mL ST ad 25 mL bidest. H ₂ O |

Die Ergebnisse der Proteinbestimmung aller verwendeten Extrakte sind in Kapitel 7.16 aufgeführt.

7.4 Enzymallergosorbent-Test (EAST)

7.4.1 Herstellung der Allergenscheiben

Die Herstellung der Allergenscheiben erfolgt nach CESKA & LUNDKVIST (1972) modifiziert nach MÖLLER et al. (1997).

Bromcyanaktivierung

- ✎ 15 g Papierscheiben (ca. 5000 Stück) in einem 1-L-Dreihalskolben - versehen mit 250-mL-Tropftrichter, pH-Elektrode und Thermometer - 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 mol/L NaOH den pH-Wert auf 10-10.5 einstellen
- ✎ und diesen bis zu einem Verbrauch von 75 mL einhalten - der pH-Wert darf 11.5 nicht übersteigen, ansonsten ist der Versuch zu wiederholen!
- ✎ Lösung mittels Wasserstrahlpumpe absaugen
- ✎ Scheiben insgesamt 12 x mit je 0.005 mol/L NaHCO₃-Lsg. waschen, jeweils 2 min stehen lassen, dann 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 trocknen
- ✎ Scheiben bei -20 °C lagern

eingesetzte Lösungen

| | | |
|-------------------------------------|--------------------|---|
| 0.005 mol/L NaHCO ₃ -Lsg | NaHCO ₃ | 2,1g mit bidest. H ₂ O ad 10 L |
|-------------------------------------|--------------------|---|

Kopplung der Extrakte

- ✎ Proteinextrakte (siehe 7.2) in bidest. Wasser aufnehmen und auf einen Proteingehalt von 20 µg/mL einstellen
- ✎ 100 mL der Proteinlösung in einen 250-mL-Jodzahlkolben füllen
- ✎ ca. 300 bromcyanaktivierte Scheiben (entspricht ca. 0.6 g) dazugeben
- ✎ über Nacht bei 4 °C rühren
- ✎ Überstand mit Pasteurpipette absaugen (Wasserstrahlpumpe)
- ✎ Papierscheiben einmal mit 100 mL 0.5 mol/L NaHCO₃ waschen, absaugen
- ✎ mit 100 mL Ethanolaminpuffer versetzen und 2 h bei RT rühren
- ✎ absaugen und wie folgt waschen:
- ✎ 3 x mit 100 mL 0.1 mol/L NaHCO₃-Lsg
- ✎ 2 x mit 100 mL 0.1 mol/L NaAc-Lsg
- ✎ 2 x mit 100 mL 0.5 mol/L NaHCO₃-Lsg.

- ✎ letzte Waschlösung gründlich absaugen
- ✎ Scheiben mit 100 mL dest. Wasser waschen – absaugen und mit dest. Wasser in einen 250-mL-Rundkolb überführen – Wasser gründlich absaugen
- ✎ 2 h bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ kühlen und über Nacht lyophilisieren
- ✎ Scheiben bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ lagern

eingesetzte Lösungen

| | | |
|----------------------------|------------------|---|
| 0.5 mol/L NaHCO_3 | NaHCO_3 | 21.0 g ad 500 mL dest. H_2O - pH auf 8.4 einstellen |
| 0.1 mol/L NaHCO_3 | NHCO_3 | 4.2 g ad 500 mL dest. H_2O - pH auf 9.5 einstellen |
| Ethanolaminpuffer | Ethanolamin | 5 mL ad 500 mL dest. H_2O - pH auf 9.2 einstellen |
| 0.1 mol/L NaAc-Puffer | Natriumacetat | 4.2 g ad 500 mL dest. H_2O - pH auf 4.0 einstellen |

7.4.2 EAST-Bestimmung

Für die EAST-Bestimmung wird der In-vitro-Test „Spez. IgE ELISA TR (RV)“ der Firma Allergopharma (Reinbek, Deutschland) verwendet.

Durchführung

- ✎ Plattenbelegungsplan erstellen; alle Messungen als Doppelbestimmungen durchführen
- ✎ für die Bestimmung benötigte Allergenscheiben in Inkubationspuffer aktivieren
- ✎ Lieschgrasscheiben für die Standards nicht aktivieren!
- ✎ je eine Scheibe in eine Kavität einer Mikrotiterplatte legen
- ✎ je 50 μL Patientenserum bzw. Kontrollserum auf die Allergenscheiben pipettieren
- ✎ je 50 μL der Standardseren auf die Lieschgrasscheiben geben
- ✎ Mikrotiterplatte mit Parafilm abdecken und 1 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (alternativ: 3 h bei RT) unter Lichtausschluß inkubieren
- ✎ je 250 μL Waschlösung zupipettieren und nach 10 min absaugen; Waschvorgang 2 x wiederholen
- ✎ in jede Kavität 50 μL Konjugatlösung geben
- ✎ Mikrotiterplatte mit Parafilm abdecken und über Nacht bei Raumtemperatur (alternativ: 3 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$) unter Lichtabschluß inkubieren
- ✎ je 250 μL Waschlösung zupipettieren und nach 10 min absaugen; Waschvorgang 2 x wiederholen
- ✎ 200 μL Färbelösung in jede Kavität geben
- ✎ für Blindwertbestimmung 2 leere Kavitäten ebenfalls mit 200 μL Färbelösung befüllen
- ✎ Mikrotiterplatte mit Parafilm abdecken und 1 h im Trockenschrank bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubieren
- ✎ 100 μL Stopplösung zupipettieren, Platte 10 sec schütteln (ELISA-Reader)
- ✎ 250 μL Lösung aus jeder Kavität analog in eine leere Mikrotiterplatte überführen
- ✎ bei 405 nm photometrisch am ELISA-Reader vermessen

Einteilung der EAST-Klassen

| | | |
|----------------|------------|------|
| 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 Patientenseren erfolgt über eine lineare Regression anhand einer Kalibrierreihe.

eingesetzte Lösungen

| | | |
|--------------------------|---|---|
| Inkubationspuffer | I: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 15.6 g ad 1 L bidest. H_2O |
| | II: NaHCO_3 | 8.4 g ad 1 L bidest. H_2O |
| | III: 190 mL I und 803 mL II mischen mit 4 mol/L HCl auf pH 7.4 einstellen | |
| | IV: in 800 mL Gemisch III lösen | BSA 3.00 g EDTA 37.22 g NaN_3 2.00 g Tween 20 2 mL mit 4 mol/L HCl auf pH 7.4 einstellen |
| 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 p-Nitrophenylphosphat | |
| Stopplösung | entsprechend dem Testkit - 1 mol/L NaOH | |
| Standardscheiben | an Cellulosescheiben 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) | |

7.5 EAST-Inhibition

Die EAST-Inhibition erfolgt modifiziert nach MÖLLER et al. (1997) unter Verwendung des In-vitro-Tests „Spez. IgE ELISA TR (RV)“ der Firma Allergopharma (Reinbek, Deutschland).

Durchführung

- ✎ Plattenbelegungsplan erstellen → alle Messungen werden als Doppelbestimmungen durchgeführt; leere Kavität für Standard berücksichtigen
- ✎ entsprechende Allergenscheiben – Proteine der nativen Frucht festphasengekoppelt - in Inkubationspuffer aktivieren und je eine in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte geben

folgende Lösungen pipettieren:

| | | |
|---------------------------------|--|---------------|
| Probe | → 50 µL unverdünnten Inhibitiorextrakt | + 50 µL Serum |
| | → 50 µL Inhibitiorextrakt 1:10 | + 50 µL Serum |
| | → 50 µL Inhibitiorextrakt 1:100 | + 50 µL Serum |
| | → 50 µL Inhibitiorextrakt 1:1000 | + 50 µL Serum |
| | → 50 µL Inhibitiorextrakt 1:10000 | + 50 µL Serum |
| | → 50 µL Inhibitiorextrakt 1:100000 | + 50 µL Serum |
| B ₀ (kein Inhibitor) | → 50 µL Allergenverdünnungslösung | + 50 µL Serum |
| OA (unspezifische Inhibition) | → 50 µL Ovalbumin-Lösung | + 50 µL Serum |
| NSB (nichtspezifische Bindung) | → 100 µL Allergenverdünnungslösung | + - |

- ✎ Mikrotiterplatte im Plattenreader schütteln, mit Parafilm abdecken und 3 h im Trockenschrank bei 37 °C unter Lichtabschluß inkubieren
- ✎ je 250 µL Waschlösung zupipettieren, nach 10 min absaugen -
Waschvorgang 2x wiederholen
- ✎ je 50 µL verdünnte Konjugatlösung in die Kavitäten geben
- ✎ Mikrotiterplatte mit Parafilm abdecken und über Nacht bei Raumtemperatur unter Lichtabschluß inkubieren
- ✎ je 250 µL Waschlösung zupipettieren, nach 10 min absaugen -
Waschvorgang 2x wiederholen
- ✎ 100 µL Färbelösung in jede Kavität geben - als Blindwert 2 leere Kavitäten befüllen
- ✎ 1 h im Trockenschrank bei 37 °C inkubieren
- ✎ je 200 µL Stopplösung (1 M NaOH) zupipettieren, Platte 10 sec schütteln (ELISA-Reader)
- ✎ 250 µL Lösung aus jeder Kavität analog in eine leere Mikrotiterplatte überführen
- ✎ bei 405 nm photometrisch am ELISA-Reader vermessen

Auswertung

Die Berechnung der prozentualen Inhibition erfolgt mit folgender Gleichung:

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{B_0 - B}{B_0 - \text{NSB}} \cdot 100$$

B: Meßwert der einzelnen Inhibitionsstufen
B₀: Meßwert ohne Inhibitorzusatz
NSB: nichtspezifische Bindung

eingesetzte Lösungen

Waschlösung, Konjugatlösung, Substratlösung, Färbetabletten und Stopplösung entsprechend dem Testkit (vgl. 7.4.2)

| | | | |
|----------------------------------|---|---------------|------------------------------------|
| Allergenverdünnungslösung | BSA Tween 20 | 1 g 500 µL | ad 100 mL mit PBS-Lösung |
| OA-Lösung | Ovalbumin | 10 mg | ad 10 mL Allergenverdünnungslösung |
| Konjugat | Konjugatlösung + Allergenverdünnungslösung → 1+1 | | |
| Serum | mit Allergenverdünnungslösung entsprechend verdünnen ⇒ Mango-Poolserum 1:1.5 ⇒ Litchi-Poolserum 1:2 | | |

7.6 SDS-Page (NuPAGE™)

Die NuPAGE™ erfolgt mit Fertiggelele und -lösungen der Firma Novex™ (San Diego, CA, USA) entsprechend deren Vorschriften. Die Probenaufarbeitung wurde nach VIETHS et al. (1992c) durchgeführt.

Probenvorbereitung

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

eingesetzte Lösungen

| | | |
|------------------------------|---|--------|
| Probenpuffer – pH 6.8 | Tris | 3.03 g |
| | β-Mercaptoethanol | 2.5 mL |
| | Glycerin | 5.0 mL |
| | SDS | 2.0 g |
| | Bromphenolblau | 0.01 g |
| | Pyronin Y-Lösung (1 %ig in dest. H ₂ O, v:v) | 150 µL |
| | mit 40 mL dest. H ₂ O versetzen und mit 4 mol/L HCl auf pH 6.8 | |
| | mit dest. H ₂ O ad 50 mL | |

Durchführung

- 📌 Fertiggelelkassette der Verpackung entnehmen, weißen Klebestreifen an der Unterseite und den Kamm entfernen!

- ✎ Gelkassette in die Elektrophoresekammer (Xcell II Mini Cell) gemäß Anleitung plazieren – bei einem Gel Glasplatte einsetzen
- ✎ Elektrodenpufferkammern mit Elektrodenpuffer füllen
- ✎ mit HPLC-Spritze 10 - 20 μ l (je nach Slotgröße) Marker und Proben auftragen
- ✎ Elektrodenbrücken ansetzen und 200 V Spannung anlegen (Power Ease 500)
- ✎ den Lauf beenden, wenn der Farbstoff aus dem Probenpuffer an der Anode angelangt ist – Dauer ca. 40 min
- ✎ Gelkassette entnehmen und mit dem Novex-Spatel aufbrechen
- ✎ Gel vom Kunststoffträger ablösen → direkt zur Färbung bzw. zum Semidry-Blotting einsetzen

Tab. 7-III A&B: Zusammensetzung der verwendeten Molekulargewichtsmarker

A: Marker I (14 bis 94 kDa)

| Protein | MG |
|-----------------------|----------|
| Phosphorylase b | 94 kDa |
| BSA | 67 kDa |
| Ovalbumin | 43 kDa |
| Carboanhydrase | 30 kDa |
| Trypsininhibitor | 20.1 kDa |
| α -Lactalbumin | 14.4 kDa |

B: Marker II (2.5 bis 17 kDa)

| Protein | MG |
|-------------------|----------|
| Myoglobin | 16.9 kDa |
| Myoglobin I + II | 14.4 kDa |
| Myoglobin I + III | 10.7 kDa |
| Myoglobin I | 8.2 kDa |
| Myoglobin II | 6.2 kDa |
| Myoglobin III | 2.5 kDa |

Die Proteingemische werden in 1 mL Probenpuffer aufgenommen und wie beschrieben reduziert.

eingesetzte Lösungen und Gele

| | | |
|-------------------------|---------------------------------------|--|
| Elektrodenpuffer | MES (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure | 97.6 g |
| NuPAGE™ | Tris Base | 60.5 g |
| MES SDS Running Puffer | SDS | 10.0 g |
| | EDTA | 3.0 g |
| | | mit bidest. H ₂ O ad 500 mL |
| | | vor Gebrauch 1:20 mit bidest. H ₂ O verdünnen |

| | |
|--------------------------|----------------------------------|
| 10 % Bis-Tris-Gel | 10 % Totalacrylamidkonzentration |
| Fertiggel | Gelmaße: 8 cm × 8 cm × 1 mm |
| | Geltyp: 10 well / 15 well / 2D |

| | |
|--------------------------|----------------------------------|
| 12 % Bis-Tris-Gel | 12 % Totalacrylamidkonzentration |
| Fertiggel | Gelmaße: 8 cm × 8 cm × 1 mm |
| | Geltyp: 10 well / 12 well |

7.7 IEF (NuPAGE™)

Die NuPAGE™ erfolgt mit Fertiggelele und -lösungen der Firma Novex™ (San Diego, CA, USA) entsprechend deren Vorschriften.

Durchführung

- ✎ Probenextrakt auf einen Proteingehalt von max. 100 µg/mL einstellen
- ✎ mit gleichem Volumen Glycerin/Wasser-Gemisch (1+1) verdünnen
- ✎ Fertiggelkassette und Elektrophoresekammer wie unter 7.6 beschrieben verwenden
- ✎ Kathodenraum mit Novex IEF-Kathodenpuffer und
- ✎ Anodenraum mit Novex IEF-Anodenpuffer befüllen
- ✎ mit HPLC-Spritze 20 - 40 µl (je nach Proteingehalt) Marker und Proben auftragen
- ✎ Elektrodenbrücken ansetzen folgende Spannungen anlegen (Power Ease 500):
- ✎ 100 V für 1 h → 200 V für 1 h → 500 V für 30 min
- ✎ Gel entnehmen und zur Färbung bzw. zum Semidry-Blotting einsetzen

Tab. 7-IV: Zusammensetzung des Markers

| Protein | pI-Werte | im → | Gel 3-10 | Gel 3-7 |
|--------------------|----------|------|----------|---------|
| Cytochrom C | 10.7 | | | |
| Ribonuclease A | 9.5 | | | |
| | 8.3 | | | |
| Lectin | 8.0 | | | |
| | 7.8 | | | |
| | 7.4 | | | |
| Myoglobin | 6.9 | | | |
| | 6.0 | | | |
| Carbonic anhydrase | 5.3 | | | |
| | 4.5 | | | |
| β-Lactoglobulin | 4.2 | | | |
| | 3.5 | | | |
| Trypsin inhibitor | 4.5 | | | |
| Glucose oxidase | 4.2 | | | |
| Amyloglucosidase | 3.5 | | | |

eingesetzte Lösungen und Gele

| | | |
|---------------------------|--|--------------------------------------|
| Kathodenpuffer | Lysin (freie Base) | 5.8 g |
| NuPAGE™ | | mit dest. H ₂ O ad 100 mL |
| IEF Cathode Buffer pH 3-7 | vor Gebrauch 1:10 mit bidest. H ₂ O verdünnen | |
| Anodenpuffer | Phosphorsäure 85 %ig | 2.4 mL |
| NuPAGE™ | | mit dest. H ₂ O ad 100 mL |
| IEF Anode Buffer | vor Gebrauch 1:50 mit bidest. H ₂ O verdünnen | |
| IEF-Gele | pH 3-7 oder pH 3-10 | |
| Fertiggele | Gelmaße: 8 cm × 8 cm × 1 mm | |
| | Geltyp: 10 well | |

7.8 Blotting

7.8.1 Semidry-Blotting auf Nitrocellulose-Membran

Die Durchführung dieser Methode erfolgt modifiziert nach KHYSE-ANDERSEN (1984).

Durchführung

- ✎ Blotmembran zurecht schneiden
- ✎ Graphitkathode mit bidest. H₂O befeuchten
- ✎ blaue Haushaltstücher (6 Lagen) in Kathodenpuffer tränken und auf Kathode legen
- ✎ aus der Kassette gelöstes Gel auf die Tücher legen
- ✎ Blotmembran in Anodenpuffer II tränken - auf Gel legen
- ✎ Blotmembran beschriften (mit Bleistift)
- ✎ freie Stellen (an denen kein Transfer erfolgt) mit Kunststoffstreifen belegen
- ✎ rote Haushaltstücher (2 Lagen) in Anodenpuffer II tränken - auf Blotmembran legen
- ✎ rote Haushaltstücher (4 Lagen) mit Anodenpuffer I tränken - auf Stapel legen
- ✎ mit Rolle Luftblasen aus dem Stapel drücken
- ✎ mit bidest. H₂O angefeuchtete Graphitanode auflegen
- ✎ 1 mm dicke Gele bei 30 V und 0.8 mA/mm² Gelfläche für 90 min blotten
- ✎ NC-Membran 40 min bei RT trocknen, dann zur Färbung einsetzen

eingesetzte Lösungen

Anodenpuffer I - pH 10.4

| | | | |
|------------------|------------------|---------|--|
| 0.005 mol/L Tris | Tris | 18.15 g | |
| 20 % Methanol | NaN ₃ | 0.05 g | |
| | Methanol | 100 mL | |
| | | | mit bidest. H ₂ O ad 500 mL |

Anodenpuffer II - pH 10.4

| | | | |
|------------------|------------------|--------|--|
| 0.025 mol/L Tris | Tris | 1.52 g | |
| 20 % Methanol | NaN ₃ | 0.05 g | |
| | Methanol | 100 mL | |
| | | | mit bidest. H ₂ O ad 500 mL |

Kathodenpuffer - pH 7.6

| | | | |
|-----------------|--------------------|--------|--|
| 0.04 mol/L EACA | EACA: | 2.6 g | 6-Aminohexansäure |
| 0.01 % SDS | SDS: | 0.05 g | |
| 20 % Methanol | NaN ₃ : | 0.05 g | |
| | Methanol | 100 mL | |
| | | | mit bidest. H ₂ O ad 500 mL |

7.8.2 Semidry-Blotting auf PVDF-Membran (zur Sequenzierung)

Diese Methode wird modifiziert nach WARD et al. (1990) durchgeführt.

- ✎ SDS-PAGE Trennung gemäß 7.6 durchführen
- ✎ PVDF-Blotmembran zurecht schneiden und 5 min in Methanol sowie 5 min in dest. Wasser konditionieren - dann 15 min in Elektrodenpuffer equilibrieren
- ✎ SDS-PAGE-Gel ebenfalls 30 min in Elektrodenpuffer equilibrieren
- ✎ Graphitkathode mit bidest. Wasser anfeuchten
- ✎ blaue Haushaltstücher (6 Lagen) in Elektrodenpuffer tränken - auf die Kathode legen
- ✎ Gel auf Tücher legen
- ✎ Blotmembran luftblasenfrei auf das Gel legen
- ✎ Blotmembran beschriften (mit Bleistift)
- ✎ freie Stellen (an denen kein Transfer erfolgt) mit Kunststoffstreifen belegen
- ✎ rote Haushaltstücher (6 Lagen) in Elektrodenpuffer tränken - auf Blotmembran legen
- ✎ mit Rolle Luftblasen aus dem Stapel drücken
- ✎ angefeuchtete Graphitanode auflegen
- ✎ 1 mm dicke Gele bei 30 V und 0.8 mA/mm² Gelfläche für 70 min blotten
- ✎ Membran bei RT 45 min Trocknen, dann zur Färbung einsetzen

eingesetzte Lösungen

Elektrodenpuffer - pH 11

| | | | |
|--|----------|--------|---|
| 10 mmol/L CAPS | CAPS | 554 mg | 3-Cyclohexyl-amino)-1-propansulfonsäure |
| 10 % Methanol | Methanol | 25 mL | |
| mit bidest. H ₂ O ad 250 mL | | | |

7.9 Immunochemische Detektion

Die immunochemische Detektion erfolgt mittels des Verstärkungssystem nach VIETHS et al. (1992a).

Durchführung

- ✎ Blot in Streifen schneiden (0.3 cm) und in Mini-Inkubations-Trays legen

Volumen pro Streifen 1.5 mL:

- ✎ unspezifische Bindung 2× 15 min mit Blockierlösung deaktivieren
- ✎ über Nacht mit Patientenserum inkubieren
- ✎ 3× 5 min mit Waschpuffer waschen
- ✎ 1 h mit Anti-Human-IgE inkubieren
- ✎ 3× 5 min mit Waschpuffer waschen
- ✎ 1 h mit Anti-Kaninchen-IgG inkubieren
- ✎ 3× 5 min mit Waschpuffer waschen

- ✎ 20 min mit Streptavidin-HRP-Konjugat inkubieren
- ✎ 3× 5 min mit Waschpuffer waschen
- ✎ 1 min mit Umpufferlösung umpuffern
- ✎ ca. 5 min mit Färbelösung behandeln - bis ausreichende Färbung erfolgt
- ✎ mit Wasser spülen und trocknen
- ✎ einkleben und sofort dokumentieren (Färbung ist unter Lichtausschluß nur kurze Zeit haltbar)

Modifikation

Beim Färben kompletter, nicht in Streifen geschnittener Blotmembranen werden pro Färbeschritt 15 mL der jeweiligen Lösung verwendet.

eingesetzte Lösungen

| | | | |
|---|---|----------------------|-----------------------------|
| PBS-Lösung - pH 7,4 0,01 mol/L K_2HPO_4 0,15 mol/L NaCl | 1 PBS – Tablette ad 200 mL | | |
| Blockierlösung 5 % Magermilchpulver 0.1 % Tween 20 0.01 mol/L PBS | Magermilchpulver Tween 20 | 5 g 100 μ L | mit PBS ad 100 mL |
| Inkubationspuffer 0.1 % BSA 0.05 % Tween 20 0.01 mol/L PBS | BSA Tween 20 | 100 mg 50 μ L | mit PBS ad 100 mL |
| Waschlösung 0.05 % Tween 20 0.01 mol/L PBS | Tween 20 | 50 μ L | mit PBS ad 100 mL |
| Patientenserum | 100 μ L Serum in 1.4 mL Inkubationspuffer verdünnen | | |
| Anti-Human-IgE | 1:4000 in Inkubationspuffer verdünnen | | |
| Anti-Kaninchen-IgG (biotinyliert) | 1:6000 in Inkubationspuffer verdünnen | | |
| Streptavidin-HRP | 1:20000 in Inkubationspuffer verdünnen | | |
| Umpufferlösung - pH 6.0 0.01 mol/L Tris | Tris mit 80 mL bidest. H_2O versetzen und mit 4 mol/L HCl auf pH 6.0 | 121.2 mg | mit bidest. H_2O ad 50 mL |

| | | | |
|--|---|-----------------------------|--|
| Färbelösung I frisch ansetzen | TMBis | 24 mg | 3,3',5,5',-Tetramethylbenzidin |
| | DONS | 80 mg | Diocetylnatriumsulfosuccinat |
| | | | mit Ethanol (96 %) ad 10 mL |
| Färbelösung II – pH 5.0 0.15 mol/L Citratphosphatpuffer | Citronensäure | 0.94 g | |
| | Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O | 1.82 g | |
| | | | mit bidest. H ₂ O ad 100 mL |
| direkt vor der Färbung | Färbelösung I | 10 mL zu | |
| | Färbelösung II | 30 mL hinzugeben, schwenken | |
| | + Wasserstoffperoxid | 20 µL | |

7.10 Immunoblot-Inhibition

Die Immunoblot-Inhibition erfolgt nach VIETHS et al. (1995)

Durchführung

- ✎ Immunoblot gemäß 7.8.1 durchführen
- ✎ NC-Membran in Streifen schneiden und gemäß 7.9 blockieren

Parallel ansetzen:

- ✎ Probenextrakt auf Proteingehalt von 300-400 mg/L einstellen = Inhibitorlösung
- ✎ pro Streifen 100 µl Poolserum mit je 200 µl Inhibitorlösung vermischen und mit 1.2 mL Inkubationspuffer verdünnen
- ✎ 1 h bei RT vorinkubieren, dann auf die Streifen geben
- ✎ unspezifische Inhibition: 100 µl Poolserum mit 200 µl einer Ovalbuminlösung (1 mg/mL in Inkubationspuffer) + 1.2 mL Inkubationspuffer als Inhibitorlösung einsetzen
- ✎ einen Streifen ohne Inhibitor mit 100 µl Poolserum (+ 1.4 mL Inkubationspuffer) inkubieren
- ✎ einen Streifen mit 100 µl Kontrollserum inkubieren
- ✎ Inkubation mit jeweiliger Inhibitionslösung über Nacht
- ✎ Immunfärbung gemäß Kapitel 7.9 durchführen

7.11 Profilin-Blot

Die Durchführung des Profilin-Blot erfolgt in Anlehnung der Methoden von VIETHS et al. (1994a) und FÄH (1995).

Durchführung

- ✎ Immunoblot gemäß 7.8.1 durchführen
- ✎ NC-Membran in Streifen schneiden und gemäß 7.9 blockieren
- ✎ Inkubation der Streifen über Nacht mit Anti-Birnenprofilin-Antikörpern
- ✎ Immunfärbung gemäß Kapitel 7.9 durchführen

Anti-Birnenprofilin-Antikörper 1:10000 in Inkubationspuffer verdünnen

7.12 Unspezifische Proteinfärbungen

7.12.1 COOMASSIE-Brillant-Blau-Färbung

Die unspezifische COOMASSIE-Brillant-Blau-Färbung der zur Elektroelution eingesetzten Gele erfolgt nach WARD et al. (1990).

Durchführung

- ✎ Gel in Kunststoffwanne mit Fixier/Färbelösung versetzen
- ✎ Färbung beenden, wenn Gel deutlich gefärbt ist (ca. 30 min – 2 h), dann Lösung abgießen
- ✎ Gel mit Entfärbelösung behandeln bis der Hintergrund entfärbt und nur noch die Banden gefärbt sind
die Zugabe von Cellulosepapier beschleunigt die Entfärbung
- ✎ Gel zur Elektroelution einsetzen

eingesetzte Lösungen

| | | | |
|---------------------------|-----------------|--------------|--|
| Fixier/Färbelösung | | | |
| 50 % Methanol | Coomassie R-250 | 0.5 g | |
| 12 % Eisessig | im Methanol | 250 mL lösen | |
| 0.1 % Coomassie R-250 | Eisessig | 60 mL | |
| | | | mit bidest. H ₂ O ad 500 mL |
| Entfärbelösung | | | |
| | Methanol | 90 mL | |
| | Essigsäure | 40 mL | mit bidest. H ₂ O ad 500 mL |

7.12.2 Silberfärbung

Die unspezifische Proteindetektion in den NuPAGE™-Gelen erfolgt mittels Silberfärbung nach HEUKESHOVEN & DERNICK (1986).

Durchführung

- ✎ Gel in eine Kunststoffwanne überführen und mit Fixierlösung mindestens 30 min inkubieren
- ✎ Lösung abgießen und Gel mit Inkubationslösung mindestens 30 min inkubieren
- ✎ Lösung abgießen und Gel 3× 5 min mit bidest. Wasser waschen
- ✎ Wasser abgießen und Gel mit Versilberungslösung 20 min inkubieren
- ✎ Lösung abgießen und Gel 1 min mit bidest. Wasser waschen
- ✎ Wasser abgießen und Gel 1 min mit Entwicklungslösung spülen
- ✎ Lösung abgießen und Gel mit Entwicklungslösung inkubieren bis Banden deutlich sichtbar
- ✎ Lösung abgießen und Gel mindestens 10 min mit Stopplösung inkubieren
- ✎ Lösung abgießen und Gel mindestens 30 min mit Präservierlösung versetzen
- ✎ Die Dokumentation erfolgt durch Scannen mit anschließender Bildbearbeitung

eingesetzte Lösungen

| | | | |
|---|---|---------|--|
| Fixierlösung | Ethanol | 75 mL | |
| | Essigsäure | 10 mL | mit bidest. H ₂ O ad 250 mL |
| Inkubationslösung frisch ansetzen | Ethanol | 75 mL | |
| | Natriumacetat | 17.0 g | |
| | Glutardialdehyd (25 %) | 1.25 mL | |
| | Na ₂ S ₂ O ₃ | 0.5 g | mit bidest. H ₂ O ad 250 mL |
| Versilberungslösung frisch ansetzen | Silbernitrat | 0.5 g | |
| | Formaldehyd (37 %) | 50 µL | mit bidest. H ₂ O ad 250 mL |
| Entwicklungslösung – pH 11.8 | Na ₂ CO ₃ | 7.5 g | |
| | Formaldehyd (37 %) | 25 µL | mit bidest. H ₂ O ad 250 mL |
| Stopplösung | ETDA | 4.65 g | mit bidest. H ₂ O ad 250 mL |
| Präservierlösung | Glycerin (87 %) | 25 g | mit bidest. H ₂ O ad 250 mL |

7.12.3 Kolloidale Goldfärbung auf Blotmembranen (NC, PVDF)

Die unspezifische Proteindetektion der Membranen erfolgt mittels kollidaler Goldfärbung modifiziert nach DANSCHER & NOORGARD (1983).

Durchführung

- ✎ Membran 3× 20 min mit 50 mL TTBS-Lösung waschen
- ✎ dann 3× 20 min mit je 50 mL bidest. Wasser waschen
- ✎ Membran mit 20 mL "Colloidal Gold Total Protein Stain" (Fertiglösung von Bio Rad®) färben bis Banden auftreten (20 min bis 2 h)
- ✎ gefärbte Membran sofort einscannen – Färbung ist unter Lichteinfluß nicht stabil

eingesetzte Lösungen

| TTBS-Lösung – pH 7.5 | | Tween-Tris-Buffered-Saline |
|----------------------|--|--|
| 20 mmol/L Tris | Tris | 1.21 g |
| 0.3 % Tween 20 | NaCl | 14.61 g |
| 500 mmol/L NaCl | mit 400 mL bidest. H ₂ O versetzen und mit 4 mol/L HCl auf pH 7.5 bringen | |
| | Tween 20 | 1.5 mL |
| | | mit bidest. H ₂ O ad 500 mL |

7.12.4 COOMASSIE-Brillant-Blau-Färbung für PVDF-Membran

Die unspezifische COOMASSIE-Brillant-Blau-Färbung der zur Sequenzierung eingesetzten Membranen erfolgt nach WARD et al. (1990).

Durchführung

- ✎ Membran in Kunststoffwanne mit Fixier/Färbelösung versetzen
- ✎ Färbung beenden, wenn Membran deutlich gefärbt ist (ca. 10 min), dann Lösung abgießen
- ✎ Membran mit 50 %igem Methanol waschen
- ✎ dann mit Methanol/Wasser (30:70, v:v) solange inkubieren bis der Hintergrund entfärbt und nur noch die Banden gefärbt sind (ca. 10 min)
die Zugabe von Cellulosepapier beschleunigt die Entfärbung
- ✎ mit dest. Wasser waschen, 30 min trocknen und zum Sequenzieren nutzen

eingesetzte Lösungen

| Fixier/Färbelösung | | |
|-----------------------|-----------------|--|
| 50 % Methanol | Coomassie R-250 | 0.5 g |
| 12 % Eisessig | im Methanol | 250 mL lösen |
| 0.1 % Coomassie R-250 | Eisessig | 60 mL |
| | | mit bidest. H ₂ O ad 500 mL |

7.13 Proteinisolierung mittels Elektroelution

Die Elektroelution erfolgt nach der Trennung der Proteine mittels SDS-PAGE leicht modifiziert nach SCHÄGGER et al. (1988).

Durchführung

- ✎ SDS-PAGE gemäß 7.6 durchführen und Gel mit Coomassie R-250 (siehe 7.12.1) färben
- ✎ interessante Banden aus dem Gel schneiden und in 2 mm² große Würfel zerkleinern
- ✎ 1 h in SDS-Lösung quellen lassen

BIOTRAP-Kammer

- ✎ Elutionskammer: BT1-Membranen (Ausschluß 5000 Da) außen einsetzen
- ✎ Fallenkammer: BT2-Membran nach innen einsetzen

Elution

- ✎ Gelwürfel in die Elutionskammer überführen
- ✎ Elutionskammer und Elektrodenräume mit Elektrodenpuffer füllen
- ✎ Separator quer stellen und bei einer Spannung von 50 V über Nacht laufen lassen
- ✎ vor Entnahme der Elutionslösung 15-20 sec umpolen

Entfärbung mittels Ultrazentrifugation

- ✎ 3x 20 min mit je 500 µL MeOH/Essigsäure 24 %ig (1:1 – v:v) bei 2000 g und 15 °C zentrifugieren
- ✎ 3x 20 min mit je 1 mL bidest. Wasser bei 2000 g und 15 °C zentrifugieren

eingesetzte Lösungen

| | | | |
|---|----------------------------------|--------|---------------------------------------|
| Elektrodenpuffer - pH 7.0 - 8.5 | NH ₄ HCO ₃ | 9.53 g | |
| 100 mmol/L NH ₄ HCO ₃ | SDS | 5.0 g | |
| 0.1 % SDS | pH mit HCl einstellen | | mit dest. H ₂ O ad 5000 mL |
| | | | |
| 0.5 % SDS-Lösung | SDS | 0.5 g | mit dest. H ₂ O ad 100 mL |

7.14 Sequenzieren

Durchführung

- ✎ Membran auf Glasplatte legen
- ✎ mit Skalpell Banden ausschneiden (Membran mit Handschuhen anfassen)
- ✎ in Eppendorftube geben und zum Sequenzieren geben
- ✎ Mindestmenge an Protein: 50 pmol

Auswertung → Datenbankrecherche im Internet – z.B Swissprot

7.15 Charakterisierung der verwendeten Patientenseren

Tab. 7-V: Zusammenstellung der für die Untersuchungen eingesetzten Patientenseren

| Nr. | Patient | Jhg. Geschlecht | Allergen | Klinische Symptome | EAST-Klasse / Spez. IgE [U/mL] | Allergenbanden im Immunoblot [kDa] |
|-----|---------|-----------------|-----------------|------------------------|--------------------------------|--|
| 1 | NB | 78 - ♀ | Litchi Mango | KA SL, AT | 2 / 1.13 2 / 2.38 | 20/30/55/≥67/94 25/35/40/43/50/≥67 |
| 2 | RD | 65 - ♂ | Litchi Mango | KM, RH SL | 3 / 3.93 2 / 1.25 | 14/20/35/55/≥67 14/16/30/50/≥67 |
| 3 | RF | 46 - ♀ | Litchi Mango | KM, SL SL | 2 / 1.84 2 / 0.72 | 20/35/55/≥67 30/40/43/≥67 |
| 4 | CF | 60 - ♀ | Litchi Mango | KA - | 2 / 0.93 - | 20/24/40/55/≥67 - |
| 5 | KDH | 54 - ♂ | Litchi Mango | RH, D, E RH, D, E | 4 / > 17.5 4 / > 17.5 | 20/30/40/42/55/≥67/94 30/40/43/50/≥67 |
| 6 | UH | 47 - ♀ | Litchi Mango | SR, AN SL | 2 / 1.04 2 / 0.77 | 20/40/55/≥67 25/30/40/43/≥67 |
| 7 | RK | 85 - ♂ | Litchi Mango | BS, Ü BS | 3 / 5.72 2 / 1.56 | 14/24/40/55/≥67/94 14/16/30/35/40/43/≥67 |
| 8 | SK | 50 - ♀ | Litchi Mango | SR, AN AS, SL | 3 / 10.1 3 / 12.3 | 14/20/40/42/55/≥67/94 25/30/40/43/50/≥67 |
| 9 | KL | 42 - ♂ | Litchi Mango | KA R, AT | 2 / 0.71 2 / 1.11 | 20/24/40/42/55/≥67/94 (25/30/35/40/43/≥67) |
| 10 | CL | 65 - ♀ | Litchi Mango | D, SL, KM - | 2 / 0.69 - | 24/40/55/≥67/94 - |
| 11 | EP | 69 - ♀ | Litchi Mango | AN, R, AT KA | 2 / 1.26 2 / 1.10 | 24/35/40/42/≥67/94 25/30/40/43/50/≥67 |
| 12 | FR | 53 - ♂ | Litchi Mango | KM, SL SR, KM, SL | 3 / 17.3 4 / > 17.5 | 14/24/30/40/42/55/≥67/94 14/16/30/40/43/50/≥67 |
| 13 | HR | 64 - ♂ | Litchi Mango | KM, SL - | 2 / 1.34 - | 14/24/30/35/40/55/≥67 - |
| 14 | LS | 72 - ♂ | Litchi Mango | KA SL, KM | 3 / 4.27 2 / 1.56 | 14/24/30/40/55/≥67 14/16/30/40/≥67 |
| 15 | FS | 67 - ♂ | Litchi Mango | SL,SR, KM SL,SR, KM | 3 / 4.27 2 / 1.56 | 20/40/55/≥67/94 30/35/40/50/≥67 |
| 16 | DS | 65 - ♀ | Litchi Mango | SR, KM SL | 4 / > 17.5 3 / 4.31 | 14/20/40/55/≥67/94 14/16/30/40/43/50/≥67 |
| 17 | SW | 65 - ♂ | Litchi Mango | KA SL, KM | 2 / 3.30 2 / 1.28 | 14/40/42/55/≥67/94 14/16/30/40/43/≥67 |
| 18 | UW | 41 - ♀ | Litchi Mango | KM KM, AT | 3 / 9.50 3 / 9.73 | 24/30/35/40/55/≥67/94 14/16/30/50/≥67 |
| 19 | JW | 44 - ♂ | Litchi Mango | KM, SL KA | 3 / 3.89 2 / 1.03 | detektiert alle Banden, nicht:20 detektiert alle Banden |
| 20 | Nu | 74 - ♂ | Litchi Mango | KA KA | 2 / 1.42 2 / 1.36 | 14/40/42/55/≥67/94 25/50/≥67 |

Tab. 7-VI: Zusätzliche für die Charakterisierung der Litchiallergene eingesetzte Patientenseren

| Nr. | Bezeichnung | Patient; Geschlecht | EAST-Klasse / Spez. IgE [U/mL] | Allergenbanden im Immunoblot [kDa] |
|-----|-------------|------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|
| 21 | 989/-- | PK, 66 - ♂ | 2 / 1.03 | 20/40/55/≥67 |
| 22 | 705/99 | AS; ♂ | 3 / 4.60 | 20/24/30/40/55/≥67 |
| 23 | 685/99 | IM; ♀ | 4 / > 17.5 | 14/30/40/55/≥67 |
| 24 | 563/99 | HW; ♂ | 3 / 3.89 | 14/24/30/55/≥67/94 |
| 25 | 538/99 | MM; ♂ | 3 / 8.16 | 14/20/24/35/94 |
| 26 | 964/99 | JB; ♂ | 3 / 7.11 | 20/24/40/55/94 |
| 27 | 997/99 | SR; ♂ | 3 / 3.42 | 14/24/30/40/55/≥67 |
| 28 | 1019/99 | CE; ♀ | 2 / 1.00 | 40/55/≥67/94 |
| 29 | 1132/99 | UR; ♀ | 2 / 1.31 | 14/24/30/40/55/≥67 |
| 30 | 1195/99 | JA; ♀ | 2 / 2.54 | 20/24/30/40/≥67 |
| 31 | 53/00 | IH; ♀ | 4 / 17.02 | 14/20/24/35/≥67/94 |
| 32 | T6 | Nu; ♂ | 3 / 3.75 | 24/30/42/55/≥67/94 |
| 33 | T7 | Nu; ♂ | 2 / 2.44 | 14/24/30/35/55/≥67/94 |
| 34 | T8 | Nu; ♀ | 2 / 0.88 | 14/24/30/55/≥67/94 |
| 35 | - | MF; ♂ | 2 / 0.98 | 14/20/40/55/≥67 |
| 36 | - | NS; ♀ | 2 / 2.98 | 24/30/35/40/55/≥67 |
| 37 | T1 | Nu; ♀ | 2 / 0.78 | 14/30/55 |
| 38 | - | GB; ♀ | 2 / 1.56 | 14/20/24/30/40/55/≥67/94 |

Erläuterungen zu den Tabellen XV und XVI:

KA: keine Angaben AN: Atemnot AT: Augentränen SL: Schwellen d. Lippen
 Nu: Name unbekannt E: Ekzeme RH: Rhinitis SR: Schwellen d. Rachenraumes
 D: Dermatitis BS: Bauchschmerzen KM: Kratzen im Mund

Tab. 7-VII A und B: Zusammenstellung der Poolseren

Tab. 7-VIIA: Poolseren für die Mango/Litchiuntersuchungen

| Poolserum | Patienten |
|-----------|---|
| Mango | RD, KDH, UH, RK, SK, FR, LS, FS, DS, SW, UW – (NB, RF, EP, JW, Nu) |
| Litchi | RD, RF, CF, KDH, UH, RK, SK, KL, CL, FR, LS, FS, DS, SW, UW – (NB, PK, EP, HR, JW, Nu) |

(*) die in Klammern aufgeführten Patienten standen nicht für den kompletten Untersuchungszeitraum zur Verfügung

Tab. 7-VIIB: Poolserum für die Untersuchungen zur Kreuzreaktivität der Litchi

| Poolserum unter Verwendung der Patienten | EAST-Klassen (Spez. IgE [U/mL]) | | | | | | | |
|--|---------------------------------|-------------|------------|--------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| | Mango | Litchi | Haselnuß | Apfel | Karotte | Kartoffel | Sellerie | Beifuß |
| RD, KDH, UH, SK, FR, LS, DS, SW, UW | 3 (4.2) | 3 (12.5) | 2 (3.2) | 4 (>17.5) | 3 (14.1) | 3 (13.0) | 3 (14.5) | 3 (6.9) |

Für die Detektion der Ei-Allergene wurde das Serum „LA“ eines stark sensibilisierten Probanden verwendet: EAST-Klasse 4; spez. IgE > 17.5 U/mL .

7.16 Untersuchungsmaterial

In den folgenden Kapiteln sind alle untersuchten Früchte und Fruchtprodukte aufgeführt. Die angegebenen Proteingehalte beziehen sich auf die zur SDS-PAGE eingesetzten Proteinextrakte und sind entsprechend dem Ergebnisteil sortiert.

7.16.1 Mango

Tab. 7-VIII: Gesamtübersicht bei den Untersuchungen verwendeten Mangosorten

| | Choke Anan | Kaew | NDM | NKW | Eden | TA-a | TA-b | Kent | Keitt |
|---|------------|------|-----|-----|------|------|------|------|-------|
| Charakterisierung der Allergene ⇒ 4.1.1 | | | | | | X | | | |
| Sortenvergleich ⇒ 4.1.2 | X | X | X | X | X | X | | X | X |
| Fractionen & Fruchtstreife ⇒ 4.1.3 | | X | | | | | X | X | |
| IEF ⇒ 4.1.4 | | X | | | | | | | |
| Profilin-Nachweis ⇒ 4.1.5 | | X | | | | | | | |
| Erhitzungsversuche ⇒ 4.1.6 | | | | | | X | | | |
| Püree/Nektare ⇒ 4.1.6 | | | | | | | X | | |
| Trockenprodukte ⇒ 4.1.6 | | | | | | | | | X |
| Verdauung ⇒ 4.1.7 | | | | | | X | | | |

Tab. 7-IX: Sortenvergleich; verwendete Mangos

| Mangosorte | Herkunft | Bezugsquelle | Proteingehalt [µg/mL] |
|-----------------------|------------|----------------------------------|-----------------------|
| Choke Anan | Thailand | Chiang Mai University , Thailand | 303 |
| Kaew | Thailand | Chiang Mai University , Thailand | 346 |
| Nam Dok Mai NDM | Thailand | Chiang Mai University , Thailand | 278 |
| Nang Klang Wan NKW | Thailand | Chiang Mai University , Thailand | 357 |
| Eden | Israel | Großmarkt, Hamburg | 349 |
| Tommy Atkins (a) TA-a | Brasilien | Grindelshop, Hamburg | 378 |
| Tommy Atkins (b) TA-b | Costa Rica | Großmarkt, Stuttgart | 435 |
| Kent | Brasilien | Großmarkt, Stuttgart | 361 |
| Keitt | Mexiko | Großmarkt, Stuttgart | 381 |

Tab. 7-X: Fraktionen & Fruchtreife; verwendete Mangoextrakte

| | Fruchtfleisch | Schale | F1 | F2 | F3 | F4 |
|--|---------------|--------|-----|-----|-----|-----|
| Proteingehalt [$\mu\text{g}/\text{mL}$] Sorte :Kaew | - | - | 392 | 398 | 344 | 373 |
| Proteingehalt [$\mu\text{g}/\text{mL}$] Sorte :TA-b | - | - | 346 | 360 | 314 | 451 |
| Proteingehalt [$\mu\text{g}/\text{mL}$] Sorte :Kent | 361 | 299 | 420 | 495 | 396 | 362 |

Tab. 7-XI: IEF & Profilinnachweis; verwendete Mangoextrakte

| Proteingehalt [$\mu\text{g}/\text{mL}$] Sorte :Kaew | Fruchtfleisch | Schale |
|--|---------------|--------|
| IEF-Untersuchung | 14 | 39 |
| Profilin-Nachweis | 304 | 331 |

Tab. 7-XII: Erhitzungsversuche; verwendete Mangos

| | Produktionsparameter | Zubereitung | Proteingehalt [$\mu\text{g}/\text{mL}$] |
|-----------------|--|------------------------|---|
| native TA-a | direkt nach dem Schälen aufgearbeitet | - | 190 |
| „TA“ 90' bei RT | geschält und gewürfelt 90' bei RT gelagert | - | 111 |
| TS | 20' – 45' – 60' – 90' bei 105 °C im Umluft-trockenschrank erhitzt | auf Blech ausgebreitet | 160 – 111 – 173 – 149 |
| SchnKT | 0' – 10' – 20' – 30' im Schnellkochtopf erhitzt | im Siebeinsatz | 154 – 180 – 135 – 113 |
| Mirko | 50'' – 1'50'' – 3' – 5' in der Mirkowelle bei 100 % Leistung (900 W) | + 4 Teelöffel Wasser | 175 – 140 – 148 – 147 |
| Autoklav | 10' – 20' – 30' – 40' im abgedeckten Glasbehälter bei 121°C und 1 bar autoklaviert | | 324 - 293 – 257 – 316 |

Es wurden die frischen, geschälten Mangos gewürfelt und den in der Tabelle beschriebenen Hitzebehandlungen unterzogen.

Tab. 7-XIII: Püreevarianten; verwendete Mangoextrakte

| Mangopüree | Produktionsparameter | | | Bezeichnung | Proteingehalt [$\mu\text{g}/\text{mL}$] |
|------------|-----------------------|------------------|-----------------------|-------------------------------------|---|
| | Inkubationstemp. [°C] | Enzymkonz. [ppm] | Inkubationszeit [min] | | |
| Var 1np | 45 | 100 | 30 | nicht-pasteurisiert/enzymiert | 327 |
| Var 2 np | 45 | 0 | 30 | nicht-pasteurisiert/nicht enzymiert | 311 |
| Var 3np | 45 | 50 | 30 | nicht-pasteurisiert/enzymiert | 290 |
| Var 4np | 37.5 | 0 | 90 | nicht-pasteurisiert/nicht enzymiert | 207 |
| Var 5np | | | | passiert + unbehandelt | 325 |
| Var 1 | | | | wie oben + pasteurisiert | 275 |
| Var 2 | | | | wie oben + pasteurisiert | 291 |
| Var 3 | | | | wie oben + pasteurisiert | 293 |
| Var 4 | | | | wie oben + pasteurisiert | 227 |

Tab. 7-XIV: Nektare; verwendete Mangoextrakte

| Mangonektar | Produktionsparameter | Proteingehalt [$\mu\text{g}/\text{mL}$] |
|-------------|-----------------------------|--|
| Nek 1 | ausgemischt aus Püree Var 1 | 316 |
| Nek 2 | ausgemischt aus Püree Var 2 | Fruchtanteil: 35 % (12 °Brix) pasteurisiert |
| Nek 3 | ausgemischt aus Püree Var 3 | |
| Nek 4 | ausgemischt aus Püree Var 4 | 287 |

Tab. 7-XV: Trockenprodukte; verwendete Mangoextrakte

| Mangoprodukt | Vorbehandlung | Produktionsparameter | Proteingehalt [$\mu\text{g}/\text{mL}$] |
|-----------------------|--------------------------------------|--------------------------------|---|
| Kontrolle | - | 8 mm Scheiben / 5 h bei 70 °C | 142 |
| NT (Niedertemperatur) | - | 8 mm Scheiben / 14 h bei 45 °C | 201 |
| geschwefelt | 10 min in 5 %iger Na-Bisulfit-Lösung | 8 mm Scheiben / 5 h bei 70 °C | 142 |
| Mangoleder | püriert, 2 min blanchiert | 9 h bei 65 °C | 210 |

Tab. 7-XVI: Handelsprodukte; verwendete Mangoextrakte

| Bezeichnung | Produkt | Hersteller | Zutaten | Bezugsquelle | Proteingehalt [$\mu\text{g}/\text{mL}$] |
|-------------|---------------------------|--------------------------------|---|--------------------------------|---|
| Gina | Fruchtsaftgetränk | Cenmaco, Inc. Philippines | Wasser, Mangofruchtmark (35 %), Zucker, Citronensäure | Vinh-Loi Klosterwall 2a, HH | 222 |
| Dietz | Nektar | Erwin Dietz Fruchtsaftkellerei | Wasser, Mangomark (35 %), Zucker, Vitamin C | Reformhaus Engelhardt, HH | 128 |
| Jefi | Fruchtsaftgetränk | Jeenhuat foodstuffs Ind. | Wasser, Mangosaft (35 %), Rohrzucker (10 %), Citronen-, Ascorbinsäure | Vinh-Loi Klosterwall 2a, HH | 158 |
| Vollfrucht | Püree | Donath-Kellerei, Erding | Mangopüree | Reformhaus Engelhardt, Hamburg | 265 |
| FSG 25 | Fruchtsaftgetränk | Uni Hohenheim | Wasser, Mangopüree (25 %) | UH, Institut 150 | 203 |
| FSG 10 | Fruchtsaftgetränk | Uni Hohenheim | Wasser, Mangopüree (10 %) | UH, Institut 150 | 142 |
| Püree | Püreekonzentrat | Firma Wesergold | Mangopüree | UH, Institut 150 | 282 |
| Scheiben 1 | getrocknete Mangoscheiben | Cock Brand, Thailand | Mango, Zucker | Asia Shop Rosenstr.2, HH | 29 |
| Scheiben 2 | getrocknete Mangoscheiben | Spinnrad | Mango, Zucker | Spinnrad Grindelallee, HH | 40 |

Tab. 7-XVII: in-vitro Verdauung; verwendete Mangoextrakte

| Extrakte Magenverdau | Proteingehalt [µg/mL] | Extrakte Darmverdau | Proteingehalt [µg/mL] |
|--|-----------------------|---|-----------------------|
| t: 120 min – ohne Pepsin | 158 | Chymotryp: t: 60 min - $7 \cdot 10^5$ Units/L | 140 |
| t: 60 min – $1.36 \cdot 10^7$ Units/L | 153 | t: 120 min - $7 \cdot 10^5$ Units/L | 125 |
| t: 120 min – $1.36 \cdot 10^7$ Units/L | 127 | Trypsin: t: 60 min - $109 \cdot 10^5$ Units/L | 131 |
| t: 120 min – $2.26 \cdot 10^7$ Units/L | 171 | t: 120 min - $109 \cdot 10^5$ Units/L | 104 |
| | | Chymotryp.+Trypsin: t: 120 min | 156 |
| | | Pancreatin: t. 60 min – 1:50 | 140 |
| | | Carboxy.A: t: 120 min – 29095 Units/L | 119 |
| | | Protease K: t: 120 min – 13400 Units/L | 98 |

Tab. 7-VIII: Eingesetzte Enzyme

| Enzymlösungen | Proteingehalt [µg/mL] |
|-------------------------------------|-----------------------|
| Pepsin (Pe) EC 3.4.23.1 | 23 |
| Chymotrypsin (Ch) EC 3.4.21.1 | 115 |
| Trypsin (T) EC 3.4.21.4 | 137 |
| Pancreatin (Pa) | 105 |
| Carboxypeptidase A (Ca) EC 3.4.17.1 | 108 |
| Protease (Pr) EC 3.4.21.14 | 417 |
| Enzymmischung | 151 |

7.16.2 Litchi

Tab. 7-XIX: Gesamtübersicht bei den Untersuchungen verwendete Litchisorten

| | Bai Dum | Hong Huey | Kuang Chao | Chacapat | Mauritius | Cope | unbekannt |
|---|---------|-----------|------------|----------|-----------|------|-----------|
| Charakterisierung der Allergene ⇒ 4.2.1 | | | | | X | | |
| Sortenvergleich ⇒ 4.2.2 | X | X | X | X | X | X | X |
| Arillus & Pericarp ⇒ 4.2.3 | | | | X | | | |
| IEF ⇒ 4.2.4 | | | | X | X | | |
| Profilin-Nachweis ⇒ 4.2.5 | | | | X | | | |
| Sequenzierung ⇒ 4.2.6 | | | | | | X | |
| Kreuzreaktivität ⇒ 4.2.7 | | | | | X | | |
| Erhizungsversuche ⇒ 4.2.8 | | | | | | | X |
| Konserven/TK ⇒ 4.2.8 | | X | | X | X | | X |
| Schälverfahren ⇒ 4.2.8 | | | | | X | | |
| Verdauung ⇒ 4.1.9 | | | | | | X | |

Tab. 7-XX: Sortenvergleich; verwendete Litchis

| Litchisorte | Herkunft | Bezugsquelle | Proteingehalt [$\mu\text{g}/\text{mL}$] |
|-------------|------------|--|---|
| Bai Dum | Thailand | Chiang Mai University , Thailand | 289 |
| Hong Huey | Thailand | Chiang Mai University , Thailand | 237 |
| Chacapat | Thailand | Chiang Mai University , Thailand | 317 |
| Kuang Chao | Thailand | Chiang Mai University , Thailand | 310 |
| Mauritius | Südafrika | Großmarkt, Stuttgart Grindelshop, Hamburg | 266 353 |
| Cope | Südafrika | Grindelshop, Hamburg | 303 |
| unbekannt | Madagaskar | Großmarkt, Stuttgart | 372 |

Tab. 7-XXI: Arillus & Perikarp, IEF-Untersuchung und Profilinnachweis; verwendete Litchiextrakte

| Proteingehalt [$\mu\text{g}/\text{mL}$] Sorte :Chacapat | Fruchtfleisch | Schale |
|--|---------------|--------|
| Arillus & Perikarp | 223 | 147 |
| IEF-Untersuchung | 76 | 105 |
| Profilin-Nachweis | 272 | 167 |

| Proteingehalt [$\mu\text{g}/\text{mL}$] Sorte :Mauritius | Fruchtfleisch |
|---|---------------|
| Arillus & Perikarp | - |
| IEF-Untersuchung | 125 |
| Profilin-Nachweis | - |

Tab. 7-XXII: Kreuzreaktivität; verwendete Extrakte

| Lebensmittel | Sorte | Proteinextrakt SDS-PAGE [$\mu\text{g}/\text{mL}$] |
|--------------|------------------|---|
| Litchi | Mauritius | 240 |
| Mango | Tommy Atkins | 495 |
| Karotte | Carotan | 317 |
| Kartoffel | Linda | 467 |
| Haselnuß | Barcelona | 3620 |
| Apfel | Golden Delicious | 325 |
| Beifuß | Allergenisolat | 451 |
| Sellerie | unbekannt | 432 |
| Ei | Trockeneiklar | 334 |

Tab. 7-XXIII: Erhitzungsversuch; verwendete Extrakte

| | Produktionsparameter | Proteingehalt [$\mu\text{g}/\text{mL}$] |
|----------|---|---|
| Autoklav | 10' – 20' – 30' – 40' im abgedeckten Glasbehälter bei 121 °C bei 1 bar autoklaviert | 272 – 360 – 341 – 261 |

Es wurden die frischen, geschälten Litchis gewürfelt und im Autoklaven bei 121 °C bei 1 bar erhitzt.

Tab. 7-XXIV: Konservenvarianten; verwendete Litchiextrakte

| Konserve | Produktionsparameter | | | | Proteingehalt [µg/mL] |
|--------------|----------------------|--------------|-----------------|------------------------|--------------------------|
| | Litchisorte | P-Wert [min] | Erhitzungstemp. | Lagerung | |
| K-1 | unbekannt | 1 | 90 °C | - | 93 |
| K-2 | | 2 | 90 °C | - | 112 |
| K-3 | | 4 | 90 °C | - | 107 |
| K-4 | | 6 | 90 °C | - | 114 |
| K-5 | Mauritius | 6 | 90 °C | - | 216 |
| K-6 | | 10 | 90 °C | - | 206 |
| K-7 | | 15 | 90 °C | - | 281 |
| K-8 | | 20 | 90 °C | - | 202 |
| K-9 | | 12 | 120 °C | - | 309 |
| K-1, 9m | unbekannt | wie oben | | 9 Monate, bei 4°C | 177 |
| K-2, 9m | | wie oben | | 9 Monate, bei 4°C | 164 |
| K-3, 9m | | wie oben | | 9 Monate, bei 4°C | 60 |
| K-4, 9m | | wie oben | | 9 Monate, bei 4°C | 114 |
| K-Thail. | Hong Huey | 15 | 100 °C | - | 175 |
| K-Thail. I | | 15 | 100 °C | 2 Monate, bei 25-30 °C | 48 |
| K-Thail. II | | 15 | 100 °C | 4 Monate, bei 25-30 °C | 47 |
| K-Thail. III | | 15 | 100 °C | 6 Monate, bei 25-30 °C | 65 |

Tab. 7-XXV: Tiefkühlware; verwendete Litchiextrakte

| TK-Ware | Produktionsparameter | | | Lagerung bei 20 °C | Proteingehalt [µg/mL] |
|------------|-----------------------------|----------------|-------------|--------------------|-----------------------|
| | Verfahren | Temp | Gefrierzeit | | |
| TK-1 | IQF [Luft/LN ₂] | -25 °C | 12.3 min | - | 111 |
| TK-2 | IQF [Luft/LN ₂] | -40 °C | 5.0 min | - | 124 |
| TK-3 | IQF [Luft/LN ₂] | -25 °C/-40 °C | 12.9 min | - | 155 |
| TK-4 | LN ₂ -Bad | -196 °C | n.b. min | - | 190 |
| TK-1, 12m | wie oben | | | 12 Monate | 272 |
| TK-2, 12m | wie oben | | | 12 Monate | 263 |
| TK-3, 12m | wie oben | | | 12 Monate | 380 |
| TK-4, 12m | wie oben | | | 12 Monate | 82 |
| TK-T-1 | IQF [Luft/LN ₂] | -38 bis -40 °C | 23 min | - | 192 |
| TK-T-1, 2m | IQF [Luft/LN ₂] | -38 bis -40 °C | 23 min | 2 Monate | 175 |
| TK-T-1, 4m | IQF [Luft/LN ₂] | -38 bis -40 °C | 23 min | 4 Monate | 243 |
| TK-T-1, 6m | IQF [Luft/LN ₂] | -38 bis -40 °C | 23 min | 6 Monate | 319 |
| TK-T-2 | IQF [Luft/LN ₂] | -38 bis -40 °C | 28 min | - | 164 |
| TK-T-2, 2m | IQF [Luft/LN ₂] | -38 bis -40 °C | 28 min | 2 Monate | 192 |
| TK-T-2, 4m | IQF [Luft/LN ₂] | -38 bis -40 °C | 28 min | 4 Monate | 300 |
| TK-T-2, 6m | IQF [Luft/LN ₂] | -38 bis -40 °C | 28 min | 6 Monate | 273 |

Tab. 7-XXVI: Handelsprodukte; verwendete Extrakte

| Bezeichnung | Produkt | Hersteller | Zutaten | Bezugsquelle | Proteingehalt [µg/mL] |
|------------------|----------|---------------------------------------|------------------------|-------------------------------|-----------------------|
| GG | Konserve | Golden Gate | Litchi, Wasser, Zucker | Karstadt Mönkebergstr., HH | 110 |
| RG | Konserve | Rio Grande, EUCO GmbH | Litchi, Wasser, Zucker | Edeka Böge Thesdorfer Weg, Pi | 113 |
| Clou gez. | Konserve | in Thailand für Dunekacke & Wilms, HH | Litchi, Wasser, Zucker | Karstadt Mönkebergstr., HH | 88 |
| Clou leicht gez. | Konserve | in China für Dunekacke & Wilms, HH | Litchi, Wasser, Zucker | Karstadt Mönkebergstr., HH | 90 |
| Püree I | Halbware | Firma Klaus | Litchi | UH, Institut 150 | 202 |
| Püree II | Halbware | Firma Klaus | Litchi | UH, Institut 150 | 336 |
| Konzentrat I | Halbware | Firma Klaus | Litchi | UH, Institut 150 | 329 |
| Konzentrat II | Halbware | Firma Klaus | Litchi | UH, Institut 150 | 272 |

Tab. 7-XXVII: In-vitro Verdauung; verwendete Litchiextrakte

| Extrakte Magenverdau | Proteingehalt [µg/mL] | Extrakte Darmverdau | Proteingehalt [µg/mL] |
|--|-----------------------|---|-----------------------|
| t: 120 min – ohne Pepsin | 43 | Chymotryp: t: 60 min – $3.5 \cdot 10^5$ Units/L | 311 |
| t: 30 min – $1.36 \cdot 10^7$ Units/L | 366 | t: 120 min - $7 \cdot 10^5$ Units/L | 303 |
| t: 60 min – $1.36 \cdot 10^7$ Units/L | 322 | Trypsin: t: 60 min - $218 \cdot 10^5$ Units/L | 143 |
| t: 120 min – $1.36 \cdot 10^7$ Units/L | 373 | t: 120 min - $218 \cdot 10^5$ Units/L | 203 |
| | | Chymotryp.+Trypsin: t: 120 min | 96 |
| | | Pancreatin: t. 60 min – 1:25 | 224 |
| | | Carboxy.A: t: 120 min – 29095 Units/L | 115 |
| | | Protease K: t: 120 min – 13400 Units/L | 151 |

Tab. 7-XXVIII: Schälversuche

| Bezeichnung | Sorte | Hersteller | Proteingehalt [µg/mL] |
|----------------------|--------------|---------------|-----------------------|
| manuell geschält | keine Angabe | Uni Hohenheim | 338 |
| enzymatisch geschält | keine Angabe | Uni Hohenheim | 358 |

7.17 Ergebnisse EAST-Inhibitionen

7.17.1 Mango

In den folgenden Tabellen sind alle Meßwerte der im Kapitel 4.1 dokumentierten EAST-Bestimmungen zusammengestellt.

Tab. 7-XXIX: Mango: „Sortenvergleich“

| Inhibitor | Konzentration [µg/mL] | Extinktion [Skt] | Extinktion OA [Skt] | Extinktion B ₀ [Skt] | Extinktion NSB [Skt] | Inhibition [%] | C ₅₀ -Wert [µg/mL] |
|------------------|--------------------------|---------------------|------------------------|------------------------------------|-------------------------|-------------------|----------------------------------|
| Eden homolog | 753.3 | 0.101 | 1.613 | 1.533 | 0.011 | 94 | 3.5 |
| | 75.33 | 0.256 | | | | 84 | |
| | 7.533 | 0.558 | | | | 64 | |
| | 0.7533 | 1.209 | | | | 21 | |
| | 0.0753 | 1.330 | | | | 13 | |
| Kaew | 1031.7 | 0.207 | 1.613 | 1.533 | 0.011 | 89 | 6.7 |
| | 103.17 | 0.343 | | | | 78 | |
| | 10.317 | 0.640 | | | | 59 | |
| | 1.0317 | 1.385 | | | | 10 | |
| | 0.0103 | 1.697 | | | | 1 | |
| Choke Anan | 939.5 | 0.165 | 1.613 | 1.533 | 0.011 | 90 | 5.5 |
| | 93.95 | 0.311 | | | | 80 | |
| | 9.395 | 0.576 | | | | 63 | |
| | 0.9395 | 1.418 | | | | 8 | |
| | 0.0940 | 1.515 | | | | 1 | |
| Namdok Mai | 2773.2 | 0.075 | 1.613 | 1.533 | 0.011 | 96 | 7.4 |
| | 277.32 | 0.270 | | | | 83 | |
| | 27.732 | 0.522 | | | | 66 | |
| | 2.7732 | 0.958 | | | | 38 | |
| | 0.2773 | 1.415 | | | | 8 | |
| Nangklang Wan | 1139.0 | 0.152 | 1.613 | 1.533 | 0.011 | 91 | 5.3 |
| | 113.90 | 0.250 | | | | 84 | |
| | 11.390 | 0.545 | | | | 65 | |
| | 1.1390 | 1.225 | | | | 20 | |
| | 0.1139 | 1.456 | | | | 5 | |
| TA-a | 384.3 | 0.263 | 2.746 | 2.617 | 0.018 | 91 | 8.3 |
| | 38.43 | 0.592 | | | | 78 | |
| | 3.843 | 1.459 | | | | 45 | |
| | 0.3843 | 2.343 | | | | 7 | |
| | 0.0384 | 2.600 | | | | 1 | |

| Inhibitor | Konzentration [µg/mL] | Extinktion [Skt] | Extinktion OA [Skt] | Extinktion B ₀ [Skt] | Extinktion NSB [Skt] | Inhibition [%] | C ₅₀ -Wert [µg/mL] |
|-----------|--------------------------|---------------------|------------------------|------------------------------------|-------------------------|-------------------|----------------------------------|
| Kent | 388.4 | 0.031 | 0.440 | 0.416 | 0.004 | 94 | 2.3 |
| | 38.84 | 0.072 | | | | 85 | |
| | 3.884 | 0.184 | | | | 59 | |
| | 0.388 | 0.356 | | | | 19 | |
| | 0.039 | 0.410 | | | | 7 | |
| Keitt | 214.8 | 0.168 | 1.440 | 1.480 | 0.019 | 90 | 2.0 |
| | 21.48 | 0.354 | | | | 77 | |
| | 2.148 | 0.693 | | | | 54 | |
| | 0.2148 | 1.121 | | | | 25 | |
| | 0.0215 | 1.454 | | | | 1 | |

Tab. 7-XXX: Mango: „Fraktionen&Reifung“

| Inhibitor | Konzentration [µg/mL] | Extinktion [Skt] | Extinktion OA [Skt] | Extinktion B ₀ [Skt] | Extinktion NSB [Skt] | Inhibition [%] | C ₅₀ -Wert [µg/mL] |
|------------------------|--------------------------|---------------------|------------------------|------------------------------------|-------------------------|-------------------|----------------------------------|
| TA-b homolog | 605.0 | 0.016 | 0.830 | 1.033 | 0.007 | 98 | 4.9 |
| | 60.50 | 0.194 | | | | 81 | |
| | 6.050 | 0.476 | | | | 54 | |
| | 0.6050 | 0.892 | | | | 14 | |
| | 0.0605 | 1.014 | | | | 2 | |
| | 0.0061 | 1.000 | | | | 3 | |
| Fruchtfleisch 0.Tag | 478.4 | 0.058 | 0.433 | 0.512 | 0.001 | 91 | 8.9 |
| | 47.840 | 0.148 | | | | 75 | |
| | 4.784 | 0.352 | | | | 41 | |
| | 0.4784 | 0.538 | | | | 9 | |
| | 0.0478 | 0.564 | | | | 4 | |
| | 0.0048 | 0.573 | | | | 3 | |
| Fruchtfleisch 2.Tag | 512.2 | 0.053 | 0.433 | 0.512 | 0.001 | 92 | 4.2 |
| | 51.22 | 0.126 | | | | 79 | |
| | 5.122 | 0.281 | | | | 53 | |
| | 0.5122 | 0.479 | | | | 19 | |
| | 0.0512 | 0.499 | | | | 15 | |
| | 0.0051 | 0.498 | | | | 16 | |
| Fruchtfleisch 6.Tag | 262.2 | 0.067 | 0.433 | 0.512 | 0.001 | 92 | 8.4 |
| | 26.22 | 0.221 | | | | 67 | |
| | 2.622 | 0.338 | | | | 33 | |
| | 0.2622 | 0.626 | | | | 2 | |
| | 0.0262 | 0.639 | | | | 0 | |
| | 0.0026 | 0.594 | | | | 7 | |

| Inhibitor | Konzentration [µg/mL] | Extinktion [Skt] | Extinktion OA [Skt] | Extinktion B ₀ [Skt] | Extinktion NSB [Skt] | Inhibition [%] | C ₅₀ -Wert [µg/mL] |
|------------------------|-----------------------|------------------|---------------------|---------------------------------|----------------------|----------------|-------------------------------|
| Fruchtfleisch 8.Tag | 445.1 | 0.064 | 0.433 | 0.512 | 0.001 | 88 | 8.9 |
| | 44.51 | 0.118 | | | | 77 | |
| | 4.451 | 0.316 | | | | 38 | |
| | 0.4451 | 0.510 | | | | 0 | |
| | 0.0445 | 0.504 | | | | 2 | |
| | 0.0045 | 0.499 | | | | 3 | |
| Schale 2.Tag | 362.2 | 0.050 | 0.433 | 0.512 | 0.001 | 92 | 10.6 |
| | 36.22 | 0.185 | | | | 69 | |
| | 3.622 | 0.396 | | | | 33 | |
| | 0.3622 | 0.485 | | | | 18 | |
| | 0.0362 | 0.538 | | | | 9 | |
| | 0.0036 | 0.513 | | | | 13 | |
| Schale 8.Tag | 141.0 | 0.044 | 0.433 | 0.512 | 0.001 | 92 | 6.1 |
| | 14.1 | 0.174 | | | | 66 | |
| | 1.41 | 0.401 | | | | 22 | |
| | 0.141 | 0.513 | | | | 0 | |
| | 0.0141 | 0.484 | | | | 3 | |
| | 0.0014 | 0.515 | | | | 0 | |

Tab. 7-XXXI: Mango: „Püreevarianten“

| Inhibitor | Konzentration [µg/mL] | Extinktion [Skt] | Extinktion OA [Skt] | Extinktion B ₀ [Skt] | Extinktion NSB [Skt] | Inhibition [%] | C ₅₀ -Wert [µg/mL] |
|-----------------|-----------------------|------------------|---------------------|---------------------------------|----------------------|----------------|-------------------------------|
| TA-b homolog | 605.0 | 0.016 | 0.830 | 1.033 | 0.007 | 98 | 4.9 |
| | 60.50 | 0.194 | | | | 81 | |
| | 6.050 | 0.476 | | | | 54 | |
| | 0.6050 | 0.892 | | | | 14 | |
| | 0.0605 | 1.014 | | | | 2 | |
| | 0.0061 | 1.000 | | | | 3 | |
| Var 1np | 353.6 | 0.063 | 0.830 | 1.033 | 0.007 | 93 | 8.4 |
| | 35.36 | 0.264 | | | | 74 | |
| | 3.536 | 0.664 | | | | 36 | |
| | 0.3536 | 0.972 | | | | 6 | |
| | 0.0354 | 1.011 | | | | 2 | |
| | 0.0035 | 1.013 | | | | 2 | |
| Var 2np | 134.6 | 0.067 | 0.830 | 1.033 | 0.007 | 93 | 4.3 |
| | 13.46 | 0.302 | | | | 71 | |
| | 1.346 | 0.704 | | | | 29 | |
| | 0.1346 | 1.002 | | | | 3 | |
| | 0.0135 | 0.975 | | | | 7 | |
| | 0.0013 | 0.948 | | | | 8 | |

| Inhibitor | Konzentration [µg/mL] | Extinktion [Skt] | Extinktion OA [Skt] | Extinktion B ₀ [Skt] | Extinktion NSB [Skt] | Inhibition [%] | C ₅₀ -Wert [µg/mL] |
|-----------|--------------------------|---------------------|------------------------|------------------------------------|-------------------------|-------------------|----------------------------------|
| Var 3np | 435.0 | 0.084 | 0.830 | 1.033 | 0.007 | 91 | 12.1 |
| | 43.5 | 0.300 | | | | 71 | |
| | 4.35 | 0.684 | | | | 34 | |
| | 0.435 | 0.800 | | | | 22 | |
| | 0.0435 | 0.890 | | | | 14 | |
| | 0.0044 | 0.947 | | | | 8 | |
| Var 4np | 186.0 | 0.073 | 0.830 | 1.033 | 0.007 | 92 | 5.3 |
| | 18.6 | 0.312 | | | | 69 | |
| | 1.86 | 0.679 | | | | 34 | |
| | 0.186 | 0.976 | | | | 6 | |
| | 0.0186 | 0.941 | | | | 9 | |
| | 0.0019 | 0.979 | | | | 5 | |
| Var 5np | 411.6 | 0.064 | 1.072 | 1.048 | 0.015 | 95 | 4.3 |
| | 41.16 | 0.120 | | | | 90 | |
| | 4.116 | 0.570 | | | | 46 | |
| | 0.4116 | 0.771 | | | | 27 | |
| | 0.0412 | 0.940 | | | | 10 | |
| | 0.0041 | 0.889 | | | | 15 | |
| Var1 | 722.8 | 0.062 | 1.072 | 1.048 | 0.015 | 95 | 10.0 |
| | 72.28 | 0.183 | | | | 84 | |
| | 7.228 | 0.589 | | | | 44 | |
| | 0.7228 | 0.929 | | | | 12 | |
| | 0.0723 | 0.952 | | | | 9 | |
| | 0.0072 | 0.977 | | | | 7 | |
| Var2 | 501.9 | 0.077 | 1.072 | 1.048 | 0.015 | 94 | 7.5 |
| | 50.19 | 0.202 | | | | 82 | |
| | 5.019 | 0.600 | | | | 43 | |
| | 0.5019 | 0.874 | | | | 17 | |
| | 0.0502 | 0.952 | | | | 9 | |
| | 0.0050 | 0.842 | | | | 20 | |
| Var3 | 767.1 | 0.070 | 1.072 | 1.048 | 0.015 | 95 | 21.3 |
| | 76.71 | 0.194 | | | | 83 | |
| | 7.671 | 0.800 | | | | 24 | |
| | 0.7671 | 0.953 | | | | 9 | |
| | 0.0767 | 1.005 | | | | 4 | |
| | 0.0077 | 0.952 | | | | 9 | |
| Var4 | 1685.8 | 0.090 | 1.072 | 1.048 | 0.015 | 93 | 19.8 |
| | 168.58 | 0.212 | | | | 81 | |
| | 16.858 | 0.555 | | | | 48 | |
| | 1.6858 | 0.872 | | | | 17 | |
| | 0.1686 | 0.917 | | | | 13 | |
| | 0.0169 | 0.969 | | | | 8 | |

Tab. 7-XXXII: Mango: „Nektarvarianten“

| Inhibitor | Konzentration [µg/mL] | Extinktion [Skt] | Extinktion OA [Skt] | Extinktion B ₀ [Skt] | Extinktion NSB [Skt] | Inhibition [%] | C ₅₀ -Wert [µg/mL] |
|-----------------|--------------------------|---------------------|------------------------|------------------------------------|-------------------------|-------------------|----------------------------------|
| TA-b homolog | 605.0 | 0.016 | 0.830 | 1.033 | 0.007 | 98 | 4.9 |
| | 60.50 | 0.194 | | | | 81 | |
| | 6.050 | 0.476 | | | | 54 | |
| | 0.6050 | 0.892 | | | | 14 | |
| | 0.0605 | 1.014 | | | | 2 | |
| | 0.0061 | 1.000 | | | | 3 | |
| Nek1 | 840.8 | 0.151 | 1.072 | 1.048 | 0.015 | 87 | 14.6 |
| | 84.08 | 0.238 | | | | 78 | |
| | 8.408 | 0.624 | | | | 41 | |
| | 0.8408 | 0.783 | | | | 26 | |
| | 0.0841 | 0.866 | | | | 18 | |
| | 0.0084 | 0.875 | | | | 17 | |
| Nek2 | 980.5 | 0.137 | 1.072 | 1.048 | 0.015 | 88 | 26.8 |
| | 98.05 | 0.317 | | | | 71 | |
| | 9.805 | 0.697 | | | | 34 | |
| | 0.9805 | 0.882 | | | | 16 | |
| | 0.0981 | 0.927 | | | | 12 | |
| | 0.0098 | 0.933 | | | | 11 | |
| Nek3 | 432.7 | 0.116 | 0.830 | 1.033 | 0.007 | 88 | 25.3 |
| | 43.27 | 0.312 | | | | 69 | |
| | 4.327 | 0.754 | | | | 27 | |
| | 0.4327 | 0.907 | | | | 12 | |
| | 0.0433 | 0.926 | | | | 10 | |
| | 0.0043 | 0.821 | | | | 20 | |
| Nek4 | 1242.6 | 0.122 | 0.830 | 1.033 | 0.007 | 88 | 30.3 |
| | 124.26 | 0.289 | | | | 72 | |
| | 12.426 | 0.655 | | | | 36 | |
| | 1.2426 | 0.850 | | | | 18 | |
| | 0.1243 | 0.901 | | | | 13 | |
| | 0.0124 | 0.891 | | | | 14 | |
| Rohpect PTE | 442.5 | 0.562 | 0.555 | 0.640 | 0.014 | 12 | - |
| | 44.25 | 0.614 | | | | 4 | |
| | 4.425 | 0.338 | | | | 8 | |
| | 0.4425 | 0.572 | | | | 11 | |
| | 0.0443 | 0.597 | | | | 7 | |
| | 0.0044 | 0.610 | | | | 5 | |
| Rohament PL | 263.5 | 0.402 | 0.555 | 0.640 | 0.014 | 38 | - |
| | 26.35 | 0.339 | | | | 16 | |
| | 2.635 | 0.628 | | | | 1 | |
| | 0.2635 | 0.620 | | | | 2 | |
| | 0.0264 | 0.619 | | | | 2 | |
| | 0.0026 | 0.628 | | | | 1 | |

Tab. 7-XXXIII: Mango: „Handelsprodukte“

| Inhibitor | Konzentration [µg/mL] | Extinktion [Skt] | Extinktion OA [Skt] | Extinktion B ₀ [Skt] | Extinktion NSB [Skt] | Inhibition [%] | C ₅₀ -Wert [µg/mL] |
|-----------------|--------------------------|---------------------|------------------------|------------------------------------|-------------------------|-------------------|----------------------------------|
| TA-a homolog | 485.4 | 0.247 | 2.746 | 2.617 | 0.018 | 91 | 8.3 |
| | 48.54 | 0.559 | | | | 79 | |
| | 4.854 | 1.549 | | | | 41 | |
| | 0.4854 | 2.428 | | | | 7 | |
| | 0.0485 | 2.555 | | | | 2 | |
| | 0.0048 | 2.602 | | | | 1 | |
| „Dietz“ | 91.5 | 0.094 | 0.953 | 1.045 | 0.011 | 92 | 6.0 |
| | 9.15 | 0.458 | | | | 57 | |
| | 0.915 | 0.838 | | | | 20 | |
| | 0.0915 | 0.920 | | | | 12 | |
| | 0.0092 | 0.912 | | | | 13 | |
| | 0.0009 | 1.025 | | | | 2 | |
| „Jefi“ | 205.4 | 0.048 | 0.555 | 0.640 | 0.014 | 95 | 7.8 |
| | 20.54 | 0.208 | | | | 69 | |
| | 2.054 | 0.492 | | | | 24 | |
| | 0.2054 | 0.607 | | | | 5 | |
| | 0.0205 | 0.639 | | | | 0 | |
| | 0.0021 | 0.643 | | | | 0 | |
| „Gina“ | 395.9 | 0.293 | 3.279 | 3.377 | 0.024 | 92 | 4.9 |
| | 39.59 | 0.600 | | | | 83 | |
| | 3.959 | 1.818 | | | | 46 | |
| | 0.3959 | 2.333 | | | | 31 | |
| | 0.0396 | 2.813 | | | | 17 | |
| | 0.0040 | 2.870 | | | | 15 | |
| FSG25 | 231.8 | 0.374 | 3.279 | 3.377 | 0.024 | 87 | 12.8 |
| | 23.18 | 1.044 | | | | 60 | |
| | 2.318 | 2.277 | | | | 21 | |
| | 0.2318 | 2.622 | | | | 4 | |
| | 0.0232 | 2.691 | | | | 1 | |
| FSG10 | 85.8 | 0.535 | 3.279 | 3.377 | 0.024 | 82 | 14.2 |
| | 8.58 | 1.649 | | | | 41 | |
| | 0.858 | 1.766 | | | | 28 | |
| | 0.0858 | 2.695 | | | | 1 | |
| | 0.0086 | 2.615 | | | | 0 | |
| Püree | 268.3 | 0.561 | 2.888 | 2.719 | 0.025 | 80 | 20.0 |
| | 26.83 | 1.223 | | | | 56 | |
| | 2.683 | 2.484 | | | | 9 | |
| | 0.2683 | 2.688 | | | | 1 | |
| | 0.0268 | 2.671 | | | | 2 | |

| Inhibitor | Konzentration [µg/mL] | Extinktion [Skt] | Extinktion OA [Skt] | Extinktion B ₀ [Skt] | Extinktion NSB [Skt] | Inhibition [%] | C ₅₀ -Wert [µg/mL] |
|------------|-----------------------|------------------|---------------------|---------------------------------|----------------------|----------------|-------------------------------|
| Vollfrucht | 236.6 | 0.688 | 3.279 | 3.377 | 0.024 | 80 | 12.7 |
| | 23.66 | 1.483 | | | | 56 | |
| | 2.366 | 2.290 | | | | 32 | |
| | 0.2366 | 2.665 | | | | 21 | |
| | 0.0237 | 2.750 | | | | 18 | |
| | 0.0024 | 2.779 | | | | 18 | |
| Scheiben1 | 82.7 | 0.513 | 3.279 | 3.377 | 0.024 | 85 | 1.1 |
| | 8.27 | 1.698 | | | | 50 | |
| | 0.827 | 2.710 | | | | 20 | |
| | 0.0827 | 2.730 | | | | 19 | |
| | 0.0083 | 2.716 | | | | 20 | |
| Scheiben2 | 85.7 | 0.339 | 3.279 | 3.377 | 0.024 | 91 | 2.9 |
| | 8.57 | 1.179 | | | | 66 | |
| | 0.857 | 2.008 | | | | 37 | |
| | 0.0857 | 2.715 | | | | 20 | |
| | 0.0086 | 2.697 | | | | 20 | |
| | 0.0009 | 2.833 | | | | 16 | |

7.17.2 Litchi

In den folgenden Tabellen sind alle Meßwerte der im Kapitel 4.2 dokumentierten EAST-Bestimmungen zusammengestellt.

Tab. 7-XXXIV: Litchi: „Sortenvergleich“

| Inhibitor | Konzentration [µg/mL] | Extinktion [Skt] | Extinktion OA [Skt] | Extinktion B ₀ [Skt] | Extinktion NSB [Skt] | Inhibition [%] | C ₅₀ -Wert [µg/mL] |
|------------------|-----------------------|------------------|---------------------|---------------------------------|----------------------|----------------|-------------------------------|
| Mauritus homolog | 444.8 | 0.092 | 0.847 | 0.806 | 0.065 | 96 | 5.2 |
| | 44.48 | 0.199 | | | | 82 | |
| | 4.448 | 0.453 | | | | 48 | |
| | 0.448 | 0.678 | | | | 17 | |
| | 0.0448 | 0.716 | | | | 12 | |
| | 0.0045 | 0.846 | | | | 0 | |
| Bai Dum | 404.0 | 0.118 | 0.847 | 0.806 | 0.065 | 93 | 6.8 |
| | 40.40 | 0.252 | | | | 75 | |
| | 4.040 | 0.489 | | | | 43 | |
| | 0.4040 | 0.666 | | | | 19 | |
| | 0.0404 | 0.775 | | | | 4 | |
| | 0.0040 | 0.807 | | | | 0 | |

| Inhibitor | Konzentration [µg/mL] | Extinktion [Skt] | Extinktion OA [Skt] | Extinktion B ₀ [Skt] | Extinktion NSB [Skt] | Inhibition [%] | C ₅₀ -Wert [µg/mL] |
|------------|-----------------------|------------------|---------------------|---------------------------------|----------------------|----------------|-------------------------------|
| Hong Huey | 467.6 | 0.109 | 0.847 | 0.806 | 0.065 | 94 | 6.4 |
| | 46.76 | 0.254 | | | | 75 | |
| | 4.676 | 0.465 | | | | 46 | |
| | 0.4676 | 0.726 | | | | 11 | |
| | 0.0468 | 0.794 | | | | 2 | |
| | 0.0047 | 0.788 | | | | 2 | |
| Kuang Chao | 366.7 | 0.130 | 0.847 | 0.806 | 0.065 | 91 | 7.9 |
| | 36.67 | 0.300 | | | | 68 | |
| | 3.667 | 0.504 | | | | 41 | |
| | 0.3667 | 0.736 | | | | 10 | |
| | 0.0367 | 0.823 | | | | 0 | |
| | 0.0037 | 0.865 | | | | 0 | |
| Chacapat | 390.0 | 0.156 | 0.847 | 0.806 | 0.065 | 88 | 3.9 |
| | 39.00 | 0.227 | | | | 78 | |
| | 3.900 | 0.434 | | | | 50 | |
| | 0.3900 | 0.658 | | | | 20 | |
| | 0.0390 | 0.788 | | | | 2 | |
| | 0.0039 | 0.807 | | | | 0 | |
| unbekannt | 342.4 | 0.085 | 0.847 | 0.806 | 0.065 | 97 | 3.4 |
| | 34.24 | 0.160 | | | | 87 | |
| | 3.424 | 0.436 | | | | 50 | |
| | 0.3424 | 0.661 | | | | 20 | |
| | 0.0342 | 0.742 | | | | 9 | |
| | 0.0034 | 0.776 | | | | 4 | |
| Cope | 374.1 | 0.123 | 0.847 | 0.806 | 0.0065 | 92 | 8.4 |
| | 37.41 | 0.296 | | | | 69 | |
| | 3.741 | 0.511 | | | | 40 | |
| | 0.3741 | 0.720 | | | | 12 | |
| | 0.0374 | 0.777 | | | | 4 | |
| | 0.0037 | 0.844 | | | | 0 | |

Tab. 7-XXXV: Litchi: „Arillus& Perikarp“

| Inhibitor | Konzentration [µg/mL] | Extinktion [Skt] | Extinktion OA [Skt] | Extinktion B ₀ [Skt] | Extinktion NSB [Skt] | Inhibition [%] | C ₅₀ -Wert [µg/mL] |
|------------------|-----------------------|------------------|---------------------|---------------------------------|----------------------|----------------|-------------------------------|
| Chacapat homolog | 399.8 | 0.141 | 1.003 | 0.975 | 0.000 | 86 | 2.6 |
| | 39.98 | 0.365 | | | | 63 | |
| | 3.998 | 0.789 | | | | 30 | |
| | 0.3998 | 0.825 | | | | 15 | |
| | 0.0400 | 0.890 | | | | 9 | |
| | 0.0040 | 0.944 | | | | 3 | |

| Inhibitor | Konzentration [µg/mL] | Extinktion [Skt] | Extinktion OA [Skt] | Extinktion B ₀ [Skt] | Extinktion NSB [Skt] | Inhibition [%] | C ₅₀ -Wert [µg/mL] |
|------------------------|-----------------------|------------------|---------------------|---------------------------------|----------------------|----------------|-------------------------------|
| Chacapat Fruchtfleisch | 392.7 | 0.139 | 1.003 | 0.975 | 0.000 | 96 | 13.9 |
| | 39.27 | 0.351 | | | | 64 | |
| | 3.927 | 0.654 | | | | 33 | |
| | 0.3927 | 0.820 | | | | 16 | |
| | 0.0393 | 0.948 | | | | 3 | |
| | 0.0039 | 1.068 | | | | 0 | |
| Chacapat Schale | 221.2 | 0.053 | 1.003 | 0.975 | 0.000 | 95 | 16.4 |
| | 22.12 | 0.277 | | | | 72 | |
| | 2.212 | 0.504 | | | | 48 | |
| | 0.2212 | 0.698 | | | | 28 | |
| | 0.0221 | 0.821 | | | | 16 | |
| | 0.0022 | 0.906 | | | | 7 | |

Tab. 7-XXXVI: Litchi: „Kreuzreaktivität; Litchi festphasengekoppelt“

| Inhibitor | Konzentration [µg/mL] | Extinktion [Skt] | Extinktion OA [Skt] | Extinktion B ₀ [Skt] | Extinktion NSB [Skt] | Inhibition [%] | C ₅₀ -Wert [µg/mL] |
|-------------------|-----------------------|------------------|---------------------|---------------------------------|----------------------|----------------|-------------------------------|
| Mauritius homolog | 240.3 | 0.069 | 1.184 | 1.296 | 0.014 | 96 | 6.8 |
| | 24.03 | 0.320 | | | | 76 | |
| | 2.403 | 0.928 | | | | 29 | |
| | 0.2403 | 1.236 | | | | 5 | |
| | 0.0240 | 1.268 | | | | 2 | |
| | 0.0024 | 1.296 | | | | 0 | |
| Mango | 1013.7 | 0.163 | 1.184 | 1.296 | 0.014 | 88 | 40.0 |
| | 101.37 | 0.536 | | | | 59 | |
| | 10.137 | 0.830 | | | | 36 | |
| | 1.0137 | 1.166 | | | | 10 | |
| | 0.1014 | 1.255 | | | | 3 | |
| | 0.0101 | 1.168 | | | | 10 | |
| Karotte | 316.8 | 0.269 | 1.184 | 1.296 | 0.014 | 80 | 11.1 |
| | 31.68 | 0.501 | | | | 62 | |
| | 3.168 | 0.838 | | | | 36 | |
| | 0.3168 | 1.296 | | | | 0 | |
| | 0.0317 | 1.294 | | | | 0 | |
| | 0.0032 | 1.300 | | | | 0 | |
| Kartoffel | 466.5 | 0.254 | 1.184 | 1.296 | 0.014 | 81 | 23.4 |
| | 46.65 | 0.493 | | | | 63 | |
| | 4.665 | 1.035 | | | | 20 | |
| | 0.4665 | 1.232 | | | | 5 | |
| | 0.0467 | 1.290 | | | | 0 | |
| | 0.0047 | 1.278 | | | | 1 | |

| Inhibitor | Konzentration [µg/mL] | Extinktion [Skt] | Extinktion OA [Skt] | Extinktion B ₀ [Skt] | Extinktion NSB [Skt] | Inhibition [%] | C ₅₀ -Wert [µg/mL] |
|-----------|-----------------------|------------------|---------------------|---------------------------------|----------------------|----------------|-------------------------------|
| Apfel | 324.8 | 0.210 | 1.184 | 1.296 | 0.014 | 85 | 8.5 |
| | 32.48 | 0.517 | | | | 61 | |
| | 3.248 | 0.755 | | | | 42 | |
| | 0.3248 | 1.181 | | | | 9 | |
| | 0.0325 | 1.254 | | | | 3 | |
| | 0.0036 | 1.297 | | | | 0 | |
| Beifuß | 451.0 | 0.248 | 1.221 | 1.272 | 0.005 | 81 | 27.6 |
| | 45.10 | 0.536 | | | | 58 | |
| | 4.51 | 1.017 | | | | 20 | |
| | 0.451 | 1.252 | | | | 2 | |
| | 0.0451 | 1.239 | | | | 3 | |
| | 0.0451 | 1.255 | | | | 1 | |
| Sellerie | 432.2 | 0.224 | 1.184 | 1.296 | 0.014 | 84 | 29.3 |
| | 43.22 | 0.592 | | | | 55 | |
| | 4.322 | 0.963 | | | | 26 | |
| | 0.432 | 1.281 | | | | 1 | |
| | 0.0432 | 1.298 | | | | 0 | |
| | 0.0043 | 1.301 | | | | 0 | |
| Haselnuß | 7235.5 | 0.188 | 1.184 | 1.296 | 0.014 | 86 | 205 |
| | 723.55 | 0.436 | | | | 67 | |
| | 72.355 | 0.967 | | | | 26 | |
| | 7.2355 | 1.128 | | | | 13 | |
| | 0.7236 | 1.228 | | | | 5 | |
| | 0.0724 | 1.097 | | | | 16 | |
| Ei | 333.9 | 1.1754 | 1.544 | 1.458 | 0.010 | 0 | - |
| | 33.39 | 1.588 | | | | 0 | |
| | 3.339 | 1.470 | | | | 0 | |
| | 0.3339 | 1.354 | | | | 7 | |
| | 0.0334 | 1.243 | | | | 15 | |
| | 0.0033 | 1.294 | | | | 11 | |

Tab. 7-XXXVII: Litchi: „Kreuzreaktivität, Litchi als Inhibitor“

| Inhibitor | Konzentration [µg/mL] | Extinktion [Skt] | Extinktion OA [Skt] | Extinktion B ₀ [Skt] | Extinktion NSB [Skt] | Inhibition [%] | C ₅₀ -Wert [µg/mL] |
|---------------------|--------------------------|---------------------|------------------------|------------------------------------|-------------------------|-------------------|----------------------------------|
| Haselnuß homolog | 5289.0 | 0.018 | 0.490 | 0.416 | 0.010 | 98 | 15.1 |
| | 528.9 | 0.020 | | | | 90 | |
| | 52.89 | 0.051 | | | | 76 | |
| | 5.289 | 0.301 | | | | 28 | |
| | 0.5289 | 0.323 | | | | 23 | |
| | 0.0529 | 0.357 | | | | 15 | |
| Litchi 1 | 240.3 | 0.101 | 0.490 | 0.416 | 0.010 | 78 | 5.9 |
| | 24.03 | 0.113 | | | | 75 | |
| | 2.403 | 0.179 | | | | 34 | |
| | 0.2403 | 0.264 | | | | 37 | |
| | 0.0240 | 0.332 | | | | 21 | |
| Mango homolog | 1013.7 | 0.035 | 0.758 | 0.767 | 0.011 | 97 | 10.1 |
| | 101.37 | 0.125 | | | | 85 | |
| | 10.137 | 0.386 | | | | 50 | |
| | 1.0137 | 0.683 | | | | 11 | |
| | 0.1014 | 0.753 | | | | 2 | |
| | 0.0101 | 0.732 | | | | 5 | |
| Litchi 2 | 240.3 | 0.036 | 0.758 | 0.767 | 0.011 | 97 | 1.04 |
| | 24.03 | 0.101 | | | | 88 | |
| | 2.403 | 0.308 | | | | 61 | |
| | 0.2403 | 0.532 | | | | 31 | |
| | 0.0240 | 0.695 | | | | 10 | |
| | 0.0024 | 0.736 | | | | 4 | |
| Apfel homolog | 324.8 | 0.275 | 2.382 | 2.290 | 0.010 | 88 | 9.5 |
| | 32.48 | 0.802 | | | | 65 | |
| | 3.248 | 1.453 | | | | 37 | |
| | 0.3248 | 1.868 | | | | 19 | |
| | 0.0325 | 2.157 | | | | 6 | |
| | 0.0036 | 2.165 | | | | 5 | |
| Litchi 3 | 240.3 | 1.715 | 2.382 | 2.290 | 0.010 | 25 | - |
| | 24.03 | 1.719 | | | | 25 | |
| | 2.403 | 1.831 | | | | 20 | |
| | 0.2403 | 2.162 | | | | 6 | |
| | 0.0240 | 2.206 | | | | 4 | |
| | 0.0024 | 2.446 | | | | 0 | |

| Inhibitor | Konzentration [µg/mL] | Extinktion [Skt] | Extinktion OA [Skt] | Extinktion B ₀ [Skt] | Extinktion NSB [Skt] | Inhibition [%] | C ₅₀ -Wert [µg/mL] |
|---------------------|--------------------------|---------------------|------------------------|------------------------------------|-------------------------|-------------------|----------------------------------|
| Beifuß homolog | 451.0 | 0.107 | 0.918 | 1.090 | 0.011 | 91 | 2.2 |
| | 45.10 | 0.182 | | | | 84 | |
| | 4.51 | 0.409 | | | | 59 | |
| | 0.451 | 0.733 | | | | 31 | |
| | 0.0451 | 0.804 | | | | 20 | |
| | 0.0451 | 1.013 | | | | 8 | |
| Litchi 4 | 2817.2 | 0.490 | 0.978 | 0.935 | 0.012 | 48 | - |
| | 281.72 | 0.479 | | | | 49 | |
| | 2.8172 | 0.522 | | | | 45 | |
| | 0.2817 | 0.727 | | | | 23 | |
| | 0.0282 | 0.948 | | | | 0 | |
| | 0.0028 | 0.939 | | | | 0 | |
| Karotte homolog | 316.8 | 0.202 | 1.474 | 1.486 | 0.011 | 87 | 9.1 |
| | 31.68 | 0.495 | | | | 67 | |
| | 3.168 | 0.961 | | | | 36 | |
| | 0.3168 | 1.290 | | | | 13 | |
| | 0.0317 | 1.258 | | | | 15 | |
| | 0.0032 | 1.300 | | | | 13 | |
| Litchi 5 | 240.3 | 0.610 | 1.474 | 1.486 | 0.011 | 59 | 11.4 |
| | 24.03 | 0.658 | | | | 56 | |
| | 2.403 | 0.938 | | | | 37 | |
| | 0.2403 | 1.273 | | | | 14 | |
| | 0.0240 | 1.375 | | | | 7 | |
| | 0.0024 | 1.462 | | | | 2 | |
| Sellerie homolog | 432.2 | 0.155 | 1.135 | 1.199 | 0.010 | 88 | 18.7 |
| | 43.22 | 0.455 | | | | 63 | |
| | 4.322 | 0.867 | | | | 28 | |
| | 0.432 | 1.034 | | | | 14 | |
| | 0.0432 | 1.156 | | | | 4 | |
| | 0.0043 | 1.169 | | | | 2 | |
| Litchi 6 | 240.3 | 0.400 | 1.135 | 1.199 | 0.010 | 67 | 23.1 |
| | 24.03 | 0.599 | | | | 50 | |
| | 2.403 | 0.930 | | | | 23 | |
| | 0.2403 | 1.174 | | | | 2 | |
| | 0.0240 | 1.161 | | | | 3 | |
| | 0.0024 | 1.221 | | | | 0 | |

| Inhibitor | Konzentration [µg/mL] | Extinktion [Skt] | Extinktion OA [Skt] | Extinktion B ₀ [Skt] | Extinktion NSB [Skt] | Inhibition [%] | C ₅₀ -Wert [µg/mL] |
|-------------------|-----------------------|------------------|---------------------|---------------------------------|----------------------|----------------|-------------------------------|
| Kartoffel homolog | 466.5 | 0.226 | 1.597 | 1.442 | 0.010 | 85 | 41.1 |
| | 46.65 | 0.695 | | | | 52 | |
| | 4.665 | 1.271 | | | | 12 | |
| | 0.4665 | 1.360 | | | | 6 | |
| | 0.0467 | 1.455 | | | | 0 | |
| | 0.0047 | 1.475 | | | | 0 | |
| Litchi 7 | 240.3 | 0.288 | 1.597 | 1.442 | 0.010 | 81 | 21.5 |
| | 24.03 | 0.697 | | | | 52 | |
| | 2.403 | 1.298 | | | | 10 | |
| | 0.2403 | 1.327 | | | | 8 | |
| | 0.0240 | 1.444 | | | | 0 | |
| | 0.0024 | 1.509 | | | | 0 | |
| Ei homolog | 333.9 | 0.068 | 1.736 | 1.873 | 0.010 | 97 | 0.2 |
| | 33.39 | 0.129 | | | | 94 | |
| | 3.339 | 0.338 | | | | 82 | |
| | 0.3339 | 0.547 | | | | 65 | |
| | 0.0334 | 1.539 | | | | 18 | |
| | 0.0033 | 1.996 | | | | 0 | |
| Litchi | 2817.2 | 1.565 | 1.736 | 1.873 | 0.010 | 17 | - |
| | 281.72 | 1.705 | | | | 9 | |
| | 2.8172 | 1.801 | | | | 1 | |
| | 0.2817 | 1.799 | | | | 1 | |
| | 0.0282 | 1.768 | | | | 6 | |
| | 0.0028 | 1.905 | | | | 0 | |

Tab. 7-XXXVIII: Litchi: „Erhitzung im Autoklaven“

| Inhibitor | Konzentration [µg/mL] | Extinktion [Skt] | Extinktion OA [Skt] | Extinktion B ₀ [Skt] | Extinktion NSB [Skt] | Inhibition [%] | C ₅₀ -Wert [µg/mL] |
|-------------------|-----------------------|------------------|---------------------|---------------------------------|----------------------|----------------|-------------------------------|
| Mauritius homolog | 920.2 | 0.089 | 0.949 | 1.001 | 0.037 | 95 | 18.6 |
| | 92.02 | 0.281 | | | | 75 | |
| | 9.202 | 0.624 | | | | 39 | |
| | 0.9202 | 0.821 | | | | 19 | |
| | 0.0920 | 0.989 | | | | 1 | |
| | 0.0092 | 1.024 | | | | 0 | |
| 5' | 163.4 | 0.123 | 0.949 | 1.001 | 0.037 | 91 | 9.2 |
| | 16.34 | 0.431 | | | | 59 | |
| | 1.634 | 0.782 | | | | 23 | |
| | 0.1634 | 0.929 | | | | 7 | |
| | 0.0163 | 0.983 | | | | 2 | |
| | 0.0016 | 1.012 | | | | 0 | |

| Inhibitor | Konzentration [µg/mL] | Extinktion [Skt] | Extinktion OA [Skt] | Extinktion B ₀ [Skt] | Extinktion NSB [Skt] | Inhibition [%] | C ₅₀ -Wert [µg/mL] |
|-----------|-----------------------|------------------|---------------------|---------------------------------|----------------------|----------------|-------------------------------|
| 10' | 221.7 | 0.123 | 0.949 | 1.001 | 0.037 | 91 | 10.9 |
| | 22.17 | 0.399 | | | | 63 | |
| | 2.217 | 0.791 | | | | 22 | |
| | 0.2217 | 0.911 | | | | 9 | |
| | 0.0222 | 0.935 | | | | 7 | |
| | 0.0022 | 0.958 | | | | 5 | |
| 20' | 184.1 | 0.125 | 0.949 | 1.001 | 0.037 | 91 | 10.6 |
| | 18.41 | 0.386 | | | | 61 | |
| | 1.841 | 0.830 | | | | 16 | |
| | 0.1841 | 0.963 | | | | 6 | |
| | 0.0184 | 1.005 | | | | 0 | |
| | 0.0018 | 0.981 | | | | 0 | |
| 30' | 144.8 | 0.104 | 0.949 | 1.001 | 0.037 | 93 | 7.5 |
| | 14.48 | 0.391 | | | | 63 | |
| | 1.448 | 0.836 | | | | 17 | |
| | 0.1448 | 0.953 | | | | 5 | |
| | 0.0145 | 1.011 | | | | 0 | |
| | 0.0015 | 1.038 | | | | 0 | |

Tab. 7-XXXIX: Litchi: „Konserven K-1 bis K-4 & Lagerung“

| Inhibitor | Konzentration [µg/mL] | Extinktion [Skt] | Extinktion OA [Skt] | Extinktion B ₀ [Skt] | Extinktion NSB [Skt] | Inhibition [%] | C ₅₀ -Wert [µg/mL] |
|-------------------|-----------------------|------------------|---------------------|---------------------------------|----------------------|----------------|-------------------------------|
| Mauritius homolog | 546.2 | 0.061 | 0.553 | 0.561 | 0.010 | 91 | 13.9 |
| | 54.62 | 0.148 | | | | 75 | |
| | 5.462 | 0.379 | | | | 33 | |
| | 0.5462 | 0.504 | | | | 10 | |
| | 0.0546 | 0.545 | | | | 3 | |
| | 0.0055 | 0.541 | | | | 4 | |
| K-1 | 53.0 | 0.047 | 0.553 | 0.561 | 0.010 | 93 | 2.3 |
| | 5.30 | 0.212 | | | | 63 | |
| | 0.53 | 0.417 | | | | 26 | |
| | 0.053 | 0.524 | | | | 7 | |
| | 0.0053 | 0.573 | | | | 0 | |
| | 0.0005 | 0.582 | | | | 0 | |
| K-2 | 102.7 | 0.058 | 0.621 | 0.611 | 0.022 | 94 | 5.9 |
| | 10.27 | 0.249 | | | | 62 | |
| | 1.027 | 0.529 | | | | 14 | |
| | 0.1027 | 0.598 | | | | 2 | |
| | 0.0103 | 0.588 | | | | 4 | |
| | 0.0010 | 0.600 | | | | 2 | |

| Inhibitor | Konzentration [µg/mL] | Extinktion [Skt] | Extinktion OA [Skt] | Extinktion B ₀ [Skt] | Extinktion NSB [Skt] | Inhibition [%] | C ₅₀ -Wert [µg/mL] |
|-----------|--------------------------|---------------------|------------------------|------------------------------------|-------------------------|-------------------|----------------------------------|
| K-3 | 92.8 | 0.069 | 0.621 | 0.611 | 0.022 | 92 | 3.2 |
| | 9.28 | 0.224 | | | | 66 | |
| | 0.928 | 0.423 | | | | 32 | |
| | 0.0928 | 0.557 | | | | 9 | |
| | 0.0093 | 0.603 | | | | 0 | |
| | 0.0009 | 0.610 | | | | 0 | |
| K-4 | 196.2 | 0.113 | 0.621 | 0.611 | 0.022 | 85 | 13.3 |
| | 19.62 | 0.287 | | | | 55 | |
| | 1.962 | 0.461 | | | | 25 | |
| | 0.1962 | 0.491 | | | | 20 | |
| | 0.0196 | 0.543 | | | | 12 | |
| | 0.0020 | 0.534 | | | | 13 | |
| K-1, 9m | 373.2 | 0.123 | 0.987 | 0.984 | 0.000 | 87 | 28.8 |
| | 37.32 | 0.447 | | | | 55 | |
| | 3.732 | 0.846 | | | | 14 | |
| | 0.3732 | 0.929 | | | | 6 | |
| | 0.0373 | 0.967 | | | | 2 | |
| | 0.0037 | 0.981 | | | | 0 | |
| K-2, 9m | 161.0 | 0.075 | 0.987 | 0.984 | 0.000 | 92 | 6.7 |
| | 16.10 | 0.345 | | | | 65 | |
| | 1.610 | 0.731 | | | | 26 | |
| | 0.1610 | 0.884 | | | | 10 | |
| | 0.0161 | 1.040 | | | | 0 | |
| | 0.0016 | 1.058 | | | | 0 | |
| K-3, 9m | 93.5 | 0.052 | 0.987 | 0.984 | 0.000 | 95 | 2.5 |
| | 9.35 | 0.257 | | | | 74 | |
| | 0.935 | 0.664 | | | | 33 | |
| | 0.0935 | 0.846 | | | | 14 | |
| | 0.0094 | 0.916 | | | | 7 | |
| | 0.0009 | 0.953 | | | | 3 | |
| K-4, 9m | 118.7 | 0.090 | 0.987 | 0.984 | 0.000 | 91 | 5.0 |
| | 11.87 | 0.393 | | | | 60 | |
| | 1.187 | 0.659 | | | | 33 | |
| | 0.1187 | 0.841 | | | | 14 | |
| | 0.0119 | 0.878 | | | | 11 | |
| | 0.0012 | 0.927 | | | | 6 | |

Tab. 7-XL: Litchi: „Konserven K-5 bis K-9“

| Inhibitor | Konzentration [µg/mL] | Extinktion [Skt] | Extinktion OA [Skt] | Extinktion B ₀ [Skt] | Extinktion NSB [Skt] | Inhibition [%] | C ₅₀ -Wert [µg/mL] |
|----------------------|--------------------------|---------------------|------------------------|------------------------------------|-------------------------|-------------------|----------------------------------|
| Mauritius homolog | 546.2 | 0.061 | 0.553 | 0.561 | 0.010 | 91 | 13.9 |
| | 54.62 | 0.148 | | | | 75 | |
| | 5.462 | 0.379 | | | | 33 | |
| | 0.5462 | 0.504 | | | | 10 | |
| | 0.0546 | 0.545 | | | | 3 | |
| | 0.0055 | 0.541 | | | | 4 | |
| K-5 | 178.8 | 0.067 | 0.553 | 0.561 | 0.010 | 89 | 9.1 |
| | 17.88 | 0.205 | | | | 63 | |
| | 1.788 | 0.405 | | | | 20 | |
| | 0.1788 | 0.509 | | | | 9 | |
| | 0.0179 | 0.555 | | | | 0 | |
| | 0.0018 | 0.612 | | | | 0 | |
| K-6 | 213.7 | 0.121 | 0.553 | 0.561 | 0.010 | 80 | 39.8 |
| | 21.37 | 0.347 | | | | 39 | |
| | 2.137 | 0.476 | | | | 15 | |
| | 0.2137 | 0.490 | | | | 13 | |
| | 0.0214 | 0.516 | | | | 8 | |
| | 0.0021 | 0.523 | | | | 7 | |
| K-7 | 252.2 | 0.131 | 0.553 | 0.561 | 0.010 | 78 | 45.0 |
| | 25.22 | 0.338 | | | | 41 | |
| | 2.522 | 0.489 | | | | 13 | |
| | 0.2522 | 0.564 | | | | 0 | |
| | 0.0252 | 0.531 | | | | 5 | |
| | 0.0025 | 0.538 | | | | 4 | |
| K-8 | 222.2 | 0.139 | 0.553 | 0.561 | 0.010 | 77 | 39.2 |
| | 22.22 | 0.334 | | | | 41 | |
| | 2.222 | 0.524 | | | | 7 | |
| | 0.2222 | 0.563 | | | | 0 | |
| | 0.0222 | 0.557 | | | | 1 | |
| | 0.0022 | 0.553 | | | | 1 | |
| K-9 | 430.3 | 0.139 | 0.553 | 0.561 | 0.010 | 77 | 75.5 |
| | 43.03 | 0.334 | | | | 41 | |
| | 4.303 | 0.524 | | | | 7 | |
| | 0.4303 | 0.563 | | | | 0 | |
| | 0.0430 | 0.557 | | | | 1 | |
| | 0.0043 | 0.553 | | | | 1 | |

Tab. 7-XLI: Litchi: „Schälung“

| Inhibitor | Konzentration [µg/mL] | Extinktion [Skt] | Extinktion OA [Skt] | Extinktion B ₀ [Skt] | Extinktion NSB [Skt] | Inhibition [%] | C ₅₀ -Wert [µg/mL] |
|-----------------|-----------------------|------------------|---------------------|---------------------------------|----------------------|----------------|-------------------------------|
| manuell homolog | 312.0 | 0.154 | 0.795 | 0.703 | 0.099 | 91 | 5.1 |
| | 31.2 | 0.222 | | | | 80 | |
| | 3.12 | 0.449 | | | | 42 | |
| | 0.312 | 0.630 | | | | 12 | |
| | 0.0312 | 0.649 | | | | 9 | |
| | 0.0031 | 0.662 | | | | 7 | |
| enzymatisch | 315 | 0.127 | 0.795 | 0.703 | 0.099 | 95 | 2.5 |
| | 31.5 | 0.234 | | | | 78 | |
| | 3.15 | 0.377 | | | | 54 | |
| | 0.315 | 0.651 | | | | 14 | |
| | 0.0315 | 0.703 | | | | 0 | |

Tab. 7-XLII: Litchi: „Magenverdau“

| Inhibitor | Konzentration [µg/mL] | Extinktion [Skt] | Extinktion OA [Skt] | Extinktion B ₀ [Skt] | Extinktion NSB [Skt] | Inhibition [%] | C ₅₀ -Wert [µg/mL] |
|---|-----------------------|------------------|---------------------|---------------------------------|----------------------|----------------|-------------------------------|
| Cope homolog | 365.7 | 0.070 | 0.851 | 0.887 | 0.006 | 93 | 3.9 |
| | 36.57 | 0.156 | | | | 83 | |
| | 3.657 | 0.453 | | | | 49 | |
| | 0.3657 | 0.696 | | | | 22 | |
| | 0.0366 | 0.821 | | | | 7 | |
| | 0.0037 | 0.878 | | | | 1 | |
| Pepsin 1.36·10 ⁷ Units/L 120 min | 161.7 | 0.075 | 0.851 | 0.887 | 0.006 | 92 | 29.6 |
| | 16.17 | 0.577 | | | | 35 | |
| | 1.617 | 0.842 | | | | 5 | |
| | 0.1617 | 0.898 | | | | 0 | |
| | 0.0162 | 0.957 | | | | 0 | |
| | 0.0016 | 0.956 | | | | 0 | |
| Pepsin 1.36·10 ⁷ Units/L 210 min | 135.8 | 0.261 | 0.851 | 0.887 | 0.006 | 71 | 45.2 |
| | 13.58 | 0.672 | | | | 27 | |
| | 1.358 | 0.927 | | | | 0 | |
| | 0.1358 | 0.948 | | | | 0 | |
| | 0.0136 | 0.957 | | | | 0 | |
| | 0.0014 | 0.901 | | | | 0 | |
| Pepsin | 100.3 | 0.874 | 0.851 | 0.887 | 0.015 | 1 | - |
| | 10.03 | 0.758 | | | | 15 | |
| | 1.003 | 0.790 | | | | 11 | |
| | 0.100 | 0.770 | | | | 13 | |
| | 0.010 | 0.763 | | | | 14 | |

Tab. 7-XLIII: Litchi: „Darmverdau“

| Inhibitor | Konzentration [µg/mL] | Extinktion [Skt] | Extinktion OA [Skt] | Extinktion B ₀ [Skt] | Extinktion NSB [Skt] | Inhibition [%] | C ₅₀ -Wert [µg/mL] |
|---|--------------------------|---------------------|------------------------|------------------------------------|-------------------------|-------------------|----------------------------------|
| Cope homolog | 361.0 | 0.054 | 0.761 | 0.774 | 0.007 | 94 | 3.1 |
| | 36.10 | 0.137 | | | | 83 | |
| | 3.610 | 0.373 | | | | 52 | |
| | 0.3610 | 0.590 | | | | 24 | |
| | 0.0361 | 0.729 | | | | 6 | |
| | 0.0036 | 0.804 | | | | 0 | |
| Chymotrypsin 3.5·10 ⁵ Units/L 60 min | 167.0 | 0.123 | 0.761 | 0.774 | 0.007 | 85 | 34.4 |
| | 16.70 | 0.5770.514 | | | | 34 | |
| | 1.67 | 0.8420.773 | | | | 5 | |
| | 0.167 | 0.8980.807 | | | | 0 | |
| | 0.0167 | 0.9570.799 | | | | 0 | |
| | 0.0017 | 0.9560.818 | | | | 0 | |
| Trypsin 1.09·10 ⁷ Units/L 60 min | 278.0 | 0.164 | 0.761 | 0.774 | 0.007 | 80 | 32.1 |
| | 27.80 | 0.403 | | | | 48 | |
| | 2.78 | 0.619 | | | | 20 | |
| | 0.278 | 0.688 | | | | 11 | |
| | 0.0278 | 0.805 | | | | 0 | |
| | 0.0028 | 0.800 | | | | 0 | |
| Chymo + Trypsin 60 min | 129.0 | 0.250 | 0.761 | 0.774 | 0.007 | 68 | 32.1 |
| | 12.90 | 0.510 | | | | 34 | |
| | 1.290 | 0.624 | | | | 20 | |
| | 0.129 | 0.642 | | | | 17 | |
| | 0.0129 | 0.677 | | | | 13 | |
| | 0.0013 | 0.670 | | | | 14 | |
| Pancreatin 1:50 60 min | 109.9 | 0.349 | 0.851 | 0.887 | 0.006 | 61 | 45.9 |
| | 10.99 | 0.584 | | | | 32 | |
| | 1.099 | 0.954 | | | | 1 | |
| | 0.1099 | 0.953 | | | | 1 | |
| | 0.0110 | 0.849 | | | | 4 | |
| | 0.0011 | 0.874 | | | | 1 | |
| Protease K 26800 Units/L 120 min | 181.0 | 0.272 | 0.818 | 0.887 | 0.015 | 71 | 30.2 |
| | 18.10 | 0.505 | | | | 44 | |
| | 1.810 | 0.662 | | | | 26 | |
| | 0.181 | 0.730 | | | | 18 | |
| | 0.0181 | 0.785 | | | | 12 | |
| | 0.0018 | 0.838 | | | | 6 | |
| Carboxy. A 1.36·10 ⁷ Units/L 210 min | 155.6 | 0.340 | 0.851 | 0.887 | 0.006 | 62 | 90.5 |
| | 15.56 | 0.792 | | | | 11 | |
| | 1.556 | 0.966 | | | | 0 | |
| | 0.1556 | 0.905 | | | | 0 | |
| | 0.0156 | 0.926 | | | | 0 | |
| | 0.0016 | 0.912 | | | | 0 | |

7.18 Chemikalien, Geräte, Verbrauchsmittel, Zubehör

7.18.1 Chemikalien

| | | |
|--|---------------|---|
| Aceton | Merck | F R11, S9-16-23.2-33 |
| 6-Aminohexansäure | Merck | |
| Ammoniumhydrogencarbonat | Merck | Xn R22 |
| Ammoniumperoxodisulfat, p.A. | Merck | Xn R8-22-42/43, S17-26-43.1 |
| Anodenpuffer | Novex | |
| Anti-Human-IgE (Kaninchen) | Dako | |
| Anti-Kaninchen-IgG, biotinyliert (Ziege) | Dako | |
| 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 |
| Carboxypeptidase A, TypII-PMSF aus Rinderpancreas (1058 Units/mL] | Sigma | |
| Chymotrypsin, aus Rinderpancreas (350 Units/mL) | Merck | |
| Citronensäure | Merck | |
| Colloidal Gold Total Protein Stain (Fertiglösung) | Bio Rad | S24-25 |
| Coomassie Brilliant Blue R/G 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 „Spez. IgE ELISA TR (RV)“ | 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 |
| Glutardialdehyd, 25 % | Merck | T R25-36/37/38-42/43, S36-44 |
| Glycerin, 87 % | Fluka | |
| di-Kaliumhydrogenphosphat | Merck | |
| Kathodenpuffer | Novex | |
| Magermilchpulver | Glücksklee | |
| Methanol | Merck | T F R11-23/25, S2-7-16-25 |
| 2-Mercaptoethanol | Serva | T R22-24-36/37/38, S26-36/37-45 |
| MES SDS Running Buffer (Fertiglösung) | Novex | |
| MG-Marker / SDS-PAGE (2.5-16.9 kDa) | Merck | |
| MG-Marker / SDS-PAGE (14-94 kDa) | Pharmacia | |

| | | |
|--|------------|------------------------------|
| pI-Marker / IEF (pI 3 - 10) | Serva | |
| Natriumacetat-Trihydrat | Merck | |
| Natriumazid | Merck | T ⁺ R28-32, S28.1 |
| Natriumcarbonat, wasserfrei | Merck | Xi R36, S22-26 |
| Natriumchlorid | Merck | |
| Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat | Merck | |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Serva | Xn R20/22-36/38, S26-28 |
| Natriumhydrogencarbonat | Merck | |
| Natriumhydrogensulfid | Merck | C R31-34, S2-24/25-26 |
| di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat | Merck | |
| Natriumhydroxid | Merck | C R35, S226-37/39 |
| Natriumthiosulfat-Pentahydrat | Merck | |
| Ovalbumin | Fluka | |
| Pancreatin (Porcine Pancreas) | Sigma | |
| Pepsin aus Schweinemagenschleimhaut (452 Units/mL) | Sigma | |
| o-Phosphorsäure, 85 % | Merck | C R34, S26-36/37/39-45 |
| PBS-Tabletten | Serva | |
| Protease Typ XI aus Tritirarchium album (13.4 Units/mg) | Sigma | |
| Pufferlösung (pH 4.0) | Merck | |
| Pufferlösung (pH 7.0) | Merck | |
| Pyronin Y | Fluka | |
| Salzsäure, 37 % | Merck | C R34-37, S26-36/37/39-45 |
| Silbernitrat | Merck | C R34, S26-45 |
| Streptavidin-HRP-Konjugat | Medac | |
| 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) | Fluka | |
| Titriplex III (EDTA) | Merck | Xn R22 |
| Trichloressigsäure | Merck | C R35, S24/25-26-45 |
| Tris-hydroxymethylaminomethan (Tris) | J.B. Baker | Xi R36/38 |
| Trypsin Typ I aus Rinderpancreas (10900 BAEE Units/mg) | Sigma | |
| Tween 20 | Serva | |
| Wasserstoffperoxid, 30 % | Merck | C R34, S28-36/39 |

7.18.2 Geräte

| | | |
|----------------------------|-----------------------------|---|
| Autoklav | Sano clav MCS-123 | Wolf (Bad Überkingen-Hausen, Deutschland) |
| Blotting-Elektroden | Nova Blot 2117-250 | LKB (Uppsala, Schweden) |
| Elektrophorese-Kammer | EI-9001-Xcell II Mini Cell | Novex (San Diego, CA, USA) |
| Elektroelutionskammer | Biotrap | Schleicher & Schüll (Dassel, Deutschland) |
| ELISA-Reader | Microplate Reader MRX | Dynex Technologies (Frankfurt, Deutschland) |
| Kühlschrank | | Eisfink (Asperg, Deutschland) |
| Kühltruhe (-20 °C) | GTS 3663 | Liebherr (Bischofshofen, Österreich) |
| Kühltruhe (-80 °C) | KLS 3085-1 | Kryotec (Hamburg, Deutschland) |
| Gefriertrocknungsanlage I | Gamma A | Christ (Osterode, Deutschland) |
| Gefriertrocknungsanlage II | Beta 1-16 | Christ (Osterode, Deutschland) |
| Magnetrührer | | Heidolph (Schwabach, Deutschland) |
| Mikrowelle | | Sharp (Hamburg, Deutschland) |
| pH-Elektrode | H 6160 | Schott (Mainz, Deutschland) |
| pH-Meter | CG 801 | Schott (Mainz, Deutschland) |
| Schlauchpumpe | LKB Pump P1 | Amersham Pharmacia (Uppsala, Schweden) |
| Schüttler | Typ 3016 | GFL (Hannover, Deutschland) |
| Säule | Chromatographiesäule C10/10 | Amersham Pharmacia (Uppsala, Schweden) |
| Säulenadapter | Adapter AC 10 | Amersham Pharmacia (Uppsala, Schweden) |
| Stromversorger I | 2297 Macrodrive 5 | LKB (Uppsala, Schweden) |
| Stromversorger II | Power Ease 500 | Novex (San Diego, CA, USA) |
| Thermostat | MGW Lauda RMT 6 | Lauda (Lauda-Königshofen, Deutschland) |
| Trockenschrank | | Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland) |
| Ultra-Turrax | T 25 | Jahnke und Kunkel (Staufen i. Br., Deutschland) |
| UV-Detektor | L-4000 UV-Detektor | Merck-Hitachi (Darmstadt, Deutschland) |
| Vortex | Reax Top | Heidolph (Schwabach, Deutschland) |
| Waage (fein) | 1202 MP | Sartorius (Göttingen, Deutschland) |
| Waage (grob) | 1602 004 | Sartorius (Göttingen, Deutschland) |
| Wasserbad | FS 2 | Haake (Karlsruhe, Deutschland) |
| Zentrifuge I | 3 K 15 | Sigma (Osterode, Deutschland) |
| Zentrifuge II | 3 K 12 | Sigma (Osterode, Deutschland) |

7.18.3 Verbrauchsmittel & Zubehör

| | | |
|----------------------------|-------------------------------------|--|
| Blotmembran | Nitrocellulose, 0.2 μ m PVDF | Schleicher & Schüll (Dassel, Deutschland) Schleicher & Schüll (Dassel, Deutschland) |
| Dauer-Elektrodenbrücken | Haushaltstücher | Vileda (Weinheim, Deutschland) |
| Elektroelutionsmembranen | BT1 / BT2 | Schleicher & Schüll (Dassel, Deutschland) |
| Färbe-Kunststoffschalen | 8 Kammern | Bio Rad (Herkules, CA, USA) |
| Filterpapierscheiben | Rundfilter 6 mm | Schleicher & Schüll (Dassel, Deutschland) |
| Folienglätter | | Pharmacia (Uppsala, Schweden) |
| Kolbenhubpipetten | 0.5 μ L – 5 mL | Eppendorf (Hamburg, Deutschland) |
| Latexhandschuhe | | |
| Membranfilter | Ultrafree-15 (AG: 15 kDa) | Millipore Corporation (Bedford, USA) |
| Pinzette | | |
| Probengefäße | Glas, 4 mL | Eppendorf (Hamburg, Deutschland) |
| Reaktionsgefäße | Safe Lock, 2 mL | Eppendorf (Hamburg, Deutschland) |
| Stepper | | Eppendorf (Hamburg, Deutschland) |
| Pipettenspitzen | | Eppendorf (Hamburg, Deutschland) |
| Membranfilter | | Schleicher & Schuell (Dassel, Deutschland) |
| NuPAGE™ 10 % Bis-Tris Gele | 1 mm; 10, 15 & 2D well | Novex (San Diego, CA, USA) |
| NuPAGE™ 12 % Bis-Tris-Gele | 1 mm; 10 & 12 well | Novex (San Diego, CA, USA) |
| NuPAGE™ IEF 3-7 | 1 mm; 10 well | Novex (San Diego, CA, USA) |
| Parafilm | | American National Can (Neenah, WI, USA) |
| Mikrotiterplatten | Minisorb, 96 Kavitäten | Nunc (Roskilde, Deutschland) |

8 Literaturverzeichnis

- AAS K, BACKMANN A, BELIN L & WEEKE B (1978) Standardization of allergen extracts with appropriate methods. The combined use of skin prick testing and radio-allergosorbent tests. *Allergy* **33** 130-137
- ABU-SARRA AF & ABU-GOUKH AA (1992) Changes in pectinesterase, polygalacturonase and cellulase activity during mango fruit ripening. *Journal of horticultural science* **67** 561-568
- AHLROTH K, ALENIOUS H, TURJANMAA K, MÄKINEN-KILJUNEN S, REUNALA T & PALOSUO T (1995) Crossreacting allergens in natural rubber latex and avocado. *J Allergy Clin Immunol* **96** 167-173 (1995)
- ANDRÉ F, ANDRÉ C, COLIN L, CACARACI F & CAVAGNA S (1994) Role of new allergens and of allergen consumption in the increased incidence of food sensitizations in France. *Toxicology* **93** 77-83
- ASKAR A & TREPTOW H (1992) Trubstabile und hochwertige Nektare aus tropischen Früchten *Confructa-Studien* **36** 130-153
- ASSELIN J, HÉBERT J & AMIOT J (1989) Effects of in vitro proteolysis on the allergenicity of major whey proteins. *J Food Sci* **54** 1037-1039
- ASTWOOD JD, LEACH JN & FUCHS RL (1996) Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nature Biotechnol* **14** 1269-1273
- AULEPP H & VIETHS S (1992) Probleme der Nahrungsmittelallergie. *Dtsch Lebensm Rundsch* **88** 171-179
- BAUER L, EBNER C, HIRSCHWEHR R, WÜTHRICH B, PICHLER C, FRITSCH R, SCHEINER O & KRAFT D (1996) IgE cross-reactivity between birch pollen, mugwort pollen and celery is due to at least three distinct cross-reacting allergens: immunoblot investigation of birch-mugwort-celery-syndrome. *Clin Exp Allergy* **26** 1161-1170
- BESLER M, STEINHART H & PASCHKE A (1997) Allergenicity of the hen's egg white proteins: IgE-binding of native and deglycosylated Ovomucoid *Food Agric Immunol* **9** 277-288
- BESLER M, STEINHART H & PASCHKE A (2001) Stability of food allergens and allergenicity of processed foods. *J Chromatogr B* **756** 207-228
- BINDSLEV-JENSEN C (1998) ABC of allergies - Food allergy. *BMJ* **316** 1299-1302
- BLASER K (1993) Die Rolle der T-Lymphozyten in Allergie und Asthma. *Allergologie* **16** 39-42
- BLEUMINK E, BERRENS L & YOUNG E (1967) Studies on the atopic allergen in ripe tomato fruits. II: Further chemical characterization of the purified allergen. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **31** 25-27
- BOCCAFUOGLI A, VICENTINI L, CAMERANI A, COGLIATI P, D'AMBROSI A & SCOLOZZI F (1994) Adverse food reactions in patients with grass pollen allergic respiratory disease. *Allergy* **73** 301-308
- BRADFORD MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72** 248-254
- BREHLER R, THEISSEN U, MOHR C & LUGER T (1997) "Latex-fruit syndrome": frequency of cross-reacting IgE antibodies. *Allergy* **52** 404-410
- BREITENEDER H, HOFFMANN-SOMMERGRUBER K, O'RIORDAIN G, SUSANI M, AHORN H, EBNER C, KRAFT D & SCHEINER 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

- BRENNA O, POMPEI C, ORTOLANI C, PRAVETTONI V, FARIOLI L & PASTORELLO E (2000) Technological processes to decrease the allergenicity of peach juice and nectar. *J Agric Food Chem* **48** 493-497
- BJØRKSTEN F, HALMEPURO L, HANNUKSELA M & LATHI A (1980) Extraktion and properties of apple allergens. *Allergy* **35** 671-677
- BRUIJNZEL-KOOMEN C, ORTOLANI C, AAS K, BINDSLEV-JENSEN C, BJØRKSTEN B & WÜTHRICH B (1995) Adverse reactions to food: Position paper of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *Allergy* **50** 623-635
- BUISSERET PD (1988) Allergie: Wenn die Immunantwort Fehler macht; in: Spektrum der Wissenschaft: Immunsystem. Spektrum Akademischer Verlag - Heidelberg. 140-150
- BURKS AW, WILLIAMS LW, HELM RM, THRESHER W, BROOKS JR & SAMPSON HA (1991) Identification of soy protein allergens in patients with atopic dermatitis and positive soy challenges; determination of change in allergenicity after heating or enzyme digestion; in: Nutritional and Toxicological Consequences of Food Processing (Friedman M, ed) Plenum Press New York 295-307
- BURKS AW, WILLIAMS LW & THRESHER W (1992) Allergenicity of peanut and soybean extracts altered by chemical or thermal denaturation in patients with atopic dermatitis and positive food challenge. *J Allergy Clin Immunol* **90** 889-897
- BURKS AW & SAMPSON H (1993) Food allergies in children. *Curr Probl Pediatr* **23** 230-252
- BURKS AW, WILLIAMS LW, HELM RM, THRESHER W, BROOKS JR & SAMPSON HA (1999) Identification of soy protein allergens in patients with atopic dermatitis and positive soy challenges; determination of change in allergenicity after heating or enzyme digestion. *Adv Exp Med Biol* **289** 295-305
- CABALLERO T, PASCUAL C, GARCIA-ARA MC, OJEDA JA & MARTIN-ESTEBAN M (1997) IgE cross-reactivity between mugwort pollen (*Artemisia vulgaris*) and hazelnut (*Abellana nux*) in sera from patients with sensitivity to both extracts. *Clin Exp Allergy* **27** 1203-1211
- CABALLERO T & MARTIN-ESTEBAN M (1998) Association between pollen hypersensitivity and edible vegetable allergy: A review. *Invest Allergol Clin Immunol* **8** 6-16
- CALKHOVEN PG, AALBERSE M, KOSHTA VL, POS O, OEI HD & AALBERSE RC (1987) Cross reactivity among birch pollen, vegetables and fruits as detected by IgE antibodies is due to at least three distinct cross reactive structures. *Allergy* **42** 382-390
- CALVERAT ML, ROBERTSON I & SAMARRATUNGA H (1996) Mango dermatitis: allergic contact dermatitis to *Mangifera indica*. *Australas J Dermatol* **37** 59-60
- CASTELLS MC, PASCUAL C, MARTIN ESTEBAN M & OJEDA JA (1986) *J Allergy Clin Immunol* **78** 1110-1114
- CASTILLO R, DELGADO J, QUIRALTE J, BLANCO C & CARRILLO T (1996) Food hypersensitivity among adult patients: epidemiological and clinical aspects. *Allergol Immunopathol (Madrid)* **24** 93-97
- CESKA M & LUNDKVIST U (1972) A new and simple radioimmunoassay method for the determination of IgE. *Immunochem* **9** 1021-30
- CHANDRA RK (1997) Food hypersensitivity and allergic disease: a selective review. *Am J Clin Nutr* **66** 526S-529S
- 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: Clinical aspects of immunology. Davis - Philadelphia 317

- DANG RW & BELL DB (1967) Anaphylactic reaction to the ingestion of mango. *Hawaii Med J* **27** 149-150
- DANSCHER G & NOORGARD JOR (1983) Light microscopic visualization of colloidal gold on resin-embedded tissue. *J Histochem Cytochem* **31** 1394-1399
- DIAZ-PERALES A, COLLADA C, BLANCO C, SANCHEZ-MONGE R, CARILLO T, ARAGONCILLO C & SALCEDO G (1999) Cross-reactions in the latex-fruit syndrome: a relevant role of chitinases but not of complex asaragine-linked glycans. *J Allergy Clin Immunol* **104** 681-687
- DIEZ-GOMEZ ML, QUIRCE S, CUEVAS M, SANCHEZ-FERNANDEZ C, BAZ G, MORADIELLOS FJ & MARTINEZ A (1999) Fruit-pollen-latex-cross-reactivity: implication of profilin (Bet v 2). *Allergy* **54** 951-961
- DOMINGUEZ J, CUEVAS M, URENA V, MUNOZ T & MONEO I (1990) Purification and characterization of an allergen of mustard seed. *Ann Allergy* **64** 352-357
- DREBORG S (1988) Food allergy in pollen-sensitive patients. *Ann Allergy* **61** 41-46
- DREBORG S & FOUCARD T (1983) Allergy to apple, carrot and potato in children with birch pollen allergy. *Allergy* **38** 167-72
- DREBORG S, BOUSQUET J, LØWENSTEIN H & FREW AJ (1994) Reponse to what is a "major" allergen? by Berrens L. *Clin Exp Allergy* **24** 610-611
- DUQUE S, FERNÁNDEZ-PELLÓN L & RODRIGUEZ F (1999) Mango allergy in a latex-sensitized patient. *Allergy* **54** 1004-1005
- EBNER C, BIRKNER T, VALENTA R, RUMPOLD H, BREITENBACH M, SCHEINER O & KRAFT D (1991) Common epitopes of birch pollen and apples – studies by Western and Northern blot. *J Allergy Clin Immunol* **88** 588-594
- EBNER C, HIRSCHWEHR R, BAUER L, BREITENEDER H, VALENTA R, EBNER H, KRAFT D & SCHEINER O (1995) Identification of allergens in fruits and vegetables: IgE cross-reactivities with the important birch allergens Bet v 1 and Bet v 2 (birch profilin). *J Allergy Clin Immunol* **95** 962-969
- EDMAN P & BEGG G (1967) A protein sequenator *Eur J Biochem* **1** 80-91
- EGGER D & BIENZ K (1987) Colloidal gold staining and immunoprobng of proteins on the same nitrocellulose blot. *Anal Biochem* **166** 413-417
- ERIKSON S & FAGERSON IS (1976) The plastein reaction and ist applications: A review. *J Food Sci* **41** 490
- ERIKSSON NE, FORMGREN H & SVENONIUS E (1982) Food hypersensitivity in patients with birch pollen allergy. *Allergy* **37** 437-443
- FÄH J, WÜTHRICH B & VIETHS S (1995) Anaphylactic reaction to lychee fruit: evidence for sensitization to profilin. *Clin Exp Allergy* **25** 1018-1023
- FAHLBUSCH B, RUDESCHKO O, MÜLLER WD, SCHLENGVOIGT G, VETTERMANN S & JÄGER L (1995) Purification and characterization of the major allergen from apple and its allergenic cross-reactivity to Bet v 1. *Int Arch Allergy Immunol* **108** 119-126
- FAO; <http://apps.fao.org/page/collections?subset=agriculture> (2000)
- 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
- FERNANDEZ-RIVAS M, VAN REE R & CUEVAS M (1997) Allergy to Rosaceae fruits without related pollinosis. *J Allergy Clin Immunol* **100** 728-733

- FERNANDEZ-RIVAS M & CUEVAS M (1999) Peels of Rosaceae fruits have a higher allergenicity than pulps. *Clin Exp Allergy* **29** 1239-1247
- FOLSTER-HOLST R, HAUSEN BM, BRASCH J & CHRISTOPHERS E (2001) Contact allergy caused by poison ivy (*Toxicodendron* spp). *Hautarzt* **52** 136-42
- FRANKE W (1997) *Nutzpflanzenkunde; 6. neubearbeitete Auflage*, Georg Thieme Verlag - Stuttgart, New York
- FRAZER AC, FLETCHER RF, ROSS CAC, SHAW B, SAMMONS HG & SCHNEIDER R (1959) Gluten-induced enteropathy. The effect of partially digested gluten. *Lancet* **2** 252-255
- FREDSTED LB (1995) Processing systems for fruit juice and related products. in: ASHURST PR (Hrsg.): *Production and packaging of non-carbonated fruit juices and fruit beverages; second edition*, Blackie Academic & Professional - Chapman & Hall
- FUNES E, MILAN JM, PAGAN JA, LOPEZ JA, GARCIA FJ, NEGRO JM, HERNANDEZ J, POLO F & RICO YP (1999) Alergia a *anaracadiaceae*. Identificación de alergenosen. *Allerg Immunol Clinic* **14** 82-89
- GALL H, KALVERAM KJ, FORCK G & STERRY W (1993) Kiwi: a new birch pollen-associated food allergen *Dermatol Monatschr* **179** 99-104
- GALLATI H & PRACHT L (1985) Peroxidase aus Meerrettich: Klinische Studien und Optimierung der Peroxidase-Aktivitätsbestimmung mit den Substraten H₂O₂ und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin. *J Clin Chem Clin Biochem* **23** 453-460
- GEIGER K (1994) Industrial processing of tropical fruit at an industrial Indian plant. *Food process* **4** 75-83
- GEROSO AM & ELPERN DJ (1992) Some observation on mango and mokihana dermatitis from hawaii. *Contact dermatitis* **26** 346-347
- Gesundheitsweb: (2001) [http:// www.gesundheitsweb.de/magendarm/2-0-0-0-0-0.html](http://www.gesundheitsweb.de/magendarm/2-0-0-0-0-0.html)
- GIANNATTASIO M, SERAFINI M, GUARRERA P, CANNISTRACI C, CRISTAUDDO A & SANTUCCI B (1995) Contact urticaria from litchi fruit (*Litchi chinesis* Sonn.) *Contact Dermatitis* **33**(1) 67
- GLICK BR & PASTERNAK JJ (1995) *Molekulare Biotechnologie*; Spektrum Akademischer Verlag - Heidelberg
- GOMEZ M, CURIEL G, MENDEZ J, RODRIGUEZ M & MONEO I (1996) Hypersensitivity to carrot associated with specific IgE to grass and tree pollens. *Allergy* **51** 425-429
- GORITSA A, ZIPPRICH F, HOGENDIJK S, ZAWODNIK S, SZABO I, EIGENMANN P & HAUSER C (1998) Die Mango-frucht, ein Nahrungsmittelallergen mit steigender Bedeutung. *Allergologie* **21**(1) 41-44
- GUTTMAN A (1996) Capillary sodium dodecyl-sulfate gel electrophoresis of Proteins. *Elektrophoresis* **17** 1333-1341)
- HALMEPURO L, VUONTELA K, KALIMO K & BJÖRKSTEN F (1984) Cross reactivity of IgE antibodies with allergens in birch pollens, fruits and vegetables. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **74** 235-240
- HANDMAN E & JARVIS HM (1985) Nitrocellulose-Based Assays for the Detection of Glycolipids and other Antigens: Mechanism of Binding to Nitrocellulose. *J Immunol Meth* **83** 113-123
- HAYAKAWA K, LINKO YY & LINKO P (1999) Mechanism and control of food allergy. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* **32** 1-11
- HEFLE SL (1996) The chemistry and biology of food allergens. *Food Technol* **50** 86-92

- HEISS R & EICHNER K (1995) Haltbarmachen von Lebensmitteln. Chemische, physikalische und mikrobiologische Grundlagen der Verfahren; 3. Auflage Springer Verlag - Berlin
- HEISS S, FISCHER S, MÜLLER WD, WEBER B, HIRSCHWEHR R, SPITZAUER S, KRAFT D & VALENTA R (1996) Identification of a 60 kd cross-reactive allergen in pollen and plant-derived food. *J Allergy Clin Immunol* **98** 938-947
- HELBING A (1994) Nahrungsmittelallergie. *Therapeutische Umschau* **51** 31-37
- HELBING A (1997) Wichtige kreuzreaktive Allergene. *Schweiz Med Wochenschr* **127** 382-389
- HELBING A (1998) Nahrungsmittel-Allergie. *Praxis* **87** 1309-1315
- HELBLING A, LÓPEZ M, SCHWARZ HJ & LEHRER SB (1993) Reactivity of carrot-specific IgE antibodies with celery, apiaceous spices and birch pollen. *Ann Allergy* **70** 495-499
- HELBLING A, SCHWARZ HJ, LÓPEZ M & LEHRER SB (1994) Lettuce and carrot allergy: are they related? *Allergy Proc* **15** 33-38
- HENZGEN M, RUDESCHKO O, SCHLENVOIGT G & JÄGER L (1998) Mangoallergie als Ausdruck einer Kreuzreaktion? *Allergologie* **21**(7) 338-343
- HEUKESHOVEN J & DERNICK R (1986) Neue Ergebnisse zum Mechanismus der Silberfärbung; In: Radola BJ (ed.), *Elektrophoreseforum*, TU München 22-27
- HILL DJ, HOSKING CS, ZHIE CY, LEUNG R, BARATWIDJAJA K & IKURA Y (1997) The frequency of food allergy in Australia and Asia. *Environ Toxicol Pharmacol* **4** 101-110
- HIRSCHWEHR R, VALENTA R, EBNER C, FERREIRA F, SPERR WR, VALENT P, ROHAC M, RUMPOLD H, SCHEINER O & KRAFT D (1992) Identification of common allergenic structures in hazel pollen and hazelnuts: A possible explanation for sensitivity to hazelnuts in patients allergic to tree pollen. *J Allergy Clin Immunol* **90** 927-936
- HOFFMANN-SOMMERGRUBER K, O'RIORDAIN G, AHORN H, EBNER C, LAIMA DA CAMARA MACHADO M, PÜHRINGER H, SCHEINER O & BREITENEDER H (1999) Molecular characterization of Dau c 1, the Bet v 1 homologous protein from carrot and its cross reactivity with Bet v 1 and Api g 1. *Clin Exp Allergy* **29** 840-847
- HOLGATE S, CHURCH M (1993) *Allergy*; Gower Medical Publishing - New York
- HSIEH LS, MOOS JR M & LIN Y (1995) Characterization of apple 18 and 31 kd allergens by microsequencing and evaluation of their content during storage and ripening. *J Allergy Clin Immunol* **96** 960-970
- HUNKAPILLER MW, LUJAN E, OSTRANDER F & HOOD LE (1983) Isolation of microgramm Quantities of Proteins from Polyacrylamid Gels for Amino Sequence Analysis. *Methods Enzymol* **91** 227-236
- Internet: www.crfq.org/pubs/ff/mango.html - MANGO Fruit Facts
- IPPEN H (1983) Kontaktallergien gegen *Anacardiaceae*. *Derm Beruf Umwelt* **31** 140-148
- ISHIZAKA T, CAMPBELL DH & ISHIZAKA K (1960) Internal antigenic determinants in protein molecules. *Proc Soc Exp Biol Med* **103** 5-9
- JAGTIANI J, CHAN HT, SAKAI WS (1988) *Tropical fruit processing*; Academic Press, Inc.- San Diego/New York
- JANEWAY CA JR (1993) Das molekulare Arsenal des Immunsystems, in: *Spektrum der Wissenschaft: Immunabwehr*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford. 22-29
- JANEWAY CA & TRAVERS P (1995) *Immunologie* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

- JANKIEWICZ A, BALTES W, VIETHS S, BÖGL KW & DEHNE LI (1995) Nachweis von allergenen Sellerieproteinen in verarbeiteten Lebensmitteln. *Lebensmittelchemie* **49** 10
- JANKIEWICZ A, AULEPP H, BALTES W, BÖGL KW, DEHNE LI, ZUBERBIER T & VIETHS S (1996) Allergic sensitization to native and heated celery root in pollen sensitive patients investigated by skin test and IgE binding. *Int Arch Allergy Immunol* **111** 268-278
- JANKIEWICZ A, BALTES W, BÖGL KW, DEHNE LI, JAMIN A, HOFFMANN A, HAUSTEIN D & VIETHS S (1997) Influence of food processing 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 thirty 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
- JENSEN-JAROLIM E, WIEDERMANN U, GANGLBERGER E, ZURCHER A, STADLER BM, BOLTZ-NITULESCU G, SCHEINER O & BREITENEDER H (1999) Allergen mimotopes in food enhance type I allergic reactions in mice. *FASEB J* **13** 1586-1592
- JOHANN P (1987) Besonderheiten bei der Verarbeitung von tropischen Früchten. *Flüss Obst* **54** 430-434
- JOHNSON DA, GAUTSCH JW, SPORTSMAN JR & ELDER JH (1984) Improved technique utilizing nonfat dry milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose. *Gene Anal Technol* **1** 3-11
- KADER AA (1999) Lychee: <http://postharvest.ucdavis.edu/Produce/ProduceFacts/Fruits/Lychee.html>
- KALRA SK, TANDON DK, SINGH BP (1995) Mango. in: SALUNKHE DK, KADAM SS (Hrsg.): Handbook of fruit science and technology; Marcel Dekker, Inc. - New York/Basel/Honkong
- KINDER H, SCHARF B, STEINHART H & PASCHKE A. (1999) Investigation of IgE-binding Patterns and Allergenicity of Mango Fruit Allergens in Different Varieties. *Internet Symposium on Food Allergens* **1** 43-49
- KINDER H (1999) Die Typ I Allergie gegen Magofrüchte unter Berücksichtigung von Kreuzreaktionen. Dissertation Universität Hamburg
- KLEINE-TEBBE J & RYTTER M (1997) IgE-vermittelte Nahrungsmittelallergien. *H+G* **3**(184-192
- KOPPELMAN SJ, BRUIJNZEEL-KOOMEN CA, HESSING M & DE JONGH HH (1999) Heat induced conformational changes of Ara h 1, a major peanut allergen, do not affect its allergenic properties. *J Biol Chem* **274** 4770-4777
- KORTEKANGAS-SAVOLAINEN O, SAVOLAINEN J, EINARRSON R. (1993) Gastrointestinal stability of baker's yeast allergens: an in vitro study. *Clin Exp Allergy* **23** 587-590
- KREFT D, BAUER R, GÖRLICH R (1995) Nahrungsmittelallergene - Charakteristika und Wirkungsweise; de Gruyter - Berlin/New York
- KYHSE-ANDERSEN J (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* **10** 203
- Lebensmittelrecht* (Stand Januar 2001) Verlag CH Beck München:
- ➔ **Leitsätze für tiefgefrorenes Obst und Gemüse** i.d.F. vom 14. Januar 1970

- ➔ **Leitsätze für verarbeitetes Obst** vom 17./18. September 1991 (BAnz. Nr. 86b v. 8.5.1992, GMBL. 1992 S. 331), geändert am 17.4.1997 (BAnz. Nr. 239a v. 20.12.1997, GMBL. 1997 S. 856)
- ➔ **Verordnung über Fruchtnektar und Fruchtsirup** In der Fassung der Bekanntmachung vom 17. Februar 1982 (BGBl. I S. 198), zuletzt geändert durch Art 12VO zur Neuordnung lebensmittelrechtlicher Vorschriften über Zusatzstoffe v. 29.1.1998 (BGBl. S. 230, 296) und Art 2 der Verordnung zur Änderung der Lebensmittel-Kennzeichnungsverordnung und anderer lebensmittelrechtlicher Verordnungen v. 14.10.1999 (BGBl. I S. 2053)

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

LEHNINGER AL, NELSON DL & COX MM (1994) Prinzipien der Biochemie; 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag – Heidelberg/Berlin/Oxford

LEHRER SB, HORNER WE & REESE G (1996) Why are some proteins allergenic? Implications for biotechnology. *Crit Rev Food Sci Nutr* **36** 553-564

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

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

LIEBSTER G (1990) Warenkunde Obst und Gemüse; Band 1 Obst, 2. Auflage, Morion Verlagsproduktion GmbH - Düsseldorf

LIECHTENSTEIN LM (1993) Allergy and the immune system *Sci Am* **9** 85-93

LÖFFLER G & PETRIDES PE (1990) Physiologische Chemie; 4. Auflage, Springer-Verlag – Berlin/Heidelberg/New York

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

LÜTTKOPF D, BALLMER-WEBER BK, WÜTHRICH B & VIETHS S (2000) Cerery allergens in patients with positive double-blind placebo-controlled food challenge. *J Allergy Clin Immunol* **106** 390-399

M'RAIHI L, CHARPIN D, PONS A, BONGRAND P & VERVLOET D (1991) Cross reactivity between latex and banana. *J Allergy Clin Immunol* **87** 129-130

MAHMOUD MI, MALONE WT, CORDLE CT (1992) Enzymatic Hydrolysis of Casein: Effect of Degree of Hydrolysis on Antigenicity and Physical Properties. *J Food Sci* **57** 1223-1229

MALANIN K, LUNDNERG M, JOHANSSON SGO (1995) Anaphylactic reaction caused by neoallergens in heated pecan nut. *Allergy* **50** 88-91

MARTIN WF & CERFF R (1986) Prokaryotic features of a nucleus-encoded enzyme. C Dann sequence for chloroplast and cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from mustard (*Sinapis alba*). *Eur J Biochem* **159** 323-331

MARTINEZ A, FERNANDEZ-RIVAS M, MARTINEZ J & PALACIOS R (1997) Improvement of fruit allergenic extracts for immunoblotting experiments. *Allergy* **52** 155-161

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

MATSUDA T, WATANABE K & NAKAMURA R (1983) Immunochemical and Physical Properties of Peptic-Digested Ovomuroid. *J Agric* **31** 942-946

- McEVILY AJ, IYENGAR R & OTWELL WS (1992) Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Crit Rev Food Sci Nutr* **32** 253-273
- MIELL J, PAPOUCHADO M & MARSHALL AJ (1988) Anaphylactic reaction after eating mango. *Br Med J* **297** 1639-1640
- MITCHAM EJ & McDONALD RE (1992) Cell wall modification during ripening of "Keitt" and "Tommy Atkins" mango fruit. *Journal of American Society of horticultural Sci* **117** 919-924
- MITRA SK & BALDWIN EA (1997) Mango. in: MITRA SK (Hrsg.): Postharvest physiology and storage of tropical and subtropical fruits; Cab international – Wallingford/New York
- MOEREMANS M, DANEELS G, & DE MEY J (1985) Sensitive colloidal metal (gold or silver) staining of protein blots on nitrocellulose membranes. *Anal Biochem* **145** 315-321
- MÖLLER M (1997) Charakterisierung von Allergenen tropischer Früchte unter Berücksichtigung von Kreuzreaktivitäten. Dissertation der Universität Hamburg
- MÖLLER M, PASCHKE A, VIELUF D, KAYMA M, VIETHS S & STEINHART H (1997) Characterization of allergens in kiwi fruit and detection of cross-reactivity with allergens of birch pollen and related fruit allergens *Food Agric Immunol* **9** 107-121
- MONERET-VAUTRIN DA (1986) Food antigens and additives. *J Allergy Clin Immunol* **78** 1039-1046
- MONERET-VAUTRIN DA (1998) Modifications of allergenicity linked to food technologies. *Allergie et Immunologie* **30**(9-13
- MONERET-VAUTRIN DA & KANNY G (1995) Food-induced anaphylaxis. A new french multicenter survey. *Ann Gastroenterol Hepatol (Paris)* **31** 256-263
- MONTAG G, KALVERAM CM & GALL H (1996) Pollenassoziierte Nahrungsmittelallergie auf Lychee. *Allergo* **5** 139-142
- NEDERGAARD-LARSEN J & LOEWENSTEIN H (1999) Official list of allergens. IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee, <http://biobase.dk/resources/pub/who-iuis/allergen.list>
- NIESTIJL JANSEN JJ, KARDINAAL AFM, HUIJBERS G, Vlieg-BOERSTRA BJ, MARTENS BP & OCKHUIZEN T (1994) Prevalence of food allergy and intolerance in the adult Dutch population. *J Allergy Clin Immunol* **93** 446-456
- ORTOLANI C, PASTORELLO EA, FARIOLI L, ISPANO M, PRAVETTONI V, BERTI C, INCORVAIA C & ZANUSSI C (1993) IgE-mediated allergy from vegetable allergens. *Ann Allergy* **71** 470-476
- PASCHKE A., KINDER H., ZUNKER K., WIGOTZKI M., WEBBECHER R., VIELUF I. & STEINHART H. (2001a) Characterization of Cross-reacting Allergens in Mango Fruit. *Allergy* **56** 237-242
- PASCHKE A., KINDER H., ZUNKER K., WIGOTZKI M., WEBBECHER R., VIELUF D. & STEINHART H. (2001b) Characterization of Allergens in Mango Fruit and Ripening Dependence of the Allergenic Potency. *Food Agric Immunol* **13** 51-61
- PASTORELLO EA, CONTI A, PRAVETTONI V, FARIOLI L, RIVOLTA F, ANSALONI R, ISPANO M, INCORVAIA C, GIUFFRIDA MG & ORTOLANI C (1998) Identification of actinidin as the major allergen of kiwi fruit. *J Allergy Clin Immunol* **101** 531-537
- PETERSEN A, VIETHS S, AULEPP H, SCHLAAK M & BECKER WM (1996) Ubiquitous structures responsible for IgE cross-reactivity between tomato fruit and grass pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol* **98** 805-815

- PICHLER WJ & STICH O (1993) Nahrungsmittelallergien bei Pollensensibilisierungen. Teil II: Kreuzreaktionen bei Beifußpollen-Sensibilisierungen. *Allergologie* **16** 494-501
- 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
- READ SM, NORTHCOTE DH (1981) Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie Blue G dye binding assay for protein. *Anal Biochem* **116** 53-64
- REICH S (1993) Nahrungsmittelallergien: Allergische und pseudoallergische Reaktionen. *AID-Ve-bräucher-dienst* **38** 51-56
- RING J (1989) Nahrungsmittelallergien und andere nahrungsmittelbedingte Unverträglichkeitsreaktionen. *Akt Ernährung* **14** 49-56
- ROITT IM (1993) Leitfaden der Immunologie, 4. Auflage, Blackwell Wissenschaft, Berlin
- ROITT IM, BROSTOFF J & MALE DK (1995) Kurzes Lehrbuch der Immunologie; 3. Auflage, Thieme Verlag - Stuttgart
- ROTH L, DAUNDERER M & KORMANN K (1988) Giftpflanzen-Pflanzengifte: Vorkommen-Wirkung-Therapie/Allergische und phytotoxische Reaktionen; 3. Auflage, ecomed Verlagsgesellschaft mbH - Landsberg
- RUBIN JM, SHAPIRO J, MUEHLBAUER P & GROLNICK M (1965) Shock reaction following ingestion of mango. *J Am Med Assoc* **193** 397-398
- RUNGE H, DERA Y., MATTERN PC, IDLER F, SCHADE W & ANNEMÜLLER G (1996) Screening of lactic acid bacteria for biological acidification of tropical fruit juices. *Fruit Proces* **6** 279-285
- SANDER I, FLAGGE A, MERGET R, HALDER TM, MEYER HE & BAUR X (2001) Identification of wheat flour allergens by means of 2-dimensional immunoblotting. *J Allergy Clin Immunol* **107** 907-13
- SAMPSON HA (1991) Immunologic mechanisms in adverse reaction to foods. *Immunology and Allergy Clinics of North America* **11** 701-716
- SAMPSON HA (1992) Food Hypersensitivity: Manifestations, Diagnosis and Natural History. *Food Technol* **46** 141-144
- SAMPSON HA (1997) Food allergy. *JAMA* **278** 1888-1894
- SAMPSON HA & MCCASKILL CC (1985) Food hypersensitivity and atopic dermatitis: evaluation of 113 patients. *Journal of Pediatrics* **107** 669-675
- SAMPSON HA & HO DG (1997) Relationship between food-specific IgE concentrations and the risk of positive food challenges in children and adolescents. *J Allergy Clin Immunol* **100** 444-451
- SAULS JW (1999) Home Fruit Production – Mango;
<http://aggie-horticulture.tamu.edu/extension/homefruit/mango/mango.html>
- SCHÄGGER H, AQUILA H & VON JAGOW G (1988) Coomassie blue-sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis. *Anal Biochem* **173** 201-205
- SCHOBINGER U (1987) Frucht und Gemüsesäfte. in: SCHOBINGER U. (Hrsg.) Handbuch der Lebensmitteltechnologie; 2. Auflage - Stuttgart

- SCHÖNING B, VIETHS S, PETERSEN A, BALTES W (1995) Identification and characterization of allergens related to Bet v 1, the major birch pollen allergen, in apple, cherry, celery, and carrot by two-dimensional immunoblotting and N-terminal microsequencing. *J Sci Food Agric* **65** 431-440
- SON DY, SCHEURER S, HOFFMANN A, HAUSTEIN D & VIETHS S (1995) Pollen-related food allergy: cloning and immunological analysis of isoforms and mutants of Mal d 1, the major apple allergen, and Bet v 1, the major birch pollen allergen. *Eur J Nutr* **38** 201-215
- SPREITZER H (1996) Nahrungsmittelallergene. *ÄAZ* **6** 248-253
- STOTT DI (1989) Immunoblotting and dot blotting. *J Immunol Meth* **119** 153-187
- TAYLOR SL (1992) Chemistry and Detection of Food Allergens. *Food Technol* **5** 146-152
- TAYLOR SL, LEMANSKE RF JR, BUSH RK & BUSSE WW (1987) Food allergens: structure and immunologic properties. *Ann Allergy* **59** 93-99
- THIEL C (1988) Nahrungsmittelallergien bei Pollenallergikern (sogenannte pollenassoziierte Nahrungsmittelallergien). *Allergologie* **10** 397-410
- THIEL C (1991) Lebensmittelallergien und -intoleranzreaktionen. *Z Ernährungswiss* **30** 158-173
- TUCKER MO & SWAN CR (1998) Images in clinical medicine. The mango-poison ivy connection. *N-Engl J Med* **339** 235
- VALENTA R, BREITENEDER H, PETTENBURGER K, BREITENBACH M, RUMPOLD H, KRAFT D & SCHEINER O (1991a) 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, PETTENBURGER K, SILLABER C, VALENTA P, BETTELHEIM P, BREITENBACH M, RUMPOLD H, KRAFT D & SCHEINER O (1991b) Identification of profilin as a novel pollen allergen: IgE-autoradioactivity in sensitized individuals. *Science* **253** 557-560
- VALENTA R, DUCHENE M, EBNER C, VALENT P, SILLABER C, DEVILLER P, FERREIRA F, TEIKL M, EDELMAN H, HIRSCHWEHR R, EBNER C, KRAFT D & SCHEINER O (1992a) Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens. *J Exp Med* **175** 377-385
- VALENTA R, DUCHENE M, VRTALA S, VALENT P, SILLABER C, FERREIRA F, TEJKL M, HIRSCHWEHR R, EBNER C, KRAFT D & SCHEINER O (1992b) Profilin, a novel plant pan-allergen. *Int Arch Allergy Immunol* **99** 271-273
- VALENTA R & KRAFT D (1996) Type I allergic reactions to plant-derived food. *J Allergy Clin Immunol* **97** 893-895
- VALLIER P, DECHAMP R, VALENTA R, VIAL O & DEVILLER P (1992) Purification and characterisation of an allergen from celery immunochemically related to an allergen present in several other plant species. Identification as a profilin. *Clin Exp Allergy* **22** 774-782
- VAN REE R, VOITENKO V, VAN LEEUWEN WA & AALBERSE RC (1992) Profilin is a cross reactive allergen in pollen and vegetable foods. *Int Arch Allergy Immunol* **98** 97-104
- VAN REE R, FERNANDEZ-RIVAS M, CUEVAS M, VAN WIJNGAARDEN M & AALBERSE RC (1995) Pollen-related allergy to peach and apple: an important role for profilin. *J Allergy Clin Immunol* **95** 726-734
- VAN REE R, AKKERDAAS JH, VAN LEEUWEN WA, VOITENKO V, VAN LEEUWEN WA, FERNANDEZ-RIVAS M, ASERO R, KNUL-BRETTLOVA V, KNULST A & AALBERSE RC (2000) New perspectives for the diagnosis of food allergy. *ACI Int* **12** 7-12

- 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
- VIELUF D, BEIL D, BEAUREGARD K, VIELUF I, KINDER H, BEHRENDT H, STEINHART H & RING J (1997) Xenobiotics and food allergy: in vivo and in vitro studies in patients with apple allergy. *Int Arch Allergy Immunol* **113** 352-54
- VIETHS S (1996) Lebensmittelallergien und andere Unverträglichkeitsreaktionen. *Jahresbericht des Paul-Ehrlich-Instituts*
- VIETHS S, SCHÖNING B, BROCKMANN S & AULEPP H (1992a) Untersuchungen zur Allergie gegen Lebensmittel pflanzlicher Herkunft: Herstellung und Charakterisierung von Obst- und Gemüseextrakten für serologische Untersuchungen. *Dtsch Lebensm Rundsch* **88** 239-43 + 273-78
- VIETHS S, SCHÖNING B & BALTES W (1992b) Allergy to fruits and vegetables in pollen-sensitive patients: Allergen characterization by IgE immunoblotting and peroxidase staining. *Food Agric Immunol* **4** 181-197
- VIETHS S, BROCKMANN S & SCHÖNING B (1992c) Nahrungsmittelallergie gegen Obst und Gemüse: Eine aktuelle serologische Untersuchung zur Sensibilisierung von Pollenallergikern. *Allergologie* **15** 367-379
- VIETHS S, SCHÖNING B, AULEPP H & BALTES W (1993a) Identifizierung kreuzreagierender Allergene in Pollen und pflanzlichen Lebensmitteln. *Lebensmittelchemie* **47** 49-53
- VIETHS S, SCHÖNING B & JANKIEWICZ A (1993b) Occurrence of IgE binding allergens during ripening of apple fruits. *Food Agric Immunol* **5** 93-105
- VIETHS S, JANKIEWICZ A, SCHÖNING B & AULEPP H (1994a) Apple allergy: the IgE-binding potency of apple strains is related to the occurrence of the 18 kDa allergen. *Allergy* **49** 262-271
- VIETHS S, FISCHER K, DEHNE LI, AULEPP H, WOLLENBERG H & BÖGL KW (1994b) Versteckte Allergene in Lebensmitteln. *Bundesgesundhbl* **2** 51-60
- VIETHS S, FISCHER K, DEHNE LI & BÖGL KW (1994b) Allergenes Potential von verarbeiteten Lebensmitteln. *Ernährungs-Umschau* **41** 140-143
- VIETHS S, JANCK K, AULEPP H & PETERSEN A (1995) Isolation and characterization of the 18 kDa major apple allergen and comparison with the major birch pollen allergen (Bet v 1). *Allergy* **50** 421-430
- VIETHS S, 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, JANKIEWICZ A, AULEPP H & HAUSTEIN D (1997) Allergy to heated and processed foods. *Arbeiten aus dem Paul-Ehrlich-Institut* **91** 250-262
- VIETHS S, HOFFMANN A, HOLZHAUSER T, MÜLLER U, REINDL J & HAUSTEIN D (1998a) Factors influencing the quality of food extracts for in vitro and in vivo diagnosis. *Allergy* **53** 65-71
- VIETHS S, MAY S & HAUSTEIN D (1998b) Qualität von Allergenextrakten; *Bundesgesundheitsblatt*
- VIETHS S, REINDL J, MÜLLER U, HOFFMANN A & HAUSTEIN D (1999) Digestibility of peanut and hazelnut allergens investigated by a simple in vitro procedure. *Eur Food Res Technol* **209** 379-388
- VON PIRQUET C (1906) Allergie. *Münch Med Wschr* **30** 1457-1458
- WADEE A, BOTING L & RABSON A (1990) Fruit allergy: demonstration of IgE antibodies to a 30 kDa protein present in several fruits. *J Allergy Clin Immunol* **85** 801-807

- WAHL R, LAU S, MAASCH HJ & WAHN U (1990) *Int Arch Allergy Appl Immunol* **92** 168-174
- 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 Ernährungswiss* **35** 348-355
- WIGOTZKI M (2001) Einfluß der technologischen Verarbeitung auf das allergene Potential der birkenpollenassoziierten Lebensmittel Haselnuß, Apfel und Karotte. *Dissertation an der Universität Hamburg*
- WIGOTZKI M, STEINHART H & PASCHKE A (2000) Influence of varieties, storage and heat treatment on IgE-binding proteins in hazelnuts (*Corylus avellana*). *Food Agric Immunol* **12** 217-219
- WÜTHRICH B (1986) Nahrungsmittelallergien. *Internist* **27** 362-371
- WÜTHRICH B (1993) Zur Nahrungsmittelallergie. *Allergologie* **16** 280-287
- WÜTHRICH B (1996a) Zur Nahrungsmittelallergie: Begriffsbestimmung, Diagnostik, Epidemiologie, Klinik. *Schw med Wschr* **126** 770-776
- WÜTHRICH B (1996b) Diagnostik-Häufigkeit der Symptome und der allergieauslösenden Nahrungsmittel bei Erwachsenen. in: Wüthrich B (ed.) *Nahrungsmittel und Allergie*; Düstri-Verlag - München
- WÜTHRICH B & HOFER T (1984) Nahrungsmittelallergie - Das „Sellerie-Beifuß-Gewürz-Syndrom“: Assoziation mit einer Mangofrucht-Allergie? *Dtsch Med Wsch* **109** 981-986
- WÜTHRICH B, STÄGER J & JOHANSSON SG (1990) Celery allergy associated with birch and mugwort pollinosis. *Allergy* **45** 566-571
- WÜTHRICH B & SCHMID-GRENDELMEIER P (1995) Nahrungsmittelallergien. *Internist* **36** 1052-1062
- www.fruechte-kuester.de/obst-abc/litchi.html (2001)
- YAMADA K, URISU A, KAKAMI M, KOYAMA H, TOKUDA R, WADA E, KONDO Y, ANDO H, MOTITA Y & TORRI S (2000) IgE-binding activity to enzyme-digested ovomucoid distinguishes between patients with contact urticaria to egg with and without overt symptoms on ingestion. *Allergy* **55** 565-569