

Identifizierung und Charakterisierung IgE-bindender Proteine in Chiasamen (*Salvia hispanica* L.)

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg

aus dem
Hamburg School of Food Science (HSFS)
Institut für Lebensmittelchemie
Universität Hamburg

vorgelegt von
Ben Abdulrahman Albunni
aus Hamburg

Hamburg 2021

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2013 bis Dezember 2016 unter Anleitung von Dr. Angelika Paschke-Kratzin und Prof. Dr. M. Fischer im Hamburg School of Food Science (HSFS) – Institut für Lebensmittelchemie an der Universität Hamburg angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Markus Fischer
2. Gutachter: Dr. Angelika Paschke-Kratzin

Tag der mündlichen Prüfung: 03. September 2021

Hamburg 2021

MEINEN ELTERN und MEINER FRAU GEWIDMET

Danksagungen

Die vorliegende Doktorarbeit wurde am 22. Juni 2021 von der MIN-Fakultät, Hamburg School of Food Science (HSFS) – Institut für Lebensmittelchemie an der Universität Hamburg als Dissertation angenommen.

Ohne die Unterstützung zahlreicher Personen und Institutionen hätte sie in dieser Form nicht realisiert werden können. Für die vielfältig erfahrene Hilfe möchte ich mich an dieser Stelle sehr herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Prof. Dr. Markus Fischer, der meine Doktorarbeit stets mit viel Verständnis unterstützt hat und sich für die Realisierung dieser Arbeit immer eingesetzt hat. Für konstruktive Anregungen danke ich ebenso Dr. Angelika Paschke-Kratzin, die meine Arbeit als zweiter Gutachter stets betreut hat und mit fachlichen Hinweisen und professionellem Lektorat für einen längeren Zeitraum begleitet hat.

Besonders möchte ich mich bei allen Patienten bedanken, welche ihr Blut diesem Projekt für Forschungszwecke zur Verfügung gestellt haben und ohne die diese Untersuchungen gar nicht möglich gewesen wären. Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. med. Hassan Ied bedanken, der allen Patienten Blut abgenommen hat.

Für vielfältige Unterstützung bin ich meinen Kollegen im HSFS verbunden.

Herrn Prof. Dr. Dr. Thomas Renné und seinem technischen Mitarbeiter, Herrn Söhnke Harder, vom Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin am UKE möchte ich für die Durchführung der UHPLC-ESI-MS/MS-Analysen und die Unterstützung bei der Auswertung der Analysenergebnisse herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt schließlich neben vielen Freunden meiner Frau, Jasmin Mudrek, und meinen Brüdern, die meine Arbeit mit großem Engagement unterstützt haben. Der größte Dank gebührt meinen Eltern, Marwan Albuni und Maha Moursi, ohne deren unermüdliche Unterstützung die vorliegende Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Veröffentlichungen und Posterbeiträge

Veröffentlichungen:

Ben Abdulrahman Albunni, Hauke Wessels, Angelika Paschke-Kratzin, Markus Fischer, Antibody Cross-Reactivity between Proteins of Chia Seed (*Salvia hispanica* L.) and Other Food Allergens *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67, 7475-7484 (2019).

Posterbeiträgen auf wissenschaftlichen Tagungen

Ben Abdulrahman Albunni; Angelika Paschke-Kratzin; Markus Fischer. Identifizierung und Charakterisierung IgE-bindender Proteine aus Chiasamen, Lebensmittelchemikertag, Gießen 22th-24th September, 2014

Ben Abdulrahman Albunni; Angelika Paschke-Kratzin; Markus Fischer. Identifizierung und Charakterisierung IgE-bindender Proteine aus Chiasamen, Lebensmittelchemikertag, Karlsruhe 14th-16th September, 2015.

Ben Abdulrahman Albunni; Angelika Paschke-Kratzin; Markus Fischer. Identifizierung und Charakterisierung IgE-bindender Proteine aus Chiasamen, Lebensmittelchemikertag, Freising 12th-14th September, 2015.

Ben Abdulrahman Albunni; Angelika Paschke-Kratzin; Markus Fischer. Identification and characterization of IgE-reactive Proteins in Chia seeds, the International Conference on Environmental Analytical Chemistry and Food Monitoring (ISEAC 39), Hamburg 18th-19th July, 2016.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	IX
Tabellenverzeichnis	XV
1. Zusammenfassung /Summary	1
1.1. Zusammenfassung	1
1.2. Summary	4
2. Grundlagen	7
2.1. Einleitung	7
2.2. Chiasamen und ihre Relevanz	8
2.3. Definition der Allergie.....	9
2.4. Einteilung und Pathogenese allergischer Reaktionen	12
2.5. Lebensmittelallergien	15
2.6. Durch Kreuzreaktivität induzierte Chiasamenallergie	16
2.7. Klassifizierung von Lebensmittelallergenen	18
2.7.1. Cupin-Superfamilie	19
2.7.2. Legumine	21
2.7.3. Viciline	21
2.8. Einfluss technologischer Verfahren auf das allergene Potenzial.....	22
3. Zielsetzung und Arbeitsplan.....	24
4. Ergebnisse und Diskussion.....	26
4.1. Charakterisierung der verwendeten Humanseren	26
4.2. Identifizierung der IgE- bzw. IgG-bindenden Proteine	27
4.2.1. Extraktion der IgE- bzw. IgG-bindenden Proteine und Proteingehaltsbestimmung 27	
4.2.2. Detektion der IgG-bindenden Proteine mittels kommerzieller Antikörper	29
4.2.3. Detektion der IgE-bindenden Proteine mittels Humanseren	31
4.2.4. Auswahl der zu isolierenden und charakterisierenden Proteinbanden	36
4.2.5. Untersuchung der detektierten Proteinbanden mittels UHPLC-ESI-MS/MS	38
4.2.6. Serumspezifische IgE-Immunblot Analyse	41
4.3. Isolierung IgE-bindender Proteine aus Chiasamen	43
4.3.1. Isolierung mittels Osborne-Fraktionierung.....	43
4.3.2. Isolierung mittels Fällungsmethoden	45

4.3.3.	Isolierung mittels chromatographischer Methoden	48
4.3.4.	Isolierung mittels 2D-Gelelektrophorese.....	58
4.4.	Charakterisierung der IgE- bzw. IgG-bindenden Proteine	72
4.4.1.	Detektion von Glycoproteinen und der Einfluss der Zuckerreste auf die IgE-Bindungsfähigkeit.....	72
4.4.2.	Einfluss technologischer Veränderung auf IgE bzw. IgG-bindende Proteine ...	73
4.4.3.	ELISA-Inhibition und Immunblot-Inhibition.....	77
4.4.4.	Computergeschützter Sequenzvergleich mittels der FARRP-Datenbank	82
4.4.5.	Amplifizierung der DNA-Sequenzen IgE-bindender Proteine durch Primer-Design in sequenzierten Peptidbereichen.....	93
5.	Schlussfolgerung und Ausblick.....	105
6.	Material.....	106
6.1.	Auswahl der zur Detektion verwendeten kommerziellen Antikörper und Humanseren 106	
6.2.	Verwendete Primer	107
6.3.	Nüsse, Sesam und Chiasamen	107
6.4.	Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien	107
7.	Methoden	108
7.1.	Methodenübersicht	108
7.2.	Gewinnung der Humanseren.....	110
7.3.	Extraktion IgE- bzw. IgG-bindender Proteine.....	110
7.4.	Proteingehaltsbestimmung	110
7.5.	Osborne-Fraktionierung.....	111
7.6.	Enzymallergosorbent-Test (EAST).....	111
7.7.	Elektrophoretische Trennmethoden	112
7.7.1.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	112
7.7.2.	Zweidimensionale Gelelektrophorese (2D).....	113
7.7.3.	Agarose-Gelelektrophorese	114
7.8.	Färbemethoden.....	115
7.8.1.	Färbung der Acrylamidgele	115
7.8.2.	Färbung der Agarosegele	115
7.9.	Immunologische Nachweismethoden.....	115
7.9.1.	Immunoblot (IB)	115
7.9.2.	Immunoblot-Inhibition	116
7.9.3.	ELISA und ELISA-Inhibition	117
7.10.	Fällung von Proteinen	118

7.10.1.	Ammoniumsulfat-Fällung (AS-Fällung).....	118
7.10.2.	PEG-Fällung	118
7.11.	Chromatographische Auftrennung der Proteine in Chiasamen-Extrakt	119
7.11.1.	Auftrennung mittels Größenausschlusschromatographie (GPC)	119
7.11.2.	Auftrennung mittels Ionenaustauschchromatographie (IEC)	119
7.11.3.	Auftrennung IgE- bzw. IgG-bindender Proteine mittels Immunaffinitätschromatographie	120
7.12.	Nachweis von Glycoproteinen mittels Periodsäure-Schiffsche-Färbung.....	122
7.13.	Untersuchung verschiedener Einflüsse auf die Stabilität der IgE- bzw. IgG-Bindung 123	
7.14.	Massenspektrometrische Methoden	123
7.14.1.	In- Gel- Trypsinverdau und UHPLC-ESI-MS/MS.....	123
7.14.2.	<i>De Novo</i> Sequenzierung von Peptiden.....	124
7.14.3.	Computergeschützter FARRP- Datenbankvergleich und Sequenzanalysen..	125
7.15.	Isolierung und Konzentrationsbestimmung der Chiasamen-DNA	125
7.16.	PCR Polymerase-Kettenreaktion	126
7.16.1.	DNA-Struktur	126
7.16.2.	Ablauf der PCR.....	127
7.16.3.	Aufreinigung und Sequenzierung der PCR-Produkte.....	127
7.16.4.	Verschachtelte PCR (<i>nested PCR</i>).....	128
8.	Literaturverzeichnis.....	129
9.	Anhang.....	140
9.1.	Material und Vorschriften der Methoden	140
9.1.1.	Verwendete Chemikalien	140
9.1.2.	Verwendete Geräte	143
9.1.3.	Verwendete Materialien	144
9.1.4.	Verwendete Antikörper	144
9.1.5.	Verwendete Humanseren	145
9.1.6.	Gewinnung der Humanseren	147
9.1.7.	Herstellung der Extrakte und Proteinbestimmung	147
9.1.8.	Enzymallergosorbent-Test (EAST)	149
9.1.9.	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	152
9.1.10.	2D-Gelelektrophorese	154
9.1.11.	Kolloidale Coomassie-Färbung.....	159
9.1.12.	Semidry Blotting	159
9.1.13.	Immunologische Methoden	160

Inhaltsverzeichnis

9.1.14.	Fällungsmethoden	165
9.1.15.	Auftrennung mittels GPC	167
9.1.16.	Auftrennung mittels IEC	167
9.1.17.	Auftrennung mittels IAC-MB.....	170
9.1.18.	Nachweis von Glycoproteinen mittels Periodsäure-Schiffsche-Färbung	171
9.1.19.	Extreme Bedingungen zur Untersuchung der IgE-Bindung	172
9.1.20.	MS-Analyse	173
9.1.21.	DNA-Isolierung und Konzentrationsbestimmung.....	174
9.1.22.	PCR	175
9.2.	Ergebnisse	180
9.2.1.	Sequenzübereinstimmung und -ähnlichkeit zwischen Sesamallergenen und anderen bekannten Allergenen	180
9.2.2.	Charakterisierung der Humanseren.....	181
9.2.3.	Proteingehaltsbestimmung.....	182
9.2.4.	Identifizierung der IgE-bindenden Proteine	183
9.2.5.	Isolierung der IgE/IgG-bindende Proteine	192
9.2.6.	Charakterisierung der IgE- bzw. IgG-bindende Proteine.....	210
9.2.7.	Amplifizierung der DNA-Sequenzen von EBPs bzw. GBPs.....	228
10.	Eidesstattliche Erklärung.....	240

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Beschreibung
μg	Mikrogramm
$^{\circ}\text{C}$	celsius
μl	Mikroliter
Å	Ångström
ABC-Transporter	<i>ATP-Binding Cassete-Transporter</i>
ACN	Acetonitril
AEC	Anionenaustauschchromatographie
AGEs	<i>Advanced Glycation Endproducts</i>
AgF	Silberfärbung
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Ammoniumsulfat (engl. <i>Ammonium Sulphate</i>)
B	Bande
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BCR	<i>B-Cell Receptor</i>
Best.	Bestimmung
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
Bidest.	doppelt destilliertes
Bis-Tris-HCl	Bis-(2-hydroxyethyl)-(imino-tris)-(hydroxymethyl)-methan-HCl
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BP	Basenpaare
BSA	Rinderalbumin (engl. <i>Bovin Serum Albumin</i>)
BV	Bootstrap-Wert (engl. <i>bootstrap value</i>)
CBBF	Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung
CEC	Kationenaustauschchromatographie (engl. <i>Cation Exchange Chromatography</i>)
CCD	kreuzreaktive Kohlenhydrat-Determinanten (engl. <i>Cross-reactive Carbohydrat Determinants</i>)
CM	Carboxymethyl
cm	Zentimeter (engl. <i>Centimeter</i>)
CnBr	Bromcyan (engl. <i>Cynogen Bromide</i>)
DEAE	Diethylaminoethyl
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DONS	Dioctylnatriumsulfosuccinat
DTT	Dithiothreitol
EA	Erdnussantikörper

Abkürzungsverzeichnis

EAACI	Die europäische Akademie für Allergologie und klinische Immunologie (engl. <i>European Academy of Allergy and Clinical Immunology</i>)
EACA	Aminohexansäure
EAST	Enzymallergosorbent-Test (engl. <i>Enzyme-Allergo-Sorbent-Test</i>)
EBP	IgE-bindendes Protein
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFSA	Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (engl. <i>European Food Safety Authority</i>)
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
ESI	Elektrospray-Ionisation (engl. <i>Electrospray Ionization</i>)
EST	<i>Expressed Sequence Tags</i>
EU	Europäische Union
FA	Ameisensäure (engl. <i>Formic Acid</i>)
Fab	Antigen bindende Fragmente (engl. <i>Antigen bindende Fragmente</i>)
FARRP	<i>Food Allergy Research and Resource Program</i>
FC	kristallisierbares Fragment (engl. <i>Fragment Crystalizable</i>)
g	Gramm
GBP	IgG-bindendes Protein
GLO	Globulin-Fraktion
GLUT	Glutelin-Fraktion
GPC	Größenausschluss-Chromatographie (engl. <i>Gel-Permeations-Chromatographie</i>)
h	Stunde (engl. <i>hour</i>)
HA	Haselnussantikörper
HCD	Kollisions-Dissoziationszelle mit hoher Energie (engl. <i>Higher Energy Collisional Dissociation</i>)
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. <i>Horseradish Peroxidase</i>)
HSFS	Hamburg School of Food Science
IAC-MB	Affinitätschromatographie mittels Magnetic Beads (engl. <i>Affinity Chromatography using Magnetic Beads</i>)
IB	Immunblot
IEC	Ionenaustauschchromatographie (engl. <i>Ion Exchange Chromatography</i>)
IEDB	<i>Immune Epitope Database</i>
IEF	Isoelektrische Fokussierung (engl. <i>Isoelectric Focusing</i>)
IgE	Immunglobulin E
IPG	Immobilisierte pH-Gradienten
IEC	Kolaskar and Tongaonkar antigenicity scale
kCF	kolloidale Coomassie-Färbung
KCl	Kaliumchlorid
Konz. Ext	Konzentration der ursprünglichen Extrakte
Konz.Ver	Konzentration der 1:20 Verdünnung

Abkürzungsverzeichnis

KTAS	<i>Kolaskar and Tongaonkar Antigenicity Scale</i>
kVh	Kilovolt pro Stunde (engl. <i>kilovolt per hour</i>)
L	Liter
LDS	Lithiumdodecylsulfat (engl. <i>Lithium Dodecyl Sulphate</i>)
LMA	Lebensmittelallergie
M	Marker
mA	Milliampere
MB	Magnetic beads
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MG	Molekulargewicht
mg	Mikrogramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
Mmol	Millimol
MOPS	3-(N-Morpholino-)propansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie (engl. <i>Mass Spectrometry</i>)
MW	<i>Molecular Weight</i>
NA	Nicht anwendbar
NBT	Nitrotetrazolium-Blau
NC	Nitrocellulose
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
PAK	Primärantikörper
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PEG	Polyethylenglykol
pI	Isoelektrischer Punkt (engl. <i>Isoelectric Point</i>)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid (engl. <i>Phenylmethylsulfonyl Fluoride</i>)
PR	<i>Pathogenesis-Related</i>
PRO	Prolamin-Fraktion
PS	Proteinspot
PTM	Posttranslationalen Modifikation (engl. <i>Post-Translational Modification</i>)
QFF	<i>Q Sepharose Fast Flow</i>
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur

Abkürzungsverzeichnis

S	Methylsulfonate
SA	Sesamantikörper
SAK	Sekundärantikörper
SÄ	Sequenzähnlichkeit (engl. <i>Positives</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (engl. <i>Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
sec	Sekunde (engl. <i>second</i>)
SerH	Serumpool aus Blutseren von Haselnussallergikern
SerS	Serumpool aus Blutseren von Sesamallergikern
SP	Sulfopropyl
SPFF	<i>SP Sepharose Fast Flow</i>
SPXL	SP Sepharose XL
SÜ	Sequenzübereinstimmung (engl. <i>Identities</i>)
T	Temperatur
TA	Totalamid
TAE	Tris-Acetat-Ethylendiamintetraacetat
TEMED	Tetraethylendiamin
Th	Thomson
TMB	3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTA	Triethylamin
TTBS	Tris-Tween-Puffer (engl. <i>Tween-Tris-Buffered Saline</i>)
TTE	Tieftemperaturextraktion
UHPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographiesystem (engl. <i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i>)
UKE	Universität Klinikum Hamburg
USA	<i>United States of America</i>
UV	Ultraviolett
ÜN	Über Nacht
V	Volt
W	Watt
WHO	<i>World Health Organisation</i>
z. B.	Zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau eines Ig-Antikörpers (Little, 2015).....	11
Abbildung 2: Typen der Überempfindlichkeitsreaktionen (Hinghofer-Szalkay, 2019).....	12
Abbildung 3: allergische Reaktion Typ I (Soforttyp) (Dermapharm, 2019).....	13
Abbildung 4: Kristallstruktur des hexameren Proteins Ara h 3, einem der Hauptallergene in der Erdnuss (Sequenz aus 510 Aminosäuren, 10% α -Hleix, 30% Beta-Faltblatt) (Jin et al., 2009)	21
Abbildung 5: Kristallstruktur des trimeren Proteins Ara h 1, einem der Hauptallergene in der Erdnuss (Sequenz aus 418 Aminosäuren, 15% α -Hleix, 40% Beta-Faltblatt) (Chruszcz et al., 2011)	21
Abbildung 6: Vergleich der Proteinspektren der untersuchten Samen. M: Marker, 1-6: Extrakte aus 1: Haselnuss, 2: Mandel, 3: Sesam, 4: Walnuss, 5. Erdnuss, 6: Chiasamen. Auftrennung mittels SDS-PAGE.....	29
Abbildung 7: Teil A: Auftrennung der Proteine im PBS-Extrakt der Chiasamen mit zwei verschiedenen Proteinkonzentrationen mittels SDS-PAGE, M: Marker, Spur 1: 500 μ g/ml, Spur 2: 1000 μ g/ml. Teil B, C und D: immunologische Detektion der IgG-bindenden Proteine in Chiasamen mit Sesamantikörpern (Teil B, M: Marker, Spur 3: Sesam-Extrakt als Referenz, Spur 4: Chiasamen-Extrakt 500 μ g/ml, Spur 5: Chiasamen-Extrakt 1000 μ g/ml), mit Haselnussantikörpern (Teil C, M: Marker, Spur 6: Haselnuss-Extrakt als Referenz, Spur 7: Chiasamen-Extrakt 500 μ g/ml, Spur 8: Chiasamen-Extrakt 1000 μ g/ml) oder mit Erdnussantikörpern (Teil D, M: Marker, Spur 9: Erdnuss-Extrakt als Referenz, Spur 10: Chiasamen-Extrakt 500 μ g/ml, Spur 11: Chiasamen-Extrakt 1000 μ g/ml).....	30
Abbildung 8: Immunoblot vom Chiasamen-Extrakt unter Verwendung der Einzelblutseren von Sesamallergikern (1-5: Blutseren von Sesamallergikern S1-S5, 6: Negativkontrolle, M: Rainbow-Proteinmarker). Die EAST-Klasse der Humansen ist unter jedem Streifen abgebildet.....	32
Abbildung 9: Die Häufigkeit der IgE-Bindung an Proteinbanden des Chiasamen-Extrakts mit Blutseren von Sesamallergikern (Projekt-Nr. 1-5).....	33
Abbildung 10: Der erste Teil der Blutseren von Haselnussallergikern, welche zur Herstellung des Serumpools (SrH) eingesetzt wurden (19 Humansen)	34
Abbildung 11: Der zweite Teil der Blutseren von Haselnussallergikern, welche zur Herstellung des Serumpools (SrH) eingesetzt wurden (8 Humansen).....	35
Abbildung 12: Die Häufigkeit der IgE-Bindung an Proteinbanden des Chiasamen-Extrakts mit Blutseren von Haselnussallergikern (Projekt-Nr. 7-39)	36

Abbildung 13: A: Auftrennung der Chiasamenproteine mittels SDS-PAGE. B: IB zur immunologischen Detektion mittels Sesamantikörper. Die mit roten Pfeilen markierten Proteinbanden sind für die MS-Analyse ausgewählt.....	39
Abbildung 14: A: Auftrennung des PBS-Extrakts und die vier Proteinfractionen mittels SDS-PAGE, B: Immunfärbung, Spur 1: PBS-Extrakt, Spur 2: Albumin-Fraktion, Spur 3: Globulin-Fraktion, Spur 4: Prolamin-Fraktion, Spur 5: Glutelin-Fraktion, rote Pfeile=IgG-bindende Proteine im PBS-Extrakt, orangene Pfeile= in Albumin-Fraktion und schwarze in Globulin-Fraktion	44
Abbildung 15: Auftrennung von GLO sowie der erhaltenen Fraktionen nach AS-Fällung mittels SDS-PAGE (links) und die dazugehörige Immunfärbung mittels SA (rechts). M: Marker, 1: GLO, 2-5: AS-Fractionen 15%, 30%, 40%, 50%.....	46
Abbildung 16: Auftrennung von GLO sowie der erhaltenen Fraktionen nach PEG-Fällung mittels SDS-PAGE. M: Marker, 1-7 Fraktionen mit aufsteigender PEG-Menge(3,3-33 µg), 8: GLO	47
Abbildung 17: Chromatogramm der GPC Trennung von GLO, erste Aufreinigung	48
Abbildung 18: SDS-PAGE der Fraktionenpools nach Trennung von GLO mittels GPC, M: Marker, G: GLO, 1-6: Fraktionenpools der Peaks 1-6.....	49
Abbildung 19: Chromatographische Trennung mittels IEC-DEAE. M: Marker, DL: Durchlauf, 50-1000: Fraktionen genannt nach der für die Elution benötigten Salzkonzentration (KCl) in mM, GLO: Globulin-Fraktion	51
Abbildung 20: Immunfärbung der Fraktionen, welche mittels QFF-Säule getrennt wurden. Zur Detektion wurden Sesamantikörper eingesetzt. M: Marker, DL: Durchlauf, 50-1000: Fraktionen genannt nach der für die Elution benötigten Salzkonzentration (KCl) in mM, GLO: Globulin-Fraktion.....	52
Abbildung 21: Isolierung der Zielproteine mittels Entkopplungspuffer 9. M: Marker, Teil A (Spuren 1-4): erster Isolierungszyklus, 1: Blindprobe (erster Zyklus), 2: Isolierte Proteinbanden, 3: Waschlösung nach der ersten Waschrunde, 4: GLO, Teil B: zweiter Isolierungszyklus (Spuren 5-8)	55
Abbildung 22: Auftrennung von GLO mittels 2D-Gelelektrophorese. Proteincluster sind durch Kreise markiert. M: Marker, 1D: Auftrennung mittels SDS-PAGE, 2D: Auftrennung mittels IEF und SDS-PAGE	60
Abbildung 23: Erhöhung der Trennschärfe des Proteinclusters bei 31-35 kDa durch Verwendung von einem IPG-Gelstreifen mit einem pH-Wert von 3-7. A: 2D-Auftrennung von GLO im pH-Bereich 3-11, B: 2D-Auftrennung von GLO im pH-Bereich 3-7. M: Marker .	62
Abbildung 24: Mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennten und durch Immunfärbung detektierten EBP bzw. GBP in GLO von Chiasamen (PS 1-PS 18), M: Marker, 1D:	

Auftrennung von GLO mittels SDS-PAGE, 2D: Auftrennung von GLO mittels 2D-Gelelektrophorese	63
Abbildung 25: IBs zur Detektion der mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteinspots mit A: kommerziellen Sesamantikörpern (gelbe Pfeile), B: mit Serumpool der Sesamallergiker (orangene Pfeile)	65
Abbildung 26: IBs zur Detektion der mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteinspots mit C: kommerziellen Haselnussantikörpern (schwarze Pfeile), D: mit Serumpool der Haselnussallergiker (grüne Pfeile)	66
Abbildung 27: Färbung von GLO mit Hilfe des Schiffschens Reagenzes nach Auftrennung mittels SDS-PAGE, A: Färbung mit Schiffschem Reagenz, B: Färbung mittels kCF nach Schiffschem Reagenz, M: Marker, 1-5: GLO (5 mg/ml) in zunehmender Konzentration (2, 4, 6, 8, 10 µl).....	73
Abbildung 28: IB nach Hitzebehandlung von GLO mit unterschiedlichen Temperaturen für 15 min. M: Marker, B: GLO unbehandelt, 1: 40 °C, 2: 60 °C, 3: 80 °C, 100 °C.....	74
Abbildung 29: IB nach Filtration und French Press von GLO. M: Marker, B: Blank GLO unbehandelt, 1: filtriert, 2: filtriert und French Press behandelt	75
Abbildung 30: IB nach pH-Veränderung von GLO. M: Marker, B: GLO unbehandelt, 1: pH=6, 2: pH=4, 3: pH=2	76
Abbildung 31: Ermittlung des für die ELISA-Inhibitionstests passenden OD-Werts mit Sesamprotein und Sesamantikörpern.....	78
Abbildung 32: A: Inhibition des OD-Werts in %, B: logarithmische Regression zur Inhibition des OD-Werts, die orangene Linie stellt Inhibition der Sesamproteindetektion dar, die blaue Linie präsentiert die Inhibition der Haselnussproteindetektion	79
Abbildung 33: Immunoblot-Inhibition durch Inkubation der NC-Streifen in (A) kommerziellen Sesamantikörper (SA), (B) kommerziellen Haselnussantikörpern (HA), mit zunehmender GLO-Konzentration (0,05-500 µg/Streifen)	80
Abbildung 34: Veranschaulichende Darstellung zur ELISA-Inhibition und Immunoblot-Inhibition (eigene Darstellung).....	81
Abbildung 35: Anzahl der Chiasamenpeptide, welche eine hohe Sequenzähnlichkeit mit Sequenzen bekannter Allergene in unterschiedlichen Spezies zeigen.	84
Abbildung 36: Alignment der als Peptidsequenzen aus Chiasamen-Vicilin mit bereits bekannten Allergenen, Chiasamenpeptide sind lila markiert. Identische Aminosäuren mit Chiasamen-Sequenzen sind gelb markiert. In Schriftfarbe „rot“ sind veröffentlichte Epitope aus der Epitop-Datenbank IEDB. In Schriftfarbe „blau“ sind prognostizierte Epitope mittels KTAS	86

Abbildung 37: Phylogenetischer Baum der Viciline aus Chiasamen und bereits bekannten Allergenen generiert durch das Tool Phylogeny (http://www.phylogeny.fr). Die Proteinsequenzen wurden der Datenbank NCBI entnommen	87
Abbildung 38: Alignment der als Peptidsequenzen aus Chiasamen-Legumin mit bereits bekannten Allergenen, Chiasamenpeptide sind lila markiert. Identische Aminosäuren mit Chiasamen-Sequenzen sind gelb markiert. In Schriftfarbe „rot“ sind veröffentlichte Epitope aus der Epitop-Datenbank IEDB. In Schriftfarbe „blau“ sind prognostizierte Epitope mittels KTAS.....	89
Abbildung 39: Phylogenetischer Baum der Legumine aus Chiasamen und bereits bekannten Allergenen generiert durch das Tool Phylogeny (http://www.phylogeny.fr). Die Proteinsequenzen wurden der Datenbank NCBI entnommen	90
Abbildung 40: Sequenz-Alignment zwischen Cruciferin aus Raps und Chiasamenpeptiden zum Primer-Entwurf, Primer sind blau markiert (vorwärts: schwarzer Schriftfarbe, rückwärts: rote Schriftfarbe), Chiasamenpeptide sind lila markiert und Sequenzen der zum Primer-Entwurf gewählten Speicherpeptide sind gelb markiert.....	95
Abbildung 41: Gelelektrophoretische Trennung der PCR-Ansätze mit Chiasamen-DNA als PCR-Matrize, M: Marker, B: Blank ohne Chiasamen-DNA, PCR-Ansätze: Ara (Primer aus Arachin Ahy-3 in der Erdnuss), ErV (Primer aus Vicilin in gelber Gauklerblume), ErG (Primer aus Legumin in gelber Gauklerblume), SeLg (Primer aus Legumin im Sesam), SeG1, SeG2, SeG3 (Primer aus 11 Globulin im Sesam), Pri (Primer aus Legumin in Perilla), Bra (Primer aus Cruciferin in Raps), Nic1 und Nic2 (Primer aus 11 Globulin in Virginischem Tabak)....	97
Abbildung 42: Messung der DNA-Konzentration mittels Nanodrop	98
Abbildung 43: präparative Gelelektrophorese des PCR-Produkts ErV, M:Marker, K: Kontrolle, ErV: PCR-Produkt	100
Abbildung 44: Alignment der erhaltenen Chiasamen-Sequenz mit Sequenzen bekannter Allergene (Viciline) und die Lokalisierung möglicher Epitope. Chiasamen-Sequenz ist lila markiert. Identische Aminosäuren sind gelb markiert. Epitope aus der Epitop-Datenbank IEDB sind rot markiert, die mittels Methode KTAS prognostizierte Epitope sind in blau markiert	101
Abbildung 45: Methodenübersicht (Identifizierung und Isolierung der Zielproteine	109
Abbildung 46: Kopplung der Antikörper an die magnetic beads	122
Abbildung 47: DNA-Struktur und Aufbau (Dramiga, 2017)	126
Abbildung 48: Verwendete Proteinmarker bei der Durchführung von SDS-PAGE (Marker 12) und Immunblot (Rainbow-Marker)	152
Abbildung 49: Die bei der Durchführung der IEC- verwendeten Pumpe.....	169
Abbildung 50: DNA-Ladder (100-10000 bp)	176

Abbildung 51: Gradienten zur Berechnung der EAST-Klasse	181
Abbildung 52: Kalibrierfunktion zur Bestimmung des Proteingehaltes.....	183
Abbildung 53: Immunblots detektiert mittels 1: Serum S1 (Projekt Nr.1), 2: kommerziellen Antikörper	183
Abbildung 54: Detektion der IgE-bindenden Proteine in Chiasamen mittels Seren von Haselnussallergikern, rot markierte Nummer sind im Serumpool nicht betrachtet.....	184
Abbildung 55: Chromatogramm der GPC Trennung von GLO, zweite Aufreinigung	192
Abbildung 56: Auftrennung der Fraktionen unter Peak 3 mittels SDS-PAGE	193
Abbildung 57: Fraktionen der chromatographischen Trennung mittels QFF-Säule. Zur Elution wurden verschiedene KCl-Konzentrationen (50-1000 mM) verwendet. M: Marker, DL: Durchlauf, 50-1000: Fraktionen, G: GLO	193
Abbildung 58: Fraktionen der chromatographischen Trennung mittels ANX-Säule. Zur Elution wurden verschiedene KCl-Konzentrationen (50-1000 mM) verwendet. M: Marker, DL: Durchlauf, 50-1000: Fraktionen, G: GLO	194
Abbildung 59: Fraktionen der chromatographischen Trennung mittels QXL-Säule. Zur Elution wurden verschiedene KCl-Konzentrationen (50-1000 mM) verwendet. M: Marker, DL: Durchlauf, 50-1000: Fraktionen, G: GLO	194
Abbildung 60: Fraktionen der chromatographischen Trennung mittels SPFF-Säule. Zur Elution wurden verschiedene KCl-Konzentrationen (50-1000 mM) verwendet. M: Marker, DL: Durchlauf, 50-1000: Fraktionen, G: GLO	195
Abbildung 61: Fraktionen der chromatographischen Trennung mittels SPXL-Säule. Zur Elution wurden verschiedene KCl-Konzentrationen (50-1000 mM) verwendet. M: Marker, DL: Durchlauf, 50-1000: Fraktionen G: GLO	195
Abbildung 62: Fraktionen der chromatographischen Trennung mittels CM-Säule. Zur Elution wurden verschiedene KCl-Konzentrationen (50-1000 mM) verwendet. M: Marker, DL: Durchlauf, 50-1000: Fraktionen, G: GLO	196
Abbildung 63: A1: Zweifachbestimmung mit der 1.Blindprobe (durchgeführt mit nicht gekoppelten magnetic beads), A2: Zweifachbestimmung mit der 2.Blindprobe (durchgeführt mit magnetic beads), B1-4: Vierfachbestimmung mit gekoppelten magnetic beads).....	196
Abbildung 64: Vergleich Fällungsmethoden. M: Marker, IsP-F: Fällung mittels Isopropanol, Meth-F: Fällung mittels Methanol.....	201
Abbildung 65: Auftrennung von GLO mittels 2D-Gelelektrophorese. IPG-Gel-Streifen 3-11, Proteinmenge 450 µg, M: Marker	201

Abbildung 66: Zu hohe Spannung bei der 2D-Elektrophorese bis zu 10000 volt und die Folge als heller Balken, der die Detektion der Proteinspots stört	202
Abbildung 67: Screening der Zielproteine mittels 24cm- IPG-Gelstreifens und anschließende SDS-PAGE und Immunblotting auf vier kleinen SDS-Gelen	203
Abbildung 68: Beispiel für die Darstellung der prognostizierten Epitope in der Proteinsequenz des Sesam-Vicilins mittels der Methode KTAS	227
Abbildung 69: Übersetzung der erhaltenen Amplifikate mittels "EXPASY translate tool"	239

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Proteinfamilien der berühmten Allergene und die dazugehörigen Superfamilien und Lebensmittel	18
Tabelle 2: Eigenschaften der Proteine Legumine und Viciline (Hegenauer R, 1994)	20
Tabelle 3: Konzentrationen der untersuchten Extrakte und deren Verdünnungen	28
Tabelle 4: Zusammenfassung der detektierten Proteinbanden mittels kommerzieller Antikörper	30
Tabelle 5: Detektionshäufigkeit der EBPs bzw. GBPs in Chiasamen, SA: Sesamantikörper, SerS: Serumpool von Sesamallergikern, HA: Haselnussantikörper, SerH: Serumpool von Haselnussallergikern, EA: Erdnussantikörper, D: detektiertbar, ND: nicht detektierbar. Detektion mit Humanseren ist hellgrün markiert und mit Antikörpern gelb markiert	37
Tabelle 6: Detektierte Proteinbanden in Chiasamen untersucht mittels UHPLC-ESI-MS/MS nach 1D-Gelelektrophorese	38
Tabelle 7: Häufig vorkommende Peptide in Proteinbanden des Chiasamen-Extrakts	40
Tabelle 8: Proteinanteile und –Konzentrationen sowie die Extraktionspuffer der Osborne-Fraktionen.....	44
Tabelle 9: Die Peaks der GPC-Trennung	48
Tabelle 10: NCBI-BLAST-Vergleich der durch IAC-MB bzw. 1D-Gelelektrophorese isolierten Peptidsequenzen aus Chiasamen, welche mittels MS-Analyse und De Novo Sequenzierung untersucht wurden.....	56
Tabelle 11: Identifizierung der Proteinbanden mittels der Datenbank NCBI	57
Tabelle 12: Mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennte Proteincluster von GLO	61
Tabelle 13: Mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennte Proteinspots, welche mit Hilfe von kommerziellen Antikörpern sowie Serumpools detektiert wurden.....	64
Tabelle 14: Lokalisierung der Vicilin-Peptide in den vollständigen Sequenzen ähnlicher Viciline aus anderen Spezies. Position im C-Terminus ist grün markiert, Position im N-Terminus ist rot markiert	69
Tabelle 15: Spezies und die entsprechenden Sequenzabschnitte, welche für den Primer-Entwurf ausgewählt wurden, sowie die Sequenzabschnitte der Chiasamenpeptide	94
Tabelle 16: Entworfenen Primer zur Amplifikation von DNA-Sequenzbereiche in der Chiasamen-DNA mittels PCR sowie die entsprechenden Annealing-Temperaturen.....	96
Tabelle 17: PCR-Ansätze, welche Zielbanden aufwiesen und sequenziert werden konnten	98

Tabelle 18: Untersuchung der Sequenzabdeckung und –übereinstimmung der durch nested-PCR erhaltenen Amplifikate mit den ursprünglichen PCR-Sequenzen	99
Tabelle 19: EAST-Klassen und der dazugehörige IgE-Gehalt.....	111
Tabelle 20: Verwendete Chemikalien.....	140
Tabelle 21: Verwendete Geräte.....	143
Tabelle 22: Verwendete Materialien	144
Tabelle 23: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper	144
Tabelle 24: Informationen zu Sesamallergikern, deren Blutseren in dieser Arbeit eingesetzt wurden.....	145
Tabelle 25: Verwendete Blutseren von Haselnussallergikern und die dazugehörigen EAST-Klassen.....	145
Tabelle 26: Im Rahmen dieser Arbeit entworfene Primer	177
Tabelle 27: Entwurf der Primer anhand der Sequenzübereinstimmung zwischen Chiasamenpeptiden und Peptiden bekannter Allergene	178
Tabelle 28: Verwendete Primer für verschachtelte PCR	179
Tabelle 29: Alle in die Tabelle aufgeführten Sequenzen sind unter http://www.uniprot.org zu finden. Die Sequenzübereinstimmung und -ähnlichkeit wurden unter http://blast.ncbi.nlm.nih.gov berechnet, „—“, bedeutet: Sequenz ist nicht vorhanden.....	180
Tabelle 30: EAST-Kalibrierreihe	181
Tabelle 31: berechnete Konzentration der spezifischen IgEs gegen Sesam in Humanseren (1-5)	181
Tabelle 32: Berechnete Konzentration der spezifischen IgEs gegen Haselnuss in Humanseren 1-5.....	182
Tabelle 33: Proteinbestimmung der verwendeten Extrakte	182
Tabelle 34: Sequenzen der Chiasamenpeptide, die nach SDS-PAGE und Immunfärbung detektiert, mittels UHPLC-ESI-MS/MS und De Novo Sequenzierung sequenziert sind.....	185
Tabelle 35: MS-Analyse der mittels Ammoniumsulfat-Fällung isolierten Proteinbanden	192
Tabelle 36: De Novo sequenzierte Peptide nach Isolierung mittels IAC-MB sortiert nach Proteinbanden	197
Tabelle 37: Auswertung der Peptidsequenzen isoliert mittels IAC-MB und sortiert nach Spezies und Proteintyp	199
Tabelle 38: De Novo sequenzierte Peptide nach Isolierung mittels 2D-Gelelektrophorese sortiert nach Proteinbanden und Proteinspots	204

Tabelle 39: Ermittlung der für die ELISA-Inhibitionstests geeigneten Antigen-Konzentration (Sesamprotein)	210
Tabelle 40: Berechnung der ELISA-Inhibition sowie des C₅₀-Werts.....	211
Tabelle 41: Sequenzvergleich der mittels MS-Analyse und De Novo Sequenzierung erhaltenen Peptide mit Peptidsequenzen bekannter Allergene in der FARRP-Datenbank.....	212
Tabelle 42: Auswertung der Peptidsequenzen isoliert mittels 2D-Gelelektrophorese und sortiert nach Spezies und Proteintyp	220
Tabelle 43: Die in dieser Arbeit erhaltenen PCR-Amplifikate und deren nested-PCR-Produkte	238

1. Zusammenfassung /Summary

1.1. Zusammenfassung

Allergie ist eine der häufigsten chronischen Krankheiten in Europa. Mehr als 150 Millionen Menschen leiden bereits unter einer Allergie, davon 7 Millionen unter einer Lebensmittelallergie. Derzeit wird vorausgesagt, dass bis 2025 die Hälfte der gesamten EU-Bevölkerung von einer Allergie betroffen sein wird. Eine der wichtigsten Ursachen für diese Entwicklung ist der drastische Konsumanstieg des funktionalen Lebensmittels (engl. *functional food*) internationalen Ursprungs in Europa wie Lupine, Kichererbse, Sesam und Chiasamen (EAACI, 2015).

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung der IgE- bzw. IgG-bindenden Proteine (EBPs bzw. GBPs) in Chiasamen sowie die Isolierung ausgewählter Zielproteine mit hohem allergenen Potenzial. Des Weiteren sollten das allergene Potenzial sowie die Kreuzreaktivität zwischen Zielproteinen in Chiasamen und bekannten Allergenen in anderen Samen und Nüssen geprüft werden. Zum Schluss sollten mögliche Epitope sowie für die Translation in EBPs bzw. GBPs zuständige Gensequenzen in Chiasamen identifiziert werden.

Zunächst wurden die Zielproteine aus Chiasamen mittels einer Tieftemperaturmethode extrahiert. Diese Methode war für die Zielproteine schonend, sodass sie für weitere Untersuchungen zur Verfügung standen.

Die Identifizierung der Zielproteine erfolgte mittels SDS-PAGE und Immunblot unter Verwendung von kommerziellen Antikörpern, welche gegen Sesam- bzw. Haselnussproteine gerichtet sind, sowie 38 Blutseren von Sesam- bzw. Haselnussallergikern. Anschließend wurden die Proteinbanden mittels UHPLC-ESI-MS/MS gemessen, *De Novo* sequenziert und in der NCBI-Datenbank identifiziert. Der Chiasamen-Extrakt wies ein ähnliches Proteilmuster wie der Sesam und Haselnuss-Extrakt auf. Die Proteinbanden bei einem Molekulargewicht (MG) von 31 und 20 kDa werden als Majorallergene betrachtet, da diese von über 80 % der verwendeten Humansenen detektiert werden konnten. Diese Proteinbanden wurden anhand der NCBI-Datenbank als Legumin identifiziert. Als Intermediärallergene sind Proteinbanden bei 49 und 45 kDa zu bezeichnen, die nur von 20 % bzw. 30 % der Humansenen von Sesam- bzw. Haselnussallergikern erfasst wurden. Diese wurden in der NCBI-Datenbank den Vicilinen zugeordnet. Sowohl die Major- als auch Intermediärallergene konnten auch erfolgreich durch kommerzielle Antikörper detektiert werden.

Zur Isolierung von EBPs bzw. GBPs aus Chiasamen wurden die Proteine zunächst nach Osborne-Fraktionierung in vier Fraktionen (Albumin, Globulin, Prolamin, Glutelin) aufgetrennt. Die Zielproteine konnten nur in der Globulin-Fraktion (GLO) nachgewiesen werden, weshalb

GLO bei weiteren Isolierungsmethoden eingesetzt wurde. Die Methoden der Ammoniumsulfat-Fällung, Gelpermeations-, Ionenaustausch-, Immunaффinitätschromatographie (IAC-MB) sowie 2D-Gelelektrophorese wurden auf ihre Eignung zur Isolierung der Zielproteine untersucht. Die aussagekräftigsten Ergebnisse wurden durch Ammoniumsulfat-Fällung, Immunaффinitätschromatographie sowie 2D-Gelelektrophorese erzielt. So konnten die Zielproteine von Begleitproteinen wie Enzymen spezifisch isoliert werden. Die Selektivität dieser Methoden wurde mittels MS-Analyse und anschließender *De Novo* Sequenzierung überprüft. Durch Ammoniumsulfat-Fällung konnten die Proteinbanden des Vicilins bei 49 und 45 kDa sogar von denen des Legumins bei 31 und 20 kDa abgetrennt werden. IAC-MB und 2D-Gelelektrophorese waren sehr spezifisch, wobei die Anzahl der erfolgreich sequenzierten Peptide durch 2D-Gelelektrophorese deutlich höher war als die durch IAC-MB. Die 49 kDa-Proteinbande präsentiert das Monomer des Vicilins, während die bei 45 kDa als eine durch posttranslationale Modifikation (PTM) entstandene Isoform identifiziert wurde. Ein weiterer Zerfall dieses Monomers wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht beobachtet. Die 31 kDa-Proteinbande repräsentiert die saure α -Untereinheit bzw. Legumin A, während die β -Untereinheit bzw. Legumin B in der 20 kDa-Proteinbande detektiert wurde. Das Monomer des Legumins befindet sich bei 60 kDa und wurde mittels kommerzieller Sesamantikörper (SA) visualisiert. Die mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennten und immunologisch detektierten Proteinspots befinden sich tendenziell im basischen oder neutralen pI-Bereich.

Des Weiteren sind an der IgE- bzw. IgG-Bindungsfähigkeit der Zielproteine keine Zuckerreste beteiligt, da keine Zielproteinbanden nach Spaltung mit Periodat mit Hilfe des Schiffschens Reagenzes gefärbt werden konnten. Das bedeutet, dass die Monomere des Vicilins bzw. Legumins keine Zuckerreste tragen.

Anschließend wurde der Einfluss technologischer Veränderung auf die IgE- bzw. IgG-Bindung der Zielproteine untersucht. Hierbei zeigten EBPs bzw. GBPs eine hohe Hitzestabilität, wobei eine Schwächung der Detektion nach thermischer Behandlung von 100 °C für 15 min beobachtet wurde. Der Druck mittels *French Press* konnte die IgE- bzw. IgG-Bindungsfähigkeit schwächen aber nicht löschen. Nur die Veränderung des pH-Werts konnte die Visualisierung dieser Zielproteine erschweren.

Inhibitionstests bestätigten eine klare Kreuzreaktivität zwischen Chiasamen einerseits und Sesam- bzw. Haselnuss andererseits. GLO konnte sowohl unter nicht reduzierenden als auch reduzierenden Bedingungen stärker mit Sesamprotein als Haselnussprotein konkurrieren. Die Zielproteine in GLO reagierten mit den Sesamallergenen verfügbaren Sesamantikörpern und führten zur stärkeren Inhibition und somit zu einem niedrigeren C_{50} -Wert im Vergleich zum Inhibitionstest mit Haselnussprotein und -Antikörpern. Dies zeigt, dass die Epitope auf Globulinen in Chiasamen ähnlichere Strukturen zu denen auf Sesamallergenen aufweisen als zu denen auf Haselnussallergenen.

Die *De Novo* sequenzierten Peptide wurden in der FARRP-Datenbank mit bekannten Allergensequenzen in Samen und Nüssen verglichen. Sesamallergene zeigten die höchste Sequenzähnlichkeit mit Legumin- bzw. Vicilin-ähnlichen Proteinen aus Chiasamen, gefolgt von Haselnuss-, Mandel- und Pistazienallergenen. Legumin- bzw. Vicilin-ähnliche Proteine aus Chiasamen wiesen eine hohe Sequenzähnlichkeit mit mehreren linearen Epitopen bekannter Allergensequenzen auf, die vermutlich zur Kreuzreaktivität führen könnten. Die höchste Verwandtschaft, basierend auf in dieser Arbeit sequenzierten Chiasamenpeptiden, konnte zwischen Chiasamen und Sesam festgestellt werden, obwohl beide Spezies aus unterschiedlichen Familien, jedoch aus der gleichen Pflanzenordnung (Lamiales) stammen. Die Verwandtschaft mit anderen Spezies konnte anhand des phylogenetischen Baums erfolgreich dargestellt werden.

Anhand der hohen Sequenzhomologie der Chiasamenpeptide mit bekannten allergenen Vicilinen bzw. Leguminen anderer Spezies wurden in den homologen Sequenzbereichen Primer entworfen, welche mit der aus Chiasamen isolierten DNA zur PCR verwendet wurden. Hierbei wurde ein PCR-Produkt (155 bp) erfolgreich amplifiziert und in der NCBI-Datenbank als Vicilin identifiziert. Diese DNA-Sequenz zeigte in der FARRP-Datenbank eine Sequenzhomologie zu 45 bekannten Allergensequenzen. Am stärksten war die Sequenzhomologie zu Vicilin aus Sesam und Walnuss. Darüber hinaus konnte eine weitere Proteinsequenz identifiziert werden, welche eine Übereinstimmung mit dem Gräserpollenallergen (S13, engl. *grass pollen allergen*) aus Bahiagrass aufwies.

1.2. Summary

Allergy is the most common chronic disease in Europe. More than 150 million people already suffer from allergies, 7 million of them from food allergies. It is currently predicted that by 2025 the allergy will affect half of the total EU population. One of the main reasons for this development is the drastic increase in the consumption of functional food with international origins in Europe, such as lupine, chickpea, sesame, and chia seeds (EAACI, 2015).

The aim of this work was the identification and characterization of IgE and IgG binding proteins (EBPs or GBPs) in chia seeds as well as the isolation of selected target proteins with high allergen potential. Furthermore, the allergenic potential and cross-reactivity between target proteins in chia seeds and known allergens in other seeds and nuts have been examined. Finally, possible epitopes, as well as the gene sequences responsible for the translation in EBPs or GBPs in chia seeds, have been identified.

Initially, the target proteins were extracted from chia seeds using a low-temperature method. This method was gentle on the target proteins so that their IgE- or IgG-binding capability was available for further studies.

The target proteins were identified utilizing SDS-PAGE and immunoblotting using commercial antibodies against sesame or hazelnut protein, as well as 38 sera from sesame or hazelnut allergy sufferers. The protein bands were measured using UHPLC-ESI-MS/MS, *De Novo* sequenced and identified with aid of the NCBI database. The chia seed extract showed a similar protein pattern as sesame and hazelnut extract. The protein bands with Molecular Weight (MW) at 31 and 20 kDa are considered to be major allergens, as these could be detected by over 80 % of the sera used. These protein bands were identified as legumin in the NCBI database. Intermediate allergens were protein bands with MW at 49 and 45 kDa, which were only detected by 20 % and 30 % of the sera from the allergy sufferers against sesame and hazelnut protein. These were identified as vicilins of other species in the NCBI database. Both the major and intermediate allergens could also be successfully detected by commercial antibodies used in the frame of this work.

To isolate EBPs or GBPs from chia seeds, the proteins were first separated into four fractions (albumin, globulin, prolamine, glutelin) according to Osborne fractionation. The target proteins could only be detected in the globulin fraction (GLO), which is the reason, why only GLO was used in further isolation methods. The methods of ammonium sulfate precipitation, gel permeation chromatography, ion exchange chromatography, immunoaffinity chromatography, and 2D electrophoresis were checked for their suitability for isolating the target proteins. The most meaningful results were obtained by ammonium sulfate precipitation, immunoaffinity chromatography, and 2D electrophoresis. In this way, the target proteins could be specifically

isolated from accompanying proteins such as enzymes. The selectivity of these methods was checked using MS analysis and subsequent *De Novo* sequencing. The protein bands of vicilin at 49 and 45 kDa could even be separated from those of legumin at 31 and 20 kDa by ammonium sulfate precipitation. IAC-MB and 2D electrophoresis were very specific. However, the number of successfully sequenced peptides by 2D electrophoresis was significantly higher than that by IAC-MB. The 49 kDa protein band represents the vicilin monomer, while the 45 kDa protein band is an isoform produced by post-translational modification (PTM). Further decomposition of this monomer was not observed in the frame of this work. The 31 kDa protein band represents the acidic α -subunit / legumin A, while the β -subunit / legumin B was detected at the 20 kDa protein band. The legumin monomer is approx. at 60 kDa and was visualized using commercial sesame antibodies (SA). The protein spots separated by 2D electrophoresis and detected immunologically tend to be in the basic or neutral pI range.

Furthermore, no sugar residues are involved in the IgE- or IgG-binding capacity of the target proteins, since no target protein band could be stained with Schiff's reagent after cleavage with periodate. This means that the monomers of vicilin or legumin do not contain any sugar residues.

Moreover, the influence of technological changes on the IgE- or IgG-binding of the target proteins was examined. In this case, EBPs and GBPs showed high heat stability, with a weakening of the detection after thermal treatment of 100 °C. for 15 min. The pressure with *French Press* could weaken the IgE- or IgG-binding capability but couldn't delete it. Only changing the pH value could have a high influence on the visualization of these target proteins. Inhibition tests confirmed a clear cross-reactivity between chia seed on the one hand and sesame seed or hazelnut protein on the other. GLO was able to compete for sesame antibodies more strongly with sesame protein than with hazelnut protein under both non-reducing and reducing conditions. GLO reduced the IgG-binding capacity of sesame antibodies to the sesame allergens and led to stronger inhibition, thus to a lower C_{50} value compared to the inhibition test with hazelnut protein and hazelnut antibodies. This shows that the epitopes on globulins in chia seed have more similar structures to those on sesame allergens than on hazelnut allergens.

The *De Novo* sequenced peptides were compared in the FARRP database with known allergen sequences in seeds and nuts. Sesame seed allergens showed the highest sequence similarity with legumin and vicilin of chia seed, followed by hazelnut, almond, and pistachio allergens. Vicilin- and legumin-like proteins from chia seed showed a high sequence identity with several linear epitopes of known allergen sequences, which can presumably lead to cross-reactivity. The strongest relationship, based on the chia seed peptides sequenced in this work, was found out between chia seed and sesame, although both species come from different

families but the same plant order (Lamiales). The relationship between chia seed and other species could be successfully demonstrated using the phylogenetic tree.

Based on the high sequence homology of chia seed peptides with known vicilin or legumin sequences, primers were designed in the homologous sequence regions, which are used for PCR with the DNA isolated from chia seed. A PCR product (155 bp) was successfully amplified, identified as Vicilin in the NCBI database, and showed sequence homology to 45 known allergen sequences. The highest sequence homology was shown with sesame and walnut vicilin. In addition, another protein sequence could be identified which showed a match (202 bp) with S13 grass pollen allergen from Bahia grass.

2. Grundlagen

2.1. Einleitung

Die Versorgung der gesamten Weltbevölkerung mit hochwertigen Lebensmitteln stellt eine der großen Herausforderungen des 21. Jahrhunderts dar. Um die Jahrtausendwende wurden grüne Biotechnologie und Gentechnik als umfassende Lösung in Bezug auf die Nahrungsmittelknappheit gesehen. Heutzutage steigt in der europäischen Bevölkerung der Bedarf an sogenannten funktionellen Lebensmitteln (engl. *functional food*) immer weiter an. Sie werden vom Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) als Lebensmittel definiert, die zusätzlich zu ihrem Nährwert einen gesundheitlichen Nutzen aufweisen (BfR, 2017). Dazu gehören das gesteigerte Wohlbefinden, der verbesserte Gesundheitszustand und sogar die signifikante Verminderung von Krankheitsrisiken. Des Weiteren wird bereits diskutiert, inwieweit sich Nahrungsmittel anderer Kulturkreise, wie z. B. Sesam, Lupinen und Chiasamen, als gegebenenfalls wertvolle Ergänzungen in den heimischen Lebensmittelmarkt integrieren lassen. Chiasamen, welche ihren Ursprung in Mexiko haben, gewannen in den letzten Jahren in der europäischen Bevölkerung aufgrund ihrer wertvollen Eigenschaften aus ernährungsphysiologischer Sicht viel an Bedeutung. Deshalb nimmt die Verwendung von Chiasamen in der Lebensmittelindustrie weiterhin zu. Mittlerweile dürfen in Backwaren, Cerealien sowie in Mischungen aus Früchten, Nüssen und Samen bis zu 10 % Chiasamen verwendet bzw. als vorverpackte Chiasamen in den Verkehr gebracht werden (BfR, 2011). Allerdings hat die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA, engl. *European Food Safety Authority*) die tägliche Verzehrmenge aufgrund der fehlenden Langzeituntersuchungen als Vorsichtsmaßnahme auf 15 g/Tag gedrosselt. Chiasamen werden als neuartiges Lebensmittel (engl. *novel food*) betrachtet und ihr allergenes und toxisches Potenzial muss vor dem Inverkehrbringen sorgfältig geprüft werden (EFSA, 2005).

Die Europäische Akademie für Allergologie und Klinische Immunologie (EAACI, engl. *European Academy of Allergy and Clinical Immunology*) schätzte im Jahr 2013, dass in der Europäischen Union (EU) über 17 Millionen Personen, darunter 3,5 Millionen Kinder, an irgendeiner Form von Lebensmittelallergien leiden (EAACI, 2013). Umso interessanter ist der Umstand, dass die Allergenität der Chiasamen in Europa bislang nur unzureichend untersucht wurde (EFSA, 2009b; EFSA, 2005). Laut EFSA wurde in mehreren Ländern mit einem hohen Konsum an Chiasamen, eine Kreuzreaktivität in Blutseren von Sesam- bzw. Erdnussallergikern festgestellt. Jedoch ist es noch schwer das allergene Potenzial von Chiasamen mit den zur Verfügung stehenden Daten und der verwendeten Methodik zu untersuchen. Deswegen ist ein allergenes Potenzial aufgrund fehlender Studien nicht auszuschließen (EFSA, 2019).

2.2. Chiasamen und ihre Relevanz

Die Pflanze Chia (*Salvia hispanica* L.) aus der Familie der Lippenblütler (*Lamiaceae*) wächst im trockenen und semiariden Klima und hat ihren Ursprung in Mexiko. Dank des hohen Ölgehalts werden Chiasamen in Mesoamerika (umfasst die heutigen Staaten Mexiko, Belize, Guatemala, El Salvador, Honduras, Nicaragua und Costa Rica) häufig als Ölsaat verwendet (Cahill, 2004). Auch bei den Mayas und Azteken haben Chiasamen als Medizin bzw. als Nahrungsergänzungsmittel bei Bedarf an Energie, Ausdauer bzw. Kraft unter extremen Umständen Verwendung gefunden (Weber et al., 1991). Außerdem stand die Pflanze Chia im Einklang mit heiligen Ritualen, indem ihre Samen bei den Mayas den Göttern geschenkt wurden. Dies wurde von den katalonischen Spaniern als ein heidnisches Ritual betrachtet, weshalb der Anbau dieser Pflanze damals verboten wurde. Erst in den frühen 90er-Jahren des vorigen Jahrhunderts nahm eine argentinische Forschungsgruppe in Kooperation mit der Arizona Universität die Forschung über Chiasamen auf. Die Pflanze wird in Mexiko seit Jahrhunderten gezüchtet und ihre Samen werden zur Herstellung von Erfrischungsgetränken eingesetzt (Olivos-Lugo et al., 2010).

Mittlerweile sind Chiasamen in Europa ein bekanntes Nahrungsmittel. Die Samen werden laut europäischer Lebensmittelverordnung als *novel food* bezeichnet, welches aus ernährungsphysiologischer Sicht viele wertvolle Eigenschaften aufweist (Weber et al., 1991). Unter anderem werden der sehr hohe Gehalt an ω -3-Fettsäuren und α -Linolsäure sowie der niedrige Gehalt an gesättigten Fettsäuren, Cholesterin und Transfettsäuren genannt (Ayerza, 2009; HU, 2002; Jin et al., 2012). Weiterhin enthalten Chiasamen hochwertige Proteine, Ballaststoffe, Vitamine, Antioxidantien und Mineralstoffe (Peiretti und GAI, 2009). Deshalb sind Chiasamen laut vieler Studien förderlich für den intestinalen Transit, regulieren den Cholesterin- und Triglyceridspiegel und reduzieren dadurch das Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen (Bemelmans et al., 2002; Ixtania et al., 2011; Poudyal et al., 2012). Die Reduzierung des Risikos von Dyslipidämie und Insulinresistenz, die in Ratten mittels Verzehr einer zuckerreichen Diät (62,5 %) induziert wurden, konnten Chicco et al. (2009) durch die Aufnahme von Chiasamen bestätigen. Des Weiteren finden Chiasamen in der Lebensmittel- und Pharmaindustrie als Verdickungsmittel bzw. Mittel zur Tablettenbeschichtung Anwendung (Muñoz et al., 2012). Beispielsweise werden sie dank ihrer hohen Wasseraufnahme (9- bis 12-fache ihres Gewichtes) als Verdickungsmittel in Backwaren oder zum Binden von veganen Burgern, Spätzle, Pfannkuchen, Waffeln und Kuchen verwendet. Als Ei-Ersatz sind sie auch gut geeignet. Die aus Chiasamen extrahierten phenolischen Verbindungen werden in der Lebensmittelindustrie zur Hemmung von enzymatischer Bräunung, beispielsweise in Obst, eingesetzt. Ein weiterer Nutzen von Chiasamen stellt das Pektin dar, welches in der Regel getrocknet und als Emulgator benutzt wird (Brutsch et al., 2019).

2.3. Definition der Allergie

Der Begriff Allergie stammt aus dem Griechischen und bedeutet abweichend von der Norm (allos=anders und ergon=Reaktion). Wissenschaftler definieren die Allergie als „die spezifische Änderung der Immunitätslage im Sinne einer krankmachenden Überempfindlichkeit gegen normalerweise harmlose und nicht-infektiöse Substanzen“.

In den letzten Jahren nahmen allergische Erkrankungen, vor allem bei Menschen aus Industrienationen, laut verschiedener epidemiologischer Studien immer mehr zu (Andre et al., 1994; Aulepp und Vieths, 1992; Maziak et al., 2003). Allergien gehören zu den wichtigsten Erkrankungen und „großen gesundheitlichen Herausforderungen“ dieses Jahrhunderts (Ring und Schultze-Werninghaus, 2004). Laut Robert-Koch-Institut wird bei jedem Kind bzw. Erwachsenen mindestens einmal im Leben eine Allergie diagnostiziert.

Allergie bedeutet, dass das Immunsystem beim Kontakt mit an sich harmlosen Stoffen in der Umwelt diese als gefährlich einstuft und somit klinische Überreaktionen einsetzt. Diese Stoffe stellen selbst keine Pathogene dar und lösen im gesunden menschlichen Körper keine allergische Reaktion aus. Sie werden als Antigene bezeichnet und können im menschlichen Körper durch Inhalation (Gras, Schimmelpilzsporen und Baumpollen), Injektion (Insektengifte, Impfstoffe), Verdauung (Nahrungsmittel und Drogen) bzw. Hautkontakt (Pflanzenblätter, Metalle und Chemikalien) aufgenommen werden (Crespo und Rodriguez, 2003).

Antigene sind nach ihrem Eindringen in einen Organismus in der Lage, die Produktion spezifischer Antikörper (Aktivierung von B-Lymphozyten) oder eine spezifische Immunantwort (Aktivierung von T-Lymphozyten) auszulösen. Bei Antigenen handelt es sich um Proteine, aber auch Glycoproteine und Saccharide können sich an der allergischen Reaktion beteiligen. Antikörper sind Substanzen, die von B-Lymphozyten gebildet werden und spezifisch an die entsprechenden Antigene binden. Die Antigen-Antikörper-Reaktion ist im Gegensatz zu anderen allergischen Reaktionen hochspezifisch. Verursacht ein Antigen in einem sensibilisierten Organismus eine allergische Reaktion, wird dieses als Allergen bezeichnet. Allergene sind Proteine oder Glycoproteine, die ein Molekulargewicht (MG) von 10 bis 70 kDa aufweisen. Um eine allergische Reaktion auslösen zu können, muss das Allergen eine Mindestgröße von ca. 10 kDa besitzen. Peptide mit MG kleiner als 10 kDa können nach Bindung an ein anderes Protein als Trägermolekül-Allergen wirken und werden als Haptene bezeichnet (Aulepp und Vieths, 1992). Verfügen zwei Allergene über die gleiche biologische Funktion und weisen eine Sequenzhomologie von mindestens 67 % auf, werden sie als Isoallergene bezeichnet (King et al., 1994). Außerdem wird zwischen Haupt- und Nebenallergenen unterschieden. Ein Hauptallergen bindet Immunglobulin E (IgE)-Antikörper von mindestens 50 % der Humanseren von mehr als 50 Allergikern. Alle anderen Allergene werden als Nebenallergene bezeichnet (Dreborg et al., 1994).

Unter dem Begriff Epitop oder Determinante versteht man den Bereich eines Allergens, an den ein Antikörper bindet. Allergene können mehrere Epitope tragen, die entweder Sequenz- bzw. Konformationsepitope sind. Während Sequenzepitope von der Aminosäuresequenz (Primärstruktur der Proteine) abhängen, basieren die Konformationsepitope auf der Sekundär, Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine (Biedermann et al., 2016a).

Antikörper sind Substanzen, die von B-Lymphozyten gebildet werden und spezifisch an die entsprechenden Antigene binden. Ein Antikörper besteht aus zwei identischen leichten und zwei schweren Polypeptidketten, welche durch Disulfidbrücken verbunden sind. So entstehen drei Fragmente, nämlich ein kristallisierbares Fragment (FC, engl. *Fragment Crystalizable*) und zwei Antigen bindende Fragmente (Fab, engl. *Fragment Antigen Binding*). Die Darstellung des Antikörpers ist in Abbildung 1 zu sehen. Im menschlichen Körper sind fünf verschiedene Immunglobulin (Ig)-Klassen, IgG, IgA, IgM, IgD und IgE vorhanden, die sich hinsichtlich Größe, elektrischer Ladung, Aminosäuresequenz und Kohlenhydratanteil unterscheiden. Ihre jeweilige Spezifität hängt mit der unterschiedlichen Sequenz der antigenbindenden Bereiche zusammen. Die nicht antigenbindenden Bereiche (konstante Regionen) besitzen die gleiche Aminosäuresequenz und bestimmen die Funktionalität des Antikörpers (Janeway, 1993; Klein, 1991; Roitt, 1993).

Die Funktionen der einzelnen Ig-Klassen sind unterschiedlich. Während IgG durch Anlagerung an Zellen Angriffe von phagozytierenden Zellen ermöglicht, kann IgM dagegen die Antigene binden und agglutinieren. IgA ist an der Abwehr von Bakterien und Viren in der Mukosa beteiligt und erleichtert die Eliminierung über mukoziliäre Ausscheidung. IgD ist im Verdauungssystem zu finden, aber seine genaue Funktion ist noch nicht bekannt (Horton und Vidarsson, 2013). IgE ist zum einen für die intestinale Parasitenabwehr bedeutend und zum anderen das Schlüsselmolekül der Typ I-Allergie, welches an der Pathogenese IgE-vermittelter Nahrungsmittelallergien beteiligt ist (Kreft et al., 1995).

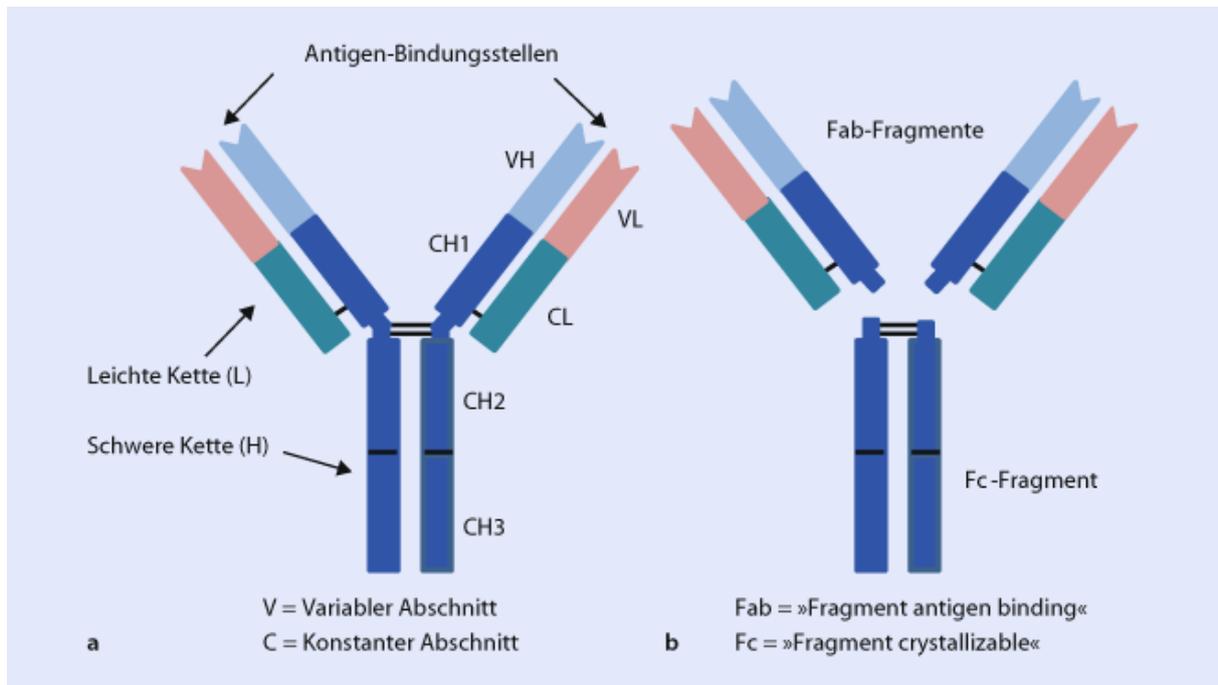


Abbildung 1: Aufbau eines Ig-Antikörpers (Little, 2015)

Die Symptome fallen bei einer Allergie unterschiedlich stark aus. Dabei sind bestimmte Organsysteme, wie z.B. die Haut (Urtikaria und Hautausschlag), die Atemwege (Husten, Keuchen und Niesen), oder der Verdauungstrakt (Übelkeit, Krämpfe, Durchfall und Erbrechen) betroffen. Sie können auch generalisiert in fast allen Organsystemen gleichzeitig auftreten. Hier spricht man von einem anaphylaktischen Schock (Wolbing und Biedermann, 2013).

Am Auslösen der Allergie sind viele Einflussfaktoren beteiligt, die sich in zwei Kategorien unterteilen lassen. Patientenbezogene Einflussfaktoren stellen die erste Kategorie dar, welche die Genetik, das Alter, das Geschlecht und die Art des Aufnehmens und des Prozessierens eines Allergens umfassen. Die Allergie kann also genetisch bedingt sein. In diesem Fall spricht man von Atopie. Darunter versteht man die Neigung eines Individuums mit Überempfindlichkeitsreaktionen auf den Kontakt mit harmlosen Substanzen zu reagieren. Eine weitere Kategorie wird von umweltbedingten Einflussfaktoren repräsentiert, zu denen beispielweise die Allergenstruktur, die Allergenexposition und die Umweltverschmutzung gehören. Inzwischen leidet fast ein Drittel der Bevölkerung in den Industrieländern unter atopischen Allergien mit steigender Tendenz (Ring et al., 2001).

Dies deutet auf veränderte Lebensgewohnheiten der Bevölkerung und die Umweltverschmutzung mit komplexen Substanzen hin. Darunter fallen neue Chemikalien im beruflichen Alltag und Haushalt (Schnuch et al., 2004). Neben Allergenen, welche die Allergie sofort auslösen können, spielen Synergie-Effekte aus einer Kombination verschiedener Stoffe eine große Rolle. Diese Stoffe können alleine keine Allergie auslösen, zusammen aber allergiefördernd wirken (Salazar et al., 2013). Darüber hinaus könnten bestimmte

Luftschadstoffe wie Stickstoffdioxid, Ozon, Schwefeldioxid und Tabakrauch bei Patienten ausgeprägte allergische Reaktionen hervorrufen oder sogar mit einem erhöhten Asthmarisiko assoziiert sein (Breton et al., 2009).

2.4. Einteilung und Pathogenese allergischer Reaktionen

Von Coombs und Gell (1963) stammt die „klassische“ Einteilung der diversen allergischen Symptome in 4 Allergietypen (siehe Abbildung 2), die sich in ihrem Mechanismus unterscheiden und heutzutage um zwei weitere Reaktionstypen erweitert werden (DocCheck, 2019).

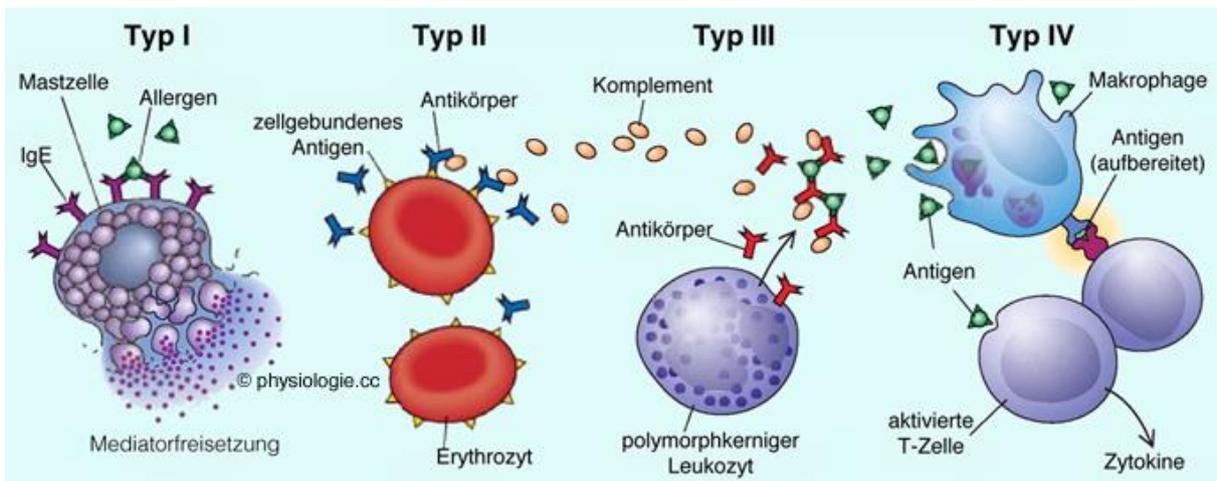


Abbildung 2: Typen der Überempfindlichkeitsreaktionen (Hinghofer-Szalkay, 2019)

Typ I (Soforttyp): Bei den meisten Lebensmittelallergien (bis zu 90 %) liegt der Pathomechanismus der Überempfindlichkeit vom Soforttyp zu Grunde (Kreft et al., 1995). Da in der präsentierten Arbeit ausschließlich die Lebensmittelallergie im Vordergrund steht, wird nur auf den Mechanismus der Typ-I-Allergie eingegangen.

Weitere Beispiele für solche allergische Reaktionen sind allergische Rhinitis, Asthma und systemische Anaphylaxie. Allergie-Typ I beruht auf einer IgE-vermittelten Immunantwort, welche zur schnellen Freisetzung von Entzündungsmediatoren führt. Neben milden Symptomen wie Rötung, Schwellung, Juckreiz oder gastrointestinalen Störungen, kann der Soforttyp einen anaphylaktischen Schock verursachen.

Der Pathomechanismus der Typ I-Allergie wird in zwei Abschnitte unterteilt:

Vor dem ersten Auftreten klinischer Symptome findet die Sensibilisierungsphase statt, in der ein Eindringen der Antigene über die Schleimhäute in den Körper vorausgesetzt ist (Abbildung 3). Da die Antigene in geringer Dosis vorliegen, werden sie von Abwehrzellen, Makrophagen und dendritischen Zellen, sowie B-Lymphozyten angegriffen und in kleine Peptide proteolytisch abgebaut. Diese werden durch das Haupthistokompatibilitätskomplex

(MHC, engl. *Major-Histocompatibility Complex*) Klasse II- Moleküle auf der Zelloberfläche präsentiert. An diese Strukturen (MHC II) der dendritischen Zellen docken native T-Lymphozyten (CD4⁺-T-Zellen) mit ihrem spezifischen T-Zell-Rezeptor an und werden somit zu T-Helferzellen aktiviert. Die T-Helferzellen schütten Zytokine aus und alarmieren damit das Immunsystem (Barral und Brenner, 2007).

Weitere Aufgabe der T-Helferzellen ist die Aktivierung der B-Lymphozyten. Native B-Lymphozyten (CD4⁺-B-Zellen) können durch ihre spezifischen Rezeptoren (BCR, engl. *B-Cell Receptor*) an MHC II der dendritischen Zellen andocken und werden somit unvollständig aktiviert. Spezifische Peptide des Allergens können auch an der Oberfläche der unvollständig aktivierten B-Lymphozyten über MHC II präsentiert werden. Bindet ein Rezeptor der T-Helferzellen an dem präsentierten Antigen der B-Lymphozyten, schütten die T-Helferzellen Interleukin-4, Interleukin-5 und Interleukin-13 aus, welche die Ausreifung der B-Zellen zu IgE-produzierenden Plasmazellen induzieren (von Garnier et al., 2005). Die Letzten klonieren sich und produzieren IgE-Antikörper in großen Mengen (>2000 IgEs/s). Die IgEs dienen zum einen der Befestigung des Allergens und zum anderen seiner Opsonierung, wodurch das Allergen von Makrophagen schneller erkannt und angegriffen wird. Die IgE-Antikörper werden zu zellständigen Antikörpern, indem sie an ihre Rezeptoren, insbesondere die hochaffinen IgE-Rezeptoren Fc ϵ RI auf basophilen Granulozyten und Mastzellen binden (Janeway et al., 2002).

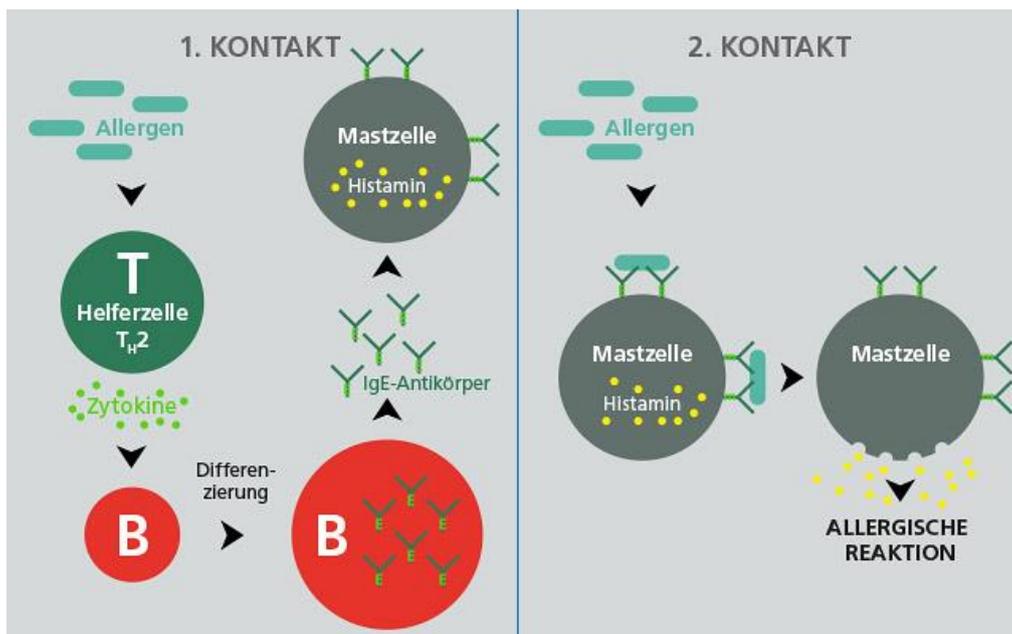


Abbildung 3: allergische Reaktion Typ I (Soforttyp) (Dermapharm, 2019)

Kommt es erneut zu einem Allergenkontakt, startet die zweite Phase mit der unmittelbaren Bindung der Allergene an die zellständigen Antikörper. Dies führt zur Degranulierung der Zellen mit massiver Freisetzung von Entzündungsmediatoren, wie Prostaglandine, Leukotriene

und Histamin, welche die klinischen Symptome der Lebensmittelallergie auslösen. Außerdem dringen sie in die Blutgefäße ein und fördern die Bildung von Adhäsionsmolekülen, die sich auf Mediatoren und auf der inneren Zellschicht der Gefäße platzieren. Infolgedessen werden sowohl die Haftung der Immunzellen an die Endothelzellen als auch ihre Diffusion in das umliegende Gewebe erhöht (Lichtenstein, 1993). Besitzen die Allergiker eine hohe Bereitschaft, eine allergische Reaktion vom Typ I zu entwickeln, werden sie als atopisch bezeichnet (Novak und Bieber, 2003).

Typische Beispiele für diesen Allergie-Typ sind unter anderem. allergische Rhinokonjunktivitis, allergische Rhinitis (Heuschnupfen), allergische Konjunktivitis, Urtikaria, Insektengiftallergie und allergisches Asthma.

Typ II: Hier entsteht eine zellständige zytotoxische Reaktion, bei der die Antikörper IgG oder IgM beteiligt sind. Diese reagieren mit den sich auf der Oberfläche körpereigener Zellen befindenden Antigenen und führen zur zytotoxischen Aktion von Killerzellen oder zur komplementvermittelten Lyse der Zellen (Blutzellen bei Transfusion von Blut einer nicht passenden Blutgruppe).

Typ III: Schwer lösliche Immunkomplexe werden hier aus Antikörpern der IgG- oder IgM-Klasse und einem löslichen Antigen gebildet. Solche Komplexe lagern sich im Gewebe ab und werden an die Blutgefäßwand angebunden, wodurch das Komplementsystem aktiviert wird. Die Folgen können persistierende Infektionen, autoimmune Immunkomplexerkrankungen oder lokale Schädigungen sein.

Typ IV: Zellvermittelte Reaktionen, die durch bestimmte, spezifisch sensibilisierte Immunzellen (T-Lymphozyten) vermittelt werden. Diese Zellen reagieren direkt mit dem Antigen und rufen eine Aktivierung des Immunsystems hervor.

Typ V: eine neu vorgeschlagene Reaktion, die nach einer Injektion von Fremdsubstanzen auftreten kann.

Typ VI: Immunreaktionen, die durch spezifische Antikörperwirkungen entstehen. Eine Signalkaskade wird angestoßen, ohne dass es zur Entzündung kommt. Die Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse sind ein wichtiges Beispiel (Antikörper gegen Azetylcholinrezeptoren).

2.5. Lebensmittelallergien

Der Anteil der Lebensmittelallergiker wird auf circa fünf Prozent der Bevölkerung geschätzt (Klimek et al., 2019).

Der Lebensmittelallergie (LMA) liegt meistens die Typ I (Soforttyp)-Reaktion zugrunde. Sie wird als eine individuelle Erkrankung beschrieben. Deshalb variieren die Ausprägung sowie die Intensität ihrer Symptomatik sehr stark und sind nicht auf bestimmte Organe begrenzt (Pastorello et al., 2003). Die häufigsten Symptome äußern sich an Schleimhäuten von Auge und Nase (Anschwellen, Rötung, Juckreiz), Bronchien (Asthma bronchiale), und Magen-Darm (Diarrhoe, Blähungen, Erbrechen) sowie auf der Haut (Urtikaria). Bei schweren allergischen Reaktionen kann das Herz-Kreislauf-System betroffen sein, was zu einem anaphylaktischen Schock führen kann (Brostoff, 1987). Sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen tritt eine LMA oft verbunden mit Asthma auf (Boyce et al., 2011). Die häufigsten Allergieauslöser weltweit sind Erdnüsse, Baumnüsse, Eier, Fisch, Milch, Weizen, Soja und Krustentiere. In Europa sind Sellerie, Senf, Sesam, Lupinen und Meeresfrüchte hinsichtlich der LMA von Bedeutung (Boyce et al., 2011; Burks et al., 2012). Laut epidemiologischer Studien tritt eine LMA in den beiden ersten Lebensjahren am häufigsten auf und nimmt mit steigendem Alter ab. Oft verschwindet die in der frühen Kindheit aufgetretene LMA spontan bis zum Alter von 5-6 Jahren wieder, wobei es hier jedoch Unterschiede je nach Art des Lebensmittels gibt (Wang und Sampson, 2007). Betroffen von LMA sind ca. 4-6 % der Kinder und 1-2 % der Erwachsenen (Rona et al., 2007; Young et al., 1994; Zuidmeer et al., 2008). Allerdings sind epidemiologische Studien nicht immer zuverlässig, weil sie nicht immer sichere Angaben zur Prävalenz von LMA liefern. Laut einer Metaanalyse von Daten aus 42 Studien der Jahre 2002-2012 zur Prävalenz von LMA in Europa tritt eine Kuhmilch- und Ei-Allergie häufiger bei Kindern als bei älteren Menschen auf. Allergien gegen Nüsse, Fisch und Meeresfrüchte wurden fast ausschließlich bei Erwachsenen festgestellt. In Bezug auf Soja- und Weizenallergie konnte kein klarer Zusammenhang mit dem Alter festgestellt werden. Generell sind Nordeuropäer von LMA mehr betroffen als Südeuropäer, wobei die Ursachen unklar sind (Nwaru et al., 2014).

Die Lebensmittelallergien können anhand ihres differenzierten Sensibilisierungsweges in drei Typen untergliedert werden (Schnyder und Pichler, 1999):

Der Typ A lässt sich bei Kindern unter 3 Jahren beobachten, da ihr Immunsystem, speziell ihre orale Toleranz noch nicht vollständig entwickelt ist. Darauffolgend wirken hitzestabile, gegen enzymatischen Abbau resistente Proteine wie Milch- und Hühnereiproteine, aber auch Erdnüsse auf ihren Gastrointestinaltrakt sensibilisierend. Nach der vollständigen Entwicklung ihres Immunsystems klingen die ersten Allergien, z.B. gegen Milch, oftmals ab.

Der Typ B tritt bei älteren Kindern, Jugendlichen und Erwachsenen auf, wobei die Sensibilisierungsphase mittels inhalativer Allergene z.B. Baumpollen (Bet v 1 von Birke oder

Hasel) verursacht wird. Durch kreuzreaktive Allergene in Lebensmitteln wie z.B. Bet v 1-homologe Proteine in Obst, Gemüse und Nüssen kann eine Lebensmittelallergie ausgelöst werden. Dabei reagieren die Mastzellen auf ähnliche Epitope der Proteine in Lebensmitteln und setzen ihre Mediatoren frei.

Von Typ C ist fast ausschließlich die erwachsene Bevölkerung mit einem vollständig entwickelten Immunsystem betroffen. Hierbei findet eine direkte Sensibilisierung über den Gastrointestinaltrakt statt, nachdem das Lebensmittel als Allergen erkannt wird. Solche Allergene sind häufig hitzestabil oder besitzen eine Stabilität gegen enzymatischen Abbau.

2.6. Durch Kreuzreaktivität induzierte Chiasamenallergie

Lebensmittelallergien, die durch immunologische Kreuzreaktionen hervorgerufen werden, werden als sekundäre oder assoziierte „Lebensmittelallergien“ bezeichnet. Das bedeutet, verschiedene Antigene besitzen ähnliche Epitope und können somit am selben Antikörper binden. Jedoch muss die Affinität des IgE-Moleküls zu jenem Allergen am höchsten sein, sodass die IgE-Synthese durch das Immunsystem bzw. die Freisetzung von Mediatoren verursacht wird. Kreuzreaktionen können aus verschiedenen Gründen stattfinden. Sowohl die hohe Homologie zweier Aminosäuresequenzen (in Primärstruktur) als auch die strukturelle Homologie der Allergene (in Sekundär- bzw. Tertiärstrukturen) stellen die wichtigsten Ursachen der Kreuzreaktivität unter Allergenen dar. Räumliche Epitope der Tertiärstrukturen sind für die IgE-Bindung von Bedeutung (Stadler, 2004).

Außerdem sind viele Allergene Glycoproteine, die Oligosaccharidketten besitzen. Diese sind an die Proteinteile des Allergens gebunden und zeigen komplexe Strukturen. Bestehen ein oder mehrere Epitope des Allergens teilweise bzw. vollständig aus diesen Oligosaccharidketten, kann eine strukturelle Homologie solcher zu einer breiten Kreuzreaktivität führen. Diese Epitope werden kreuzreaktive Kohlenhydrat-Determinanten (CCD, engl. *Cross-reactive Carbohydrat Determinants*) genannt. Sie können wie Epitope, die sich aus Proteinen zusammensetzen, Antikörper binden und IgE-Synthese beim Menschen induzieren (Altmann, 2007).

Kreuzreaktionen mittels inhalativer Allergene (Typ B-Allergie) stellen die häufigste Ursache für LMA dar. Dies liegt beispielsweise an der hohen Sequenzhomologie der linearen Epitope (57-79 %) zwischen Bet v 1 von Birke mit diversen Lebensmittelallergenen wie Mal d 1 aus Apfel, Pru av 1 aus Kirsche, Cor a 1 aus Hazelnuss, Api g 1 aus Sellerie, Dau c 1 aus Karotte oder Gly m 4 aus Sojabohne (Henzgen et al., 2005).

Allerdings ist eine Typ-C-Allergie nicht zu unterschätzen, da sie mit einer Anaphylaxiegefahr verbunden ist. Eine Kreuzallergie innerhalb bestimmter Proteinfamilien, wie z. B.

Speicherproteine, ist nicht unmöglich, da diese sequenzielle bzw. strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen (Dunwell et al., 2004).

Jedoch hängt die Wahrscheinlichkeit solcher Kreuzallergien von der Lebensmittelgruppe ab. So sind Kreuzreaktionen unter Hülsenfrüchten (z.B. Reaktionen auf Bohnen oder Erbsen bei Erdnussallergikern) selten, während eine Allergie gegen Nüsse oder Krustentiere meist auf verschiedene Arten weit verbreitet ist (Burks et al., 2012).

Laut einer Studie wurde bei einem Allergiker gegen Speicherproteine in Zitronen-, Orangen- und Mandarinensamen eine Kreuzallergie gegen Erdnuss und andere Nüsse wie Haselnuss, Macadamianuss, Paranuss, Pinien und Mandeln festgestellt. Dies bestätigt weiterhin die hohe sequenzielle bzw. strukturelle Homologie unter Speicherproteinen (Glaspole et al., 2007). Chiasamen enthalten auch Speicherproteine wie z. B. 11S-Globuline (auch bekannt als Conglutin, Legumin und Glycinin), 7S-Globuline (auch bekannt als β -Conglutin, Vicilin, Convicilin), 7S-basische Globuline (auch bekannt als γ -Conglutin) und 2S schwefelreiche Globuline (auch bekannt als δ -Conglutin). Sandoval-Oliveros und Paredes-Lopez (2013) publizierten eine allgemeine Analyse zur Zusammensetzung von Chiasamen, die zeigt, dass enthaltene Speicherproteine eine hohe Homologie zu diesen in Sesam aufweisen. Eine andere noch nicht veröffentlichte Studie, welche mit 30 Blutseren von Lebensmittelallergikern durchgeführt wurde, konnte eine IgE-Bindung zum Chiasamenprotein bei Erdnuss- und Nussallergikern feststellen. Die positive IgE-Bindung war einerseits unterschiedlich stark, andererseits sehr spezifisch. Des Weiteren wurde ein Pricktest mit dem Chiasamenprotein bei diversen Lebensmittelallergikern durchgeführt. Eine positive Reaktion zum Chiasamenprotein konnte bei zwei Sesamallergikern beobachtet werden. Allerdings müssen die Ergebnisse solcher Studien validiert werden, um den Chiasamen allergische Reaktionen zuschreiben zu können (EFSA, 2009b). Außerdem gibt es in der Literatur bisher nur zwei Humanstudien, die eine IgE-vermittelte Reaktion von Chiasamen bestätigen konnten (Garcia Jimenez et al., 2015; Tomas-Perez et al., 2018). Jedoch wurden einige Studien mit allergischer Reaktion auf Pflanzen derselben Familie (*Lamiaceae*) veröffentlicht. So wurde von Symptomen wie Anaphylaxie durch ein in Zahnpasta enthaltenes Menthol, Kontaktdermatitis durch den Pflanzenextrakt von *Salvia officinalis* in kosmetischen Produkten bzw. systematische allergische Reaktion durch die Einnahme von Oregano und Thymian, berichtet (Benito et al., 1996; Mayer et al., 2011; Paiva et al., 2010). Laut individueller Angaben einiger europäischer und amerikanischer Verbraucher haben Chiasamen Symptome einer allergischen Reaktion hervorgerufen. So berichten manche Verbraucher bei einem erhöhten Verzehr von Chiasamen über Symptome wie z.B. tränende Augen, Ausschläge der Haut oder sogar Nesselsucht. Des Weiteren wurden bei manchen Verbrauchern gastrointestinale Nebenwirkungen, wie Blähungen oder Durchfall, beobachtet, während Asthma oder Zungenschwellungen sehr selten vorkamen. Obwohl die wissenschaftliche Bewertung solcher Angaben noch umstritten

ist, fällt es auf, dass solche Symptome bei Menschen auftreten, welche die empfohlene Verzehrmenge von 15 g/Tag überschritten haben. Des Weiteren berichtete BfR, dass Chiasamen bei Allergikern gegen Rosmarin, Thymian, Senf oder Salbei allergische Reaktionen hervorrufen könnten (BfR, 2019). Deshalb empfiehlt EFSA, dass Chiasamen (*Salvia hispanica* L.) mit relevanten Allergenen gekennzeichnet werden sollen (EFSA, 2009a).

2.7. Klassifizierung von Lebensmittelallergenen

Generell können Allergene acht Superfamilien zugeordnet werden, in denen sie sich durch ihren unterschiedlichen Ursprung unterscheiden. Beispielsweise kommen allergene Cupine und Prolamine nur in Pflanzen vor, während allergene Tropomyosine und Lipocaline nur in Tieren und Insekten zu finden sind. Ferner werden Superfamilien in Proteinfamilien untergliedert. Dabei ist zu bemerken, dass Allergene nur in wenigen Proteinfamilien vertreten sind, die bestimmte Proteinarchitekturen aufweisen. Warum nur einige wenige Vertreter dieser Proteinarchitekturen Allergien induzieren können, ist bis heute nicht abschließend geklärt. Weder auf der Ebene der Primärstruktur noch der Sekundär- oder Tertiärstrukturen konnten Besonderheiten festgestellt werden, die Allergene von normalen Proteinen unterscheiden (Biedermann et al., 2016b).

Die bisher identifizierten Allergene können ca. 30 Proteinfamilien zugeordnet werden (Biedermann et al., 2016b). Lebensmittelallergene pflanzlicher Herkunft werden Panallergene genannt und nur in fünf Proteinfamilien gefunden. Diese wiederum stammen aus vier unterschiedlichen Superfamilien (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Proteinfamilien der berühmten Allergene und die dazugehörigen Superfamilien und Lebensmittel

Proteinfamilie	Superfamilie	Zugehöriges Lebensmittel
PR (engl. <i>Pathogenesis-Related</i>)-10-Proteine (Bet v 1-Homologe)	Superfamilie Bet v 1-ähnlicher Proteine	z. B. Apfel, Haselnuss, Karotte
PR-14-Proteine (Lipidtransferproteine)	Prolamin-Superfamilie	z. B. Pfirsich, Apfel, Kirsche, Haselnuss
Speicherproteine-2S-Albumine	Prolamin-Superfamilie	Kerne, Nüsse, Samen wie z. B. Erdnüsse, Sojabohne, Baumnüsse, Getreide
Glykoproteine (Kohlenhydratseitenketten)	Prolamin-Superfamilie	z. B. Sellerie, Tomate, Zucchini
Profiline (Bet v 2-Homologe)	Superfamilie der profilinähnlichen Proteine	z. B. Zitrusfrüchte, Melone, Banane, Tomate
Speicherproteine-7S/11S-Globuline	Cupin-Superfamilie	Kerne, Nüsse, Samen, z. B. Erdnüsse, Sojabohne, Baumnüsse, Getreide

Allergene derselben Superfamilie weisen sowohl ähnliche Strukturen als auch einheitliche physikalische und chemische Eigenschaften auf. So zeigen die Proteine der Cupin-Superfamilie die charakteristische β -Fass-Struktur, während das konservierte Cysteinskelett ein besonderes Merkmal für Proteine aus der Porlamin-Superfamilie darstellt.

Im Rahmen dieser Arbeit wird ausschließlich auf die Cupin-Superfamilie eingegangen.

2.7.1. Cupin-Superfamilie

Die Mitglieder dieser Superfamilie haben alle eine oder mehrere Cupindomänen, welche eine charakteristische β -Fassstruktur (lat. Cupa= Fass) aufweisen. Entstanden sind diese in einem prokaryontischen Organismus, wodurch sie ihren Eingang ins Pflanzenreich gefunden haben (Dunwell et al., 2004). Darüber hinaus werden sie während der Samenbildung produziert und gespeichert. Außerdem besitzen sie zahlreiche biologische Funktionen, wie z.B. die Bindung von Saccharose, Sporulationsproteine in Schleimpilzen, die Enzymaktivierung von Germinen, bei denen in der Cupindomänen Manganionen gebunden werden, oder als Stickstoffquelle während der Keimung (Radauer und Breiteneder, 2007; Willison et al., 2014). Ihre Löslichkeit in verschiedenen Salzlösungen und ihre Säure- und Hitzestabilität zeichnen sie aus. Bei Blütenpflanzen wurde die Cupindomäne verdoppelt, wodurch die Bicupin-Globuline, Samenspeicherproteine vom Typ 7S (Viciline) und 11S (Legumine) entstanden sind. Das S steht für den Sedimentationskoeffizienten und dient als Nomenklatur für diese Globuline. Sie wurden außerdem nach den Quellen (Viciace und Leguminosae) benannt, in denen sie zum ersten Mal entdeckt wurden (Dunwell et al., 2004).

7S-Globuline bekommen in anderen Familien andere Namen wie Vicilin-ähnliche Proteine (engl. *vicilin-like proteins*) aus grünen Bohnen (*Phaseolus vulgaris*) oder β -conglycinin aus Sojabohnen (*Glycine max*). Das gleiche gilt für 11-Globuline als Legumin-ähnliche Proteine (engl. *legumin-like proteins*), als Glycinin in der Sojabohne oder als Crusiferin im Kohl (*Brassica*) (Derbyshire et al., 1976).

Ferner ist es bekannt, dass solche Proteine eine hohe Sequenzhomologie untereinander aufzeigen und die Hauptallergene der Erdnüsse, Baumnüsse und anderer Samen darstellen. Beispielsweise weist das Vicilin aus Sesam (Ses i 3) eine Sequenzidentität von 33-55 % und Sequenzähnlichkeit von 54-74 % zu verschiedenen Vicilinen aus Nüssen und anderen Samen auf (siehe Tabelle 29 im Anhang unter 9.2.1.). Der Sequenzvergleich wurde mittels der Suchmaschine NCBI-BLAST, basierend auf der Datenbank NCBI (engl. *National Center for Biotechnology Information*), durchgeführt.

Da die Proteintypen Vicilin und Legumin die meisten Lebensmittelallergene vertreten, wird im Rahmen dieser Arbeit hauptsächlich auf diese eingegangen. In Tabelle 2 sind ein paar wichtige Eigenschaften dieser beiden Globuline dargestellt (Hegenauer R, 1994). Legumine und

Viciline denaturieren bei einer Temperatur über 70 °C und bilden dabei Aggregate, die ihre Sekundärstruktur beibehalten können (Mills et al., 2001; Mills et al., 2003).

Tabelle 2: Eigenschaften der Proteine Legumine und Viciline (Hegenauer R, 1994)

Eigenschaften	Legumin 11S	Vicilin 7S
Löslichkeit in verdünnten Salzlösungen	Weniger löslich	Besser löslich
Temperaturbeständigkeit von Lösungen	Beständig bei 95 °C	Präzipitiert bei 95 °C
N- Gehalt	Höher (etwa 18 %)	Niedriger (etwa 17.4 %)
S- Gehalt	Höher (etwa 0.42 %)	Niedriger (etwa 0.18 %)
Tryptophangehalt	Höher	Niedriger
Sedimentationskoeffizient	11- 12 S	Etwa 7 S
Molekulargewicht (MG)	300 - 400 kDa	50 - 200 kDa
Proteinnatur	Holoprotein	Glycoprotein
Disulfidbrücken	Oft vorhanden	Keine
Assoziation der Polypeptide oder monomeren Proteine	Tri- und Hexamere	Tri- und Hexamere

2.7.2. Legumine

Legumine sind 11S-Globuline, deren Untereinheiten von Multigenfamilien kodiert werden, wobei jede Untereinheit noch posttranslational in einen sauren und einen basischen Teil gespalten wird. Diese werden durch eine Disulfidbrücke zusammengehalten. Folglich wird das Protein Legumin als heterohexameres Gesamtprotein (Holoprotein) betrachtet, das aus 6 polymorphen Untereinheiten mit einem MG von 320-400 kDa besteht (Jung et al., 1998; Muntz, 1998). Sie werden in den Samen vieler einkeim- und zweikeimblättriger Pflanzen gefunden und die Untereinheiten sind in seltenen Fällen glykosyliert. Nicht alle Legumine sind allergen oder lösen eine allergische Kreuzreaktion aus. Legumine wie Ara h 3 in der Erdnuss (siehe Abbildung 4), Gly m 6 in der Sojabohne, Ana o 2 in der Cashewnuss, Ses i 6, Ses i 7 im Sesam oder Cor a 9 in der Haselnuss sind Beispiele für allergene Legumine (Biedermann et al., 2016c).

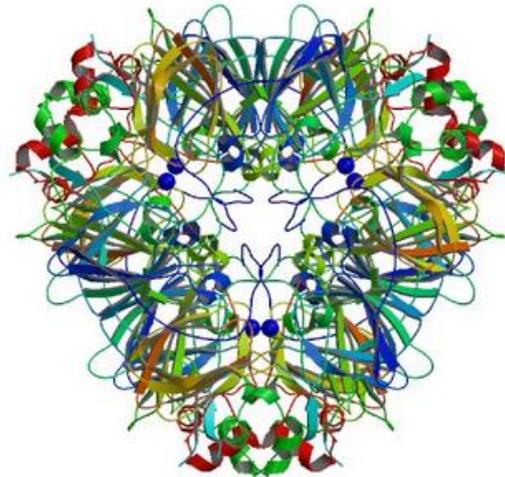


Abbildung 4: Kristallstruktur des hexameren Proteins Ara h 3, einem der Hauptallergene in der Erdnuss (Sequenz aus 510 Aminosäuren, 10% α -Hleix, 30% Beta-Faltblatt) (Jin et al., 2009)

2.7.3. Viciline

Viciline sind 7S-Globuline, welche normalerweise aus Trimeren bestehen und von der Viciae-Gruppe der Leguminosen abstammen. In dem Gesamtprotein (Holoprotein) „Vicilin“ kommen eine kleine und eine große Untereinheit vor. Anhand zahlreicher Studien wurde festgestellt, dass die kleine Untereinheit des Vicilins ein MG von 50 kDa aufweist und glykosyliert ist, während die größere Untereinheit 70-80 kDa beträgt und nicht glykolsyliert vorliegt (Muntz, 1998; Shewry et al., 2002). Außerdem sind Viciline Produkte einer Multigenfamilie, die während ihrer Reifung proteolytisch prozessiert und abhängig von der

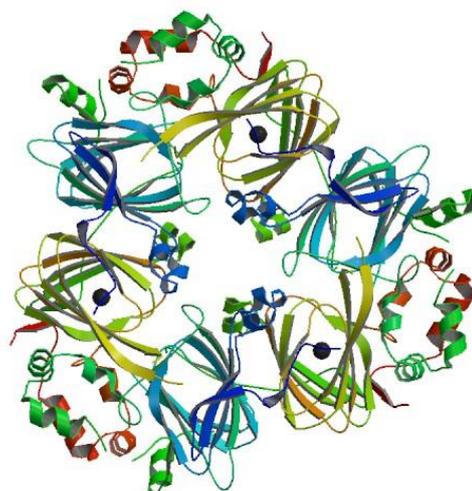


Abbildung 5: Kristallstruktur des trimeren Proteins Ara h 1, einem der Hauptallergene in der Erdnuss (Sequenz aus 418 Aminosäuren, 15% α -Hleix, 40% Beta-Faltblatt) (Chruszcz et al., 2011)

Pflanzenart glykosyliert werden. Da diese beiden Untereinheiten zu Oligomeren kombiniert werden, können sowohl homo- als auch hetero- oligomere Trimere entstehen. Die Aminosäure Cystein fehlt in der Aminosäuresequenz fast aller Viciline. Das bedeutet, die Untereinheiten des Vicilins werden im Gegensatz zu Leguminen durch andere zwischenmolekulare Kräfte zusammengehalten. Zu den allergenen Vicilinen gehören Ara h 1 in der Erdnuss, Gly m 5 in der Sojabohne, Ana o 1 in der Cashewnuss, Ses i 3 im Sesam und Cor a 11 in der Haselnuss. In der Abbildung 5 ist die Kristallstruktur vom Hauptallergen in der Erdnuss Ara h 1 dargestellt.

2.8. Einfluss technologischer Verfahren auf das allergene Potenzial

Es ist bekannt, dass Proteinfunktion (z.B. Enzymaktivität), Stabilität (Resistenz gegen enzymatische Hydrolyse) und die Glykosylierung die Allergenität beeinflussen können (Huby et al., 2000). Allerdings stellt die Lebensmittelverarbeitung eine weitere Dimension zur potenziellen Veränderung der Allergenität dar. Das allergene Potenzial kann durch verschiedene Verfahren wie Konservierung, Lagerung, Zerkleinern, Erhitzung, Waschung oder Reifung reduziert werden (EFSA, 2014; Mills und Mackie, 2008; Thomas et al., 2007). Allerdings können manche Verfahren wie Pasteurisation sogar die Allergenität erhöhen, indem bestimmte Epitope besser zugänglich werden oder neue Epitope gebildet werden (Hansen et al., 2003). Viele Allergene sind stabil und bleiben nach industrieller Behandlung des Lebensmittels unverändert. Nur wenige Allergene lassen ihre Allergenität reduzieren bzw. gar auslöschen, wenn für die allergische Reaktion relevante Epitope inaktiviert werden. Beispielsweise kann eine enzymatische Behandlung mancher Allergene sowohl konformationelle als auch lineare Epitope beeinflussen, wodurch die Allergenität reduziert werden kann (Kleber et al., 2004). In der Literatur wurden verschiedene Studien zur Reduzierung bzw. Inaktivierung der Allergenität bekannter Allergene durch Behandlung mit Hitze, Enzymen oder Hochdruck veröffentlicht. Die Allergenität der Baumnüsse durch Allergene aus Familien wie PR (engl. *Pathogenesis-Related*)-10-Proteine (z.B. Cor a 1 and Pru du 1) oder Profiline (z.B. Cor a 2, Pru du 4) können durch Hitzebehandlung inaktiviert werden. Hingegen zeigten Allergene aus der Familie der Speicherproteine (z.B. Cor a 9, Cor a 11, Cor a 12, Cor a 14, Pru du 6) oder RP-14-Proteine (z.B. Cor a 8, Pru du 3) kaum Veränderungen in ihrer Allergenität, was mit der Hitzestabilität solcher Proteine begründet wird (Biedermann et al., 2016d). In einer Studie wurde der Einfluss des Blanchierens, Röstens, Autoklavierens, Frittierens sowie der Behandlung mit der Mikrowelle auf Hauptallergene der Paranüsse untersucht. Die Allergenität blieb nach allen Verfahren unverändert außer durch die Mikrowelle, wodurch sie sogar erhöht wurde (Sathe und Sharma, 2009). Hingegen haben diverse Studien festgestellt, dass das Kochen der Erdnüsse die IgE-Bindung der Allergene reduziert hat. Allerdings hat das Braten die IgE-Bindung durch eine erhöhte Anzahl an

fortgeschrittenen Glykierung-Endprodukten (AGEs, engl. *Advanced Glycation Endproducts*) verbessert (Beyer et al., 2001; Chung et al., 2003; Mondoulet et al., 2005). Enzyme wie Peroxidase oder Verdauungsenzyme wie α -Chymotrypsin und Trypsin konnten Ara h 1 und Ara h 2 in gebratenen aber nicht in rohen Erdnüssen eliminieren (Yu et al., 2011). Eine reduzierte IgE- bzw. IgG-Bindung der Allergene in der Sojabohne (Glycinin und β -Conglycinin) durch Hitzebehandlung, chemische und enzymatische Hydrolyse sowie Druck wurde in mehreren Studien bestätigt (Frias et al., 2008; Tsumura, 2009).

3. Zielsetzung und Arbeitsplan

Aufgrund der fehlenden Daten zum allergenen Potenzial der Chiasamen werden in dieser Arbeit IgE- bzw. IgG-bindende Proteine (EBPs bzw. GBPs) in Chiasamen (*Salvia hispanica* L.) identifiziert und charakterisiert. Hierbei liegt der Schwerpunkt auf Speicherproteinen, insbesondere Globulinen, welche in Saatgut, Obstkernen und Nüssen die dominierenden Allergene darstellen.

Zunächst werden die EBPs bzw. GBPs mittels Methoden wie Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, engl. *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) und Immunblot (IB, engl. *Immune Blot*) mit Hilfe von kommerziellen Antikörpern und Humanseren, identifiziert.

Des Weiteren werden Methoden wie Größenausschlusschromatographie (GPC, engl. *Gel Permeation Chromatography*), Ionenaustauschchromatographie (IEC, engl. *Ion Exchange Chromatography*), Affinitätschromatographie mittels *magnetic beads* (IAC-MB, engl. *Affinity Chromatography using Magnetic Beads*) und zweidimensionale (2D) Gelelektrophorese (engl. *two Dimensional Gel Electrophoresis*) zur Isolierung der Zielproteine eingesetzt.

Für die Überprüfung der Kreuzreaktivität zwischen Chiasamenproteinen und Sesam- bzw. Nussproteinen werden Methoden wie IB-Inhibition oder ELISA (engl. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)-Inhibition verwendet. Auch der Einfluss technologischer Verfahren auf die IgE- bzw. IgG-Bindung wird geprüft.

Darüber hinaus werden die isolierten EBPs bzw. GBPs mittels UHPLC-ESI-MS/MS analysiert. Hierbei wird die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie UHPLC (engl. *Ultra High Performance Liquid Chromatography*) mit zwei Massenspektrometern (MS, engl. *Mass Spectrometry*) gekoppelt, wobei die Ionen durch Elektrospray-Ionisation (ESI, engl. *Electrospray Ionization*) erzeugt werden. Im Anschluss erfolgt die *De Novo* Sequenzierung der detektierten Peptide und die erhaltenen Peptidsequenzen sollen mit Proteinsequenzen bereits bekannter Allergene verglichen werden. Dafür kommen die Suchmaschinen BLAST (engl. *Basic Local Alignment Search Tool*) und FARRP (engl. *the Food Allergy Research and Resource Program*) zum Einsatz.

Zur Lokalisierung der möglichen Epitope mit hohem allergenen Potenzial wird die Epitop-Datenbank IEDB (engl. *Immune Epitope Database*) mit Hilfe der Methode KTAS (engl. *Kolaskar and Tongaonkar Antigenicity Scale*) benutzt. Dies ist eine semi-empirische Methode, die physiochemische Eigenschaften der Aminosäurenreste prüft und die Wahrscheinlichkeit ihres Vorkommens in bereits bekannten Epitopen bestimmt. So können Prognosen über mögliche Antigen determinanten (Epitope) auf sequenzierten Peptiden getroffen werden.

Um mehr Informationen über die DNA (engl. *Deoxyribonucleic Acid*) -Sequenz der Zielproteine zu gewinnen, werden mit Hilfe von *De Novo* Peptidsequenzen spezifische Primer entworfen. In Anwesenheit der aus Chiasamen extrahierten DNA können sich mittels der Polymerase-Kettenreaktion PCR (engl. *polymerase chain reaction test*) Amplifikate vervielfältigen, die die EBPs bzw. GBPs während der Biosynthese codieren. Diese Amplifikate werden durch Sanger-Sequenzierung sequenziert und die jeweiligen Sequenzen werden mit Hilfe von verschachtelter PCR bestätigt.

Diese Sequenzen können anschließend mit DNA-Sequenzen bekannter Allergene zum Homologievergleich herangezogen werden, was mehr Informationen über die Kreuzreaktivität auslösenden Epitope liefern soll.

4. Ergebnisse und Diskussion

In diesem Kapitel werden alle erhaltenen Ergebnisse dargestellt und parallel diskutiert. Im ersten Abschnitt werden die Ergebnisse der Charakterisierung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Blutseren von Sesam- und Haselnussallergikern vorgestellt. Der zweite Abschnitt handelt von der Identifizierung von IgG bzw. IgE-bindenden Proteinen (EBPs bzw. GBPs) mittels kommerzieller Antikörper (siehe Abschnitt 9.1.4. im Anhang) und Humansenen (siehe Abschnitte 9.1.5.1. und 9.1.5.2. im Anhang). Der dritte Abschnitt befasst sich mit der Entwicklung von Methoden um Zielproteine zu isolieren und mittels UHPLC-ESI-MS/MS, *De Novo* Sequenzierung sowie NCBI-Datenbank zu identifizieren. Die Charakterisierung der Zielproteine wird im vierten Abschnitt beschrieben.

4.1. Charakterisierung der verwendeten Humansenen

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Serumreihen verwendet. Die eine Serumreihe stammt von fünf Sesamallergikern (Projekt Nr. 1-5, Tabelle 24 im Anhang unter 9.1.5.1.), während die zweite auf Blutseren von 33 Haselnussallergikern (Projekt Nr. 7-39, Tabelle 25 im Anhang unter 9.1.5.2.) basiert. Blutseren von Sesamallergikern wurden im Rahmen dieser Arbeit gewonnen (Durchführung im Anhang unter 9.1.6.). Um diese Humansenen charakterisieren zu können, mussten sie einem Enzymallergosorbent-Test (EAST) unterzogen werden, um den Gehalt an spezifischem IgE gegen das Sesamprotein zu bestimmen. Die EAST-Klasse der Blutseren von Haselnussallergikern wurde bereits in einer vorherigen Doktorarbeit bestimmt (Wigotzki, 2001). Ein Serum von einem Patienten ohne Sesam- oder Haselnussallergie wurde als Negativkontrolle mit untersucht (B.A. Projekt-Nr. 6, Tabelle 24 unter 9.1.5.1.).

Bei der EAST-Untersuchung wurden die aktivierten (CnBr)-Scheiben zur Kopplung mit Sesamprotein in einem PBS-Extrakt aus Sesam inkubiert (siehe Abschnitt 7.6.). Laut Herstellerangaben empfiehlt sich eine Konzentration des PBS-Extrakts von 20 µg/ml. Allerdings war diese Konzentration unzureichend, um ein detektierbares photometrisches Signal zu erhalten. Daher wurde die Konzentration auf 200 µg/ml erhöht (siehe Abschnitt 9.1.8.1. im Anhang). Die EAST-Kalibrierreihe sowie der Gradient zur Berechnung der IgE-Konzentrationen sind im Anhang unter 9.2.2.1. dargestellt (siehe Tabelle 30 und Abbildung 51). Die Konzentration der spezifischen IgEs für Sesam- und Haselnussprotein sind in den Tabellen 31 und 32 im Anhang unter 9.2.2.2. und 9.2.2.3. wiedergegeben.

Die höchste EAST-Klasse für Sesamprotein mit 3,6 und 6,1 U/ml (EAST-Klasse 3) zeigten die Humansenen 1 und 2. Die EAST-Klasse 2 wiesen zwei andere Humansenen, nämlich 3 und 4, auf. Das fünfte Serum wies die EAST-Klasse 1 mit 0,49 U/ml auf. Die Konzentration der

spezifischen IgEs gegen das Haselnussprotein schien ähnlich zu sein. So wiesen die Humanseren 1 und 2 jeweils EAST-Klasse 2 und 3 auf. Eine Ausnahme war das Serum Nr. 5, welches eine höhere Konzentration am spezifischen IgE gegen das Haselnussprotein (3,65 U/ml) als die Konzentration des spezifischen IgE gegen das Sesamprotein aufwies (de Leon et al., 2003).

Die Ergebnisse der EAST-Untersuchung für Blutseren von Haselnussallergikern zeigten, dass 17 Humanseren die EAST-Klasse 4 für Haselnussprotein besaßen, während neun Humanseren die EAST-Klasse 3 aufwiesen. Darüber hinaus konnte die EAST-Klasse 2 bei sechs Humanseren festgestellt werden, während nur ein Serum die Klasse 1 zeigte. Die Tabelle 25 im Anhang unter 9.2.2.3. zeigt, dass 27 % bzw. 40 % der Patienten zusätzlich unter einer Milch- bzw. Eiallergie leiden.

4.2. Identifizierung der IgE- bzw. IgG-bindenden Proteine

4.2.1. Extraktion der IgE- bzw. IgG-bindenden Proteine und Proteingehaltsbestimmung

Zunächst wurde eine geeignete Methode zur Extraktion der Speicherproteine aus den ausgewählten Samen durchgeführt. Die von Clements (1965) entwickelte und durch Vieths (1992) modifizierte Tieftemperaturextraktion mit Aceton (-80 C°) dient der vollständigen Isolierung der Proteine ohne Allergenitätsverlust aus pflanzlichem Material. Dadurch wurde das Acetonpulver aus untersuchten Samen (Haselnuss, Mandel, Sesam, Walnuss, Erdnuss und Chiasamen) hergestellt. Die genaue Durchführung ist im Anhang unter 9.1.7.1. dargestellt. Zur Herstellung des Acetonpulvers wurden 200 g Samen eingesetzt. Zwei Methoden wurden auf Ihre Eignung zur Extraktion der Chiasamenproteine aus dem Acetonpulver geprüft, wobei Acetonpulver und Extraktionsmittel im Verhältnis 1:20 (v/v) verwendet wurde. Die Proteine wurden sowohl mittels des PBS-Puffers (pH 7,4) als auch mit einem zur Extraktion von Cashewnuss-Allergenen empfohlenen Puffer (Tris-Puffer, pH 8) extrahiert. Anschließend wurde die Proteinausbeute der beiden Puffer verglichen. Die erhaltenen Extrakte wurden filtriert, lyophilisiert und gravimetrisch bestimmt. Aus 500 mg Acetonpulver konnte mit PBS-Puffer 455 mg Lyophilisat gewonnen werden (Proteinausbeute von 92 %), während die mit Tris-Puffer gewonnene Menge bei nur 45 mg lag (Proteinausbeute von 9,1 %). Somit erwies sich die Methode nach Wang et al. (2002) als ungeeignet. Dies lag an der Anwesenheit von NaCl im PBS-Puffer, welche im Puffer von Wang fehlte. Folglich wurde das Acetonpulver aller untersuchten Samen mit PBS-Puffer extrahiert. Die erhaltenen relativen Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe der Methode nach Bradford (1976) bestimmt. Eine externe Kalibrierung mit dem Standardprotein BSA dient der Berechnung der Proteinkonzentration (siehe Abbildung 52 im Anhang unter 9.2.3.). Die BSA-Standards

betragen 100, 200, 300, 400 und 500 µg/ml und sind in PBS-Puffer gelöst. Für die Blindprobe wurde PBS-Puffer verwendet und als Kontrolle diente eine Lösung von BSA mit einer Konzentration von 120 mg/ml. Da die Konzentrationen der Extrakte außerhalb des Arbeitsbereiches lagen, mussten sie entsprechend mit bidest. Wasser im Verhältnis 1:20 verdünnt werden (Ergebnisse sind in Tabelle 33 im Anhang unter 9.2.3. zu finden). In der Tabelle 3 sind die Konzentrationen der untersuchten Extrakte und deren Verdünnung aufgeführt. Der Tabelle ist zu entnehmen, dass die Extraktionsmethode bei Haselnuss, Mandel und Sesam eine höhere Proteinkonzentration (ca.10 mg/ml) erzielt hat als bei Walnuss-, Erdnuss- oder Chiasamenextrakt, welche eine Proteinkonzentration zwischen 6-7 mg/ml aufwiesen.

Tabelle 3: Konzentrationen der untersuchten Extrakte und deren Verdünnungen

Extrakt	Konzentration der verdünnten Extrakte (µg/ml)	Verdünnung	Konzentration der Extrakte (mg/ml)
Haselnuss	484	1:20	9,8
Mandel	519	1:20	11,4
Sesam	572	1:20	10,5
Walnuss	309	1:20	6,3
Erdnuss	345	1:20	6,9
Chiasamen	353	1:20	7,2

Neben der Quantifizierung der Proteingehalte der untersuchten Samen und Nüsse wurde außerdem das Proteinspektrum von Chiasamen nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE mit dem Proteinspektrum anderer Samen verglichen (siehe Abbildung 6). Generell wurden im Proteinmuster aller untersuchten Samen Proteinbanden im Bereich 10-70 kDa mit leichten Intensitätsunterschieden beobachtet. Hauptsächlich wurden im Proteinmuster des Chiasamen-Extrakts vier Gruppierungen der Proteinbanden in Bereichen 45-50 kDa, 30-35 kDa, 20-25 kDa und 10-18 beobachtet, wobei die Proteinbanden im Bereich 20-25 kDa und 30-35 kDa am intensivsten waren.

Ein ähnliches Proteinmuster wiesen Haselnuss- und Sesamextrakt auf, was einen Hinweis auf eine hohe Proteinhomologie unter diesen Spezies gibt. Hingegen zeigten Mandel- und Erdnussextrakte eine andere Verteilung der Proteinbanden, wobei die Proteinspektren von Mandel und Erdnuss ähnlich erschienen. Bei allen Extrakten konnten Proteinbanden im Bereich 20-25 kDa detektiert werden.

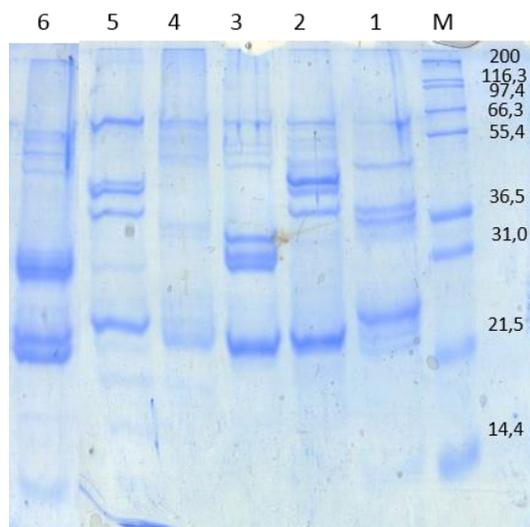


Abbildung 6: Vergleich der Proteinspektren der untersuchten Samen. M: Marker, 1-6: Extrakte aus 1: Haselnuss, 2: Mandel, 3: Sesam, 4: Walnuss, 5: Erdnuss, 6: Chiasamen. Auftrennung mittels SDS-PAGE

4.2.2. Detektion der IgG-bindenden Proteine mittels kommerzieller Antikörper

Zur Detektion der GBPs wurden kommerzielle Antikörper gegen Sesam-, Haselnuss- und Erdnussprotein mittels Immunoblot mit anschließender Immunfärbung eingesetzt (siehe Abschnitt 7.9.1.). Alle verwendeten kommerziellen Antikörper sind in Tabelle 23 im Anhang unter 9.1.4 zusammengefasst.

Durch die Detektion der GBPs konnte ein Überblick über allgemeine Proteinhomologie oder -ähnlichkeit zwischen Sesam, Haselnuss bzw. Erdnuss einerseits und Chiasamen andererseits gewonnen werden. Die optimalen Konzentrationen der Primär- und Sekundärantikörper gegen Haselnuss- und Erdnussprotein wurden aus früher durchgeführten Arbeiten in der Allergie-Abteilung im HSFS an der Universität Hamburg bestimmt. Diese Konzentrationen wurden in dieser Arbeit übernommen. Die zur Detektion des Haselnuss- bzw. Sesamproteins verwendeten Sekundärantikörper sind bereits mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert. Bei der Detektion mit Erdnussantikörpern weisen die Sekundärantikörper kein HRP auf, weshalb eine Inkubation dieser mit Streptavidin-HRP für 20 min erforderlich war (siehe Durchführung der Immunfärbung im Anhang unter 9.1.13.1.). Die optimale Konzentration des Sesamantikörpers (SA), welche zu einer ausreichenden Färbung der Proteinbanden geführt hat, wurde im Rahmen dieser Arbeit ermittelt und betrug für Primär- und Sekundärantikörper 0,1 µg/ml. Die Konzentration und die dazugehörige Verdünnung aller im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind im Anhang unter 9.1.13.1. zu finden.

Um eine Detektion sämtlicher Zielproteine in Chiasamen zu gewährleisten, welche mit den kommerziellen Antikörpern reagieren könnten, wurde die Proteinkonzentration der SDS-

Proben bis auf 1000 µg/ml erhöht. Haselnuss- bzw. Erdnussextrakt mit Proteinkonzentration von 300 µg/ml wurden jeweils als Referenz mit untersucht. Die Auftrennung mittels SDS-PAGE sowie die Immunoblots sind in Abbildung 7 dargestellt.

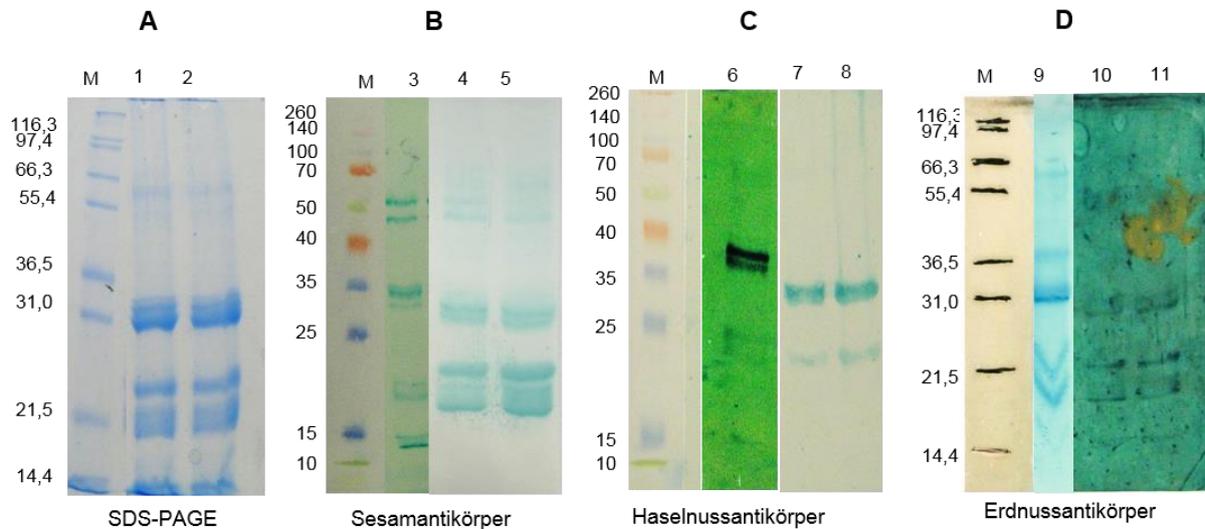


Abbildung 7: Teil A: Auftrennung der Proteine im PBS-Extrakt der Chiasamen mit zwei verschiedenen Proteinkonzentrationen mittels SDS-PAGE, M: Marker, Spur 1: 500 µg/ml, Spur 2: 1000 µg/ml. Teil B, C und D: immunologische Detektion der IgG-bindenden Proteine in Chiasamen mit Sesamantikörpern (Teil B, M: Marker, Spur 3: Sesam-Extrakt als Referenz, Spur 4: Chiasamen-Extrakt 500 µg/ml, Spur 5: Chiasamen-Extrakt 1000 µg/ml), mit Haselnussantikörpern (Teil C, M: Marker, Spur 6: Haselnuss-Extrakt als Referenz, Spur 7: Chiasamen-Extrakt 500 µg/ml, Spur 8: Chiasamen-Extrakt 1000 µg/ml) oder mit Erdnussantikörpern (Teil D, M: Marker, Spur 9: Erdnuss-Extrakt als Referenz, Spur 10: Chiasamen-Extrakt 500 µg/ml, Spur 11: Chiasamen-Extrakt 1000 µg/ml)

Die detektierten Proteinbanden des Chiasamen-Extrakts sowie des Sesam-, Haselnuss- und Erdnuss-Extrakts wurden in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Zusammenfassung der detektierten Proteinbanden mittels kommerzieller Antikörper

Kommerzielle IgGs	Eingeschätztes MG der detektierten Proteinbanden (kDa)			
Detektion	Chiasamenprotein	Sesamprotein	Haselnussprotein	Erdnussprotein
Sesamantikörper	60, 49, 45, 31, 23, 20	52, 49, 34, 33, 22, 15, 10	-	-
Haselnussantikörper	31, 20	-	60, 36, 35, 23, 20, 14	-
Erdnussantikörper	45, 31, 23, 18, 15	-	-	60, 38, 31, 20, 18

Unter Verwendung der kommerziellen Antikörper konnten nach Auftrennung des Chiasamen-Extrakts Proteinbanden bei 60, 49, 45, 31, 23, 20, 15 kDa detektiert werden. Die Abbildung 7 zeigt, dass die Proteinbanden bei 31 und 20 kDa mittels aller kommerziellen Antikörper detektiert werden konnten. Durch Immunfärbung mit SA wurden zusätzlich Proteinbanden bei

60, 49, 45 und 23 kDa visualisiert. Mittels Erdnussantikörpern konnten Proteinbanden bei 15 und 18 kDa detektiert werden. Bei der Detektion der Sesam-, Haselnuss- oder Erdnussproteine mit den dazugehörigen kommerziellen Antikörpern wurden IgG-Bindungen in ähnlichen MG-Bereichen festgestellt (siehe Abbildung 7). Dies weist darauf hin, dass Chiasamenproteine ähnliche Epitope zu denen von Allergenen anderer Spezies tragen, die zur IgG-Bindung und somit zur Kreuzreaktivität führen könnten. Dies könnte auf strukturelle Ähnlichkeit unter Speicherproteinen zurück zu führen sein. Diese Sequenzähnlichkeit (SÄ) wurde bereits zwischen Sesam- und Chiasamenproteinen mittels einer MS-Analyse beobachtet (Sandoval-Oliveros und Paredes-Lopez, 2013).

Bei der Detektion mit Erdnussantikörpern trat eine starke Verfärbung der NC-Membran auf, was anschließend die Auswertung erschwerte. Diese Verfärbung lag daran, dass der Primärantikörper gegen Agglutinin ist, das zu den Lektinen gehört. Lektine sind Glykoproteine, die spezifische Kohlenhydratstrukturen tragen. Somit bindet der Primärantikörper spezifisch an die NC-Membran, die wiederum auch Zuckerstrukturen trägt. Dies führt schließlich zu einer höheren Bindung der Sekundärantikörper und des Konjugates, Streptavidin-HRP, an die Primärantikörper und somit zu einer störenden Hintergrundfärbung. Daher wurde in dieser Arbeit auf diese Antikörper verzichtet, zumal die durch Erdnussantikörper detektierten Proteinbanden des Chiasamen-Extrakts auch mit Haselnuss- bzw. Sesamantikörpern visualisiert werden konnten.

4.2.3. Detektion der IgE-bindenden Proteine mittels Humanseren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden fünf Blutseren von Sesamallergikern und 33 Blutseren von Haselnussallergikern zur Immunfärbung der IgE-bindenden Proteine in Chiasamen verwendet. Durch den Einsatz der Humanseren konnte eine IgE-Bindung der Chiasamenproteine, die in eine allergische Kreuzreaktivität zwischen Chiasamen und Samen anderer Spezies resultieren könnte, geprüft werden. Des Weiteren konnte eine spätere Identifizierung dieser Proteine mittels anderer Verfahren erleichtert werden. Hierfür wurde das PBS-Extrakt des Acetonpulvers von Chiasamen (Proteingehalt: 500 µg/ml) elektrophoretisch mittels SDS-PAGE getrennt. Dafür wurde ein 10 %iges NuPAGE™-Fertig-Gel mit einem Probenslot verwendet, der sich über die gesamte Breite des Gels erstreckt. Aufgegeben wurden 200 µl SDS-Probe. Nach anschließendem Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine NC-Membran wurde diese in Streifen (5 mm breit) geschnitten. Anschließend wurden die NC-Streifen mit 1,5 ml 1:5 verdünnten Humanseren (20 %) inkubiert und mit Sekundärantikörpern immungefärbt (siehe 8.1.12.1. im Anhang). Um unspezifische Bindungen ausschließen zu können, erfolgte zudem eine Inkubation eines NC-Streifens mit dem Serum eines Nicht-Allergikers (EAST-Klasse= 0) als Negativkontrolle (Serum S6, siehe Tabelle 24 im Anhang unter 9.1.5.1.).

4.2.3.1. Charakterisierung der Blutseren von Sesamallergikern mittels Immunoblot

Durch den Einsatz der Blutseren von Sesamallergikern zur Immunfärbung konnten mehrere Proteinbanden des Chiasamen-Extrakts detektiert werden. Die Proteinbande 20 kDa konnte bei allen Humanseren (100 %) detektiert werden (Abbildung 8). Vier von fünf Humanseren konnten Proteinbanden bei 23 und 31 kDa sichtbar machen (80 %).

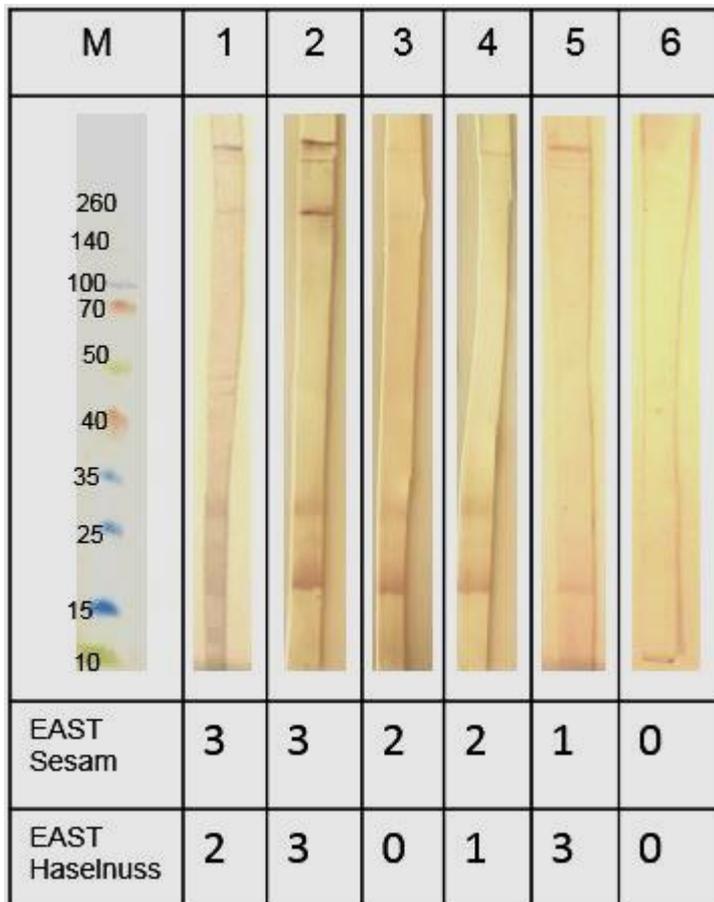


Abbildung 8: Immunoblot vom Chiasamen-Extrakt unter Verwendung der Einzelblutseren von Sesamallergikern (1-5: Blutseren von Sesamallergikern S1-S5, 6: Negativkontrolle, M: Rainbow-Proteinmarker). Die EAST-Klasse der Humanseren ist unter jedem Streifen abgebildet

Lediglich ein Serum (Projekt-Nr.1) konnte fünf weitere Proteinbanden bei 60, 49, 45, 12 und 9 kDa visualisieren. Dieses Serum stammte von einem Patienten, der unter einer starken Sesamallergie leidet. Allerdings zeigt dieses Serum laut EAST-Ergebnissen eine EAST-Klasse 3. Dies könnte daran liegen, dass die IgE-Bindung bei der EAST-Untersuchung nicht vollständig verlief bzw. die Blutprobe zum Zeitpunkt der Blutabnahme eine niedrige IgE-Konzentration aufwies (siehe Abbildung 53 im Anhang unter 9.2.4.1.) Die Abhängigkeit der IgE-Konzentration von vielen Faktoren wurde bereits in der Literatur beschrieben (Kim et al., 2013).

Das Serum Nr. 5 konnte nur eine Proteinbande bei 20 kDa detektieren, wobei dieses Serum EAST-Klasse 1 für Sesamprotein aber EAST-Klasse 3 für Haselnussprotein aufweist. Dies bedeutet, dass die Mehrheit der im Blutserum enthaltenen IgEs spezifisch gegen Haselnussprotein und nicht gegen Sesamprotein ist. Es lässt sich vermuten, dass die Epitope auf Chiasamenproteinen mehr Ähnlichkeit zu denen des Sesamproteins als des Haselnussproteins zeigen, da mit diesem Serum nur eine Proteinbande des Chiasamen-Extrakts detektiert werden konnte. Mit der Negativkontrolle (Projekt-Nr. 6) aus einem Patienten ohne Sesam- bzw. Haselnussallergie konnten keine Proteinbanden in Chiaextrakt detektiert werden. Um weitere Untersuchungen mit den Blutseren von Sesamallergikern zu ermöglichen wurde ein Serumpool (SerS) aus den Humanseren 1-4 zusammengesetzt. In Abbildung 9 ist die Häufigkeit der von den Humanseren gezeigten IgE-Bindung an Proteinbanden des Chiasamen-Extrakts grafisch dargestellt.

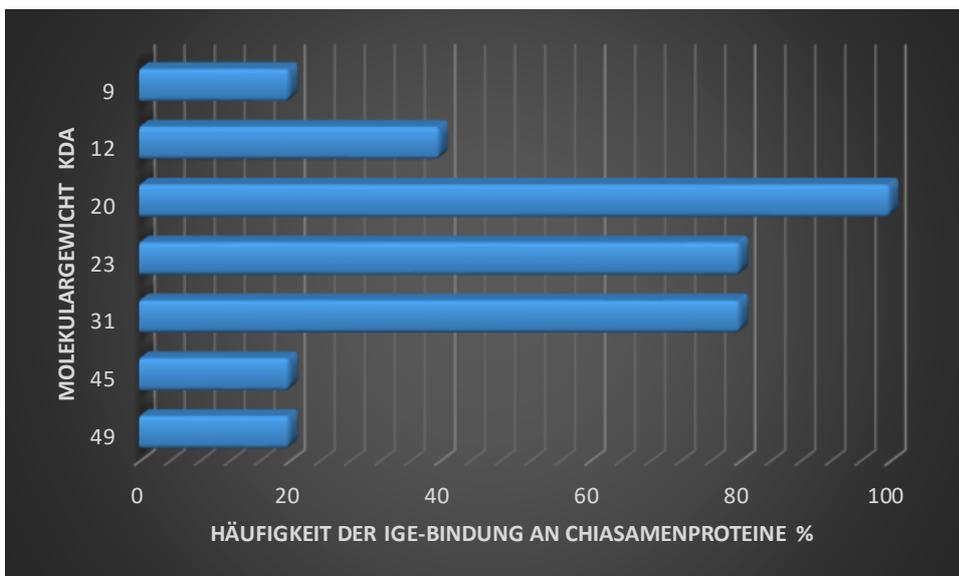


Abbildung 9: Die Häufigkeit der IgE-Bindung an Proteinbanden des Chiasamen-Extrakts mit Blutseren von Sesamallergikern (Projekt-Nr. 1-5)

4.2.3.2. Charakterisierung der Blutseren von Haselnussallergikern mittels Immunoblot

Die 33 in dieser Arbeit verwendeten Humanseren, welche von Haselnussallergikern stammen, wiesen IgE-Bindung zu Proteinbanden des Chiasamen-Extrakts bei MG 300, 140, 45, 31, 20, 6 kDa auf. Ergebnisse der Immunfärbung sind in Abbildung 54 im Anhang unter 9.2.4.2. zu entnehmen. Außerdem wurde ein Serumpool (SerH) aus allen Humanseren mit EAST-Klasse 3 und 4 (27 Humanseren) für weitere Untersuchungen zusammengesetzt. Diese Humanseren sind in Abbildung 10 und 11 dargestellt. So wurden die Humanseren 15, 19, 23, 28, 33 und 35 ausgelassen.

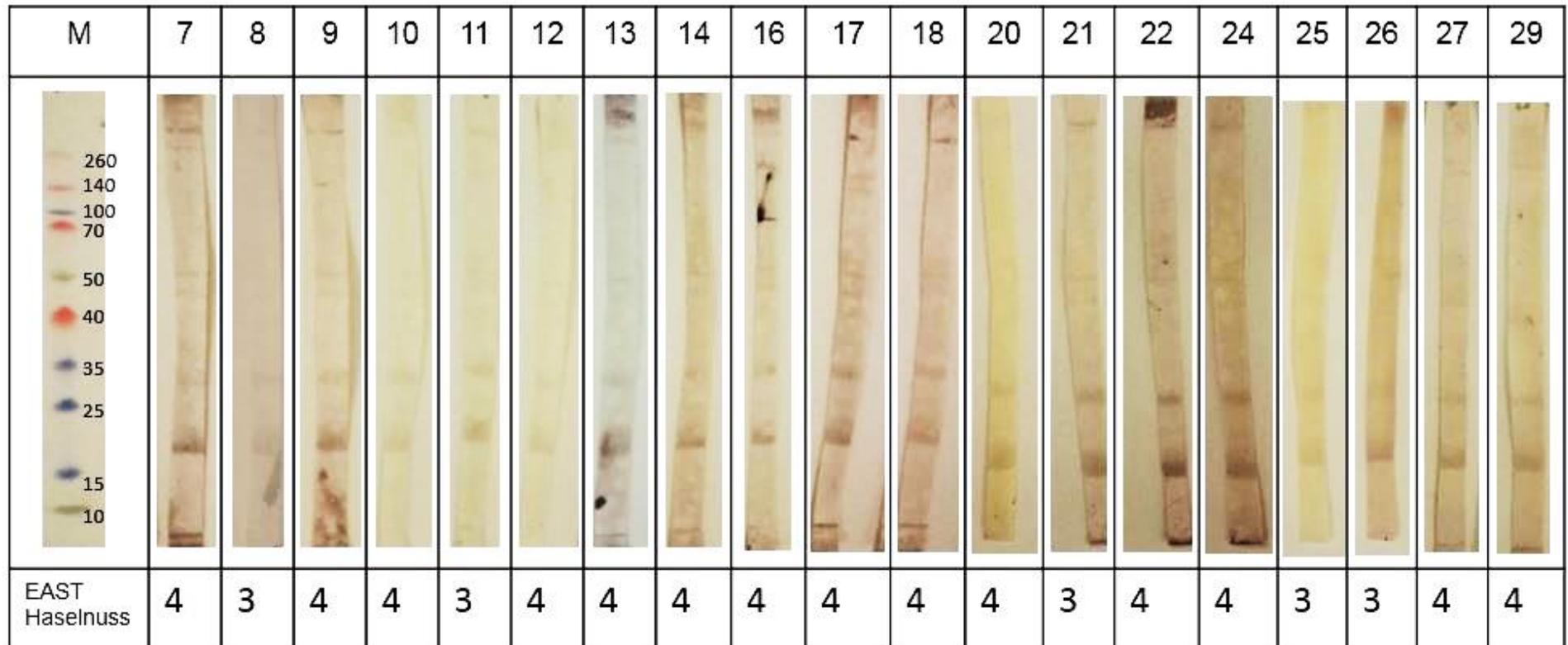


Abbildung 10: Der erste Teil der Blutseren von Haselnussallergikern, welche zur Herstellung des Serumpools (SrH) eingesetzt wurden (19 Humanseren)

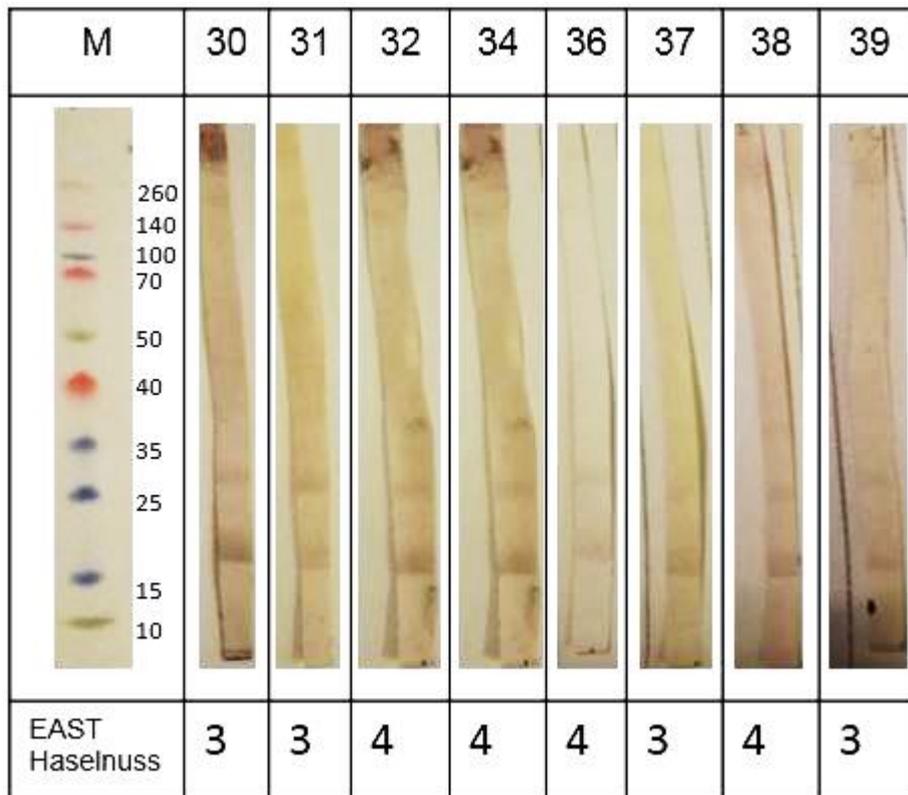


Abbildung 11: Der zweite Teil der Blutseren von Haselnussallergikern, welche zur Herstellung des Serumpools (SrH) eingesetzt wurden (8 Humanseren)

Die meist detektierten Proteinbanden lagen bei 31 und 20 kDa (81,8 % der getesteten Humanseren). Die Proteinbande bei 49 kDa konnte von 39,4 % der Humanseren visualisiert werden, während die Proteinbanden bei 40 und 140 kDa nur von 12 % bzw. 6 % der Humanseren detektiert wurden. Außerdem zeigten nur 36,4 % der eingesetzten Humanseren eine IgE-Bindung zur 45 kDa-Proteinbande sowie zu Proteinbanden mit höherem MG als 260 kDa (siehe Abbildung 12). Humanseren mit hoher EAST-Klasse, beispielsweise Serum 17 und 18 mit einer EAST-Klasse 4 konnten mehr Proteinbanden detektieren, unter anderem 140 und 6 kDa, verglichen mit Humanseren mit niedrigen EAST-Klassen. Das bedeutet, je höher die Konzentration der gegen Haselnussprotein spezifischen IgEs im Serum ist, desto mehr Proteinbanden werden in Chiasamen-Extrakt detektiert.

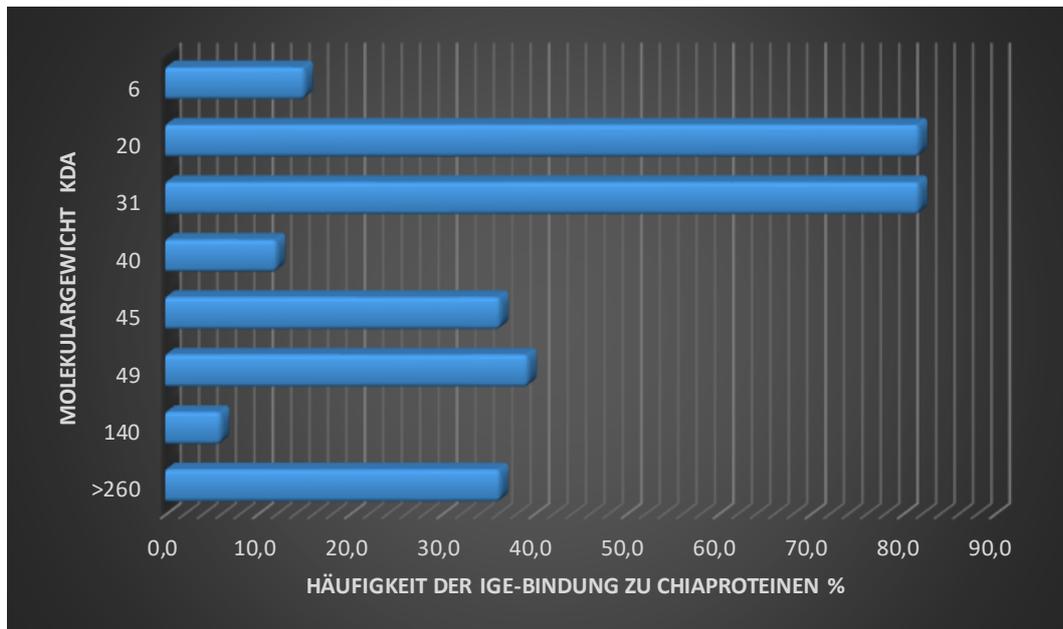


Abbildung 12: Die Häufigkeit der IgE-Bindung an Proteinbänder des Chiasamen-Extrakts mit Blutseren von Haselnussallergikern (Projekt-Nr. 7-39)

Nach der Bestätigung der IgE-Bindung an mehrere Proteinbänder des Chiasamen-Extrakts, kann daraus geschlossen werden, dass es sich vermutlich um eine Kreuzreaktivität zwischen Chiasamen und anderen Spezies wie Sesam, Haselnuss oder Erdnuss handelt. Chiasamen besitzen genau wie andere Samen Speicherproteine, welche höchstwahrscheinlich ähnliche Epitope tragen und somit eine Kreuzreaktivität mit anderen Spezies wie Sesam, Haselnuss oder Erdnuss hervorrufen könnten. Jedoch konnten solche Epitope überwiegend lineare Epitope sein, da die untersuchten Proteine bei der Probenvorbereitung vor SDS-PAGE einer irreversiblen Denaturierung unterzogen wurden, wodurch die bekannten Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen verloren gehen (Richter, 2003). Durch das Blotting auf eine NC-Membran und das Entfernen von SDS könnten Proteine die Sekundär- bzw. die Tertiärstruktur aber nicht die Quartärstruktur zurückbekommen (siehe Abschnitt 7.9.1.).

4.2.4. Auswahl der zu isolierenden und charakterisierenden Proteinbänder

Im Abschnitt 4.2.2. und 4.2.3. wurden verschiedene EBPs bzw. GBPs mit kommerziellen Antikörpern gegen Sesam-, Haselnuss- und Erdnussprotein sowie Blutseren von Sesam- und Haselnussallergikern detektiert. Das bedeutet, es wurden zur Detektion 5 verschiedene immunologische Sorten eingesetzt, wobei die Erdnussantikörper später aufgrund der starken Verfärbung der NC-Membran nach Immunfärbung nicht mehr verwendet wurden (siehe Abschnitt 4.2.2.). Die Auswahl der im Rahmen dieser Arbeit zu charakterisierenden Proteine (Zielproteine) wurde nach der Detektionshäufigkeit (Anzahl der zur Detektion einsetzbaren Sorten) getroffen. Chiasamenproteine, die häufig und durch mehrere Sorten immunologisch erfasst werden, haben logischerweise eine höhere Wahrscheinlichkeit, eine Kreuzreaktivität

auszulösen. In Tabelle 5 ist die Detektionshäufigkeit der verschiedenen Proteinbanden dargestellt. „D“ steht für „detektierbar“ und „ND“ für „nicht detektierbar“. So wurden ausschließlich Proteine zur weiteren Charakterisierung ausgewählt, welche durch mindestens drei verschiedene immunologische Sorten bei der Immunfärbung visualisiert werden konnten. Außerdem stellte die Detektion mit mindestens einem der beiden in dieser Arbeit erstellten Serumpools von Sesam- bzw. Haselnussallergikern eine weitere Voraussetzung zur Auswahl dar.

Die von allen Antikörpern und Humanseren nachgewiesene Proteinbande lag bei 31 kDa. Die Proteinbanden bei 45, 23 und 20 kDa wurden immunologisch durch vier Sorten erfasst, während die Proteinbanden bei 60 kDa und 49 kDa nur mittels drei Sorten nachweisbar waren.

Die Tabelle 5 gibt eine Übersicht über die Detektionshäufigkeit sowohl mit kommerziellen Antikörpern (gelb markiert) als auch mit Humanseren (grün markiert). Die zur Charakterisierung ausgewählten Proteinbanden sind in der Tabelle mit „OK“ markiert.

Tabelle 5: Detektionshäufigkeit der EBPs bzw. GBPs in Chiasamen, SA: Sesamantikörper, SerS: Serumpool von Sesamallergikern, HA: Haselnussantikörper, SerH: Serumpool von Haselnussallergikern, EA: Erdnussantikörper, D: detektierbar, ND: nicht detektierbar. Detektion mit Humanseren ist hellgrün markiert und mit Antikörpern gelb markiert

Chiasamenproteine (kDa)	SA	SerS	HA	SerH	EA	Detektionshäufigkeit	Auswahl
60	D	D	ND	ND	D	3	OK
49	D	D	ND	D		3	OK
45	D	D	ND	D	D	4	OK
40	ND	ND	D	ND	ND	1	Nein
31	D	D	D	D	D	5	OK
23	D	D	D	ND	D	5	OK
20	D	D	ND	D	D	4	OK
12	ND	D	ND	ND	ND	1	Nein
9	ND	D	ND	ND	D	2	Nein
6	ND	ND	ND	D		1	Nein

Abschließend werden Proteinbanden bei 60, 49, 45, 31, 23, 20 kDa weiter untersucht. Die Proteinbanden bei 12, 9, 6 kDa sind vermutlich 2S Albumine oder Profiline, welche nicht im Fokus dieser Arbeit liegen.

4.2.5. Untersuchung der detektierten Proteinbanden mittels UHPLC-ESI-MS/MS

Proteinbanden des Chiasamen-Extrakts, welche durch Sesam- und Haselnussantikörper sowie verfügbare Humanseren am häufigsten detektiert wurden, sind nach der SDS-PAGE und der kolloidalen Coomassie-Färbung (kCF) aus dem SDS-Gel ausgestanzt und tryptisch verdaut worden. Diese waren bei 60, 49, 45, 31, 23 und 20 kDa zu beobachten (siehe Abbildung 13). Aufgrund der hohen Anzahl an Proteinbanden ließen sich diese bei 23 und 20 kDa nur als eine Proteinbande ausstanzen. Die Proteinbanden wurden mit „B“ bezeichnet und nummeriert von 1 bis 5 (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Detektierte Proteinbanden in Chiasamen untersucht mittels UHPLC-ESI-MS/MS nach 1D-Gelelektrophorese

Proteinbande (kDa)	Bezeichnung
60	B ₁
49	B ₂
45	B ₃
31	B ₄
23+20	B ₅

Anschließend wurden die tryptischen Peptide durch UHPLC-ESI-MS/MS fragmentiert, gemessen und *De Novo* sequenziert (siehe Abschnitt 7.14.). Sämtliche mittels MS-Analyse erhaltene Sequenzen sind in Tabelle 34 unter 9.2.4.3. im Anhang zu finden. Insgesamt wurden 118 Peptide aus fünf Proteinbanden B₁-B₅ sequenziert.

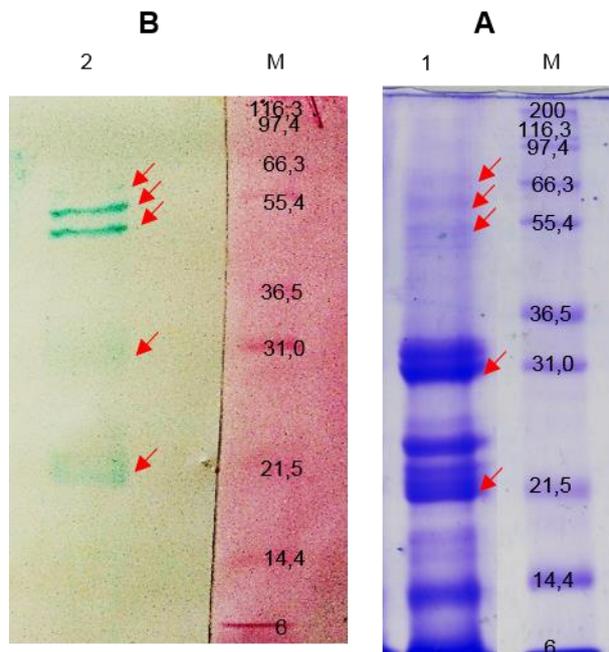


Abbildung 13: A: Auftrennung der Chiasamenproteine mittels SDS-PAGE. B: IB zur immunologischen Detektion mittels Sesamantikörper. Die mit roten Pfeilen markierten Proteinbanden sind für die MS-Analyse ausgewählt

Die meisten sequenzierten Peptide stammen aus B₃ bei 45 kDa, gefolgt von B₂, B₄ und B₅ mit jeweils 35, 29 und 21 Peptiden. Aus B₁ konnten nur 6 Peptide sequenziert werden. Werden die erhaltenen Peptide in der Sequenzdatenbank NCBI verglichen, fällt auf, dass 36 Peptide unterschiedlichen Enzymen, wie z.B. Dihydrolipoamide dehydrogenase, Enolase bzw. Citrate Synthase, zugeordnet wurden. Außerdem wurden 44 Peptide in der Datenbank nicht charakterisierten Proteinen aus diversen Organismen wie gelber Gauklerblume (*Erythranthe guttata*) mit 5 Peptiden, Kartoffel (*Solanum tuberosum*) und Tomate (*Solanum lycopersicum*) jeweils mit 2 Peptiden zugeordnet (siehe Tabelle 34 im Anhang unter dem Punkt 9.2.4.3.).

Insgesamt konnten 19 Peptide Globulinen aus verschiedenen Organismen wie z.B. Sesam (*Sesamum indicum*), gelbe Gauklerblume (*Erythranthe guttata*), Möhre (*Daucus carota*), Kaffee (*Coffea arabica*), Eiche (*Quercus robur*) und Minze (*Perilla frutescens*) bzw. Glutelinen aus Rizinus (*Ricinus communis*) und Ölpalme (*Elaeis guineensis*) mit einer 100 %igen Sequenzidentität zugeordnet werden. Hierbei ist es auffällig, dass alle dieser Peptide in allen bzw. mehreren Proteinbanden gefunden wurden. Während die Peptide „GLPVEWANSFQISR“ und „NLRPNALSLPNYHPNPR“ beispielsweise in allen fünf Proteinbanden sequenziert werden konnten, waren zwei andere Peptide, nämlich ADIYNPQAGR und NLRPNALSLPNYHPNPR in Proteinbanden B₂, B₃, B₄ und B₅ nachweisbar. 13 weitere Peptidsequenzen, deren Sequenzen in der Sequenzdatenbank NCBI auf bekannte Globuline anderer Spezies hindeuteten, wiederholen sich in mindestens zwei Proteinbanden (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Häufig vorkommende Peptide in Proteinbanden des Chiasamen-Extrakts

Peptidsequenz	Proteinbande (B)	Proteinname	Familie
NTLRPNALSLPNYHPNPR	1,2,3,4,5	Legumin-like protein	<i>Perilla frutescens</i>
GLPVEVVANSFQISR	1,2,3,4,5	11S seed storage protein	<i>Populus trichocarpa</i>
ADIYNPQAGR	2,3,4,5	Legumin	<i>Quercus robur</i>
GLLLPHYNNAPQLLYVVR	2,3,4,5	11S-Globulin	<i>Sesamum indicum</i>
TGPFEFFGFTTSAR	2,3,4	11S-Globulin	<i>Erythranthe guttata</i>
SPMHIGFITMEPK	2,3,4	11S-Globulin	<i>Erythranthe guttata</i>
VNEGDVFWIPR	2,3,4	Globulin-like protein	<i>Daucus carota</i>
LNAQEPSFR	1,3,4	11S storage protein	<i>Coffea arabica</i>
QGQLVVVPQNFAVVK	3,4,5	11S seed storage globulin A	<i>Chenopodium quinoa</i>
LNAQEPSFR	1,3,4	11S storage protein	<i>Coffea arabica</i>
QGQVVIVPQNFAVVK	2,5	11S seed storage protein	<i>Solanum lycopersicum</i>
LTAQEPTIR	1,3	11S-Globulin	<i>Sesamum indicum</i>
ASQDEGLEWISFK	4,5	11S-Globulin	<i>Sesamum indicum</i>
GPDAYNIYDR	3,4	11S-Globulin	<i>Erythranthe guttata</i>
SLFIPQYLDSSLILFVR	2,4	11S-Globulin	<i>Erythranthe guttata</i>
TNDNAQVSELAGR	4,5	11S seed storage protein	<i>Populus trichocarpa</i>

In allen untersuchten Proteinbanden konnten Peptide dem Protein 11S-Globulin (Legumin) zugeordnet werden, während B₅ zwei Peptide aus dem Protein Glutelin aufwies. Anderen Proteingruppen wie Prolaminen und Albuminen konnten keine Peptide zugeordnet werden, was vermutlich an der geringen Konzentration dieser Proteine lag. Darüber hinaus wird vermutet, dass die Albumine und Prolamine in Chiasamen nicht IgE bzw. IgG-bindend sind. Dies muss durch Auftrennung solcher Proteine und Untersuchung der IgE- bzw. IgG-Bindungsfähigkeit bestätigt werden.

Laut der Literatur wurden Proteinbanden in ähnlichen MG-Bereichen als Untereinheiten der Globuline z.B. Viciline bzw. Legumine charakterisiert (Warsame et al., 2018). So wurden beispielsweise in Ackerbohne, Erbse bzw. Sojabohne Proteinbanden bei 60 kDa als Convicilin bzw. bei 46-55 kDa als Vicilin identifiziert (Bourgeois et al., 2009; Le Signor et al., 2017; Liu et

al., 2017). Des Weiteren wurden Proteinbanden bei 38-40 kDa bzw. 18-23 kDa in mehreren Studien als Untereinheiten des Legumins A (saure Untereinheit) bzw. Legumin B (basische Untereinheit) identifiziert (Boehm et al., 2018; Bourgeois et al., 2009; Le Signor et al., 2017; Utsumi et al., 1980).

Sandoval-Oliveros und Paredes-Lopez (2013) haben Chiasamenproteine in einer Studie mittels UHPLC-ESI-MS/MS charakterisiert. So wurden Proteinbanden bei 31, 23 und 20 kDa als Untereinheiten des Legumins bestätigt. Dies stimmt mit der MS-Messung der Proteinbanden im Chiasamen-Extrakt überein. Allerdings wurden Proteinbanden bei 49 und 45 kDa als Vicilin identifiziert, was mittels der nach 1D-Gelelektrophorese durchgeführten MS-Messung nicht bestätigt werden konnte (siehe Tabelle 7). Dies lag vermutlich daran, dass die MS-Messung von Sandoval der Globulin-Fraktion in Chiasamen gewidmet war. Aufgrund der hohen Anzahl an Begleitproteinen wie z.B. Enzymen oder nicht charakterisierten Proteinen, wird vermutet, dass diese Proteine ein Störfaktor für diese MS-Messung sind. Deshalb waren die aus dem 7S-Globulin (Vicilin) stammenden Peptide bei der Auswertung nicht mehr zu detektieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Zielproteine zunächst durch geeignetere Trennverfahren isoliert werden müssen, um eine präzisere Charakterisierung zu erzielen (siehe Abschnitt 4.3.).

4.2.6. Serumspezifische IgE-Immunblot Analyse

Allergene werden in der Regel basierend auf ihrer Relevanz für den Patienten in drei Kategorien unterteilt. So wird ein Allergen als Majorallergen betrachtet, wenn es in mehr als 50 % der getesteten Humanseren spezifisches IgE bindet (WHO, 2001a, b). Wird die Sensibilisierung der Patienten bei weniger als 10 % hervorgerufen, liegt ein Minorallergen zugrunde. Bei Intermediärallergenen ist die Sensibilisierung zwischen 10-50 % der Patienten nachzuweisen (WHO, 2001a, b). Aus der Detektion mit Humanseren (Abschnitt 4.2.3.) kann geschlussfolgert werden, dass die Proteinbanden bei 49, 45, 31 und 20 kDa von beiden Serumtypen (von Sesam- und Haselnussallergikern) detektiert wurden. Wie auf Abbildungen 8, 10 und 11 zu sehen ist, werden die als Legumin identifizierten Proteinbanden bei 31 und 20 kDa von 81,8 % der Blutseren von Haselnussallergikern und von 80 % (Proteinbande 31 kDa) bzw. 100 % (Proteinbande 20 kDa) der Blutseren von Sesamallergikern erkannt. Deshalb sind diese als Majorallergene zu betrachten. Außerdem deutet dieses Ergebnis auf spezifische IgEs in beiden Serumtypen mit ähnlichen Paratopen hin, da sie an dieselben Proteine binden können.

Dies gilt aber nicht für die 23 kDa-Proteinbande, da diese ausschließlich mittels vier Blutseren von Sesamallergikern erkannt wurde, aber nicht mittels Blutseren von Haselnussallergikern.

Vermutlich fehlen die spezifischen IgEs für dieses Monomer in den Blutseren von Haselnussallergikern. Die Unterschiede in der IgE-Bindungsfähigkeit bei Humanseren sind in der Literatur bekannt. In einer Studie zur Charakterisierung der Allergene in Bockshornklee enthielten zwei Humanseren eine hohe Konzentration an spezifischen IgEs gegen Weizen, die in anderen verwendeten Humanseren nicht nachweisbar waren (Faeste et al., 2009).

Die in der Literatur als Vicilin beschriebenen Proteinbanden bei 49 und 45 kDa wurden von ca. 35 % der Blutseren von Haselnussallergikern und 20 % der Blutseren von Sesamallergikern detektiert. So könnten diese theoretisch als Intermediärallergene bezeichnet werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass die IgE-Bindungsfähigkeit der verwendeten Humanseren zu Legumin höher ist als zu Vicilin. Hingegen zeigen die kommerziellen Sesamantikörper eine höhere IgG-Bindung zu Proteinbanden des Vicilins als zu diesen des Legumins.

Die Proteinbanden bei 12, 9 und 6 kDa, welche mittels Blutseren von Sesam- bzw. Haselnussallergikern detektiert wurden, präsentieren vermutlich das 2S-Albumin und seine zwei Untereinheiten (schwere Kette und leichte Kette). Das 2S-Albumin wurde in der Literatur in verschiedenen Spezies wie Sesam, Lupine und Sojabohne charakterisiert (Lin et al., 2006; Nadal et al., 2011; Wolff et al., 2003). Diese Proteinbanden werden im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter charakterisiert, da sie für die Kreuzreaktivität zwischen Chiasamen und anderen Spezies keine Relevanz darstellen (siehe Tabelle 5 im Abschnitt 4.2.4).

Ob die identifizierten Proteine als Allergene bezeichnet werden dürfen, ist unklar. Dafür müssten Humanstudien durchgeführt werden.

4.3. Isolierung IgE-bindender Proteine aus Chiasamen

Für die Isolierung der IgE-bindenden Proteine in Chiasamen wurden aufgrund der nicht ausreichenden Menge der zur Verfügung stehenden Humanseren lediglich kommerzielle Antikörper zur Detektion eingesetzt. Hierbei wurden verschiedene fraktionierte Fällungen und chromatographische Methoden verwendet. Die Methoden AS-Fällung, GPC, IAC-MB, IEC, 2D-Gelelektrophorese werden auf ihre Eignung, das vorliegende Proteingemisch zu trennen, untersucht. Der Fokus bei der Isolierung wird auf die EBPs bzw. GBPs gelegt, welche bei der Mehrheit der Humanseren detektiert wurden. Dafür wurden Chiasamenproteine bei 60, 49, 45, 31, 23, 20 kDa ausgewählt (siehe Abschnitt 4.2.4.).

4.3.1. Isolierung mittels Osborne-Fraktionierung

Um die Zielproteine effektiver charakterisieren zu können werden die Proteine im Acetonpulver fraktioniert. Dies bedeutet, dass die Proteine im Acetonpulver anhand ihrer Löslichkeit in unterschiedlichen Lösungsmitteln nach der von Osborne beschriebenen Methode in vier Proteinfractionen unterteilt werden (Osborne, 1924). Tabelle 8 gibt die Proteinfractionen mit ihrer jeweiligen Konzentration und die zur Fraktionierung verwendeten Puffer an. Alle Puffer enthalten 2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, Protease-Inhibitor), das den enzymatischen Abbau der Proteine während der Lagerung verhindert. Die Methode ist im Abschnitt 7.5. beschrieben. Nach der Fraktionierung wurde die Proteinkonzentration der erhaltenen Fraktionen mittels Bradford-Methode bestimmt (siehe Abschnitt 7.4.). Die Fraktionen wiesen unterschiedliche Proteinanteile auf. So zeigte die Globulin-Fraktion (GLO) den höchsten Proteinanteil mit 69,2 %, gefolgt von der Glutelin-Fraktion (GLUT) mit 10,60 %. Während die Albumin-Fraktion (ALB) einen Proteinanteil von 9,4 % hatte, wurde in der Prolamin-Fraktion (PRO) nur 2,60 % nachgewiesen. Eine ähnliche Proteinverteilung in solchen Fraktionen wurde in anderen Pflanzen wie Erbsen, Baumwolle bzw. Lupinen nachgewiesen (Nikokyris und Kandyliis, 1997). Es ist klar, dass die Verteilung der Fraktionen von verschiedenen Faktoren wie z.B. der Extraktionsmethode abhängt, allerdings war der Proteinanteil von GLO in dieser Arbeit höher verglichen mit einer Studie, die einen Proteinanteil von GLO in Chiasamen von 52 % ermittelt hat (Sandoval-Oliveros und Paredes-Lopez, 2013). Die niedrige Proteinkonzentration von PRO erschwerte die Extraktion sowie die Proteinbestimmung enorm, sodass die Fraktion am Ende mit SpeedVac unter Vakuum getrocknet und wieder mit dem entsprechenden Puffer aufgenommen werden musste.

Tabelle 8: Proteinanteile und –Konzentrationen sowie die Extraktionspuffer der Osborne-Fractionen

Proteinfraktion	Bezeichnung	Proteinkonzentration mg/ml	Anteil %	Extraktionspuffer
Albumin	ALB	0,74	9,4	Wasser
Globulin	GLO	5,40	69,2	Tris-Puffer mit 0,5 M NaCl (GLO-Puffer)
Prolamin	PRO	0,20	2,6	70 % Isopropanol
Gluteline	GLUT	0,83	10,6	0,1 M Borax

Die erhaltenen Extrakte wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Die Immunfärbung wurde ausschließlich mit kommerziellen Sesamantikörpern durchgeführt. In Abbildung 14 sind das Gesamtproteinmuster des PBS-Extrakts von Chiasamen sowie die vier Proteinfraktionen dargestellt (Abbildung 14, Teil A). Die Extrakte der Proteinfraktionen wurden zuvor einheitlich auf die gleiche Konzentration (500 ug/ml) eingestellt.

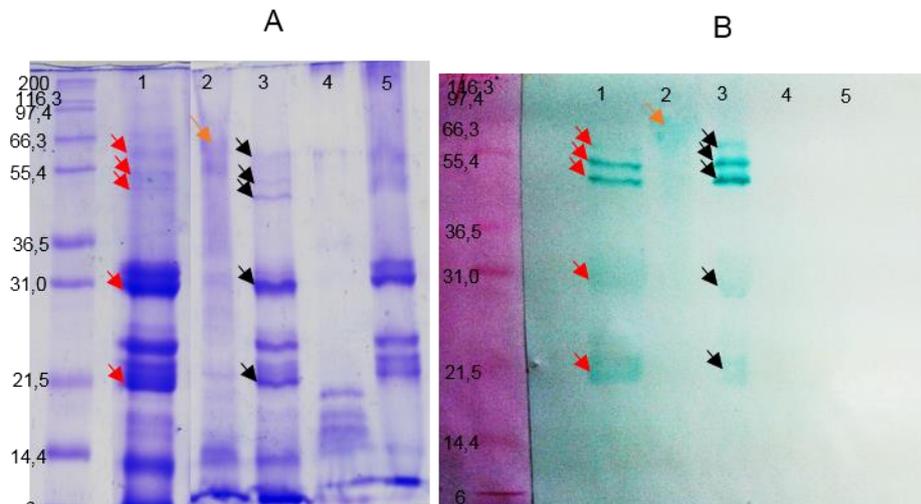


Abbildung 14: A: Auftrennung des PBS-Extrakts und die vier Proteinfraktionen mittels SDS-PAGE, B: Immunfärbung, Spur 1: PBS-Extrakt, Spur 2: Albumin-Fraktion, Spur 3: Globulin-Fraktion, Spur 4: Prolamin-Fraktion, Spur 5: Glutelin-Fraktion, rote Pfeile=IgG-bindende Proteine im PBS-Extrakt, orangene Pfeile= in Albumin-Fraktion und schwarze in Globulin-Fraktion

Auf dem SDS-Gel ist zu erkennen, dass die Fraktionen unterschiedliche Proteinmuster aufweisen. Die Globulin-Fraktion (GLO) zeigt ein ähnliches Proteinmuster zum PBS-Extrakt auf. Jedoch sind die Proteinbanden bei 60, 49 und 45 kDa in GLO intensiver als im PBS-Extrakt, was auf eine optimierte Extraktion zurückzuführen ist. In der Albumin-Fraktion (ALB) konnten mehrere schwache Proteinbanden mit MG von 20 bis 70 kDa mittels kCF visualisiert werden. Es konnte lediglich eine starke Proteinbande bei MG von 14 kDa beobachtet werden.

Proteinbanden in der Prolamin-Fraktion (PRO) erstreckten sich über den MG-Bereich von 14-20 kDa. Darüber hinaus ähnelte das Proteinmuster der Glutelin-Fraktion (GLUT) dem von GLO, wobei die in GLO visualisierten Proteinbanden bei 45 und 49 kDa in GLUT nicht vorhanden waren.

Anhand der Sesamantikörper konnten die Proteinbanden bei 60, 49, 45, 31, 23 und 20 kDa in GLO detektiert werden (Abbildung 14, Teil B). In ALB konnte lediglich eine Proteinbande bei 80 kDa schwach visualisiert werden. Hier fällt auf, dass die Intensität der detektierten Proteinbanden 45 und 49 kDa in GLO stärker waren als im PBS-Puffer. Auch die Proteinbanden, die im PBS-Extrakt mit kommerziellen Haselnussantikörpern detektiert wurden, konnten in GLO nachgewiesen werden. Da sich die meisten mit kommerziellen Antikörpern bzw. Humansenen detektierten Proteinbanden in GLO befinden, wird diese Fraktion zur Isolierung der Zielproteine eingesetzt.

4.3.2. Isolierung mittels Fällungsmethoden

4.3.2.1. Ammoniumsulfat-Fällung (AS-Fällung)

Durch diese Methode der fraktionierten Fällung kann ein Proteingemisch grob aufgetrennt werden, wobei eine spezifische Isolierung der Zielproteine unwahrscheinlich ist. Eine weitere Isolierung des Proteingemisches kann anhand weiterer chromatographischer Verfahren erfolgen. Die Fraktion GLO wurde für die Fällung eingesetzt. Hierbei wurde diese Fraktion mit zerriebenem Salz versetzt und geschüttelt, so dass der Anteil des gesättigten Ammoniumsulfats 15, 30, 40, 50 % betrug. Die ausgefallenen Proteine wurden durch Zentrifugation abgetrennt und die erhaltenen Extrakte wurden entsalzen, elektrophoretisch aufgetrennt und mit kCF visualisiert. Genaue Angaben zur im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methode sind unter 9.1.14.1. im Anhang zu finden.

Die Abbildung 15 zeigt das Proteinmuster von GLO vor der AS-Fällung sowie der AS-Extrakte nach Zugabe von 15 %, 30 %, 40 % und 50 % Ammoniumsulfat (AS) mittels SDS-PAGE. Auf der Spur 1 (GLO) wurden Proteinbanden im MG-Bereich 20-60 kDa visualisiert. Nach einer Fällung mit 15 % AS blieb das Proteinmuster (Spur 2) unverändert. Wird die AS-Konzentration auf 30 % erhöht, fallen alle Proteine in GLO aus, mit Ausnahme von Proteinbanden bei 45 und 49 kDa (Spur 3). Somit konnten diese Proteinbanden durch diese Methode erfolgreich isoliert werden.

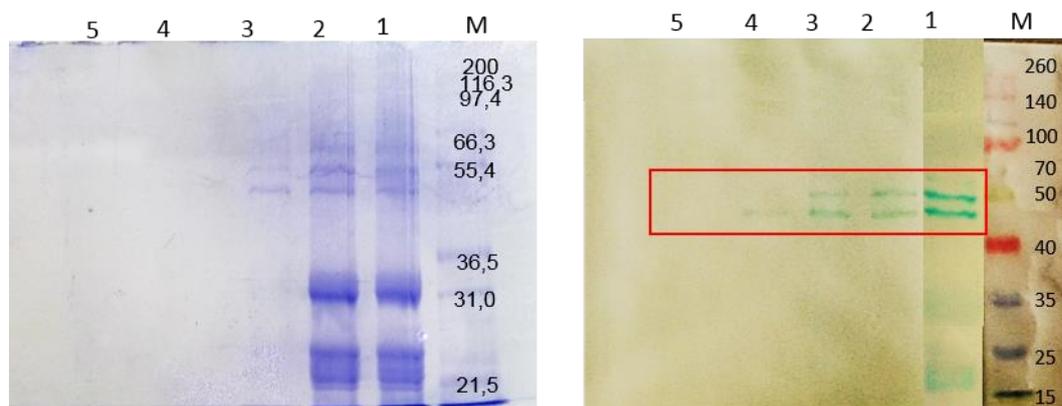


Abbildung 15: Auftrennung von GLO sowie der erhaltenen Fraktionen nach AS-Fällung mittels SDS-PAGE (links) und die dazugehörige Immunfärbung mittels SA (rechts). M: Marker, 1: GLO, 2-5: AS-Fractionen 15%, 30%, 40%, 50%

Bei höheren Konzentrationen (40-80 %) konnten bis auf eine sehr leichte Proteinbande bei 45 kDa in der 40 %-Fraktion (Spur 4) keine Proteinbanden mehr beobachtet werden. Fraktionen mit höheren Konzentrationen bei 70, 80 und 90 % sind nicht in der Abbildung 15 dargestellt.

Im Weiteren stellt sich die Frage, ob die isolierten Proteinbanden noch IgE bzw. IgG-Bindungsfähigkeit besitzen. Deshalb wurden die erhaltenen Fraktionen auf eine NC-Membran geblottet und mit kommerziellen Sesamantikörpern immungefärbt (siehe Abbildung 15). Hierbei ist zu erkennen, dass die isolierten Proteine bei 45 und 49 kDa (rot markiert) noch an die Antikörper binden konnten. Andere Zielproteine z.B. bei 31 und 20 kDa konnten in der 15 %-Fraktion nicht detektiert werden. Vermutlich lag es an dem Einfluss von AS auf die IgG-Bindung. In einer Studie wurde die AS-Fällung in einer Konzentration von 52,5 % eingesetzt, um das Allergen Ana o 1 (*vicilin-like protein*) mit einem ähnlichen MG von 50 kDa aus Cashewnuss zu isolieren (Reitsma et al., 2016). Es lässt sich vermuten, dass die isolierten Proteinbanden bei 45 und 49 kDa Monomere aus dem Vicilin ähnlichen Protein in Chisamen sein könnten.

Zur weiteren Charakterisierung dieser Proteine wurden die Extrakte nach Zugabe von 30 % und 40 % AS vereinigt und mittels Ultrafiltration (Amicon Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheit, 30 kDa) aufkonzentriert (siehe Anhang unter 9.1.14.3.). Diese Fraktion wurde mittels SDS-PAGE wieder aufgetrennt. Die Proteinbanden bei 45 und 49 kDa wurden ausgestanzt, tryptisch verdaut und anschließend mit UHPLC-ESI-MS/MS charakterisiert. Durch *De Novo* Sequenzierung konnten die Proteinbanden bei 49 und 45 kDa als Vicilin aus verschiedenen Spezies wie Sesam und gelbe Gauklerblume identifiziert werden (siehe Tabelle 35 im Anhang unter 9.2.5.1.). Hierbei kann geschlussfolgert werden, dass sich das Vicilin und seine Isoforme in den Proteinbanden bei 45 und 49 kDa zu finden sind.

4.3.2.2. PEG-Fällung

Diese Methode wird im Rahmen dieser Arbeit zum Aufkonzentrieren der GPC- und IEC-Fractionen eingesetzt, da die Proteinkonzentration der erhaltenen Fractionen zu niedrig war, so dass eine Visualisierung der mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine erschwert wurde. Außerdem bleiben die Proteine nach der PEG-Fällung intakt und verlieren ihre IgE- bzw. IgG-Bindungsfähigkeit nicht, so dass sie für weitere Untersuchungen eingesetzt werden können. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die Wiederaufnahme der ausgefällten Proteine in GLO-Puffer. Die Durchführung ist dem Anhang unter 9.1.14.2. zu entnehmen. So wurden 10 Reaktionsgefäße mit 100 µl GLO und je 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 bzw. 100 µl 33 %ige PEG-Lösung versetzt. Die PEG-Endkonzentrationen sind unter 9.1.14.2. zu finden.

In Abbildung 16 ist es erkennbar, dass die Proteine im MG-Bereich 20-35 kDa bei der niedrigsten Konzentration ausgefallen sind (Spur 1). Für die Fällung der Proteine bei 45 und 49 kDa werden höhere Konzentrationen benötigt (Spur 2-5). Allerdings fallen Globuline im MG-Bereich 10-35 mit aus. Auf Spur 6 waren nur Proteine im MG-Bereich 10-35 kDa aber viel schwächer zu beobachten.

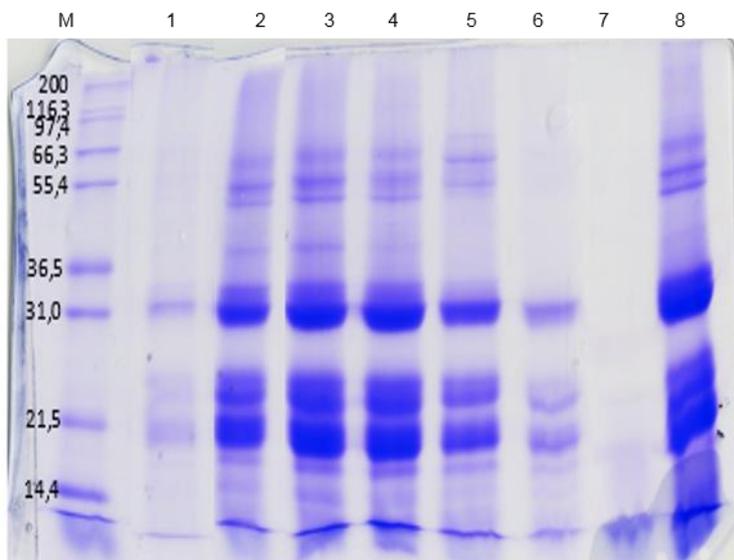


Abbildung 16: Auftrennung von GLO sowie der erhaltenen Fractionen nach PEG-Fällung mittels SDS-PAGE. M: Marker, 1-7 Fractionen mit aufsteigender PEG-Menge(3,3-33 µg), 8: GLO

Da die Globuline gleichzeitig ausgefallen sind, ist nicht davon auszugehen, dass nur durch diese Ausfällungsmethode eine Isolierung der Globuline im MG-Bereich 10-35 kDa von restlichen Proteinbanden erfolgreich sein könnte. Das frühere Verschwinden von Globulinen im MG-Bereich 40-60 kDa in Spur 6 im Vergleich zu den anderen Proteinbanden könnte am Unterschied in der Proteinkonzentration in den jeweiligen Proteinbanden liegen. Das bedeutet, je niedriger die Proteinkonzentration in den Proteinbanden ist, desto schneller findet das

Ausfallen der Proteine statt. Da diese Methode keine spezifische Trennung der Zielproteine bietet, wird sie nur zum Aufkonzentrieren der GPC- und IEC-Fractionen eingesetzt.

4.3.3. Isolierung mittels chromatographischer Methoden

4.3.3.1. Isolierung mittels GPC

Für die weitere Isolierung der Globuline in Chiasamen wurde GLO zunächst mit Hilfe der Gelfiltration über eine Superdex 200-Säule nach Molekulargewicht (MG) aufgetrennt. Die Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit angewandt, um ausschließlich Zielproteine in GLO zu isolieren. Alle Proteine, die ein MG größer als 200 kDa besaßen, sind mit dem Laufpuffer als Durchlauf im Ausschlussvolumen der Säule eluiert. Die Abbildung 17 zeigt das Chromatogramm für die Trennung der Globuline. Hierbei sind sechs Peaks zu erkennen, deren Fraktionen potenzielle Proteinmengen enthalten (höher als 6 mAu). Fraktionen unter jedem Peak wurden vereint, mittels PEG-Fällung aufkonzentriert und die Globuline unter reduzierten Bedingungen mit SDS-PAGE aufgetrennt (siehe Tabelle 9). Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 dargestellt.

Tabelle 9: Die Peaks der GPC-Trennung

Peak	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4	Peak 5	Peak 6
Fraktionenpools	21-25	26-30	31-41	45-50	51-55	57-63

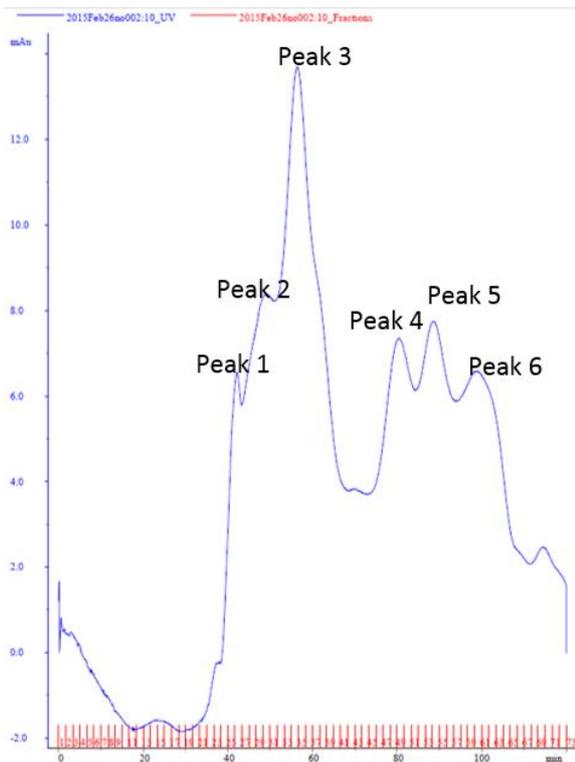


Abbildung 17: Chromatogramm der GPC Trennung von GLO, erste Aufreinigung

Unter Peak 1 und 2 waren Proteine mit MG zwischen 20-70 kDa und einer sehr niedrigen Konzentration vertreten. Peak 3 wies die höchste Proteinkonzentration auf und enthielt alle Proteinbanden, die in GLO-Fraktion ersichtlich sind, was auf eine nicht gelungene Auftrennung der Globuline hindeutet. Jedoch konnte unter Peak 5 die Proteinbande mit MG von 12 kDa von anderen Proteinbanden sehr gut isoliert werden (Abbildung 18, Spur 6).

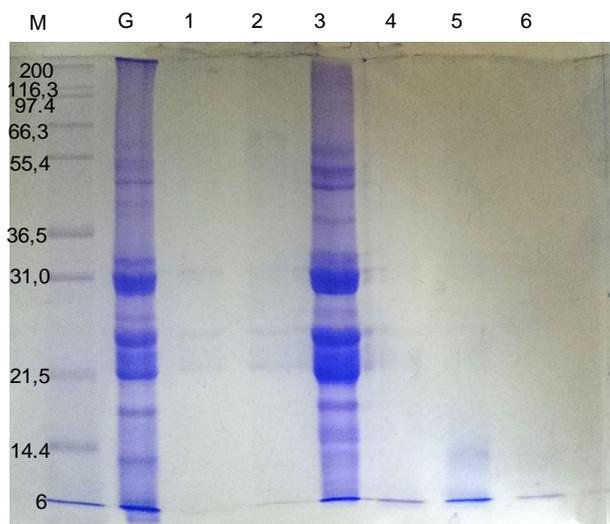


Abbildung 18: SDS-PAGE der Fraktionpools nach Trennung von GLO mittels GPC, M: Marker, G: GLO, 1-6: Fraktionpools der Peaks 1-6

In einer Studie konnte anhand dieser Methode das Profilin gleiches MG in der Litschi gut von anderen Allergenen isoliert werden (Hoppe, 2006). Daher könnte dies ein Indiz sein, dass die isolierte Proteinbande in Spur 5 das Profilin in Chiasamen vertritt. Allerdings wurde diese Proteinbande in Chiasamen nicht weiterverfolgt, da Profileine nicht im Fokus dieser Arbeit stehen.

Um die Proteine unter Peak 3 mit dieser Methode gezielter trennen zu können, wurde eine zweite Aufreinigung durchgeführt, wobei hier die Fraktionen unter Peak 3 mittels SDS-PAGE einzeln untersucht wurden. Das Chromatogramm sowie die Fraktionen 25 bis 41 der zweiten Aufreinigung sind auf Abbildungen 55 und 56 im Anhang unter 9.2.5.2. dargestellt. Hier wird schnell ersichtlich, dass sich die Globuline in Chiasamen mittels GPC sehr schlecht trennen lassen. Proteinbanden im MG-Bereich 21-35 kDa eluierten über den gesamten chromatographischen Verlauf. Ausschließlich eluierten Proteinbanden bei 45 und 49 kDa stärker in Fraktionen 38, 39 und 40 als in anderen Fraktionen. In der Fraktion 41 konnten nur Proteinbanden im Bereich 21-35 kDa visualisiert werden.

Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass die Ergebnisse aufgrund der ähnlichen Retentionszeit und des Elutionsverhaltens der Proteinbanden nicht zufriedenstellend waren. Diese Methode könnte als eine Vorisolierung oder gekoppelt mit anderen Isolierungsmethoden zum Einsatz kommen. Reitsma et al. (2016) haben diese Methode gekoppelt mit IEC zur

Isolierung von Ana o 3 (*legumin-like protein*) erfolgreich eingesetzt. Deshalb werden noch weitere chromatographische Verfahren zur Isolierung der Zielproteine in Chiasamen eingesetzt werden.

4.3.3.2. Isolierung mittels IEC

Als eine sehr schonende Fraktionierung eines Proteingemisches stellt sich die Ionenaustauschchromatographie (IEC) dar. Aufgrund der fehlenden Daten zu dem pI der Globuline in Chiasamen wird im Rahmen dieser Arbeit das zur Isolierung der Zielproteine geeignete Säulenmaterial ermittelt. Hierfür kam das *HiTrap™ IEX Selection Kit* zum Einsatz, welches ein schnelles Screening zur Auswahl des geeigneten Säulenmaterials anbietet. Dieses Kit enthält sieben 1 ml-Säulen, vier davon sind Anionenaustauscher und die restlichen drei sind Kationenaustauscher. Das Ziel dieser Untersuchung ist, die sieben Säulenmaterialien in Bezug auf Trennleistung miteinander zu vergleichen, um das geeignete Säulenmaterial zur Trennung der EBPs bzw. GBPs in GLO herauszufinden. Die Methode ist im Abschnitt 7.11.2. beschrieben. Hierfür sind Trennparameter wie die Fließgeschwindigkeit (1 ml/min), das Puffersystem, das Säulenvolumen (1 ml) und die auf die Säule aufgetragene Probenmenge festgehalten. Da eine hohe Salzkonzentration die chromatographische Trennung von Proteinen an IEC-Säulen erheblich verschlechtern könnte, wurde die Salzkonzentration in der Probe auf 25 mM reduziert (5 mg Protein in 20 ml Laufpuffer). Somit ist die Salzkonzentration in der Probe und im Laufpuffer exakt gleich. Die erhaltenen Fraktionen (Durchlauf, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1000 mM KCl) wurden mittels PEG-Fällung aufkonzentriert (siehe Abschnitt 7.10.2.).

Die Elution der Proteine mittels Anionenaustauschchromatographie (AEC, engl. *Anion Exchange Chromatography*) erfolgte in Anlehnung an Möller (1997). Hierbei wurde die Trennleistung in vier verschiedenen Säulenmaterialien verglichen, welche quartäre Ammonium (QFF, QXL)-, Diethylaminoethyl (DEAE Sepharose Fast Flow)- bzw. Diethylaminopropylgruppen (ANX Sepharose 4 Fast Flow) als Festionen tragen. QFF (Q Sepharose Fast Flow) zeichnet sich durch die langen Ketten von Dextran aus, welche an die hochvernetzten Agarose-Matrix gebunden sind. Im Gegensatz dazu enthält QXL (Q Sepharose XL) kein Dextran. Nach der Auftrennung erfolgen die Untersuchung der erhaltenen Fraktionen mittels SDS-PAGE, kCF sowie die Immunfärbung mit kommerziellen Sesamantikörpern (siehe Abbildungen 58, 59 und 60 im Anhang unter 9.2.5.3.). Die chromatographische Trennung mittels DEAE-Säule wurde in Abbildung 19 dargestellt. Durch kCF konnten die Globuline in Chiasamen in drei MG-Bereichen (45-65 kDa, 34-36 kDa und 18-25 kDa) unterteilt werden. Bei allen Säulenmaterialien eluiert die Mehrheit der Globuline bei einer Salzkonzentration zwischen 200-400 mM. Außerdem werden Globuline von den verwendeten Säulen generell sehr gut retardiert. Nur bei DEAE sind leicht angefarbte

Proteinbanden im Durchlauf zu sehen. Auffällig ist, dass die Globuline unabhängig von dem Säulenmaterial allmählich und über die ganze Elutionszeit eluieren, weshalb sie in fast allen Fraktionen zu finden sind. Diese Tatsache erschwert eine deutliche Trennung der Globuline mittels AEC. Eine Ausnahme stellt die Trennung anhand der Säulenmaterial DEAE. Hierbei eluieren bereits die Proteine im Bereich 45-65 kDa bei einer Salzkonzentration von 200 mM. Bei einer Salzkonzentration von 400 mM sind diese Proteine vollständig eluiert. Hingegen blieben manche Proteine in Proteinbanden zwischen 18-35 kDa länger in Wechselwirkung mit der Säule und konnten in der letzten Fraktion mit der höchsten KCl-Konzentration detektiert werden (siehe Abbildung 19).

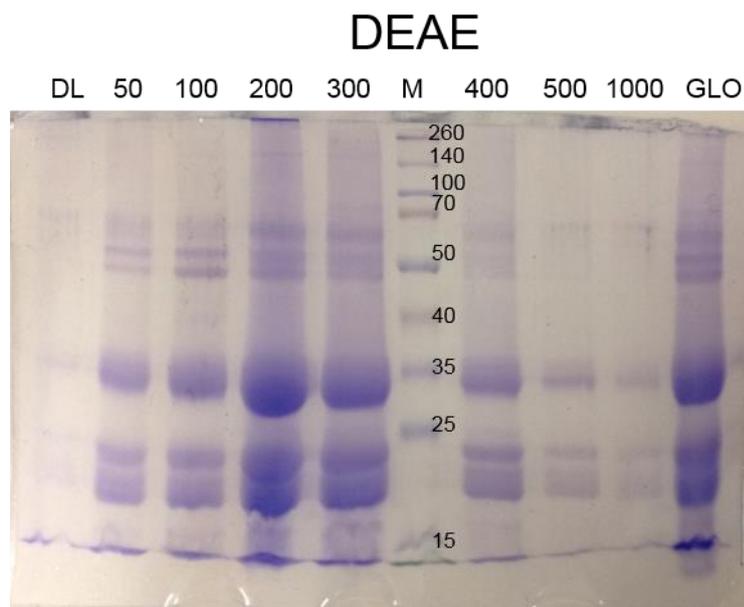


Abbildung 19: Chromatographische Trennung mittels IEC-DEAE. M: Marker, DL: Durchlauf, 50-1000: Fraktionen genannt nach der für die Elution benötigten Salzkonzentration (KCl) in mM, GLO: Globulin-Fraktion

Im Gegensatz dazu eluieren bereits in den ersten zwei Fraktionen mit der Säulenmaterial QFF nur Proteine in den MG Bereichen 34-36 und 18-25 kDa (siehe Abbildung 57 im Anhang unter 9.2.5.3.). Dies könnte vorteilhaft für die Abtrennung dieser Proteinbanden von denen im Bereich 45-65 kDa sein.

Bei Säulenmaterialien ANX und QXL eluieren in den ersten zwei Fraktionen (50 und 100 mM) keine Proteinbanden (Abbildungen 58 und 59 im Anhang unter 9.2.5.3.). Dies deutet auf eine längere Retentionszeit an der Säulenmaterial und somit auf eine starke Wechselwirkung zwischen den Chiasamenproteinen und den Trennsäulen hin. Unter Verwendung von ANX, QFF bzw. QXL findet die vollständige Elution erst bei einer Salzkonzentration von 1000 mM statt, während sie bei DEAE bereits bei 500 mM auftritt.

In Abbildung 20 ist die Immunfärbung mit Sesamantikörpern für die mittels QFF-Säule getrennten Globuline aus Chiasamen. Hierbei ist ersichtlich, dass die IgG-Bindungsfähigkeit

an Sesamantikörper noch vorhanden ist. Dies bedeutet, die Epitope auf Chiasamen-Globulinen bleiben nach dieser Auftrennung intakt. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die Proteinbanden bei 45 und 49 kDa bei einer Konzentration 200-300 mM eluieren und sind in den Fraktion 500 bzw. 1000 nicht mehr nachweisbar. Die restlichen Proteine im MG-Bereich 18-35 kDa waren sogar in der letzten Fraktion (1000 mM KCl) noch detektierbar.

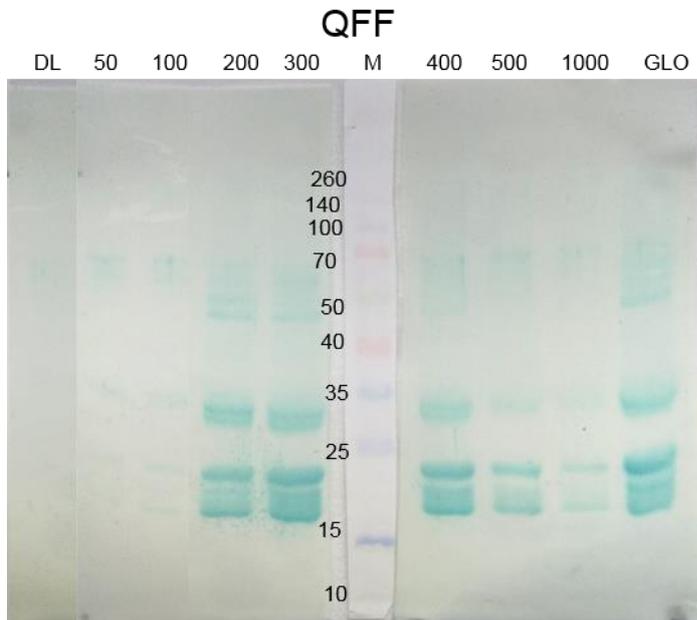


Abbildung 20: Immunfärbung der Fraktionen, welche mittels QFF-Säule getrennt wurden. Zur Detektion wurden Sesamantikörper eingesetzt. M: Marker, DL: Durchlauf, 50-1000: Fraktionen genannt nach der für die Elution benötigten Salzkonzentration (KCl) in mM, GLO: Globulin-Fraktion

Zur chromatographischen Trennung mittels Kationenaustauschchromatographie (CEC, *Cation Exchange Chromatography*) wurden Säulen mit negativ funktionellen Sulfopropyl (SP), Methylsulfonate (S) bzw. Carboxymethyl (CM)-Gruppen verwendet. Nach Empfehlung des Herstellers kam ein Natriumacetat-Puffer mit einem pH-Wert von 4,0 als Laufpuffer zum Einsatz. Die Proteine wurden fraktioniert und mittels Immunoblot untersucht. Es wurden sieben Fraktionen bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen gesammelt (siehe Abbildungen 60, 61 und 62 im Anhang unter 9.2.5.3.). Unter Verwendung von SPFF und SPXL wurde der überwiegende Teil der Globuline im Totvolumen des Chromatographie-Systems wiedergefunden. Somit konnten in den gesammelten Fraktionen mittels beider Säulen keine Zielproteine beobachtet werden. Ausschließlich wurden zwei schwache Proteinbanden im Bereich 60-70 kDa visualisiert, welche nicht weiter charakterisiert wurden. Diese Proteinbanden besitzen vermutlich basische Proteine, die von dem Kationenaustauscher retardiert werden konnten. Der Grund, warum mittels SPFF und SPXL keine effektive Trennung erzielt wurde, ist vermutlich der sehr niedrige pH-Wert des Laufpuffers, welcher außerhalb des Stabilitätsbereichs der Zielproteine lag. Dies könnte das Eluieren von der Trennsäule erschweren. Vermutlich wird eine sehr hohe Salzkonzentration benötigt, um diese

Proteine von der Trennsäule vollständig eluieren zu lassen. Hierbei könnten die Zielproteine sogar denaturieren. Daher wird für die CEC ein pH-Gradient zwischen 5-7 empfohlen.

Unter Verwendung der CM-Säule wurden die Proteine zwar von der Säule zurückgehalten, konnten aber, selbst mit höchster Salzkonzentration von 1000 mM, von der Trennsäule nicht eluiert werden. Das hängt damit zusammen, dass die aktive Gruppe dieser Säule, „Carboxymethyl“, starke Veränderungen in Bezug auf geladene Gruppen der Zielproteine mit sich bringt. Dadurch könnte die Bindungsstärke erhöht werden, so dass die höchste Salzkonzentration zur Elution nicht ausreichend war.

Abschließend ist zu sagen, dass die AEC verglichen mit CEC eine effektivere Auftrennung der Globuline in Chiasamen anbietet. Allerdings wechselwirken die Proteine im MG-Bereich 18-35 kDa stark mit den Säulenmaterialien und eluieren erst mit der höchsten Salzkonzentration, was die Trennung anderer Proteine erschwert. Das bedeutet, sie sind in der letzten Fraktion noch detektierbar. Jedoch ist das Aufkonzentrieren der Zielproteinbanden 45 und 49 kDa in den Fraktionen 200 bzw. 300 mM (KCl) ein Vorteil dieser Methode. Diese Zielproteine können einfach mittels AS-Fällung von den restlichen Proteinen in hohen Mengen isoliert werden (siehe Abschnitt 4.3.2.1.). Durch das frühe Eluieren der Proteinbanden bei 49 und 45 kDa, können Fraktion 500 und 1000 für weitere Isolierung der Zielproteine in den kleineren Proteinbanden benutzt werden. Um die Trennung der Globuline weiter zu verbessern, könnten ein anderer Laufpuffer oder ein pH-Gradient verwendet werden, um die Ionenstärke des Startpuffers zu reduzieren (GE-Healthcare, 2020).

4.3.3.3. Isolierung mittels IAC-magnetic beads (IAC-MB)

In dieser Arbeit wurde eine schnelle Methode basierend auf *magnetic beads* (MB) zur Isolierung der Zielproteine entwickelt. Dafür wurden 25 µg SA an 10 mg MB gekoppelt. Um diese Kopplung an MB zu prüfen, wurden diese mit Sekundärantikörpern inkubiert, welche an SA binden konnten und mit Meerrettichperoxidase (HRP) versehen waren. Zwei Blindproben, eine mit nicht gekoppelten MB und eine ohne Sekundärantikörper wurden mit vorbereitet. Durch die enzymatische Umsetzung der Substrate und die Entstehung eines gelben Farbstoffs, konnte nachgewiesen werden, dass die kommerziellen Antikörper erfolgreich an MB gekoppelt waren (siehe Abbildung 63 im Anhang unter 9.2.5.4.). Eine Farbentwicklung wurde bei der Blindprobe nicht beobachtet.

Als nächstes wurden 200 µg MB mit 400 µg Globulin aus Chiasamen über Nacht (ÜN) inkubiert und anschließend dreimal mit PBS-Puffer gewaschen. Hierbei sollen die Zielproteine an die Antikörper gebunden bleiben und die Störproteine weggespült werden. Die Bindung zwischen Antikörper und Antigen könnte laut Holtzhauer (1997) mit diversen Puffern zerstört werden. Unter dem Punkt 9.1.17.4. im Anhang sind die in dieser Arbeit verwendeten

Entkopplungspuffer aufgeführt. Nach einer Inkubation mit diesen Puffern wurden die MB zentrifugiert, der Überstand mit SDS-PAGE aufgetrennt und mit kCF visualisiert.

Durch alle Puffer mit Ausnahme von Puffer 1 konnten die Proteine bei MG von 45 und 49 kDa erfolgreich eluieren. Darüber hinaus waren Puffer 8 (0,15 M NaCl/NH₄OH) und Puffer 9 (0,1 M Trithylamin) sogar in der Lage, weitere Zielproteine bei MG-Bereichen 31, 23 und 20 kDa zu eluieren. Diese waren im Falle von Puffer 9 noch intensiver als mit Puffer 8, was auf eine größere eluierte Proteinmenge hindeutete. Folglich wurde mit Puffer 9 weitergearbeitet.

In Abbildung 21, Teil A ist die Isolierung der Zielproteine mittels Puffer 9 dargestellt (Teil A). Spur 1 ist die Blindprobe, wobei MB mit PBS-Puffer statt GLO inkubiert wurde. Die eluierten Proteine wurden in Spur 2 aufgetragen, während Spur 3 die erste Waschlösung mit PBS-Puffer zeigte. Die Waschlösung nach dem zweiten und dritten Waschschrift wies keine Proteinbanden mehr auf, was als Beweis für eine geeignete Zusammensetzung der Waschlösung dient. In der Spur 4 wurde zum Vergleich GLO aufgetragen, um die Selektivität dieser Methode zu überprüfen. So konnten Proteinbanden in Spur 4 bei MG von 40, 18, 15 und 13 kD detektiert werden, welche im Eluat, wie erwartet, nicht beobachtet wurden. Die mit SA detektierten Proteinbanden bei 49, 45, 31, 23 und 21 kDa, konnten im Eluat wiedergefunden bzw. spezifisch isoliert werden. Dies bestätigt die spezifische Isolierung der Zielproteine durch MB. Außerdem wurden in der Blindprobe (Spur 1) keinerlei Proteinbanden identifiziert, was untermauert, dass der PBS-Puffer zu keiner Entkopplung der an MB immobilisierten Antikörper geführt hat. Daraus könnte geschlossen werden, dass die an MB noch gekoppelten Antikörper nach Entkopplung der Zielproteine theoretisch für weitere Isolierungszyklen einsatzbereit sind. Dies wurde überprüft, indem MB erneut mit Glo inkubiert wurden (zweiter Zyklus, Abbildung 21, Teil B, Spuren 5-8).

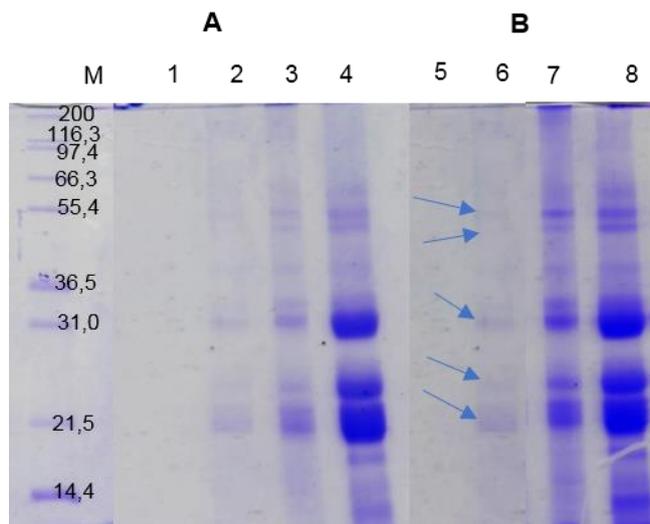


Abbildung 21: Isolierung der Zielproteine mittels Entkopplungspuffer 9. M: Marker, Teil A (Spuren 1-4): erster Isolierungszyklus, 1: Blindprobe (erster Zyklus), 2: Isolierte Proteinbanden, 3: Waschlösung nach der ersten Waschrunde, 4: GLO, Teil B: zweiter Isolierungszyklus (Spuren 5-8)

Während Spur 5 die Blindprobe war, präsentiert Spur 6 die Proteinbanden im Eluat nach dem zweiten Isolierungszyklus. Es ist eine erfolgreiche Isolierung im zweiten Zyklus festzustellen, da die gleichen Proteinbanden wie im ersten Zyklus vorhanden sind. Allerdings fällt beim Vergleich der Spuren 2 und 6 auf, dass Proteinbanden im zweiten Zyklus intensiver sind als im ersten. Dies könnte daran liegen, dass nach dem ersten Isolierungszyklus mit Puffer 9 nicht die gesamte Menge an gekoppelten Zielproteinen eluiert wurde, was im zweiten Zyklus zur Erhöhung der Konzentration der Zielproteine im Eluat führte.

Um die IgG-Bindungsfähigkeit der isolierten Proteine aus sowohl dem ersten als auch dem zweiten Zyklus zu überprüfen, wurden diese auf eine NC-Membran geblottet und mit SA detektiert. Die mittels IAC-MB isolierten Zielproteine aus beiden Zyklen wiesen keine IgG-Bindungsfähigkeit auf. Dies liegt vermutlich daran, dass sich die Proteinlöslichkeit durch die pH-Veränderung verschlechtert, was zur Beeinträchtigung der IgG-Bindung führt (L'Hocine et al., 2007). Es ist allerdings zu berücksichtigen, dass die isolierten nativen Proteine (im nichtreduzierten Zustand) der pH-Veränderung ausgesetzt sind, wodurch relevante Epitope verdeckt worden wären.

Um die isolierten Zielproteine zu identifizieren, wurden Proteinbanden bei MG von 49, 45, 31, 23 und 20 kDa aus Spur 6 ausgestanzt und tryptisch verdaut. Die ausgestanzten Proteinbanden sind auf Abbildung 22 mit einem blauen Pfeil markiert. Die entstandenen Peptide wurden massenspektrometrisch analysiert.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 36 im Anhang unter 9.2.5.4. dargestellt. Insgesamt konnten 14 unterschiedliche Peptidsequenzen aus fünf Proteinbanden *De Novo* sequenziert werden, was ca. ein Zehntel der Peptidanzahl der mittels 1D-Gelelektrophorese untersuchten Proteine

beträgt (siehe Abschnitt 4.2.5. und Tabelle 34 im Anhang unter 9.2.4.3.). Dieses Ergebnis zeigt die hohe Selektivität dieser Methode zur Isolierung der Zielproteine mittels *magnetic beads*. Die hier erhaltenen Peptidsequenzen wurden mit den aus der MS-Analyse nach Auftrennung mittels 1D-Gelelektrophorese gewonnenen Peptidsequenzen verglichen. Hierbei fällt unmittelbar auf, dass von 14 Peptidsequenzen nur fünf mit einer Ähnlichkeit von über 70 % identifiziert werden konnten. In der Tabelle 10 sind diese fünf Peptidsequenzen aus zwei MS-Messungen dargestellt (identische Aminosäuren sind in grün markiert).

Tabelle 10: NCBI-BLAST-Vergleich der durch IAC-MB bzw. 1D-Gelelektrophorese isolierten Peptidsequenzen aus Chiasamen, welche mittels MS-Analyse und De Novo Sequenzierung untersucht wurden

Proteinbande	IAC-MB	1D-Gelelektrophorese	Übereinstimmung % NCBI-BLAST
Bande 1	GLVLPFYTNA	GLLLPHYNNA	70 %
Bande 3	DNALVSPLAGR	TNDNAQVSELAGR	81,82 %
	LQQL	LQQL	100 %
Bande 4	ALSLPNYHNPPR	NTLRPNALSLPNYHPNPR	90,91 %
Bande 5	DNALVSPLAGR	TNDNAQVSELAGR	81,82 %

Die restlichen 9 Peptide waren durch die erste MS-Messung (1D-Gelelektrophorese) nicht nachzuweisen bzw. nicht zu sequenzieren. Dies liegt vermutlich daran, dass die Konzentration der Begleitproteine höher als die Konzentration der Zielpeptide war, sodass sie mittels UHPLC-ESI-MS/MS nicht mehr bzw. schwer zu detektieren waren.

11 sequenzierte Peptide waren in mehreren Proteinbanden nachweisbar, was auch bei der ersten MS-Analyse nach 1D-Gelelektrophorese (Abschnitt 4.2.5.) beobachtet wurde. Es handelt sich hier vermutlich um verschiedene Peptidfragmente bzw. Isoformen eines Trimers bzw. Hexmers mit unterschiedlichem MG. Dieses Phänomen konnte in mehreren Studien beobachtet werden (Bourgeois et al., 2009; Fontes et al., 1984; Le Signor et al., 2005; Tucci et al., 1991). Peptidsequenzen YYLAGSAPQG, FLAGNPQS-LESQ und TQCQLQQLSAR, welche als Legumin identifiziert wurden, kamen in vier Proteinbanden vor, während die restlichen 8 Peptide nur in 2 Proteinbanden nachzuweisen waren (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: Identifizierung der Proteinbanden mittels der Datenbank NCBI

Peptidsequenz	Proteinbande	Proteinname	Familie
YYLAGSAPQG	1,2,3,5	Legumin 11S-globulin	<i>Ginkgo biloba</i>
TQCQLQQLSAR	2,3,4,5	Legumin B like precursor	<i>Sesamum indicum</i>
FLAGNPQS-LESQ	1,3,4,5	legumin B-like	<i>Populus euphratica</i>
NNPYVFEDR	1,2	vicilin-like protein	<i>Populus euphratica</i>
YEVESQFR	1,2	vicilin-like protein	<i>Erytharante guttata</i>
GLVLPFYTNARP	1,4	11S seed storage globulin	<i>Arachis hypogaea</i>
SEYLAGSEP	4,5	Legumin-Like Protein	<i>Asarum europaeum</i>
YGQLYEVDSSH	1,2	sucrose binding protein	<i>Dorcoceras hygrometricum</i>
DNALVSPLAGR	3,5	Legumin A-like Protein	<i>Malus domestica</i>
RLEALPQL	4,5	hypothetical protein	<i>Chenopodium quinoa</i>
NELDPELQK	4,5	oxysterol-binding-related protein	<i>Sesamum indicum</i>

Die Ergebnisse nach dem Datenbankvergleich in der NCBI-BLAST zeigen, dass Proteinbanden bei 45 kDa und 49 kDa eine Mischung aus 7S und 11S-Globulinen sind, während diese bei 31, 23 und 20 kDa nur auf 11S-Globuline hindeuten. Als 7S-Globuline (Viciline) wurden vier Peptidsequenzen identifiziert, während acht andere Peptidsequenzen als 11S-Globuline (Legumine) erfasst worden sind.

Die meisten Peptidsequenzen wurden als Proteine aus dem Sesam identifiziert (siehe Tabelle 36 im Anhang unter 9.2.5.4.). Außerdem konnten in der Proteinbande 5 mehrere Peptidsequenzen detektiert werden, die als Enzympeptide aus Sesam wie *ribulose-bisphosphate carboxylase* bzw. *Xaa-pro aminopeptidase P* identifiziert waren. Des Weiteren wurden in der Proteinbande 5 drei Sequenzen gefunden, welche in der NCBI-Datenbank als „hypothetisches Protein“ erfasst wurden (siehe Tabelle 11). Hierbei handelt es sich um in Bakterien rekombinierte Proteine, wobei es noch keine Beweise gibt, dass sie in vivo exprimiert werden (Usui et al., 2001). Diese Peptidsequenzen könnten spezifisch für Chiasamen (*Salvia hispanica* L.) sein.

Es konnten nicht alle im Rahmen dieser Arbeit detektierten Chiasamenproteine (siehe Abschnitte 5.2.2. und 5.2.3.) mittels dieser Methode isoliert werden, da nur kommerzielle Sesamantikörper für die Isolierung der Zielproteine im Einsatz waren. Jedoch stehen andere kommerzielle Haselnussantikörper oder Serumpools zur Kopplung an die *magnetic beads* für

künftige Arbeiten bereit, um weitere Zielproteine (EBPs bzw. GBPs) aus Chiasamen selektiv zu isolieren.

Zusammenfassend ist diese Methode zur Isolierung der EBPs bzw. GBPs aus Chiasamen geeignet und selektiv. Darüber hinaus konnten die an MB immobilisierten Antikörper für eine weitere Isolierungsrunde eingesetzt werden. Allerdings waren die Zielproteine mittels Immunfärbung nicht mehr nachweisbar. Dies lag vermutlich an der Entkopplung der Antigen-Antikörper-Bindung durch eine starke pH-Veränderung, wodurch für die IgE- bzw. IgG-Bindung relevante lineare bzw. konformationelle Epitope aufgrund der Aggregation bzw. Kompaktheit der Zielproteine räumlich verdeckt waren (L'Hocine et al., 2007).

4.3.4. Isolierung mittels 2D-Gelelektrophorese

Mit der 2D-Gelelektrophorese werden die Proteine erst nach ihrem pI und anschließend nach ihrem MG aufgetrennt. Dadurch wird eine stärkere Trennleistung als mit der SDS-PAGE erzielt. Auch eventuell vorliegende Isoallergene (Isoformen) werden voneinander getrennt. Die Auftrennung erfolgt erst mittels IEF und nach Reduktion mit Hilfe der SDS-PAGE (12 %iges Bis-Tris-Gel). Die Proteine werden mittels kCF unspezifisch visualisiert und können nach dem Transfer auf eine Membran durch Immunfärbung detektiert werden.

In diesem Abschnitt werden zunächst die Methodenentwicklung und anschließend die Charakterisierung der 7S- und 11S-Globuline in GLO mittels großer IPG-Gelstreifen (24 cm, pH 3-11) und kleiner IPG-Gelstreifen (7 cm, pH 3-11 und 4-7) dargestellt.

4.3.4.1. Methodenentwicklung

Im Rahmen der Methodenentwicklung wurde die Auftrennung der Globuline in GLO (siehe Anhang unter 9.1.10.) entwickelt, indem die Probenaufarbeitung sowie die Parameter der isoelektrischen Fokussierung optimiert wurden.

Die Probenvorbereitung wird als ein essentieller Schritt angesehen, um die 2D-Probe von Substanzen zu befreien, welche die Trennleistung verschlechtern können. Beispielweise sind phenolische Verbindungen und DNA zu nennen. Für diese Zwecke wurden die zu untersuchenden Proteine mittels des Chloroforms und Iso-Propanol gefällt und mit Aceton gewaschen (Anhang unter 9.1.10.1.). Durch die Fällung konnten Salze im Extraktionspuffer (0,5 M NaCl) entfernt werden, welche die vollständige Entfärbung des IPG-Gelstreifens bei der isoelektrischen Fokussierung stören könnten. Außerdem konnte die Proteinkonzentration in der 2D-Probe durch die Aufnahme der ausgefallenen Proteine in kleinerem Volumen des Probenpuffers erhöht werden.

Die Fällung wurde mittels sowohl Isopropanol als auch Methanol in Bezug auf Effektivität, Aufwand und Proteinmenge überprüft (siehe Durchführung 1 und 2 im Anhang unter Abschnitt

9.1.10.1.). Bei der Anwendung der Isopropanol-Fällung (Durchführung 1 im Anhang unter 9.1.10.1.) sind nach dem 5. Schritt „Waschen mit Ethanol“ Zielproteine ausgefallen. Diese sollten laut dem Protokoll entsorgt werden, da nur mit dem Überstand weitergearbeitet werden soll, was sowohl zur Reduzierung der Proteinkonzentration in der 2D-Probe von 11,45 mg/ml auf 7,1 mg/ml als auch zum Fehlen von zwei Zielproteinbanden bei 45 und 49 kDa führte (Abbildung 64 im Anhang unter 9.2.5.5.). Diese Proteinbanden wurden mittels verschiedener Untersuchungen als Zielproteine definiert (siehe Abschnitte 5.2., 5.3.2.1. und 5.3.3.3.). Darüber hinaus war das Protokoll der Isopropanol-Fällung sehr aufwendig im Vergleich zur Methanol-Fällung (Durchführung 2 im Anhang unter 9.1.10.1.), die keinerlei Proteinverluste verursachte. Alle essentiellen Proteinbanden konnten in der 2D-Probe nach der Methanol-Fällung wiedergefunden werden, weshalb mit dieser Methode weitergearbeitet wurde.

Das Pellet wurde anschließend gewaschen und mit einem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Rehydrationspuffer (8M Harnstoff, 2 % CHAPS, 20 mM DTT) durch eine einstündige Ultraschallbehandlung gelöst. Zur schärferen Abgrenzung der Proteinspots (PSs) im 2D-Gel wurde der Probe 0,5 % IPG-Puffer zugesetzt (Ebo und Stevens, 2002).

Die Proteinmenge, welche für die Rehydratisierungsbeladung eingesetzt wurde, betrug zunächst 450 µg Protein pro 24 cm IPG-Gelstreifen, während diese für 7 cm IPG-Streifen nur 60 µg betrug. Die ersten Untersuchungen nach Entfärben der 2D-Gele zeigten, dass die von Herstellern vorgeschlagene Proteinmenge viel zu hoch war (Abbildung 65 im Anhang unter 9.2.5.5.). Daher wurde die Proteinmenge angepasst und betrug für spätere Untersuchungen 225 µg pro 24 cm Streifen und 21 µg pro 7 cm Streifen.

Für die 2D-Gelelektrophorese wurde zunächst ein 24 cm IPG-Gelstreifen mit pH-Gradienten 3-11 verwendet, um den isoelektrischen Punkt (pI) der Zielproteine präzise zu lokalisieren. Das IEF-Programm wurde nach Angaben des IEF-Protokolls des Herstellers (GE Healthcare, USA) durchgeführt. Die zu hohe Spannung bis 10000 Volt hat nach der Entfärbung des Geles einen hellen Balken in dem SDS-Gel verursacht, weshalb die Spannung im Gradienten nur bis 8000 Volt eingestellt wurde (Abbildung 66 im Anhang unter 9.2.5.5.).

Ausgehend von diesen Optimierungsschritten wurden die Proben zweidimensional aufgetrennt. Die daraus resultierenden Gele wurden im nächsten Abschnitt ausgewertet.

Große IPG-Gelstreifen wurden nach Äquilibration in vier Teile, je 6 cm, geschnitten. Der erste Teil besteht aus dem sauren Bereich des Gelstreifens von pH 3-5. Die anderen drei Teile sind analog über den pH-Bereich (pH 5-7, 7-9 und 9-11) aufgeteilt. Die vertikale Auftrennung (zweite Dimension mittels SDS-PAGE) erfolgte entsprechend in vier kleinen Gelen, welche auf vier kleine Membrane geblottet wurden.

Nach Durchführung des Semidry-Blottings erfolgte die Detektion der EBPs bzw. GBPs im IB. Zur Detektion wurden kommerzielle Sesam- und Haselnussantikörper sowie Serumpools, die

aus Blutseren von Sesam- bzw. Haselnussallergikern stammen, verwendet. Die verwendeten Serumpools sind unter 5.2.3.1. und 5.2.3.2. zu entnehmen.

Die detektierten Proteinspots wurden aus dem SDS-Gel ausgestanzt und tryptisch verdaut. Für die MS-Analyse wurden ausschließlich kleine Polyacrylamid-Fertiggele vom Typ NOVEXTM NuPAGE eingesetzt, da einerseits die Durchführung der zweiten Dimension für große Gele sehr aufwendig war und andererseits der Vernetzungsgrad solcher Gele nicht reproduzierbar war. Die aufgetrennten Proteinspots wurden mittels der kCF gefärbt, welche zum einen die Proteinstruktur nach der Entfärbung schont, zum anderen eine sehr niedrige Nachweisgrenze von Subnanogrammengen von Proteinen erreicht (Lottspeich und Engels, 2012).

4.3.4.2. Identifizierung der isolierten Proteinspots

Für eine optimale Auftrennung des Globulin-Extrakts (GLO) erfolgte die isoelektrische Fokussierung zunächst in einem pH-Bereich von 3-11, um einen Gesamtüberblick über die Chiasamenproteine zu erhalten. Die Auftrennung mittels 2D-Gelelektrophorese ist in Abbildung 22 dargestellt.

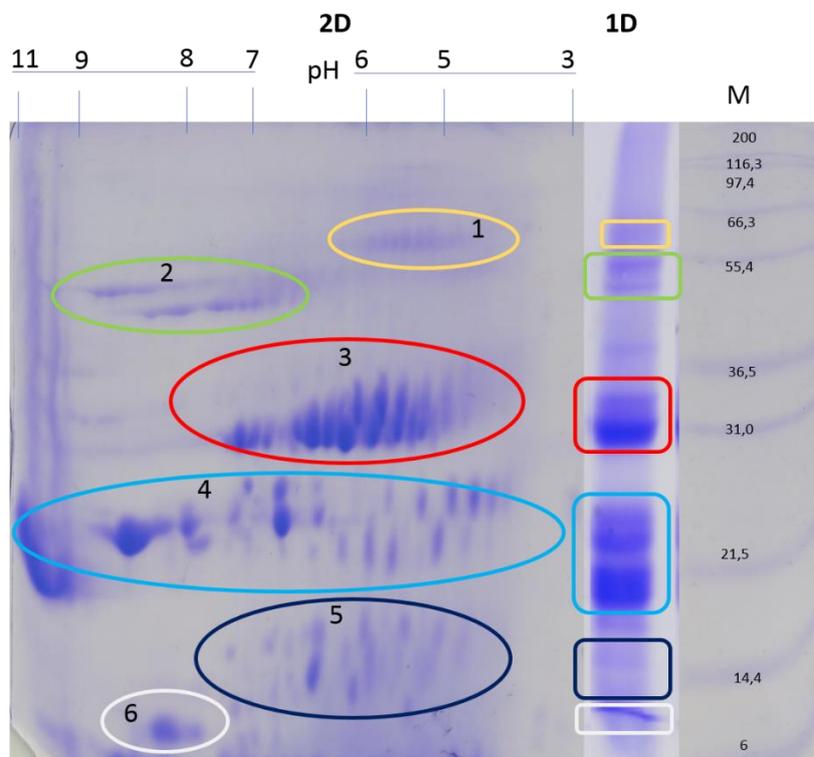


Abbildung 22: Auftrennung von GLO mittels 2D-Gelelektrophorese. Proteincluster sind durch Kreise markiert. M: Marker, 1D: Auftrennung mittels SDS-PAGE, 2D: Auftrennung mittels IEF und SDS-PAGE

Tabelle 12: Mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennte Proteincluster von GLO

Protein-cluster	MG-Bereich (kDa)	pI-Bereich	Anzahl Spots
1	50-60	5-6	15
2	40-50	7-9	10
3	30-35	5-8	15
4	20-25	4-10	22
5	11-18	5-8	16
6	9-12	8,5-9	2

Nach Betrachtung der Abbildung 22 können sechs Proteincluster festgestellt werden, die sich in ihrem MG unterscheiden (siehe Tabelle 12). Die MG-Bereiche dieser Proteincluster stimmen mit den der mittels 1D-Gelelektrophorese identifizierten Proteinbanden überein (siehe Abbildung 22, Spur „1D“). Während sich Proteincluster 1 mit ca. 15 Proteinspots in Höhe von 60 kDa und einem pI von 5-6 befindet, enthielt das Proteincluster 2 mit einem pI von 7-9 ca. 10 Proteinspots, wobei Proteincluster 2 aus einer Doppelbande (45 und 49 kDa) besteht. Bei beiden Proteinclustern 1 und 2 konnte das Phänomen „Perlschnur“ beobachtet werden. Das bedeutet, detektierte Proteinspots liegen sehr nah neben einander, besitzen zwar das gleiche Molekulargewicht, haben jedoch einen unterschiedlichen pI. Dies kann an einer posttranslationalen Modifikation (PTM) der Proteine liegen, indem die Aminosäurereste beispielsweise glykosiliert, amidiert oder phosphoryliert werden. Die Aminosäuresequenz bleibt unverändert, nur die Ladungen verändern sich, weshalb sich die Nettoladung des Proteins verschiebt und somit der gesamte isoelektrische Punkt (Halligan et al., 2004; Horton et al., 2010; Hunzinger et al., 2006). Die Perlschnur wurde bei der Auftrennung der Sesamallergene vor allem beim Allergen ses i 3 (Vicilin) mittels 2D-Gelelektrophorese beobachtet (Beyer et al., 2002).

Proteincluster 3 beinhaltet ca. 15 intensiv gefärbte und dicht aneinander gereihten Proteinspots, stammend aus beiden Proteinbanden bei 31 und 34 kDa (Abbildung 23, rot markiert). Die 31 kDa-Proteinbande zeigte bereits in dieser Arbeit eine IgE- bzw. IgG-Bindungsfähigkeit (siehe Abschnitte 5.2.2. und 5.2.3.). Um dieses Proteincluster effizienter auftrennen zu können, wurde eine geringere pH-Spanne (3-7) verwendet, wodurch eine erheblich deutlichere Trennung dieses Proteinclusters im MG-Bereich 31-35 kDa erzielt wurde (Abbildung 23), was die Aussage von Coquet et al. (2004) bestätigt hat.

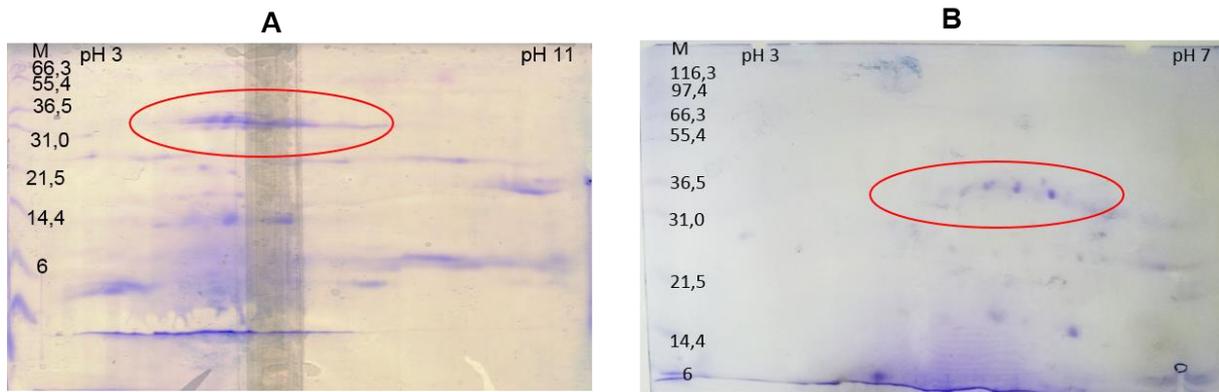


Abbildung 23: Erhöhung der Trennschärfe des Proteinclusters bei 31-35 kDa durch Verwendung von einem IPG-Gelstreifen mit einem pH-Wert von 3-7. A: 2D-Auftrennung von GLO im pH-Bereich 3-11, B: 2D-Auftrennung von GLO im pH-Bereich 3-7. M: Marker

Der isoelektrische Punkt dieses Proteinclusters erstreckt sich über einen pI-Bereich von 5-8. Auch die Proteinspots im MG-Bereich von 20-25 kDa (Abbildung 22, Proteincluster 4, blau markiert) trennen sich über einen großen pI-Bereich von 4-10 auf. Ein Proteincluster bei ähnlichem MG wurde auch bei der Auftrennung der Sesam- bzw. Erdnussallergene mittels 2D-Gelelektrophorese beobachtet (Beyer et al., 2002; Boldt, 2005).

Die mittels 1D-Gelelektrophorese isolierten Proteinbanden im MG-Bereich 11-18 kDa (Abbildung 22, schwarz markiert) wurden in 16 Proteinspots in einem pI-Bereich von 5-8 aufgetrennt. Abschließend lassen sich aus der Proteinbande mit MG von 10 kDa zwei Proteinspots mit einem pI von 8,8 und 9 detektieren.

Da die Auftrennung der Chiasamenproteine mittels 2D-Gelelektrophorese viel präziser war, wodurch die Anzahl der mittels kCF detektierten Proteinspots viel höher wurde, wurden bei der Immunfärbung die verfügbaren Antikörper und Serumpools eingesetzt, um die IgE- bzw. IgG-bindenden Proteinspots zu lokalisieren und später für die MS-Analyse zu selektieren.

Zunächst wurde IEF in einem IPG-Gelstreifen (24 cm, pH 3-11) durchgeführt. Dieser Gelstreifen wurde in vier Teile je 6 cm geschnitten. Anschließend erfolgt die Auftrennung mittels SDS-PAGE in kleinen Gelen, welche auf vier NC-Membranen geblottet worden sind (siehe Abbildung 67 im Anhang unter 9.2.5.5.). Es wurden kommerzielle Sesamantikörper eingesetzt. Hierbei konnte geschlossen werden, dass die IgG bindenden Proteinspots weitgestreut auf den ersten drei Membranen auftreten. Um den Aufwand dieser Methode zu reduzieren und mit den kommerziellen Antikörper und Serumpools sparsam umzugehen, wurde die Detektion der Zielproteinspots mit Hilfe von kleinen IPG-Gelstreifen (7 cm) im pH-Bereich von 3-11 durchgeführt.

Insgesamt konnten 18 Proteinspots immunologisch detektiert werden. Ein geschätzter pI sowie MG der detektierten Proteinspots sind der Tabelle 13 zu entnehmen. Außerdem wurden die detektierten Proteinspots auf SDS-Gel mit roten Kreisen angezeigt (siehe Abbildung 24).

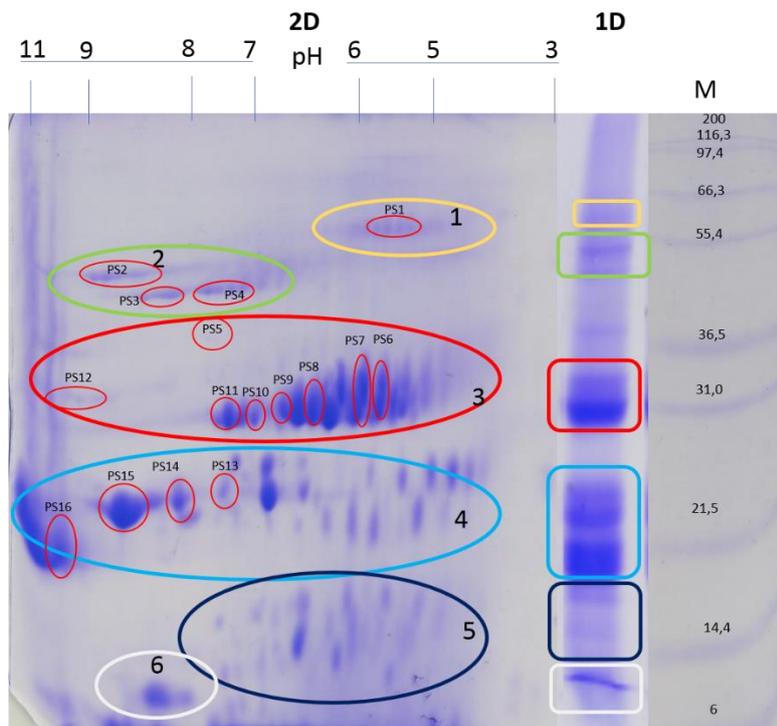


Abbildung 24: Mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennten und durch Immunfärbung detektierten EBP bzw. GBP in GLO von Chiasamen (PS 1-PS 18), M: Marker, 1D: Auftrennung von GLO mittels SDS-PAGE, 2D: Auftrennung von GLO mittels 2D-Gelelektrophorese

Neben dem MG stellt der pI ein wichtiges Charakteristikum für EBPs bzw. GBPs dar. Der pI-Bereich der Zielproteine in Chiasamen lag zwischen 5,5 und 9,3. Das bedeutet, bei der Mehrheit der Zielproteine konnte ein pI im neutralen und basischen Bereich detektiert werden. Dieses Ergebnis stimmt mit der Auftrennung der Sesamallergene mittels 2D-Gelelektrophorese überein. So wurden die meisten Sesamallergene im basischen pI-Bereich nachgewiesen (Beyer, 2002). Hingegen weisen Erdnuss-, Litschi- und Kiwi-allergene überwiegend einen pI von unterhalb 6 auf (Boldt, 2005; Hoppe, 2006; Möller et al., 1997).

Tabelle 13: Mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennte Proteinspots, welche mit Hilfe von kommerziellen Antikörpern sowie Serumpools detektiert wurden

MG (kDa)	Proteinspot	pI	Sorten*
60	PS 1	5,5	1
49	PS 2	8,5-9	1
45	PS 3	7,5-8	1
	PS 4	8-8,5	1,2,4
40	PS 5	8	4
31	PS 6	5,5	1,2,4
	PS 7	6	2,4
	PS 8	6,5	4
	PS 9	6,9	3
	PS 10	7,3	3
	PS 11	7,8	4
23	PS 12	9,1	4
	PS 13	7,8	4
	PS 14	8,3	1,2
20	PS 15	8,6	1,2
	PS 16	9,3	1,2,3

*Sorten:
1: kommerzielle Sesamantikörper (SA)
2: Serumpool aus Blutseren von Sesamallergikern (SerS)
3: kommerzielle Haselnussantikörper (HA)
4: Serumpool aus Blutseren von Haselnussallergikern (SerH)

In Abbildungen 25 und 26 sind vier Immunblots nach Durchführung der 2D-Gelelektrophorese dargestellt, welche mit kommerziellen Antikörpern sowie mit Serumpools behandelt wurden. Es werden bis auf die 6 kDa-Proteinbande alle Proteine in Chiasamen nachgewiesen, welche mittels 1D-Gelelektrophorese mit anschließender Immunfärbung detektiert worden sind. Die fehlende Detektion der 6 kDa-Proteinbande wurde bereits in der Literatur beschrieben. So zeigte Schocker (2002) in seiner Doktorarbeit, dass niedermolekulare Erdnussallergene wie Ara h 2 und Ara h 6 schlechter zu detektieren sind als hochmolekulare Allergene. Eine größere Proteinmenge konnte nicht eingesetzt werden, da dies in einer unzureichenden Auftrennung der Proteinspots resultiert. In der Literatur sind keine Untersuchungen mittels 2D-EGelelektrophorese für EBPs und GBPs aus Chiasamen dokumentiert, weshalb die 2D-Auftrennung von bekannten Allergenen zum Vergleich herangezogen wurde.

In Abbildung 27 sind Blots A und B dargestellt, welche mit kommerziellen Sesamantikörpern (SA) bzw. dem Serumpool von Sesamallergikern behandelt wurden. Hierbei ist ein ähnliches Muster der detektierten Proteinspots bei MG von 60, 49, 45, 31, 23 und 20 kDa zu erkennen.

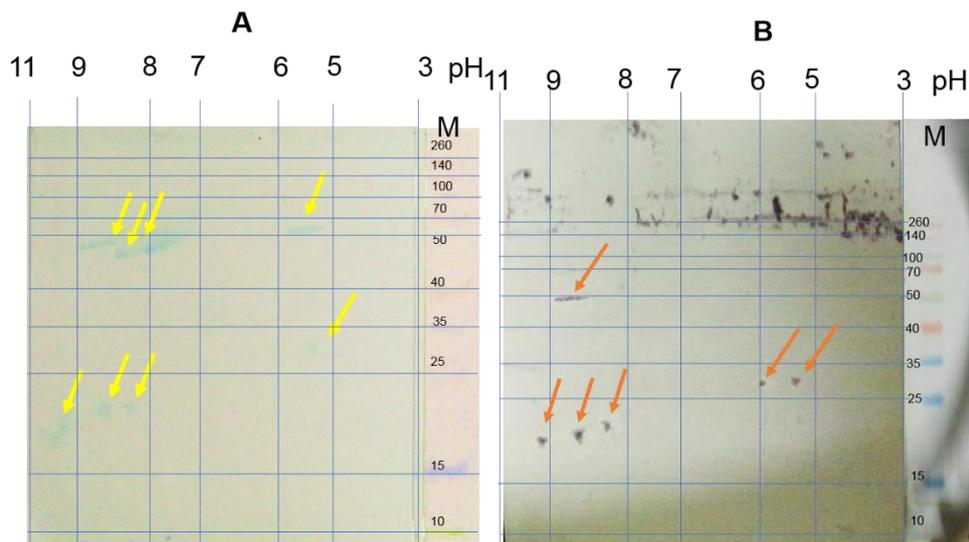


Abbildung 25: IBs zur Detektion der mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteinspots mit A: kommerziellen Sesamantikörpern (gelbe Pfeile), B: mit Serumpool der Sesamallergiker (orangene Pfeile)

Insgesamt konnten mit kommerziellen Sesamantikörpern bzw. dem Serumpool (SerS) acht bzw. sechs Proteinspots detektiert werden. Die aneinandergereihten Proteinspots bei 60 kDa mit dem pl von 5,3-5,8 konnten allerdings nur mit kommerziellen Antikörpern detektiert werden. Dieses Ergebnis stimmt mit dem Ergebniss im Abschnitt 4.2.3.1. überein. Der Grund für die fehlende Detektion von PS 1 mittels 2D-Gelelektrophorese könnte die niedrige Konzentration der spezifischen IgEs im Serumpool sein. Hingegen konnten die IgEs im Serumpool an zwei Proteinspots bei 31 kDa mit pl von 5,5 bzw. 6,0 binden, während die kommerziellen Antikörper nur zur Detektion des Proteinspots mit einem pl von 5,5 beigetragen haben.

Erwähnenswert ist, dass die aneinandergereihten Proteinspots, welche wie eine Perlschnur aussehen, einen pl von 7-9 besitzen. Diese Proteinspots wurden im Immunblot A bei 45 bzw. 49 kDa und bei Immunblot B nur bei 49 kDa gesichtet (siehe Abbildung 25). Hier handelt es sich vermutlich um mehrere Isoformen (Isoproteine), die durch PTM der Chiasamenproteine entstanden sind. Sie besitzen zwar einen unterschiedlichen pl (7-9), tragen aber die gleichen Epitope, weshalb sie mit den kommerziellen Antikörpern auch detektierbar waren. Dieses Phänomen wurde beim Sesam-Vicilin (Ses i 3, MG bei 49 kDa) und Erdnuss-Vicilin (Ara h 1, MG bei 65 kDa) mit einem ähnlichen pl beobachtet (Beyer et al., 2002; Boldt, 2005)

Auf Abbildung 26 ist die Detektion mit kommerziellen Haselnussantikörpern (Immunblot C) bzw. Serumpool (SerH) von Haselnussallergikern (Immunblot D) dargestellt. Hierbei ist es auffällig, dass mit kommerziellen Haselnussantikörpern nur 3 Spots visualisiert werden konnten, während das Serumpool 10 Proteinspots als IgE-reaktiv erkannt hat. Somit zeigt das Serumpool von Haselnussallergikern die stärkste IgE-Bindungsfähigkeit. Dies könnte an der

hohen Anzahl an Humanseren im Serumpool und der hohen Vielfalt an spezifischen IgEs liegen.

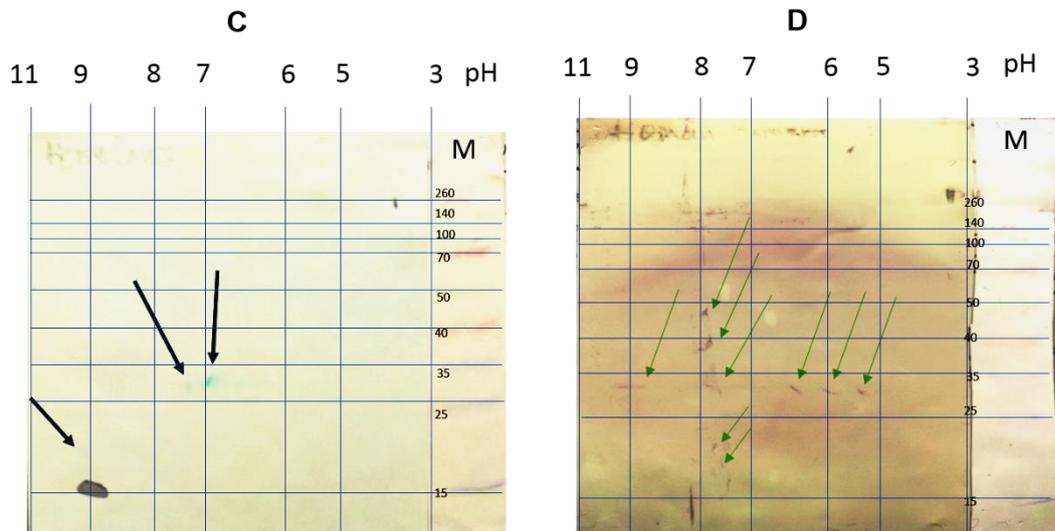


Abbildung 26: IBs zur Detektion der mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteinspots mit C: kommerziellen Haselnussantikörpern (schwarze Pfeile), D: mit Serumpool der Haselnussallergiker (grüne Pfeile)

Bei 31 kDa konnten die IgEs im Serumpool an fünf Proteinspots mit pls von 5,0, 6,0, 7,5, 8,0 und 10,0 binden, während die kommerziellen Antikörper nur zwei mit pl von 7,5 und 8,0 detektiert haben. Die 31 kDa-Proteinbande wurde bereits als 11S-Globulin identifiziert (siehe Abschnitt 4.3.3.3.). Es lässt sich vermuten, dass aus der 31 kDa-Proteinbande stammende Proteinspots durch Zerfall der Legumin-Untereinheiten entstanden sind. Der Zerfall der sauren (N-Terminalen) und basischen (C-Terminalen) Untereinheiten der Isoformen im MG-Bereich 28-34 kDa wurde auch bei Charakterisierung von 11S-Globulinen wie Ara h 3 und Ara h 4 sowie bei Ses i 6 und Ses i 7 beobachtet (Beyer et al., 2002; Beyer et al., 2007; Boldt, 2005).

Das Serumpool konnte drei weitere Proteinspots jeweils bei 23, 20 und 12 kDa mit neutralem pl detektieren, während die kommerziellen Antikörper nur an einen Proteinspot bei 20 kDa mit pl von 9,5 gebunden sind. Hier ist erwähnenswert, dass die 23 kDa-Proteinbande mit SerH nach 1D-Gelelektrophorese nicht erfasst werden konnte (siehe Abschnitt 4.2.3.2.). Dies könnte an der für die Detektion unzureichenden Konzentration des Zielproteins liegen. Mit dieser Methode konnte das Zielprotein durch die isoelektrische Fokussierung von den Störproteinen isoliert und konzentriert werden, sodass eine Immunfärbung mit SerH möglich war.

Generell konnte geschlussfolgert werden, dass sich die detektierten Proteinspots tendenziell im basischen oder neutralen pl-Bereich befinden. Dies stimmt mit der Literatur überein. So zeigten die basischen Untereinheiten (C-Terminalen) der Allergene aus Erdnuss, Sojabohne

und Lupine mehr IgE. bzw. IgG-Reaktivität als die sauren (N-Terminalen) (Guillamon et al., 2010; Helm et al., 2000; Restani et al., 2005).

Die 2D-Gelelektrophorese und die anschließende Immunfärbung stellen eine präzisere Isolierungsmethode als die 1D-Gelelektrophorese dar. Allerdings werden die Globuline in Chiasamen durch 2D-Gelelektrophorese einer intensiven Modifikation ausgesetzt, weshalb viele kleine Untereinheiten mit unterschiedlichen MGs und pls entstehen können, wie in mehreren Studien über Viciline und Legumine anderer Spezies beobachtet wurde (Bourgeois et al., 2009; Le Signor et al., 2017; Warsame et al., 2018).

Ob die Zielproteine in GLO mittels 2D-Gelelektrophorese in ihre Untereinheiten zerfallen oder von anderen Störproteinen isoliert worden sind, muss noch durch eine MS-Analyse überprüft werden. Hierfür wurden alle immunologisch erfassten Proteinspots bis auf PS 18 bei 6 kDa (nicht detektiert) ausgestanzt, tryptisch verdaut und die erhaltenen Peptide auf molekularer Ebene mittels UHPLC-ESI-MS/MS untersucht. Anschließend erfolgt die *De Novo* Sequenzierung (siehe Abschnitte 4.14.1. und 4.14.2.).

Die Ergebnisse der dritten MS-Analyse nach der Auftrennung mittels 2D-Gelelektrophorese stimmen mit der zweiten MS-Analyse nach dem Einsatz von IAC-MB überein. So wurden von 14 identifizierten Peptidsequenzen 10 Peptide wiedergefunden. Allerdings wiesen manche Sequenzen der beiden MS-Analysen kleine Unterschiede auf z.B. (VNADNNEQFTLAG / VNADDNEQFTLAG) und (NNQQFECAGVA AVR / NNQKMQCAGVA VAR). Dies liegt vermutlich an der Desamidierung vom Asparagin (N) zur Asparaginsäure (N) und Glutamin (Q) zur Glutaminsäure (E) während der Probenvorbereitung, bei der Peptide extremen Bedingungen bezüglich des pH-Werts oder der Temperatur ausgesetzt werden (Wright, 1991). Jedoch zeigen die wiedergefundenen Peptide, dass beide Isolierungsmethoden IAC-MB und 2D-Gelelektrophorese spezifisch und geeignet sind. Allerdings war die Anzahl an detektierten und sequenzierten Peptiden nach der 2D-Gelelektrophorese höher als nach der IAC-MB.

Insgesamt konnten aus allen Proteinspots 55 Peptide erfolgreich sequenziert und identifiziert werden. Während nur 5 Peptide als 7S-Globulin wie Vicilin, Convicilin bzw. Vicilin-ähnliches Protein aus 6 verschiedenen Spezies erfasst wurden, konnte die Mehrheit (43 Peptidsequenzen) als 11S/12S Globulin aus 26 Spezies wie Cruciferin und Legumin (Typ A und Typ B) identifiziert werden.

Alle sequenzierten Peptide mit dazugehörigen Sequenz-ID sowie Spezies sind in Tabelle 38 im Anhang unter 9.2.5.5. dargestellt.

So wiesen PS 2 aus der 49 kDa-Proteinbande sowie PS 3 und PS 4 aus der 45 kDa-Proteinbande Peptidsequenzen auf, welche eine große Ähnlichkeit bis 100 % mit dem Vicilin aus Spezies wie *Sesamum indicum*, *Erythranthe guttata*, *Solanum tuberosum*, *Pisum sativum* und *Nicotiana tabacum* zeigten. Des Weiteren konnte im PS 2 eine Peptidsequenz detektiert

werden, die als Legumin B aus Ackerbohne (*Vicia faba*) identifiziert wurde. Das bedeutet, die Proteinbande 49 kDa deutet auf eine Mischung aus Vicilin und Legumin hin. Hingegen wurden die restlichen Proteinspots, die den Proteinbanden bei 60, 31, 23, 20 kDa zugeordnet sind, als Legumin identifiziert. Dieses Ergebnis wurde in der Studie von Sandoval-Oliveros und Paredes-Lopez (2013) beschrieben und bestätigt das Ergebnis der MS-Analyse nach der Isolierung mittels IAC-MB im Abschnitt 4.3.3.3.

In der Regel teilen sich die Globuline nach ihrem Sedimentationskoeffizient in zwei Proteintypen auf, 7S-Globuline (Viciline) und 11S-Globuline (Legumine). Diese stehen in einem ungleichmäßigen Verhältnis zueinander, was in der Literatur bereits beschrieben ist. So stellen die Sedimentationsuntersuchungen der Chiasamen in einer Studie fest, dass 11S-Globuline (Legumine) den Hauptanteil in der Globulin-Fraktion vertreten, während die 7S-Globuline (Viciline) in viel geringerer Konzentration vorkommen (Sandoval-Oliveros und Paredes-Lopez, 2013). Dieses Phänomen erklärt die höhere Anzahl an *De Novo* sequenzierten Peptiden aus 11S-Globuline im Vergleich zu 7S-Globulinen. Ein ähnliches Verhältnis ist auch in Samen der Zweikeimblättrigen wie Amaranth, Sesam, Gerste und anderen Samen zu beobachten. Beispielsweise liegt der Anteil der 11S-Globuline in Sesam bei 60-70 %, während 7S-Globuline nur 1-2 % von der gesamten Globulin-Fraktion ausmachen (Hsiao et al., 2006).

7S-Globuline (Viciline) bestehen in der Regel aus Monomeren (MG ca. 50 kDa), welche sich zu einem stabilen Trimer von 150-200 kDa lagern (Tzitzikas et al., 2006). Dieses Trimer ist gegen die proteolytische Spaltung resistent, sodass es den Gastrointestinaltrakt als komplexes Molekül übersteht. Bei anderen Spezies wie Leguminosen kann das Vicilin unter kontrollierter Hydrolyse in drei Untereinheiten, α -Kette (19-20 kDa), β -Kette (13 kDa) und γ -Kette (12-16 kDa) gespalten werden. α + β -Ketten ergeben eine Untereinheit bei 30-36 kDa und gemeinsam mit der γ -Kette entsteht das 7S-Globulin-Monomer (Lycett et al., 1983; O'Kane et al., 2004; Tzitzikas et al., 2006). Die Doppelbande in GLO (45-49 kDa, PS 2, PS 3, PS 4) mit einem pI von 7-9 bildet eine sogenannte Perlschnur und wurde als Vicilin identifiziert. Dies stimmt mit dem Ergebnis von Sandoval-Oliveros und Paredes-Lopez (2013) überein. Ein ähnliches Vicilin bei gleichem MG (45 und 49 kDa) und einem pI 7-8 konnte auch als Doppelbande in Sesam charakterisiert werden (Beyer, 2002; Navuluri et al., 2006). Es wird vermutet, dass die Entstehung der Doppelbande (45-49 kDa) durch eine PTM erfolgte. Ob das Monomer bei 45 bzw. 49 kDa durch Extraktion, Isolierungsmethoden bzw. Prozessierung in kleinere Untereinheiten weiterzerfällt, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. So wurden keine anderen Peptide in anderen Proteinbanden detektiert, die als Vicilin identifiziert werden. Hierbei kann geschlussfolgert werden, dass die Doppelbande (45-49 kDa) die basische Untereinheit des Vicilins (α + β + γ) präsentiert. Zur Bestätigung dieses Ergebnisses wurden die Start- und Endpositionen ähnlicher Peptide in vollständigen Vicilin-Sequenzen anderer

Spezies mittels der NCBI-Datenbank bestimmt. Die Ergebnisse zeigen, dass die sequenzierten und identifizierten Chiasamenpeptide über die gesamte Vicilin-Sequenz verteilt vorliegen, aber überwiegend aus dem C-Terminus stammen (siehe Tabelle 14, grün markiert).

Tabelle 14: Lokalisierung der Vicilin-Peptide in den vollständigen Sequenzen ähnlicher Viciline aus anderen Spezies. Position im C-Terminus ist grün markiert, Position im N-Terminus ist rot markiert

Chiasamen-Sequenz	ähnliche Sequenzen	Start	Ende	Sequenz-ID	Spezies
NPYVFEDR	IPYVFEDQ	194	201	13183177	Sesamum indicum
VNADDNEQFTLAG	VNAYNNEKFTLAG	530	542	XP_012833200.1	Erythranthe guttata
LENELQTYR	LEN-LQNYR	67	74	P08438.1	Vicia faba
SQKEEFFFEQPGR	SQKEEFFFQGGP	454	465	XP_006349767.1	Solanum tuberosum
LHAGTTTYLVNR	LHAGTTTYLVN	294	304	P13919.2	Pisum sativum
QTTNPNYVFEDR	QSDNPYYFDER	249	257	Q9SPL4.1	Macadamia integrifolia

Des Weiteren besitzen Viciline in der prozessierten Form normalerweise jeweils nur einen Cysteinrest, weshalb sie keine Disulfidbrückenbindungen bilden (Quiroga et al., 2010). Aufgrund dessen lässt sich daraus resultieren, dass das Vicilin in Chiasamen durch Isolierungsmethoden und die dazugehörige Reduzierung der Disulfidbrücken keine Spaltung seines Monomers in α -, β - oder γ -Ketten erfahren sollte. Sandoval-Oliveros und Paredes-Lopez (2013) kamen auch zum selben Ergebnis im reduzierenden Zustand. Im Gegensatz zu Leguminen liegen Viciline ungleichmäßig glykolisiert vor, weshalb die Identifikation des Vicilins als ein heterogenes Protein erschwert wird. Der Glykolisierungsgrad des Vicilins in Chiasamen wird im Abschnitt 4.4.1. untersucht und diskutiert.

Legumine sind im Gegensatz zu Vicilinen Hexamere, welche aus drei großen sauren (α -Untereinheit bzw. Legumin A, MG 30-40 kDa) und drei basischen Untereinheiten (β -Untereinheit bzw. Legumin B, MG 20 kDa) bestehen (Tzitzikas et al., 2006). Ein Monomer besteht aus einer α - und β -Untereinheit, welche über Disulfidbrücken verbunden sind (Wang et al., 2003). Die Spaltstelle des Legumins liegt zwischen Asparagin und Glycin und ihre Position wurde in Tabelle 38 im Anhang unter 9.2.5.5 mit aufgeführt. Um die sequenzierten Chiasamenpeptide der richtigen Untereinheit zuordnen zu können, wurden die Start- und Endposition der zu Chiasamenpeptiden ähnlichen Peptidsequenzen aus anderen Spezies bestimmt. Liegt das Peptid in α -Untereinheit (saurer N-Terminaler Teil), wird die Start- und Endposition der Sequenz rot markiert. Gehört das Peptid der β -Untereinheit (C-Terminus), werden die Start- und Endposition blau markiert.

Legumine ähneln sich in ihrer Struktur und besitzen mit Vicilinen gemeinsame Vorläufermoleküle (Boldt, 2005). Peptidsequenzen aus allen Proteinspots außer aus PS 3 und PS 4 zeigten eine hohe Ähnlichkeit zu Peptidsequenzen des Legumins bzw. 11S-Globulins verschiedener Spezies, wie *Sesamum indicum*, *Erytharante guttata*, *Vicia faba* (*fava bean*), *Brassica napus* und *Corylus avellana* (siehe Tabelle 38 im Anhang unter 9.2.5.5.). Außerdem zeigen die Ergebnisse, dass die meisten Peptide eine hohe Sequenzähnlichkeit (SÄ) zu Peptiden aus 11S Sesamglobulinen unter anderem Q9XHP0.1 und NP_001291327.1 haben.

Der Proteinspot PS 1 bei MG von 60 kDa mit einem pI von 5-6 präsentiert das ganze Monomer (α -Untereinheit + β -Untereinheit). Das Monomer des Legumins liegt in der Regel zwischen 60-70 kDa und wurde in der Literatur in mehreren Studien beschrieben (Boehm et al., 2018; Bourgeois et al., 2009; Le Signor et al., 2017; Utsumi et al., 1980). Alle sequenzierten Peptide aus dieser Proteinbande wurden als Legumin aus verschiedenen Spezies wie Ackerbohne, Sesam, Quinoa, Stieleiche und Prilla identifiziert. Die erhaltenen Chiasamenpeptide lagen über die gesamte Proteinsequenz des Legumins verteilt vor. Wird der theoretische pI einer vollständigen Legumin-Sequenz bekannter Spezies wie z.B. Ackerbohne (*Vicia faba*, Sequenz-ID: P05190.1) mittels eines pI-Rechners (Compute pI/Mw tool, EXPASY: https://web.expasy.org/compute_pi/) berechnet, kommt man auf einen theoretischen pI von 5,8, was mit dem pI von PS 1 auf dem 2D-Chromatogramm übereinstimmt (siehe Abbildung 24).

In PS 5 bei 40 kDa wurden zwei Peptide als 11S-Globulin aus Sesam (Sequenz-ID: Q9XHP0.1) identifiziert, welche zu der basischen C-terminalen Untereinheit gehören. Der theoretische pI von Q9XHP0.1, liegt bei 7,5, was dem pI vom PS 5 entspricht.

Aus der 31 kDa-Proteinbande konnten PS 6 mit pI 5,5, PS 7 mit pI 6, PS 8 mit pI 6,5, PS 9 mit pI 6,7 und PS 10 mit pI 6,9 als Legumin A (saure α -Untereinheit) identifiziert werden. Die Zuordnung zu den jeweiligen Untereinheiten erfolgte wie oben beschrieben anhand der Position der homologen Peptide in vollständigen Legumin-Sequenzen aus anderen Spezies. Allerdings wurden auch zwei weitere Proteinspots (PS 11, PS 12) mittels Immunfärbung detektiert, welche einen basischen pI hatten (siehe Abbildungen 24 und 26). Diese Proteinspots wiesen außerdem Peptide in der basischen β -Untereinheit auf. Das bedeutet, dass die 31 kDa-Proteinbande nicht rein aus der sauren Untereinheit besteht, sondern auch aus zwei basischen Untereinheiten (bei PS 11 und bei PS 12). Welches Vorläufermonomer diese basischen Untereinheiten haben, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Es wird jedoch vermutet, dass in der Legumin-Sequenz aus Chiasamen ein mittlerer Bereich startet und durch eine nicht vollständige posttranslationale Spaltung entsteht. Dieses Ergebnis konnten Boldt (2005) und Koppelman et al. (2003) bei der Charakterisierung von Ara h 3 beobachten. Zwar ist die Anzahl der das Legumin codierenden Gene gering, könnten aber durch die extensive posttranslationale Prozessierung der Globuline mehrere Untereinheiten

mit unterschiedlichem MG und pI entstehen. Ein ähnliches Phänomen wurde bei der Identifizierung der aus der 23 kDa-Proteinbande stammenden Proteinspots (PS 13, PS 14, PS 15) beobachtet. Während die Peptide aus PS 13 vollständig der basischen Untereinheit des Legumins zugeordnet werden konnten, wiesen PS 14 und PS 15 Peptidsequenzen aus sowohl der sauren als auch der basischen Untereinheit auf. Aus der 20 kDa- Proteinbande konnte nur ein Proteinspot (PS 16) mit pI von 9,3 detektiert werden. Anhand der Position der homologen Peptide in anderen Legumin-Sequenzen sowie der NG-Spaltstelle konnte PS 16 vollständig der basischen Untereinheit zugeordnet werden. Ähnliche Ergebnisse haben Forscher bei der Charakterisierung von Ses i3 beobachtet. So wurden auch zwei Proteinbanden bei 24 kDa und 20 kDa als die basische Untereinheit des Sesam-Legumins identifiziert. In der Literatur variiert das MG der basischen Untereinheit zwischen 17-25 kDa (Warsame et al., 2018).

In der Literatur werden die identifizierten Globuline in Chiasamen als Vicilin-ähnliches Protein (*vicilin-like protein*) oder Legumin-ähnliches Protein (*legumin-like protein*) bezeichnet (Sandoval-Oliveros und Paredes-Lopez, 2013)

Durch den Sequenzvergleich mittels NCBI-BLAST wurden sequenzierte Chiasamenpeptide als Viciline bzw. Legumine aus verschiedenen Spezies identifiziert. Allerdings konnte noch nicht festgestellt werden, ob die erhaltenen Peptide an der IgE- bzw. IgG- Bindung beteiligt sind. Um die Allergenität der sequenzierten Peptide aus Chiasamen zu überprüfen und mögliche Epitope zu lokalisieren, erfolgt später in dieser Arbeit (Abschnitt 4.4.4.) ein Sequenzvergleich in der FARRP-Datenbank mit bekannten Allergensequenzen anderer Spezies.

4.4. Charakterisierung der IgE- bzw. IgG-bindenden Proteine

In Abschnitt 4.2.4. wurde eine Auswahl der zu charakterisierenden Zielproteine getroffen. Nach Isolierung der Zielproteine in Abschnitt 4.3. konnte geschlussfolgert werden, dass alle immunologisch detektierten Proteine in Chiasamen in der Globulin-Fraktion existieren. Deshalb wurde entschieden, in diesem Abschnitt mit der Globulin-Fraktion (GLO) weiterzuarbeiten, in der sich die Zielproteine (Viciline und Legumine) befinden (Sandoval-Oliveros und Paredes-Lopez, 2013).

Zielproteine werden zunächst auf Kohlenhydrate geprüft, um festzustellen, ob Zuckerreste in der IgE- bzw. IgG-Bindung involviert sind. Die Stabilität dieser Proteine gegen technologische Einflüsse, wie Temperatur, Druck und pH-Veränderung werden weiterhin bestimmt.

Außerdem soll geprüft werden, ob die IgE- bzw. IgG-Bindung der Zielproteine im nicht reduzierenden (nativen) Zustand nachzuweisen ist. Dafür wird die Methode ELISA-Inhibition angewandt, wodurch die Kreuzreaktivität zwischen Proteinen aus Chiasamen und bekannten allergenen Speicherproteinen aus anderen Spezies untersucht wird. Weiterhin wird die Kreuzreaktivität im reduzierenden Zustand mittels Immunblot-Inhibition bestätigt.

Anhand der mittels *De Novo* Sequenzierung erhaltenen Peptidsequenzen sollen Sequenzhomologien mit bekannten Allergensequenzen anderer Spezies mit Hilfe von der FARRP-Datenbank sowie Clustal Omega untersucht werden. Eine Vorhersage der möglichen Epitope könnte in der Epitop-Datenbank IEDB getroffen werden.

Um mehr Informationen über exprimierte Gensequenzen der Zielproteine auf Chiasamen-DNA und somit über vollständige Proteinsequenzen zu erhalten, werden anhand der homologen Sequenzabschnitte bekannter Allergene Primer entworfen. Diese werden mit Chiasamen-DNA als Matrize für PCR verwendet. Erhaltene PCR-Amplifikate werden in Aminosäuresequenzen übersetzt und mit Proteinsequenzen bekannter Allergene in NCBI- und FARRP-Datenbanken verglichen.

4.4.1. Detektion von Glycoproteinen und der Einfluss der Zuckerreste auf die IgE-Bindungsfähigkeit

Das Vorliegen von Glycoproteinen wurde mit Hilfe des Schiffschens Reagenzes untersucht. Hierfür wurden die Globuline in GLO mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Glycoproteine im Gel unter Verwendung des Schiffschens Reagenzes angefärbt. Die Durchführung ist unter 9.1.18. zu finden. Es wurden verschiedene Volumina (2, 4, 6, 8, 10 µl) der SDS-Probe in die Taschen des SDS-Gels aufgetragen, um eine mögliche schwache Detektion zu vermeiden. Auf Abbildung 27, Teil A ist zu erkennen, dass nur Globuline in höheren MG-Bereichen angefärbt wurden. Die durch kCF bzw. Immunfärbung detektierten Proteine mit niedrigerem

MG konnten hier nicht detektiert werden. Das bedeutet, dass vermutlich nur trimere bzw. hexamere Globuline Zuckerreste tragen, weshalb die monomeren Globuline bzw. Isoformen bei MG von 49, 45 und 31 kDa nicht detektiert wurden. Dies führt zum Ergebnis, dass an den Epitopen der Globuline, welche zur IgE- bzw. IgG-Bindung beigetragen haben, keine Zuckerreste beteiligt sind.

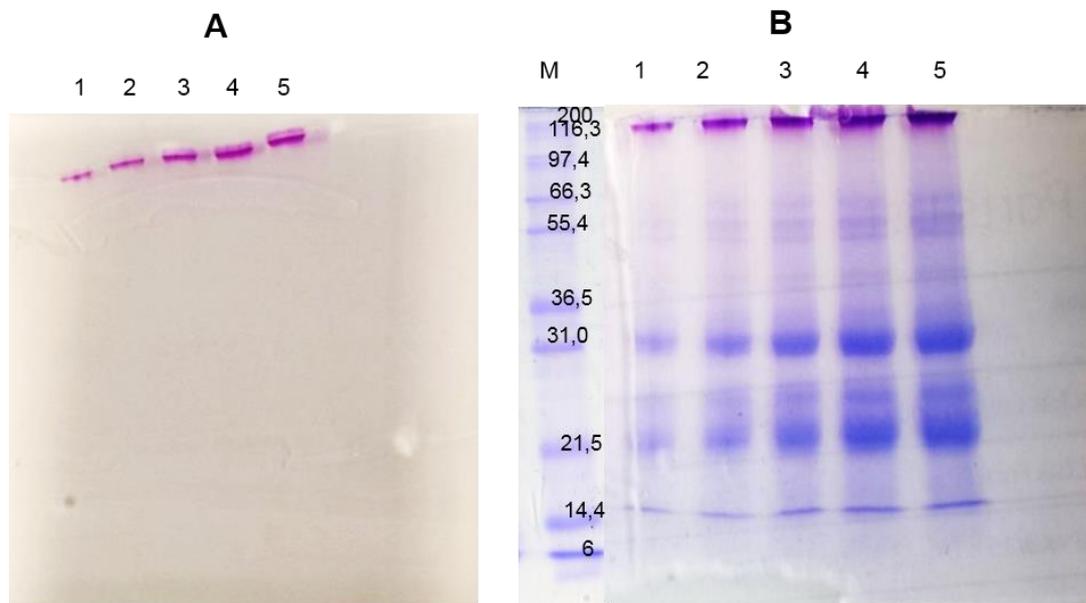


Abbildung 27: Färbung von GLO mit Hilfe des Schiffschens Reagenzes nach Auftrennung mittels SDS-PAGE, A: Färbung mit Schiffschem Reagenz, B: Färbung mittels kCF nach Schiffschem Reagenz, M: Marker, 1-5: GLO (5 mg/ml) in zunehmender Konzentration (2, 4, 6, 8, 10 μ l)

Um die Anwesenheit der monomeren Globuline im Gel nach SDS-PAGE nachzuweisen, wurde das SDS-Gel, welches mit Schiffschem Reagenz behandelt wurde, mit Commassie unspezifisch gefärbt. Abbildung 27, Teil B zeigt, dass die Auftrennung der monomeren Globuline mittels SDS-PAGE erfolgreich war.

4.4.2. Einfluss technologischer Veränderung auf IgE bzw. IgG-bindende Proteine

Im Rahmen dieser Arbeit wird die IgE- bzw. IgG-Bindung der Chiasamenproteine auf ihre Stabilität untersucht. Dafür werden aus Chiasamen extrahierte EBPs bzw. GBPs extremen Bedingungen ausgesetzt. Dazu zählen Einflüsse wie, Hitze, pH-Veränderung und Druck. Die IgE-Bindungsfähigkeit der Proteine wird anschließend mittels Immunoblot ermittelt. Zur Detektion wurden die kommerziellen Sesamantikörper verwendet, da mit diesen Antikörpern sowohl ein Vicilin-ähnliches Protein bei 45 bzw. 49 kDa als auch ein Legumin-ähnliches Protein bei 31, 23 und 20 kDa detektierbar waren. Bei der Hitze-Behandlung wird GLO mit unterschiedlichen Temperaturen (40, 60, 80, 100 °C) für je 5, 10 und 15 min behandelt, während ihre Stabilität bei niedrigeren pH-Werten von 2, 4 und 6 geprüft wird. Zur Behandlung

der Proteine mit einem Druck von 69-138 MPa bei 4 °C wird das Verfahren „*French Press*“ angewandt, welches in der Regel zum Zellaufschluss verwendet wird. Die Durchführung wird dem Anhang unter 9.1.19. entnommen.

4.4.2.1. Temperatur

Die Ergebnisse zeigen, dass keine Schwächung der Farbintensität der detektierten Zielproteine bei 40 und 60 °C bei allen Behandlungsdauern beobachtet wurde. Hingegen zeigt die Hitzebehandlung bei 80 °C und 100 °C eine deutliche Schwächung der Farbintensität mit zunehmender Dauer, wobei die Farbreduktion bei 100 °C am stärksten war.

Die Abbildung 28 zeigt den direkten Einflussvergleich der Hitzebehandlung bei 40, 60, 80, 100 °C für 15 min. Im IB lässt die Farbintensität der Proteinbande bei 20 kDa (Legumin-ähnliches Protein) bereits bei 40 °C deutlich nach. Die Proteinbanden bei 45 und 49 kDa (Vicilin-ähnliches Protein) wurden erst nach der 100 °C-Behandlung schwächer. Dies bedeutet, dass die Epitope des Vicilin-ähnlichen Proteins gegen Hitzebehandlung viel beständiger sind als die Epitope des Legumin-ähnlichen Proteins.

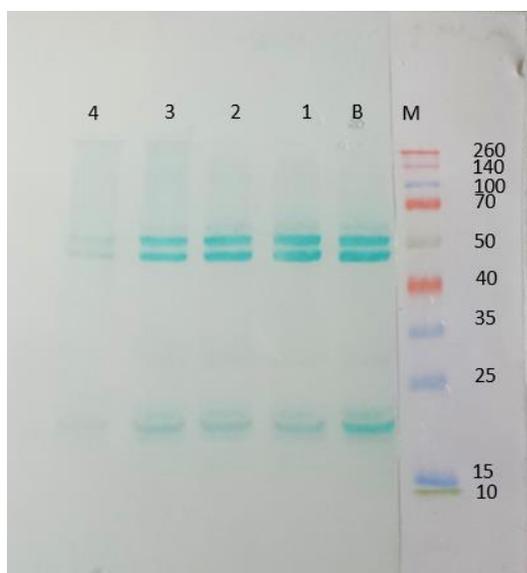


Abbildung 28: IB nach Hitzebehandlung von GLO mit unterschiedlichen Temperaturen für 15 min. M: Marker, B: GLO unbehandelt, 1: 40 °C, 2: 60 °C, 3: 80 °C, 100 °C

Während die Farbintensität des Legumin-ähnlichen Proteins bei 20 kDa nach der Hitzebehandlung bei 100 °C nicht mehr sichtbar war, konnten die Proteinbanden des Vicilin-ähnlichen Proteins mittels Immunfärbung noch visualisiert werden. Dies könnte allerdings auch daran liegen, dass die Epitope des Vicilin-ähnlichen Proteins mehr Primärantikörper als die Epitope des Legumin-ähnlichen Proteins binden. Das bedeutet, dass die Paratope der kommerziellen Antikörper mehr Affinität zu den Epitopen des Vicilin-ähnlichen Proteins zeigen. Die Detektion der Zielproteine bei der unbehandelten Probe (B) untermauert diese Aussage, da die Proteinbande bei 20 kDa schwächer war als diese der Proteinbanden bei 45 und 49 kDa.

Die Hitzebeständigkeit unter den Speicherproteinen (Vicilinen und Leguminen) ist in der Literatur bereits bekannt und beschrieben. Allerdings gibt es noch keine feste Regel zur Hitzebeständigkeit der Globuline, denn es ist stark von der Spezies bzw. der Art der Hitzebehandlung abhängig. So sind 7S-Globuline (Viciline) in der Haselnuss und der Cashewnuss bei der Hitzebehandlung sensibler als 11S-Globuline (Legumine), während sie in der Walnuss (Jur g 2, Jur g 4) und im Senf bis 180 °C gleich stabil sind (Cucu et al., 2011; de Leon et al., 2003). Die IgE- bzw. IgG-Bindung der Allergene (7S- und 11S-Globuline) in der Sojabohne bzw. in der Erdnuss wird bei einer Temperatur von 66 °C bzw. 100 °C beeinträchtigt werden, während das Kochen die Allergenizität der Sesamallergene sogar erhöht hat (Achouri und Boye, 2013; Burks et al., 1991; Jyothi et al., 2007). Der Schlüssel für die Stabilität dieser Allergene gegen Hitzebehandlung liegt in der charakteristischen β -Fasstruktur und die die Anwesenheit der Disulfidbrücken (Breiteneder und Mills, 2005).

4.4.2.2. Druck

Hierbei wurden die Proben zur Untersuchung mit *French Press* mittels Flaschenaufsatzfilter unter Vakuum ultrafiltriert. Für diesen Vorgang wurde eine Membran mit einer Porengröße von 0.45 μm eingesetzt. Anschließend wurde die Probe durch eine kleine Öffnung mit 69-138 MPa gepresst. Die Zielproteine eines unbehandelten, eines nur filtrierte und eines filtrierte und mit *French Press* behandelte Globulin-Extrakt (GLO) wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mittels SA detektiert. Die Darstellung dieser Proben ist in Abbildung 29 ersichtlich.



Abbildung 29: IB nach Filtration und French Press von GLO. M: Marker, B: Blank GLO unbehandelt, 1: filtrierte, 2: filtrierte und French Press behandelt

Die Ergebnisse zeigen, dass die Ultrafiltration keine Schwächung der Farbtintensität sowohl bei der 20 kDa-Proteinbande des Legumin-ähnlichen als auch bei beiden Proteinebanden des Vicilin-ähnlichen Proteins (45 und 49 kDa) verursacht hat. Im Gegensatz dazu wurde eine Farbschwächung aller detektierten Proteinbanden nach *French Press* beobachtet, wobei die Proteinbande bei 20 kDa nicht mehr detektierbar war. Dies bedeutet, dass die *French Press*

einen Einfluss auf die IgG-Bindung hat. Achouri und Boye (2013) sind bei der Druckbehandlung der Sesamallergene zum gleichen Ergebnis gekommen. So führte die Druckbehandlung zu einer deutlichen Reduktion der Allergenität.

4.4.2.3. pH-Wert

Um den Einfluss des pH-Werts zu überprüfen, wurde der pH-Wert von GLO auf 2, 4, 6 mit Salzsäure (HCl) eingestellt, anschließend wurden die Globuline mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit SA detektiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 30 zusammengefasst. Nach der Immunfärbung wurden lediglich die Proteinbanden der Blindprobe detektiert. Dies lässt daraus schließen, dass die Zugabe von Salzsäure die IgE- bzw. IgG-Bindung beeinträchtigt hat.

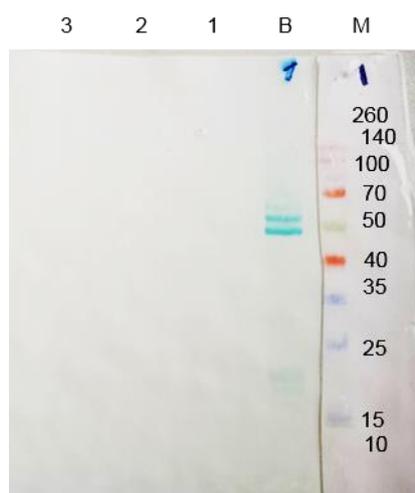


Abbildung 30: IB nach pH-Veränderung von GLO. M: Marker, B: GLO unbehandelt, 1: pH=6, 2: pH=4, 3: pH=2

Dies könnte daran liegen, dass die Zielproteine und somit deren Epitope durch die Reduzierung des pH-Werts eine strukturelle Veränderung erfahren. In Abschnitt 4.3.3.3. wurde der Verlust der IgG-Bindungsfähigkeit während der Isolierung mittels IAC-MB durch die Veränderung des pH-Werts auf 11,5 diskutiert. Ein weiterer Grund ist die Hydrolyse in der Anwesenheit der Salzsäure, welche auch zur Beeinträchtigung der IgE- bzw. IgG-Bindung führen kann.

Der Einfluss der pH-Veränderung auf IgE- bzw. IgG-Bindungsfähigkeit wurde in der Literatur bereits beschrieben. Kim et al. (2013) haben die Schwächung der IgE-Bindung von Erdnussallergenen Ara h 1 und Ara h 3 bei pH-Wert von 1, 3 und 5 beobachtet. Außerdem haben L'Hocine et al. (2007) in ihrer Studie über Sojaallergene berichtet, dass die niedrigste IgG-Bindung des Glycinins (11S-Globulin, Gly m 6) in einem pH-Bereich von 3-6 festgestellt wurde.

4.4.3. ELISA-Inhibition und Immunblot-Inhibition

Im Abschnitt 4.2. wurden die Zielproteine in reduzierendem Zustand (Anwesenheit von Mercaptoethanol) detektiert, weshalb keine Aussage in Bezug auf konformationelle Epitope getroffen werden konnte. Um eine Aussage diesbezüglich treffen zu können, wird die 3D-Struktur der Zielproteine in Chiasamen, welche in der Literatur noch nicht beschrieben ist, benötigt.

Jedoch könnte mittels ELISA-Inhibition überprüft werden, ob die Kreuzreaktivität unter IgEs bzw. IgGs gegen Chiasamenproteine und Proteine in Samen bzw. Nüssen anderer Spezies z.B. Sesam und Haselnuss auch an konformationellen Epitopen liegt. Die Inhibition der IgG- bzw. IgE-Bindung wurde in dieser Arbeit nur in Bezug auf Sesam- und Haselnussallergene getroffen.

Darüber hinaus kommt die Immunblot-Inhibition zum Einsatz, welche die Konkurrenz um die IgEs- bzw. IgGs zwischen Globulinen in Chiasamen einerseits und bekannten Allergenen in Sesam und Haselnuss andererseits darstellt. Hier sind überwiegend lineare Epitope involviert, da die Allergene im reduzierten Zustand vorliegen.

Zunächst wird mittels ELISA die Inhibition des allergenen Potenzials der nativen Haselnuss- und Sesamallergene im PBS-Extrakt durch GLO aus Chiasamen bestimmt. Die Methode ist im Abschnitt 7.9.3. beschrieben und die Durchführung ist dem Anhang unter 9.1.13.4. zu entnehmen. Wallowitz et al. (2007) haben in ihrer Arbeit belegt, dass die Kreuzreaktivität unter Allergenen nicht nur mit Humanseren sondern auch kommerziellen Antikörpern wie z.B. IgYs nachgewiesen werden kann. Dabei wurde die IgE-Bindung zu Sesamproteinen mit Anti-Walnuss-Antikörpern inhibiert, was als Beweis für die Kreuzreaktivität zwischen Sesam und Walnuss galt (Wallowitz et al., 2007). Um mit der in dieser Arbeit zur Verfügung stehenden Menge an Humanseren sparsam umzugehen, wurden die kommerziellen Antikörper in Inhibitionstests zum Nachweis der Kreuzreaktivität verwendet, zumal die meisten mittels Humanseren detektierten Zielproteine aus Chiasamen mit kommerziellen Antikörpern zu visualisieren waren (siehe Abschnitt 4.2.2.).

Zur Ermittlung der optimalen OD-Wert für den photometrischen Assay wurde die Mikrotiterplatte mit verschiedenen Konzentration der Zielantigene (10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 und 10000 µg/ml) inkubiert. Ergebnisse sind in Tabelle 39 im Anhang unter 9.2.6.1. zu finden. Die ELISA-Assays haben deutlich gezeigt, dass die optimale Antigen-Konzentration des PBS-Extrakts, welcher zum für den Inhibitionstest geeigneten OD-Wert führte, 100 µg/ml betrug (siehe Abbildung 31).

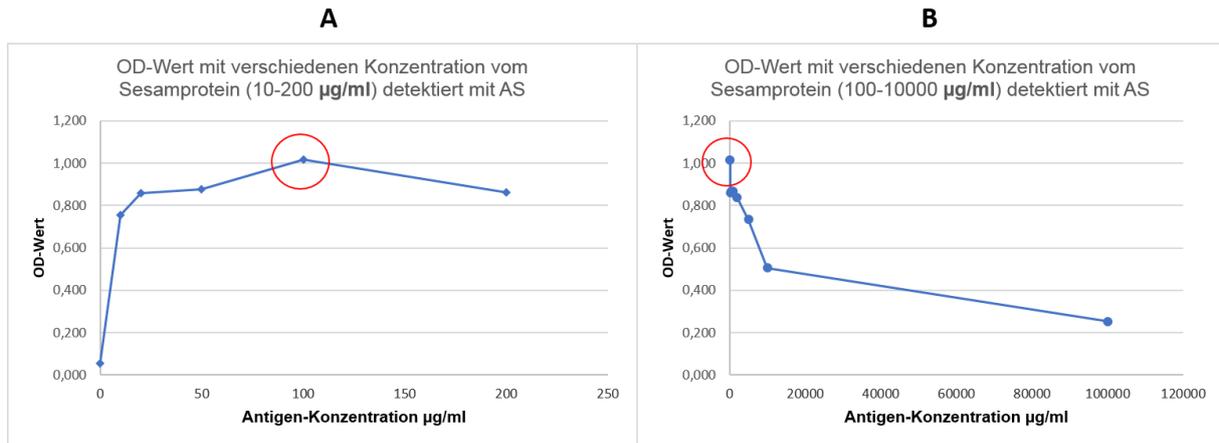


Abbildung 31: Ermittlung des für die ELISA-Inhibitionstests passenden OD-Werts mit Sesamprotein und Sesamantikörpern

Um den höchsten OD-Wert bei 100 µg/ml deutlich zu zeigen, sind in Abbildung 31, Teil A nur die Antigen-Konzentrationen zwischen 10-200 µg/ml dargestellt. Wie in Abbildung 31, Teil B ersichtlich, sanken die OD-Werte bei höheren Proteinkonzentrationen (mehr als 100 µg/ml) des PBS-Extrakts, welches vermutlich mit dem Blockieren freier Epitope auf dem Antigen durch unspezifische Proteine korreliert.

Darüber hinaus betrug die optimale Verdünnung der kommerziellen Sesam- bzw. Haselnussantikörper (Primärantikörper) 1:10000. Diese Verdünnung war nötig, um die optische Messung der Inhibition festzulegen. Auffällig war hier der OD-Wert der Blindprobe, der in Abwesenheit von GLO inkubiert wurde. Hier lag der OD-Wert bei der Detektion der Sesamallergene deutlich niedriger als bei dieser der Haselnussallergene. Dieses Ergebnis gibt Information darüber, wie stark die IgG-Bindung der Antikörper zu eigenen Allergenen ist. In diesem Fall waren mehr Haselnussantikörper an Haselnussallergene gebunden als Sesamantikörper an Sesamallergene.

Des Weiteren wurden die ELISA-Inhibitionstests durchgeführt und die ELISA-Inhibition (%) sowie der C_{50} -Wert berechnet (siehe Tabelle 40). Die Ergebnisse wiesen darauf hin, dass die Farbentwicklung mit zunehmender Menge an GLO in beiden Fällen (Haselnuss- bzw. Sesamantikörper) signifikant absinkt (Abbildung 32). Dies bedeutet, dass immer weniger Primärantikörper an Zielantigene binden, je größer die Konzentration von GLO ist. Die Bindungsinhibition der Sesamantikörper war jedoch stärker und betrug 80 %, während das Signal bei Haselnussantikörpern nur um 32 % inhibiert wurde (Abbildung 32, Teil A). Daraus lässt sich schließen, dass sich Chiasamen-Globuline (Viciline und Legumine) auch im nicht reduzierten (nativen) Zustand, an die kommerziellen Antikörper zu binden scheinen. Es kann daher festgestellt werden, dass Zielproteine in Chiasamen sowohl lineare als auch konformationelle Epitope tragen.

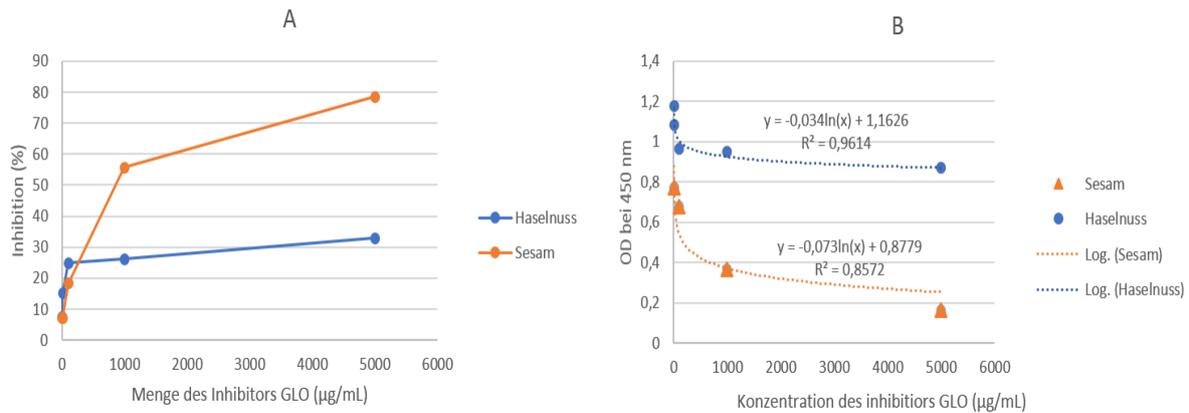


Abbildung 32: A: Inhibition des OD-Werts in %, B: logarithmische Regression zur Inhibition des OD-Werts, die orangene Linie stellt Inhibition der Sesamproteindetektion dar, die blaue Linie präsentiert die Inhibition der Haselnussproteindetektion

Um die IgG-Bindungsfähigkeit zu bemessen, wurde der C_{50} -Wert berechnet (siehe Abschnitt 7.9.3.). Der C_{50} -Wert im Falle der Sesamantikörper-Inhibition lag signifikant niedriger (0,282 mg/ml) als dieser der Haselnussantikörper (1077 mg/ml) (siehe Abbildung 32, Teil B). Das führt zur Erkenntnis, dass die Epitope auf Sesam- bzw. Chiasamenproteinen ähnlich sind, was eine Kreuzreaktivität hervorrufen konnte (Jimenez et al., 2015). Die Inhibition der IgG-Bindung der Haselnussantikörper an die Zielallergene (Haselnuss-Extrakt) war limitiert (32%) im Vergleich zur Inhibition der IgG-Bindung der Sesamantikörper (80%). Vermutlich könnte das damit zusammenhängen, dass konformationelle bzw. lineare Epitope auf Chiasamen-Globulinen weniger Sequenzhomologie zu denen auf Haselnussallergenen zeigen als auf Sesamallergenen. Dies konnte auch bei der Immundetektion mit kommerziellen Antikörpern nach 1D- und 2D-Gelelektrophorese beobachtet werden. So war die Anzahl der detektierten Proteine mittels Haselnussantikörper viel weniger als die mittels Sesamantikörper (siehe Abschnitte 5.2.2. und 5.3.4.).

Um den Einfluss der Inhibitor-Lösung (GLO) auf lineare Epitope der Sesam- und Haselnussallergene zu überprüfen, wurde die Immunoblot-Inhibition durchgeführt. Hierfür wurden die Primärantikörper (1:10000) mit verschiedenen Konzentrationen an GLO vorinkubiert. Die Mischung wurde anschließend mit NC-Membranen inkubiert, auf die reduzierte mittels SDS-PAGE aufgetrennte Haselnuss- bzw. Sesamproteine transferiert waren. Die Durchführung ist im Anhang unter 9.1.13.2. zu finden. In Abbildung 33, Teil A wurde die Inhibition der Sesamantikörper dargestellt, während Teil B die Inhibition der Haselnussantikörper zeigt.

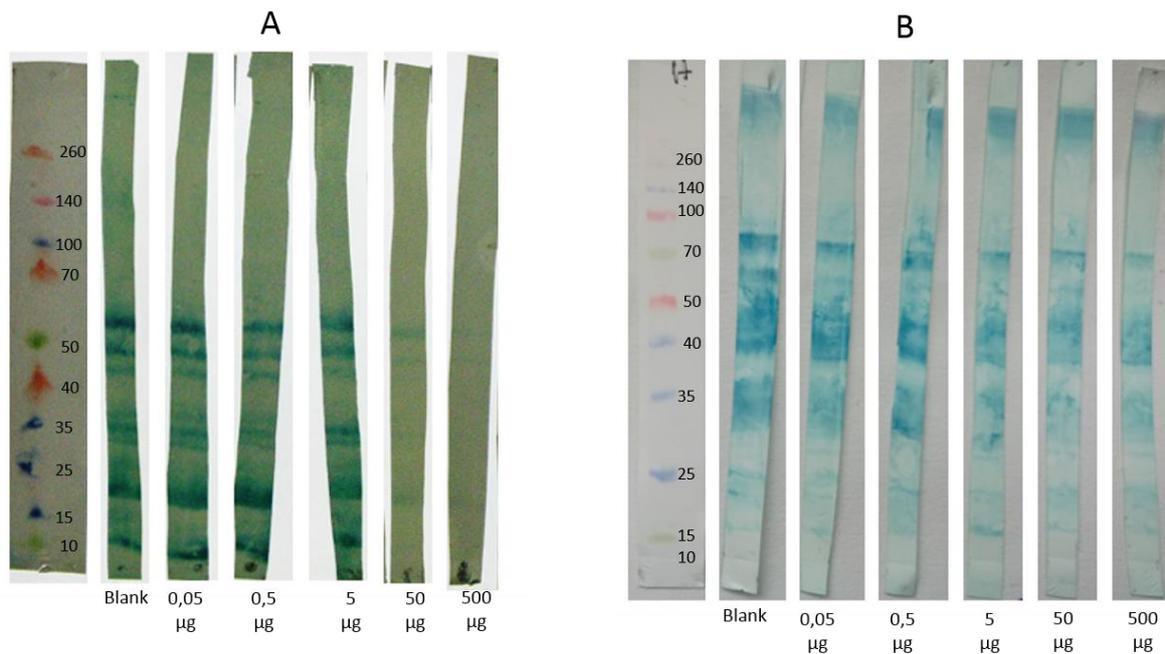


Abbildung 33: Immunoblot-Inhibition durch Inkubation der NC-Streifen in (A) kommerziellen Sesamantikörper (SA), (B) kommerziellen Haselnussantikörpern (HA), mit zunehmender GLO-Konzentration (0,05-500 µg/Streifen)

Bei Betrachtung der Abbildung 33 fällt auf, dass den Sesam- bzw. Haselnussallergenen mit zunehmender Konzentration der Inhibitor-Lösung (GLO) immer weniger IgGs zu Verfügung standen, wodurch eine schwächere Detektion erfolgte. Allerdings war die Bindungsinhibition der Sesamantikörper signifikant stärker als die der Haselnussantikörper. Dies bedeutet, dass lineare Epitope der Sesamallergene höhere Sequenzhomologie zu Epitopen auf Chiasamen-Globuline zeigen als zu linearen Epitopen auf Haselnussallergenen. Auch nach MS-Analyse (Abschnitt 4.3.3.3.) wurden 8 Peptidsequenzen aus Chiaglobulinen als Sesamproteine identifiziert, während als Haselnussproteine nur 5 Peptidsequenzen erfasst wurden (siehe Tabelle 37 im Anhang unter 9.2.5.4.). Die Abbildung 34 veranschaulicht das Prinzip der ELISA-Inhibition und der Immunoblot-Inhibition.

Ob bei der IgG-Bindung zwischen Globulinen in Chiasamen und kommerziellen Antikörpern konformationelle bzw. lineare Epitope involviert sind, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend beantwortet werden. Um herauszufinden, welche Epitope involviert sind, muss die vollständige Proteinsequenz der Zielproteine bestimmt werden. Ferner können die Epitope mittels Epitopmapping mit Hilfe von synthetischen Peptiden bestimmt und mit Antikörpern bzw. Humansenen detektiert. Danach kann die Lokalisierung der IgE-reaktiven Bereiche in der Proteinstruktur erfolgen, welche mit synthetischen Peptiden als Sonde zum Aufspüren von IgE- bzw. IgG-reaktiven Epitopen realisiert wird (Gruber et al., 2004).

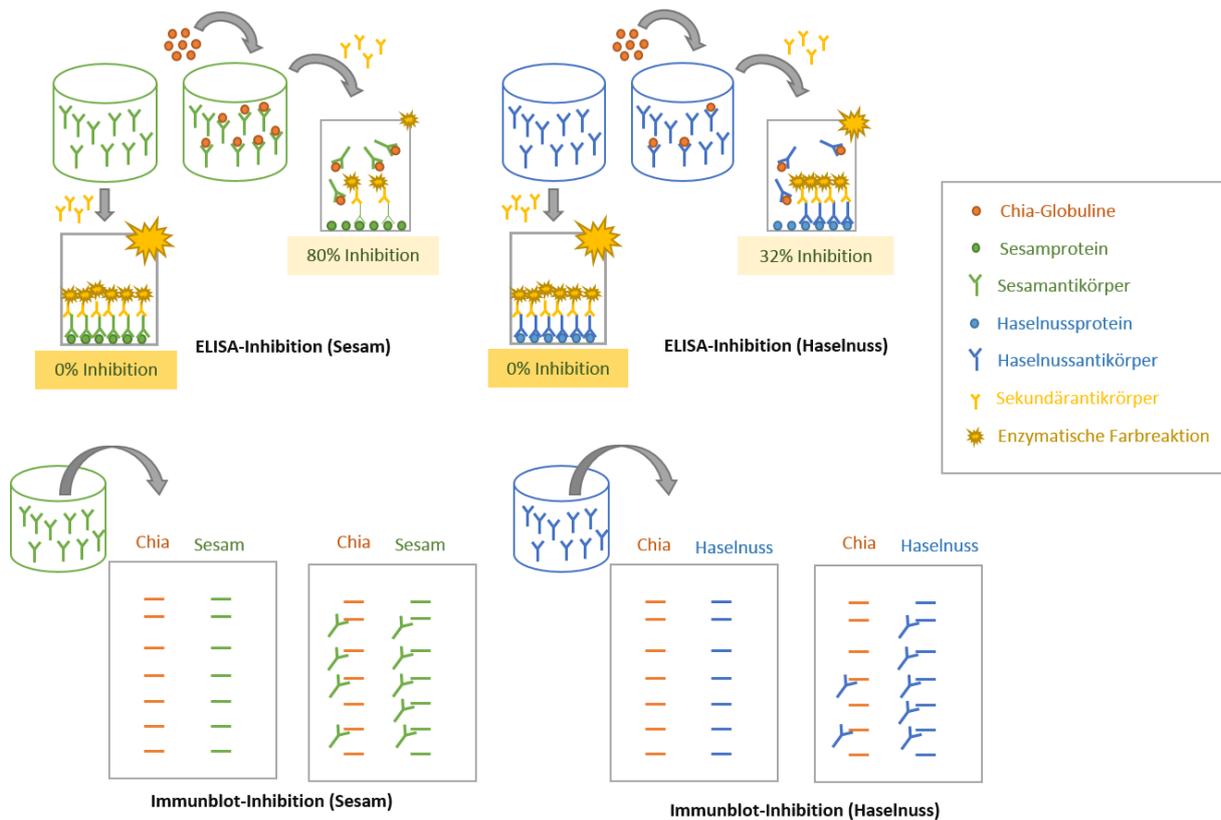


Abbildung 34: Veranschaulichende Darstellung zur ELISA-Inhibition und Immunblot-Inhibition (eigene Darstellung)

Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass die Inhibition des OD-Werts bzw. der Immunfärbung auf eine Kreuzreaktivität mit Chiasamen-Globulinen hindeutet. Der Globulin-Extrakt (GLO) aus Chiasamen war in der Lage, die IgG-Reaktivität der Sesam- und Haselnussantikörper zu reduzieren. Diese Kreuzreaktivität ist in der Literatur aufgrund der hohen Sequenzhomologie unter Speicherproteinen auf verschiedenen Strukturebenen (unter Vicilinen z.B. Cor a 11 aus Haselnuss, Ara h 1 aus Erdnuss, Ses i 3 aus Sesam, bzw. unter Leguminen, z.B. Cor a 9, Ara h 3 or, Ses i 7) nicht unbekannt. Patienten können in ihren Blutseren über IgEs verfügen, die mit mehreren Leguminosenspezies immunologische Kreuzreaktionen zeigen (Eigenmann et al., 1996). Des Weiteren haben Wallowitz et al. (2007) mittels Immunblot-Inhibition belegt, dass spezifische IgEs in Blutseren von Sesamallergikern mit Walnussallergen Jug r 4 kreuzreagieren. Außerdem konnten in einer Doktorarbeit mit vier Humanseren von Sojaallergikern manche Erdnussproteinbanden detektiert werden, obwohl in diesen Humanseren keine spezifischen IgEs für Erdnuss nachzuweisen waren (Boldt, 2005).

In der Literatur gibt es bisher keine aussagekräftigen Humanstudien, die das allergene Potenzial von Chiasamen bewiesen. Eine IgE-vermittelte Reaktion zum Chiasamenprotein konnte in zwei Studien beobachtet werden (Jimenez et al., 2015; Tomas-Perez et al., 2018). Allerdings müssen die Ergebnisse solcher Studien validiert werden, um den Chiasamen allergische Reaktionen zuschreiben zu können (EFSA, 2009b).

Jimenez et al. (2015) schließen in Ihrer Studie eine Kreuzreaktivität zwischen Speicherproteinen aus Chiasamen und folgenden Allergenen aus: Ana o 2 aus Cashewnuss, Ber e 1 aus Brasilnuss, Cor a 9 und Cor a 14 aus Haselnuss, Jug r 1, Jug r 2 aus Walnuss, Ses i 1 aus Sesam, Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 6 aus Erdnuss, Gly m 5, Gly m 6 aus Sojabohne, und Fag e 2 aus Buchweizen. Diese Studie ist jedoch durch die Tatsache begrenzt, dass nur ein einziges Blutserum für die Untersuchung der Kreuzreaktivität herangezogen wurde. Der Patient litt unter Rhinitis und Asthma bei einem Kontakt zu Gräserpollen und Katzenschuppen. Nach dem Verzehr von Chiasamen entwickelte der Patient Juckreiz im Mund, Urtikaria, Angioödem sowie Atemnot und Schwindel. Der Prick-Test gegen Chiasamen war zwar positiv, hat aber ein negatives Ergebnis gegen Sesamextrakt oder Extrakte üblicher Allergene gezeigt. Des Weiteren ist diese Studie kritisch anzuwenden, da nicht geprüft wurde, ob sich die spezifischen IgEs im verwendeten Humanserum an Epitope binden, welche unter Speicherproteinen homolog sind. Es ist daher fraglich, ob die allergische Reaktion überhaupt von Speicherproteinen ausgelöst ist. Die allergische Reaktion könnte vermutlich von Bet v 1 bzw. Bet v 2-ähnliche Proteinfamilien wie PR-10-Proteine oder Profiline ausgelöst worden sein (Henzgen et al., 2005). Um mehr Informationen über die für die IgE- bzw. IgG-Bindung zuständige Epitope auf Chiasamen-Globulinen zu erhalten, müssen die mittels IAC-MB und 2D-Gelelektrophorese isolierten und *De Novo* sequenzierten Peptide mit Sequenzen bekannter Allergene verglichen werden.

4.4.4. Computergestützter Sequenzvergleich mittels der FARRP-Datenbank

In diesem Abschnitt wird die Kreuzreaktivität zwischen Globulinen aus Chiasamen und Allergenen anderer Spezies über die Sequenzhomologie überprüft. Wie im Abschnitt 4.3.3.3. und 4.3.4.2. dargestellt wurde, war die Isolierung der Chiasamen-Globuline mittels IAC-MB und 2D-Gelelektrophorese sehr spezifisch, wodurch wertvolle Peptidsequenzen mittels UHPLC-ESI-MS/MS gewonnen werden konnten. Daher wurden nur diese Peptidsequenzen durch eine Sequenzalignierung in der FARRP-Datenbank weiter untersucht. Der Grund für diesen Sequenzvergleich ist einerseits die Feststellung der Sequenzhomologie zwischen Peptiden aus Chiasamen und bereits bekannten Allergenen aus anderen Spezies, andererseits die Ermittlung der Epitope, welche für die IgE- bzw. IgG-Bindung verantwortlich sein könnten. Basierend auf historischen Daten ist eine Kreuzreaktivität unter Allergenen mit weniger als 50 % Sequenzübereinstimmung (SÜ) über die gesamte Proteinsequenz nicht wahrscheinlich, während über 70 % ziemlich häufig auftritt (Aalberse, 2000). Daher war eine Voraussetzung für einen Treffer in der FARRP-Datenbank eine Sequenzübereinstimmung (SÜ) von über 50 % und eine Sequenzähnlichkeit (SÄ) von über 70 %. In Tabelle 41 im Anhang unter 9.2.6.2. sind die Ergebnisse des Sequenzvergleichs unter anderem Sequenz-ID, ähnliche Sequenz, SÜ, SÄ, sowie der entsprechende Organismus dargestellt. Die

identifizierten Peptidsequenzen aus bekannten Allergenen wurden in Tabelle 41 farblich markiert. Die rot bzw. orange markierte Aminosäure zeigt dieselbe bzw. ähnliche Aminosäure in der Peptidsequenz aus Chiasamen, während eine unterschiedliche Aminosäure blau markiert wurde. Nach Auswertung der Ergebnisse, lässt sich sagen, dass die Identifizierung der erhaltenen Peptide mittels der FARRP-Datenbank mit den Ergebnissen aus der NCBI-Datenbank in Bezug auf den Proteintyp (Vicilin bzw. Legumin) übereinstimmt (siehe Abschnitt 4.3.3.3.). Hier ist es auffällig, dass aufgrund der Sequenzhomologie Peptidsequenzen aus Chiasamen mehreren Allergenen aus verschiedenen Spezies zugeordnet waren. Dies zeigt die hohe SÄ unter diesen Allergenen. Allerdings konnte anhand der NCBI-Datenbank gezeigt werden, dass die erhaltenen Chiasamenpeptide auch eine SÄ mit Peptiden aus Vicilinen und Leguminen zeigen, welche nicht allergieauslösend sind. Dies kann daran liegen, dass Viciline bzw. Legumine unter sich eine hohe Sequenzhomologie besitzen. Warum manche Viciline bzw. Legumine allergisch sind und manche nicht konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Barre et al. (2008) vermuten, dass die Sequenz bzw. die strukturelle Position der für die allergische Reaktion zuständigen Epitope eine entscheidende Rolle spielen.

Insgesamt ähneln sich 35 Peptidsequenzen aus Chiasamen mit unterschiedlichen bekannten Allergensequenzen aus 22 Organismen. 29 Peptidsequenzen wurden in der Datenbank als 11S-Globulin (Legumin) identifiziert, wobei am häufigsten das Peptid NNQQFECAGVAAVR in 11 verschiedenen Spezies mit 25 Treffern erfasst wurde. Als 7S-Globulin (Vicilin) wurden nur 5 Peptide festgestellt. Hierbei hat das Peptide VNADNNEQFTLAG in 11 unterschiedlichen Spezies die meisten Treffer (21 Treffer). Nur das Peptid LGASLSAVAGP wurde dem Allergen Kiwellin aus der Kiwi zugeordnet, welches nicht als Globulin sondern als Cystein-reiches Protein charakterisiert ist (Tamburrini et al., 2005).

Es ist bemerkenswert, dass manche Peptide viele Treffer in der FARRP-Datenbank hatten, obwohl sie nur einem Allergen zugeordnet waren. Dies liegt daran, dass in der Datenbank mehrere Sequenz-IDs unter einem Allergen hinterlegt sind. Beispielsweise wurde die Sequenz VNADNNEQFTLAG acht unterschiedlichen Sequenz-IDs des Allergens Ara h 1 zugeordnet.

In Abbildung 35 wurden die Spezies nach der Anzahl (11S- und 7S-Globulin) der Chiasamenpeptide mit hoher Übereinstimmung sortiert und dargestellt. Hierbei wird sofort deutlich, dass Allergensequenzen aus Sesam mit 26 Chiasamenpeptiden (ca. 70 % der Peptide) übereinstimmen. Darauffolgend zeigen Allergene aus Haselnuss, Mandel und Pistazien eine hohe SÄ mit 10 Peptiden aus Chiasamen (ca. 32 %). Sequenzen aus Buchweizen, weißer Senf, Sojabohne und Cashewnuss konnten 7-9 Chiasamenpeptiden zugeordnet werden, während Allergensequenzen aus Erdnuss nur vier Peptiden ähneln. Durch diese Ergebnisse konnte festgestellt werden, dass Sesamallergene die höchste SÄ mit dem Chiasamen-Legumin bzw. -Vicilin gefolgt von Haselnuss-, Mandel- und Pistazienallergenen zeigen. In der Tabelle 42 im Anhang unter 9.2.6.2. wurde die Anzahl der

Hits beim Sequenzvergleich mit aufgeführt. Die Anzahl der Hits beschreibt, wie viele Sequenz-IDs insgesamt in der Datenbank den Chiasamenpeptiden zugeordnet werden konnten, wobei eine Allergensequenz mehrere Sequenz-IDs besitzen kann.

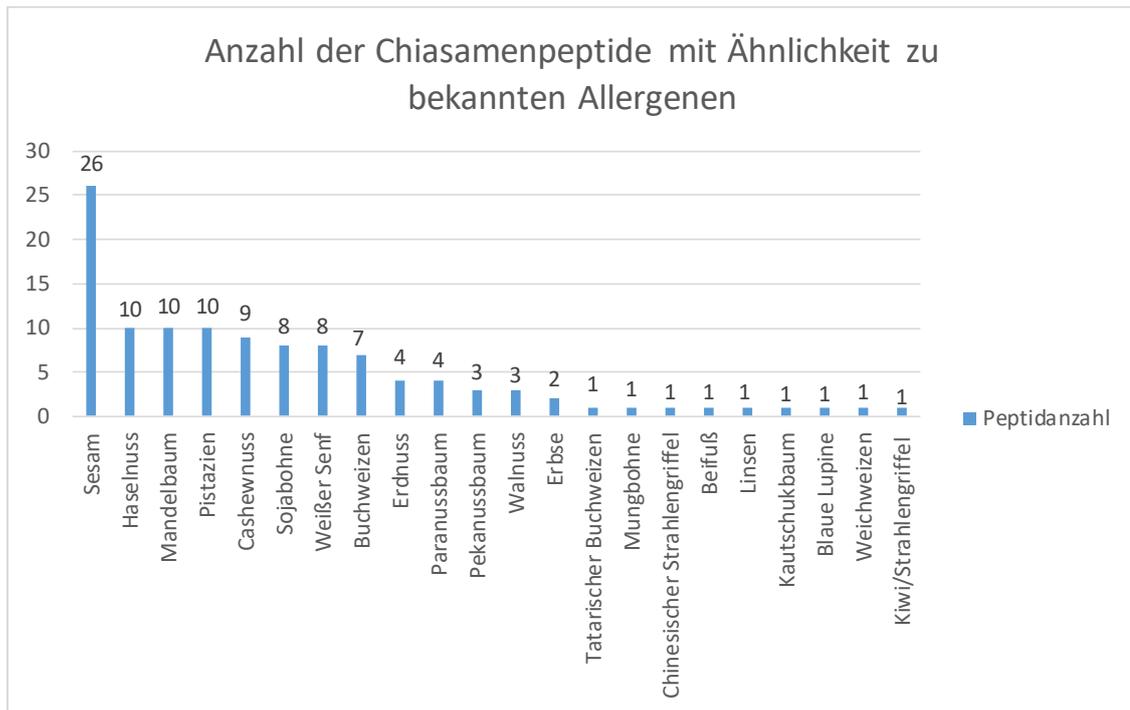


Abbildung 35: Anzahl der Chiasamenpeptide, welche eine hohe Sequenzähnlichkeit mit Sequenzen bekannter Allergene in unterschiedlichen Spezies zeigen.

Eine SÜ von 80-100 % mit den als Legumin identifizierten Chiasamenpeptiden wiesen die Allergenpeptide in Sesam, Echtem Buchweizen, Walnuss, Haselnuss, Mandel, Pekannuss und Sojabohne auf. Solch eine hohe SÜ konnte auch mit Vicilin identifizierten Peptiden in Sesam, Cashewnuss, Pistazien, Sojabohne gezeigt werden.

Die hohe SÜ bzw. SÄ zwischen Chiasamenpeptiden und Peptiden bekannter Allergene deutet auf eine mögliche Kreuzreaktivität zwischen Chia und anderen Spezies hin. So könnten Peptidsequenzen wie NNQQFECAGVA AVR bzw. VNADNNEQFTLAG, welche eine hohe Übereinstimmung mit Peptidsequenzen aus 15 bzw. acht verschiedenen Spezies zeigen, kreuzreaktive IgE-Epitope tragen, was zur Kreuzreaktivität führen könnte. In einer Studie konnte festgestellt werden, dass die Peptidsequenz GQL(I/L)VVPQNFV V in Leguminen aus Sojabohne (Glycinin G1), Erdnuss (Ara h 3) und Lupin (Lup-2) hoch konserviert ist, was der Grund der Kreuzreaktivität zwischen diesen Spezies sei (Guillamon et al., 2010).

Allerdings konnte eine weitere Studie belegen, dass eine SÜ von über 50 % zwischen dem Vicilin Pis s 1 aus Erbse und Ara h 1 aus Erdnuss selten zur Kreuzreaktivität führt. Nach einer sorgfältigen Untersuchung der Struktureigenschaften der Allergene weisen Aalberse (2000) darauf hin, dass eine Kreuzreaktivität erst bei einer Sequenzabdeckung von über 70 % in Betracht gezogen werden kann. Um Kreuzreaktivität unter Allergenen genauer zu bestimmen,

sollten bei einem Sequenzvergleich die Anwesenheit von linearen und konformationellen Epitopen in Chiasamenpeptiden untersucht werden.

Zur Bestimmung dieser Epitope wurde eine umfassende Sequenzalignierung über das Programm Clustal Omega im Internet online durchgeführt. Es wurden die auf der Internetseite voreingestellten Parameter verwendet (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Die für die Alignierung eingesetzten Allergensequenzen wurden nach Anzahl der Chiasamenpeptide mit hoher SÜ ausgewählt. Beispielsweise zeigt die 11S-Globulin-Sequenz „5381325“ aus Sesam eine Ähnlichkeit zu 14 Chiasamenpeptiden, verglichen mit „13183173“ (nur acht Peptide). In diesem Fall wird 5381325 für die Sequenzalignierung verwendet (siehe Tabelle 42 im Anhang unter 9.2.6.2.). In Tabelle 42 sind Vicilin-Sequenzen grün markiert und Legumin-Sequenzen orange markiert.

Das vollständige Alignment aus Proteinsequenzen der ausgewählten Allergene (Legumin bzw. Vicilin) und den Chiasamenpeptiden (Lila markiert) ist dem Anhang unter 9.2.6.2. zu entnehmen. Die Markierung unter dem Alignment durch Sterne soll die Sequenzhomologie der Allergene verdeutlichen. Abnehmende Homologie der Aminosäuren wird durch Doppelpunkte, Punkte und Lücken gekennzeichnet. Identische Aminosäuren wurden gelb markiert. Epitope, welche in der Epitop-Datenbank IEDB veröffentlicht sind, wurden in rot geschrieben. Da nicht alle Epitope die untersuchten Allergene in der Datenbank zu Verfügung stehen z.B. Ses i 3 aus Sesam oder Vicilin aus Erbsen, wurde die Methode KTAS angewandt, um mögliche Antigen determinaten (Epitope) zu prognostizieren. Diese Methode basiert auf physiochemische Eigenschaften der Aminosäurereste und prüft die Wahrscheinlichkeit von deren Vorkommen in bereits bekannten Epitopen. Die Genauigkeit dieser Methode zur Bestimmung von Epitopen beträgt 75 % (Kolaskar und Tongaonkar, 1990). Prognostizierte Epitope wurden im Alignment blau markiert. Ein Beispiel der prognostizierten Epitope in einer Vicilin-Sequenz aus Sesam sowie das dazugehörige Chromatogramm der Methode KTAS sind in Abbildung 68 im Anhang unter 9.2.6.2. zu finden.

Abbildung 36 zeigt nur die Teile des Alignments, wo die Peptidsequenzen des 7S-Globulins in Chiasamen mit Sequenzen anderer Spezies verglichen wurden.

	1	2	3	4	5
Chiasamen	QTTNNPYVFE ^{xDR}	LHAGTTTYLVNR	YGQLYEVDSS ^{xHF}	VNADNNEOFTLAG	SOKEEFFFEGPGR
Erdnuss	TSRNNPFYFP ^{xSR}	IPSGFTSYILNR	FGKLFVVKPDKKN	INAENNHRIFLAG	NQKESHFVSARP
Erbse	SDQENPFIFK ^{xSN}	LPAGTIAYLANR	FGKFFEITPE ^{xKN}	INAENNERNFLAG	NQKQSYFANAQPL
Sojabohne	EDENNPFYFRSSN	IPAGTTYLVN ^P	FGKFFEITPE ^{xKN}	INAENNQRNFLAG	KQRESYFVDAQPO
Mandel	TFNPNPYFP ^{xKF}	VPAGATTYLINN	YGKFYEASPO ^{xEF}	INAGNNIRNFLAG	SOQKQSYFVPASRR
Sesam	GRGRIPYVFE ^{xDQ}	INAGTTAYLINR	YGQLYEVDAS ^{xQY}	VNANNNEKFPLAG	SQQEEFFFKGPRQ
Haselnuss	EQEENPYVFQ ^{xDE}	IPAGTPVYMINR	FGRLYEAHDP ^{xDH}	VNAHGNSRFPLAG	NQDQAFFFP ^{GP} PK
Pistazien	EEDENPYVFE ^{xDE}	IRAGTPFYI ^{VNT}	YGQLFESEFK ^{xDY}	VNAEGNIRYTLAG	KQDEEFFFQ ^{GP} PKW
Cashewnuss	EEDENPYVFE ^{xDE}	ISSGTPFYI ^{ANN}	YGQLFEAERI ^{xDY}	VNAEGNIRYTLAG	KQDEEFFFQ ^{GP} PEW
	*: * .	: : * * : *	:*::* .	:** .* : **	.* : .* .

Abbildung 36: Alignment der als Peptidsequenzen aus Chiasamen-Vicilin mit bereits bekannten Allergenen, Chiasamenpeptide sind lila markiert. Identische Aminosäuren mit Chiasamen-Sequenzen sind gelb markiert. In Schriftfarbe „rot“ sind veröffentlichte Epitope aus der Epitop-Datenbank IEDB. In Schriftfarbe „blau“ sind prognostizierte Epitope mittels KTAS

Hier wird sofort ersichtlich, dass die Chiasamen-Sequenzen Aminosäureabfolgen beinhalten, welche ein hohes allergenes Potenzial aufweisen. Beispielsweise zeigt das Peptid 1 die Aminosäureabfolge „NPYVF“, welche einen Epitop-Teil in Sequenzen aller Spezies mit Ausnahme von Erbse darstellt. Das gleiche Phänomen wurde beim Peptid 2 mit „YLVN“, Peptid 4 mit „VNA“ und Peptid 5 mit „EEFFF“ beobachtet. Dies könnte die Ursache für die IgE- bzw. IgG-Bindung der Chiasamen-Viciline sein, was wiederum die Wahrscheinlichkeit auf eine Kreuzallergie erhöht. Diese Sequenzähnlichkeit der linearen Epitope wurde unter Vicilinen aus Erdnuss, Haselnuss, Cashewnuss, Walnuss und Sojabohne bereits beobachtet (Barre et al., 2008). In dieser Studie wurde festgestellt, dass lineare Epitope an positiv (Arginin bzw. Lysin) bzw. negativ (Asparaginsäure bzw. Glutaminsäure) geladenen Aminosäuren reich sind und sich auf der Oberfläche des Vicilins befinden. Nur so könnte eine Kreuzreaktivität durch ähnliche Epitopsequenzen möglich sein. Des Weiteren stellen Mari et al. (1999) fest, dass CCDs für die Kreuzreaktivität keine relevante Rolle spielen, welches im Abschnitt 4.4.1. bestätigt werden konnte. Bei dieser Untersuchung konnten keine Zuckerreste im Monomer des Vicilins nachgewiesen werden, was die Rolle der CCDs bei einer Kreuzreaktivität ausschließt.

Um die evolutionäre Verwandtschaft bzw. die Sequenzhomologie unter Vicilin-Sequenzen aus Chia und anderen Spezies zu überprüfen, wurde ein phylogenetischer Baum online über das Tool „Phylogeny (<http://www.phylogeny.fr/>) generiert (siehe Abbildung 37). Hierbei werden zwischen zwei Arten des phylogenetischen Baums unterschieden. Wird die Evolution über einen phylogenetischen Baum mit einer Darstellung der gemeinsamen Vorfahren, redet man von einem gerechtigten Baum. Auf einem ungerechten Baum sind keine Vorfahren (keine Wurzel) dargestellt, sondern nur die Verwandtschaft zwischen den zu untersuchenden Spezies. In dieser Arbeit wurde nur der ungerechte phylogenetische Baum dargestellt, da die Verwandtschaft nur basierend auf Proteinsequenzen analysiert wurde. Um die Zuverlässigkeit und Robustheit der Aussage über die Verwandtschaft zwischen Spezies zu überprüfen, wurde der Bootstrap-Wert (engl. *bootstrap value*, BV %) herangezogen (Hilu et al., 2003). Der

phylogenetische Baum besteht aus Ästen bzw. Zweigen und Verzweigungen bzw. Knoten, in denen Äste zusammenlaufen. Die Gruppe mit gemeinsamer Abstammung wird in einer Klade zusammengefasst. Die Astlänge beschreibt die Zeit der evolutionären Veränderungen der Organismen und ist proportional zur evolutionären Entfernung von der Allergensequenz des Vorläufer-Vicilins.

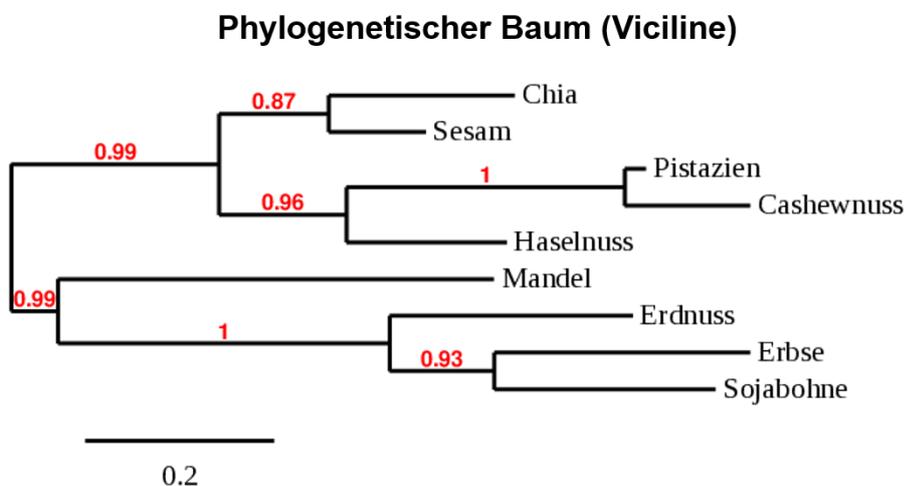


Abbildung 37: Phylogenetischer Baum der Viciline aus Chiasamen und bereits bekannten Allergenen generiert durch das Tool Phylogeny (<http://www.phylogeny.fr>). Die Proteinsequenzen wurden der Datenbank NCBI entnommen

Die Verwandtschaftsverhältnisse bezogen sich hier ausschließlich auf die Proteinsequenzen der untersuchten Viciline aus obengenannten Spezies. Bei Betrachtung des phylogenetischen Baums der Viciline, fällt es direkt auf, dass die Aussage der Verzweigung eine hervorragende Zuverlässigkeit mit einem Bootstrap-Wert von 87-100 % hat. Des Weiteren bilden Chia und Sesam eine sogenannte Klade und besitzen möglicherweise eine gemeinsame Vorläufer-Proteinsequenz, wobei die Astlänge von Chia länger als die von Sesam ist. Dies könnte ein Hinweis auf evolutionäre Veränderungen bzw. Familienunterschiede sein, welche die Schlussfolgerung erlaubt, dass die Vicilin-Sequenz aus Sesam ähnlicher zu allen anderen Allergensequenzen ist als diese aus Chia. Nichtsdestotrotz ist die Vicilin-Sequenz aus Sesam die ähnlichste zu der aus Chia, gefolgt von Haselnuss, was die Kernvermutung dieser Arbeit untermauert. Um eine bessere Einschätzung über die evolutionäre Beziehung zu gewinnen, muss die komplette Sequenz des Vicilins aus Chia zur Verfügung stehen. Betrachtet man andere Knoten im phylogenetischen Baum, fällt direkt auf, dass Pistazie und Cashewnuss ebenfalls eine Klade mit unterschiedlichen Astlängen bilden, wobei Pistazie näher zu Chia ist. Eine Kreuzreaktivität zwischen Cashewnuss und Pistazie ist in der Literatur bereits beschrieben (Andorf et al., 2017). Darüber hinaus bilden Vicilin-Sequenzen aus Pistazie, Cashewnuss sowie Haselnuss einen Hauptknoten aus, wobei die Sequenzen aus Pistazie und Cashewnuss mit unterschiedlicher Astlänge am ähnlichsten sind. Die dritte Klade stellt Sequenzen aus Erdnuss, Erbse und Sojabohne auf einer Seite und Mandel auf der anderen

Seite dar. In dieser Klade ist Mandel am nächsten zu Chia. Hier zeigen Erbse und Sojabohne die höchste Sequenzhomologie des Vicilins in dieser Gruppe.

Bei dem Legumin-Alignment zeigen die Chiasamenpeptide eine hohe Sequenzhomologie zu bekannten Allergenen aus 12 Spezies. In Abbildung 38 sind Ausschnitte aus diesem Alignment mit Chiasamenpeptiden dargestellt. Das vollständige Alignment mit allen Sequenzen ist im Anhang unter 9.2.6.2. zu sehen.

Bei Betrachtung der Abbildung 38 wird deutlich, dass auch die Legumin-Sequenzen Aminosäureabfolgen aufweisen, welche bei den meisten bekannten Allergenen Epitope und somit ein hohes allergenes Potenzial zeigen. Im Alignment überlappen sich putative Epitope stark unter Chiasamenpeptiden 1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, und 12. So wird beispielsweise vermutet, dass die hochkonservierten Sequenzbereiche FQCAGVA in der Sequenz 2, FYLAGN in der Sequenz 4, ETFCM in der Sequenz 5 bzw. LPLL in der Sequenz 8 ein hohes Risiko für eine Kreuzreaktivität darstellen könnten, zumal diese Sequenzbereiche auch Epitope in mehreren Spezies zeigen (siehe Abbildung 38, Epitope mit Schriftfarbe rot bzw. blau). Peptide mit sehr hohen allergenen Potenzialen stellen die Sequenzen 9 und 12 dar, wobei sich Epitope wie, VVY bzw. VLTNAYQ in Chiasamenpeptiden wiederfinden konnten.

Die Asparagin- Glycin (NG)- Spaltstelle des Legumins konnte außerdem aus dem Alignment entnommen werden (grün markiert). Somit konnte die Zuordnung der Chiasamenpeptide zum N- bzw. C-terminalen Teil des Legumins erfolgen. Hierbei fällt direkt auf, dass die Peptide aus der N-terminalen α -Untereinheit alle aus Proteinspots bei 31 kDa stammen, während Peptide aus der C-terminalen β -Untereinheit in Proteinspots bei 20 und 23 kDa beobachtet wurden. Dies bedeutet, dass die 31 kDa-Proteinbande dem N-terminalen Teil und die 20 bzw. 23 kDa Proteinbanden dem C-terminalen Teil des Chiasamen-Legumins zugeordnet werden können. Dieses Ergebnis stimmt mit der Zuordnung der mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennten und immunologisch detektierten Proteinspots im Abschnitt 4.3.4.2. überein.

Ergebnisse und Diskussion

	1	2	3	4	5	6
Chiasamen	TQCQLQQLSAR-	NNEQFQCAGVAAMR	-GLVLPFYTNAPR	PQTFESPQQQ	KFVLAGNPOS	--FFETFTCTMK
Buchweizen	RQCRLDQLTSSQ	EEDQFQCAGVAAMR	DSLSLPSYSSPR	PETYQSRGMEI	TFFLAGGVQGI	NGLEESFCNMR
Senf	DACLNDNLVDLQ	NNPQIRCAGVSIAR	GGFYLPFFFSSPK	AETFMDSQPM	VFRLAGNPNQI	NGLEETICTSMR
Sojabohne	NECQIQKLNALK	NNKPFQCAGVALSR	NALRRPSYTNBPQ	CPSTFEEPQQ	RFYLAGNQEIQ	NGIDETICTMR
Erdnuss	NECQFQRLNAQR	NNQEFCAGVALSR	NALRRPFYSNAPL	PSTYEEPAQE	RFYLAGNQEIQ	NGIETICTSAS
Sesam	TDCRVERLTAQE	NNQQFECAGVAAVR	RGLLLPHYNNAPQ	AETFERDTQP	HFFLAGNPQG	NGLEETLCTAK
Pistazien	TQCQIQNLNALE	NEEQFQCAGVAVFR	RGLLVPSYNNAPE	PETFQESQS	KFVLGSSPQQI	NGLEETFCMT
Paranuss	YECRIQRLTAQE	TDQQFRCAGVAALR	QGLLLPVYTNAPK	PETFQSMSQF	HFFLAGNIQR	NGLEETICTSAT
Mandel	NQCQLNQLQARE	NQEDFQCAGVAASR	NGLHLPSYSNAPQ	PETFESQSS	KFYLGNPENI	NGLEETFCSLR
Cashewnuss	DECQIDRLDALE	NHEQFRCAGVALVR	NGLLLPQYSNAPQ	PETYQAPQQG	KFHLGNPKD	NGIETICTMR
Haselnuss	GECLDRNLNALE	NDQQFQCAGVAVIR	NGLLLPQYSNAPQ	PETFEDPQQQ	HFYLAGNPDDI	NGFEETICTSLR
Pekannuss	GQCQLNRDLALE	NHQQLQCAGVAVVR	NGLLLPHYSNAPQ	PETFESQRQ	RFYLAGNPDDI	NGLEETICTLS
Walnuss	GQCQLNRDLALE	NNQQFQCAGVAVVR	NGLLLPQYSNAPQ	PETFESQRQ	RFYLAGNPDDI	NGLEETICTLR
	* . . . *	. : . ** . * :	. : * : . . *	. ** :	* * . *	: ** . *
	7	8	9	10	11	
Chiasamen	NLDHPTASADLYNPR	LPLLSYMDMSAQ	TVVYVTK	LVDSHGQTYFNDR	DNALVSPLAGRTSALR	
Buchweizen	NLGPRTEADIASRQ	LPILFIDMSAE	RVFYVLR	IVDDNGQTVLDDR	ANPMSSPLNGHASVFK	
Senf	NIDDPARADIYKPN	IPILQYIRLSAT	IEILYCTQ	VVNDNGQNVLDQQ	ANAMISTLAGRTSALR	
Sojabohne	NIGQTSPPDIYNPQ	FPALSWLRLSAE	ISIIYALN	VVNCNGERVFDGE	DTPMIGTLAGANSLLN	
Erdnuss	NLGRSNNPDIYNPQ	LPILGWLGLSAQ	TIIVVALN	VVDSNGNRVYDEE	SRPSIANQAGENSIID	
Sesam	NLDEPARADVYNPH	LPVLSWLRLSAE	SIYYITR	VVGHTRGSVFDGV	DNAMTSQLAGRLSAIR	
Pistazien	NINDPSRADVYNPR	LPILRFLQLSVE	SIYYITR	IVSENGESVFDEE	GLAKISQLAGRISVMR	
Paranuss	NIDNPAEADFYNPR	VPILTFLQLSAM	ISVVYAVR	IVDHRGETVFDN	DNALFSTAAGRTSPLR	
Mandel	NIGNPERADIFSPR	LPILRFLRLSAE	SVVYVIR	VVNENGDAILDQE	ENAFINTLAGRTSFLR	
Cashewnuss	NINDPARADIYTPQ	LPILKWLQLSVE	SIYYGCK	VVDNFGNRVFDGE	DRAMTSPLAGRTSVLG	
Haselnuss	NIGSRADIIYTEQ	LPVLRWLQLSVE	SVVYAIR	VVDNNGNTVFDDE	DNAQISPLAGRTSAIR	
Pekannuss	NIGDPSRADIYTEE	LPILRWLQLSVE	SVVYALR	VVDNFGQTVFDDE	ENAMVSPLAGRTSAIR	
Walnuss	NIGDPSRADIYTEE	LPVLRWLQLSVE	SVVYALR	VVDNFGQTVFDDE	ENAMVSPLAGRTSAIR	
	* : .	* * : : * :	. : .	* : * :	* * :	
	12	13				
Chiasamen	PIQVLTNAYQFSPAQQLK	EEQTFLLSPPQR				
Buchweizen	PIPVLSNSYQISPRAAAYELK	SHEHGLFSPFG				
Senf	PLEVITNAFQISLEEARKIK	LE-TTLTRARG				
Sojabohne	PEEVIQHTFNLKSQQARQIK	PF-KFLVPPQE				
Erdnuss	PEEVVANSYRLPREQARQLK	PF-KFFVPPFD				
Sesam	PEEVVMTAYQVSRDEARRLK	EE-SRVFSSTS				
Pistazien	PLDVIONSFDISREDAWNLK	SE-MTIFAPGS				
Paranuss	PVGVLANAYRLSQEEARRIK	DE-AVLFQPGS				
Mandel	PDEVLANAYQISREQARQLK	QE-TIALSSSQ				
Cashewnuss	PEEVLANAFQISREDARKIK	QQ-TTLTSGES				
Haselnuss	PDDVLANAFQISREEARRLK	QE-TTLARSSR				
Pekannuss	PEEVLVNAFQIPREDARRLK	QE-STLVRSSR				
Walnuss	PEEVLATAFQIPREDARRLK	QE-STLVRSRP				
	* * : : .	* * :				

Abbildung 38: Alignment der als Peptidsequenzen aus Chiasamen-Legumin mit bereits bekannten Allergenen, Chiasamenpeptide sind lila markiert. Identische Aminosäuren mit Chiasamen-Sequenzen sind gelb markiert. In Schriftfarbe „rot“ sind veröffentlichte Epitope aus der Epitop-Datenbank IEDB. In Schriftfarbe „blau“ sind prognostizierte Epitope mittels KTAS

Auch hier wurden die Verwandtschaftsverhältnisse der untersuchten Spezies basierend auf der Proteinsequenz geprüft. In Abbildung 39 ist der phylogenetische Baum für allergene Legumine aus 13 Spezies dargestellt.

Phylogenetischer Baum (Legumine)

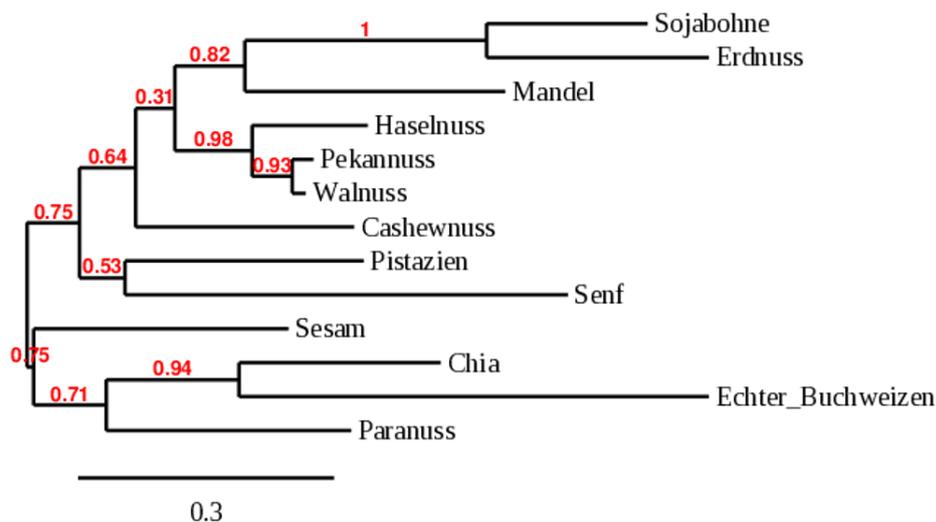


Abbildung 39: Phylogenetischer Baum der Legumine aus Chiasamen und bereits bekannten Allergenen generiert durch das Tool Phylogeny (<http://www.phylogeny.fr>). Die Proteinsequenzen wurden der Datenbank NCBI entnommen

Insgesamt wurden zwei große Kladen im phylogenetischen Baum dargestellt. Hierbei kann die Zuverlässigkeit der Verzweigung als gut bewertet werden, da der Bootstrap-Wert (BV) überwiegend über 70 % lag. (auf Abbildung 39 in rot geschrieben)

In der ersten Klade waren Chia, Buchweizen, Paranuss und Sesam zusammen gebündelt, wobei Chia, Buchweizen und Paranuss eine Untergruppe bilden. Chia und Buchweizen laufen in einen gemeinsamen Unterknoten, wobei Sesam näher zu Chia und zu Paranuss ist als zu Buchweizen. Die zweite Klade besteht aus dem Rest der Spezies, wobei Cashewnuss mit Chia am nächsten verwandt ist. Folgend kommen Walnuss, Pekannuss und Haselnuss, welche in einen Unterknoten zusammenlaufen. Hier ist Walnuss am nächsten zu Chia. Unter demselben Knoten befinden sich Pistazien, Senf, Mandel, Sojabohne und Erdnuss, wobei Pistazien und Senf bzw. Mandel, Sojabohne und Erdnuss jeweils in einen Unterknoten zusammenlaufen. Hier ist Pistazie am stärksten mit Chia verwandt. Die am weitesten von Chia entfernten sind Mandel, Sojabohne und Erdnuss, wobei die letzten zwei in einem weiteren Unterknoten umfasst werden.

Generell konnte aus diesen Ergebnissen geschlussfolgert werden, dass sowohl Vicilin-Peptide als auch Legumin-Peptide aus Chiasamen eine hohe SÜ bzw. SÄ zu linearen Epitopen in verschiedenen bekannten Allergensequenzen aufweisen konnten. Die höchste Verwandtschaft konnte sowohl unter Vicilinen als auch Leguminen zwischen Chia und Sesam nachgewiesen werden, obwohl die beiden Spezies aus unterschiedlichen Familien stammen, welche sich jedoch in der gleichen Pflanzenordnung „Lamiales“ befinden. Die Abstammung von unterschiedlichen Familien schließt eine Kreuzreaktivität zwischen beiden Spezies nicht

aus. Beispielsweise ist die Kreuzreaktivität zwischen Haselnuss und Mandel sowie Erdnuss und Baumnüssen in der Literatur bereits beschrieben worden (de Leon et al., 2003; Gillespie et al., 1976; Maloney et al., 2008). In diesem Abschnitt konnte eine SÜ der Chiasamenpeptide zu Proteinen sogar aus 10 verschiedenen Pflanzenordnungen wie Fables, Ericales, Poales und Rosales gezeigt werden. Das bedeutet, dass sich die Proteinstruktur von Legumin und Vicilin über die Evolution kaum verändert hat. Dies erklärt in bestimmten Fällen allergische Kreuzreaktionen, wenn eine hohe SÜ in Epitop-Bereichen auftritt. Smeekens et al. (2018) haben einen umfassenden Sequenzvergleich unter Leguminen, Vicilinen und 2S-Albuminen aus 16 verschiedenen Spezies abgesehen von ihrem allergenen Potenzial durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, wie hochkonserviert manche allergenen Proteine über mehrere Pflanzenspezies sind. Der Grund, weshalb diese Proteine bei Abstammung von bestimmten Spezies eine allergische Reaktion im menschlichen Körper auslösen, ist bisher unklar. Eine Vermutung für dieses Phänomen ist die Abwesenheit der linearen bzw. konformationalen Epitope in nicht allergieauslösenden Spezies, welche für eine Sensibilisierung beim Verzehr dieser Proteine verantwortlich sind. Hierbei muss zwischen Kreuzsensibilisierung und Kreuzreaktion unterschieden werden. Eine allergische Kreuzreaktion tritt auf, wenn der Patient allergische Symptome beim Verzehr eines verwandten Lebensmittels zeigt. Das heißt, seine spezifischen IgEs kreuzreagieren mit Proteinen des verwandten Lebensmittels. Hingegen sind allergische Symptome bei einer Kreuzsensibilisierung nicht erforderlich, sondern es reichen IgE-Bindung bzw. positiver Prick-Test aus (Smeekens et al., 2018). In dieser Arbeit konnte ausschließlich eine Kreuzsensibilisierung mit Hilfe der IgE-Bindung der Globuline in Chiasamen bestätigt werden, was in der Literatur neben einem Prick-Test sehr üblich ist (Blankestijn et al., 2017; van der Valk et al., 2017). Allerdings reicht dies für das Auslösen einer Kreuzallergie nicht aus (Kazatsky und Wood, 2016). Beispielsweise waren 49 von 83 Patienten mit Nussallergie gegen Mandel sensibilisiert (Prick-Test) aber eine allergische Reaktion hat nur ein einziger Patient gezeigt (Elizur et al., 2018). Ein Grund für diese Diskrepanz zwischen Kreuzsensibilisierung und Kreuzreaktion ist, dass nicht alle IgEs zwangsläufig eine Allergie auslösen. Eine Kreuzallergie setzt eine besondere Epitopstruktur an der Allergenoberfläche voraus, wodurch eine Quervernetzung zwischen IgE und seinem hochaffinem Rezeptor $Fc\epsilon R1$ möglich sei (Zhuang und Dreskin, 2013). Daher führen manche Viciline oder Legumine zu keiner Allergie, wenn sie auch diesen Rezeptor nicht binden können. Eine weitere Ursache für eine positive IgE-Bindung ohne allergische Reaktion sind die kreuzreaktiven Kohlenhydratdeterminanten (CDDs), welche Bindungsstellen für spezifische IgEs unabhängig von Peptid-Epitopen besitzen (Smeekens et al., 2018). Dies konnte in dieser Arbeit durch die Ergebnisse im Abschnitt 4.4.1. ausgeschlossen werden. Ob eine Kreuzallergie zwischen Chiasamen und Sesam möglich ist, bleibt noch offen. Jedoch ist zu vermuten, dass die Gefahr

bei Patienten mit Kreuzallergien für Speicherproteine aus verschiedenen Spezies hoch sein könnte. Diese Aussage konnte die Studie von Stutius et al. (2010) untermauern, die zeigen konnte, dass kein signifikanter Zusammenhang zwischen Allergien bei Kindern gegen Erdnuss bzw. Baumnüsse und einer erhöhten Wahrscheinlichkeit zur Sesamallergie besteht. Jedoch haben Kinder mit Allergien gegen sowohl Erdnuss als auch Baumnüsse ein erhöhtes Risiko für eine Sesamallergie. Das bedeutet, Patienten mit dem Hintergrund einer Kreuzreaktivität haben ein erhöhtes Risiko für eine weitere Kreuzreaktivität unter Speicherproteinen. In diesem Fall können spezifische IgEs die Epitope unterschiedlicher Allergene aufgrund einer hohen Sequenzübereinstimmung bzw. einer strukturellen Ähnlichkeit nicht mehr voneinander unterscheiden (Dziuba et al., 2014). In der Literatur sind die Aussagen über die Ursache einer Kreuzreaktivität umstritten. Willison et al. (2008) begründete auf der einen Seite die Kreuzreaktivität zwischen Cashewnuss und Pistazie mit der hohen Sequenzhomologie (80 %) in Epitop-Bereichen und stellte dies als Prädiktor für die Kreuzreaktivität dar. Auf der anderen Seite wurde die Kreuzreaktivität bei einer niedrigen Sequenzhomologie zwischen Erdnuss und Baumnüssen (z.B. 40 % zwischen Ara h1 und Jur g1) durch strukturelle Homologie der Epitope an der Oberfläche des Allergens erklärt (Barre et al., 2007; Barre et al., 2008). Eine Untersuchung der konformationellen Epitope auf Globulinen aus Chiasamen und deren Einflusses auf die Kreuzreaktivität konnten in dieser Arbeit aufgrund des Fehlens der vollständigen Proteinsequenzen aus Chiasamen nicht erfolgen. Für diesen Zweck wird die vollständige Proteinsequenz der Zielproteine in Chiasamen benötigt, um eine genaue Strukturklärung auf sekundärer und tertiärer Ebene zu ermöglichen und verlässliche Ergebnisse der Orthologie zu generieren. Im nächsten Abschnitt sollten die Gensequenzen der Chiasamen-Globuline (Vicilin und Legumin) durch PCR ermittelt werden.

4.4.5. Amplifizierung der DNA-Sequenzen IgE-bindender Proteine durch Primer-Design in sequenzierten Peptidbereichen

Nach Sequenzierung der mittels UHPLC-ESI-MS/MS erhaltenen Chiasamenpeptide wurde anhand ähnlicher Sequenzstellen überprüft, inwieweit die Peptidsequenzen als Primer dienen können. Diese werden bei einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt, um mehr Informationen über die DNA-Sequenzen des Vicilin-ähnlichen Proteins und des Legumin-ähnlichen Proteins aus Chiasamen herausfinden zu können. Dafür wurde im Rahmen dieser Arbeit die These aufgestellt, dass in den zu Chiasamen-Sequenzen ähnlichen Sequenzbereichen bekannter Allergene (über 80 %) geeignete Primer entworfen werden können. Diese Primer würden an die Chiasamen-DNA andocken (*Annealing*). Mit Hilfe einer PCR und Zugabe von dNTPs können Sequenzabschnitte (Zielsequenzen) aus den Genbereichen auf der DNA amplifiziert werden, welche für die Translation in die IgE bzw. IgG-bindenden Proteine während der Biosynthese verantwortlich sind. Somit können mehr relevante Informationen über die ursprüngliche Proteinstruktur und lineare bzw. konformationelle Epitope gewonnen werden.

Die Isolierung des DNA-Templats aus Chiasamen wurde über das *DNeasy Plant Pro Kit* (QIAGEN, USA) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt (siehe Anhang unter 9.1.21.2.). Als Referenz wurde die DNA aus Sesam isoliert, um das *Annealing* der verwendeten Primer zu überprüfen. Hierbei lagen die DNA-Konzentrationen nach Elution zwischen 25-90 ng/ μ l.

Die Auswahl der Primer beschränkte sich auf die *De Novo* sequenzierten Chiasamenpeptide stammend aus Proteinspots, welche mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt und immunologisch detektiert wurden. Diese Peptide wurden mittels MS-Analyse häufig erfasst (siehe Abschnitt 4.3.4). Nur Sequenzbereiche, welche eine SÜ mit Chiasamenpeptiden von über 65 % aufwiesen, wurden zum Entwurf der Primer herangezogen. Außerdem wurden für diesen Zweck nicht nur Sequenzen potenziell allergieauslösender Globuline sondern auch Globuline aus Spezies wie z.B. gelbe Gauklerblume und Prilla in Betracht gezogen, da diese aus derselben Familie der Chiasamen (*Lamiaceae*) stammen. Für jede Spezies wurde ausschließlich eine Sequenz zum Entwurf der Primer herangezogen. Eine Ausnahme stellen Sesam und gelbe Gauklerblume mit jeweils zwei Sequenzen dar.

In Tabelle 15 sind die für den Primer-Entwurf ausgewählten Peptidsequenzen aus verschiedenen Spezies und den dazugehörigen Chiasamenpeptiden aufgeführt. Unterschiedliche Aminosäuren sind in Chiasamen-Sequenzen rot markiert.

Tabelle 15: Spezies und die entsprechenden Sequenzabschnitte, welche für den Primer-Entwurf ausgewählt wurden, sowie die Sequenzabschnitte der Chiasamenpeptide

Name	Spezies	Sequenz-ID	Peptide mit SÜ über 65 %	Chiasamenpeptide
Erdnuss	<i>Arachis hypogaea</i>	Q647H2.1	A D I Y N P	A D L Y N P
			N N N P F T	N N E Q F T
Gelbe Gauklerblume	<i>Erythranthe guttata</i>	XP_012854379.1	N A Y N N E K F	N A Y N N E K F
			Q K E E F F F K G	Q K E E F F F E G
			N P Y V F E E R	N P Y V F E D R
			Q K E E F F F K G	Q K E E F F F E G
		XP_012831308.1	A A Q P T Q R	A Q Q P T L R
			T I V Y V T K	T V V Y V T K
Sesam	<i>Sesamum indicum</i>	XP_011083024.1	Q Q G Q C	Q Q G E C
			F L A G N P	F L A G N P
		Q9XHP0.1	V D H N G Q	V D H S G Q
			Q V I T N S Y Q	Q V L T N A Y Q
			Y H P S P R	Y H P N P R
			L A G Y T S V	M A G Y T S A
			Q S F L L S P	Q T F L L S P
Perilla	<i>Perilla frutescens</i>	AAF19607.1	F Q C A G V	F Q C A G V
			Y L A G G V P	Y L A G S A P
Haselnuss	<i>Corylus avellana</i>	AAL73404.1	F Y L A G	F Y L A G
			Q Q F Q C A	Q Q F E C A
			R T S A I R	Y T S A L R
Raps	<i>Brassica napus</i>	CAA32692.1	E C Q L D Q L N A	Q C Q L Q Q L S A
			Y L A G N N P Q	Y L A G S Q P O
Tabak	<i>Nicotiana tabacum</i>	XP_016455279.1	F Q C A G V	F Q C A G V
			Y L A G G V P E	Y L A G S A P Q
			V D H S G Q Q V	V N H S G Q E H

Bei Proteinsequenzen, welche eine hohe SÜ mit mehreren Chiasamenpeptiden wie Sequenzen aus Sesam, Haselnuss, Prilla und gelbe Gauklerblume zeigten, wurden mehr als ein Primer-Paar entworfen, um die Chance einer Amplifikation während der PCR zu erhöhen. Beispielsweise wurden bei Haselnuss zwei Vorwärtsprimer und bei Tabak zwei Rückwärtsprimer entworfen.

Um den Entwurf der Primer zu erleichtern, wurden die DNA-Sequenzen der gewählten Speicherproteine der NCBI-Datenbank entnommen und mittels des Tools „Expasy-Translate“ auf <https://web.expasy.org/translate/> entsprechend in Aminosäuren übersetzt. Das Template wurde anschließend kopiert und die ähnlichen Chiasamenpeptide wurden darin als Alignment integriert, welche lila markiert sind. Proteinsequenzen aus anderen Spezies sind gelb markiert. Verwendete Primer sind im Alignment hellblau markiert, wobei der Rückwärts-Primer in roter

Tabelle 16: Entworfenene Primer zur Amplifikation von DNA-Sequenzbereiche in der Chiasamen-DNA mittels PCR sowie die entsprechenden Annealing-Temperaturen

PCR-Ansatz	Fw-Primer	Rev-Primer	Annealing-Temperatur °C
Ara	ArahFw	AraRev	45,5
ErV	EryVicFw1	EryVicRev1	54,3
ErG	EryGloFw	EryGloRev	54
SeLg	SesLegFw	SesLegRev	58
SeG1	SesGloFw1	SesGloRev1	49,7
SeG2	SesGloFw2	SesGloRev2	52
SeG3	SesGloFw2	SesGloRev3	54
Pri	PriLegFw	PriLegRev	52
Cor1	CorGloFw1	CorGloRev	52
Cor2	CorGloFw2	CorGloRev	52
Bra	BraCruFw	BraCruRev	52
Nic1	NicGloFw	NicGloRev1	52
Nic2	NicGloFw	NicGloRev2	52

Auf der Abbildung 41 ist zu erkennen, dass von 13 PCR-Ansätzen nur vier spezifische Amplifikationsprodukte beobachtet werden konnten (ErV, SeG3, ErG, Bra). Bei manchen PCR-Ansätzen wie „Pri“ und „SeG1“ konnten unspezifische Amplifikationsprodukte nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Fokus nur auf Primer und PCR-Amplifikate gelegt, welche eine deutlich spezifische Bande in dem zu erwartenden Basenbereich aufwiesen.

Bei stark nachgewiesenen Banden wie „ErV“ und „SeG3“ wurde der PCR-Ansatz ausschließlich mittels präparativer Gelelektrophorese mit anschließender Aufreinigung durch „PeQ Gold Gel Extraktion Kit“ (siehe Anhang unter 9.1.21.3.) isoliert. Hierfür wurden ein größerer PCR-Ansatz (100 µl) und eine Kontrollprobe vorbereitet. Spezifische Banden wurden aus dem Elektrophorese-Gel unter UV-Licht rausgeschnitten und mittels des obengenannten Kits extrahiert. Bei zu niedriger DNA-Konzentration wird eine sogenannte Doppel-PCR durchgeführt. Hierbei werden das nach präparativer Gelelektrophorese aufgereinigte DNA-Eluat als Matrize sowie die gleichen Primer für eine weitere PCR eingesetzt.

Bei spezifisch amplifizierten aber schwach detektierten PCR-Produkten wie ErG und Bra wurde eine Doppel-PCR durchgeführt, ohne die Gelbande präparativ zu isolieren und aufzureinigen. Dabei wurde der PCR-Ansatz direkt nach der PCR mit dem Kit aufgereinigt (siehe Anhang unter 9.1.21.4.) und das entstehende Eluat als Matrize für eine weitere PCR eingesetzt.

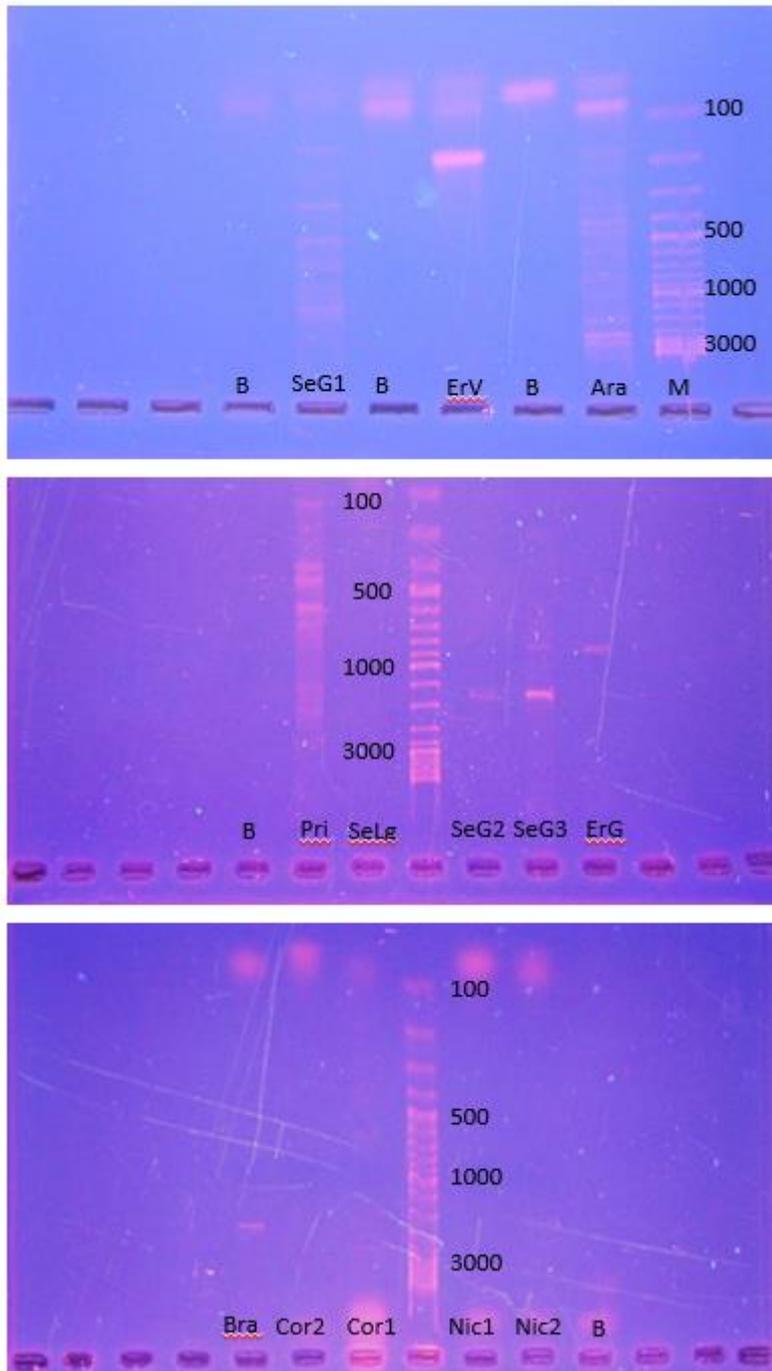


Abbildung 41: Gelelektrophoretische Trennung der PCR-Ansätze mit Chiasamen-DNA als PCR-Matrize, M: Marker, B: Blank ohne Chiasamen-DNA, PCR-Ansätze: Ara (Primer aus Arachin Ahy-3 in der Erdnuss), ErV (Primer aus Vicilin in gelber Gauklerblume), ErG (Primer aus Legumin in gelber Gauklerblume), SeLg (Primer aus Legumin im Sesam), SeG1, SeG2, SeG3 (Primer aus 11 Globulin im Sesam), Pri (Primer aus Legumin in Perilla), Bra (Primer aus Cruciferin in Raps), Nic1 und Nic2 (Primer aus 11 Globulin in Virginischem Tabak)

Das Gerät Nanodrop wurde zur Ermittlung der DNA-Konzentration eingesetzt. Lag die DNA-Konzentration des Gelextrakts über 14 ng/µl, wurde der Gelextrakt mittels Sanger-Sequenzierung sequenziert. Das Chromatogramm der Konzentrationsmessung mittels Nanodrop sowie das entsprechende Ergebnis sind in Abbildung 42 dargestellt.

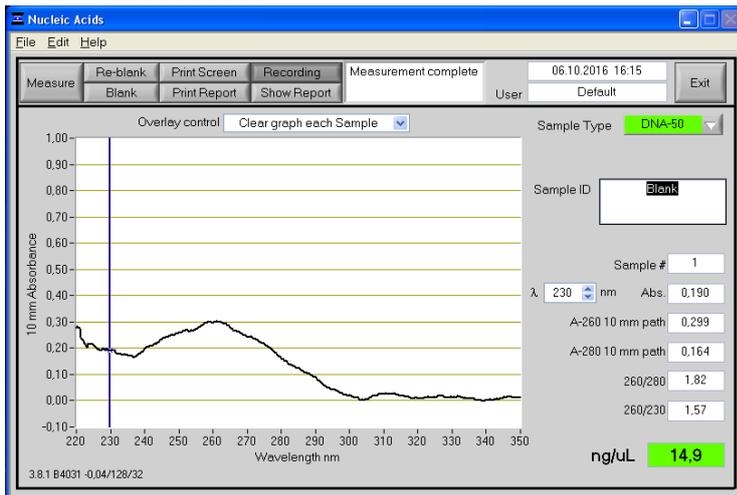


Abbildung 42: Messung der DNA-Konzentration mittels Nanodrop

Die Sequenzierung wurde bei der Firma GATC Biotech vorgenommen. Nach Erhalt der Sequenzen wurde mittels der Datei „abi“ im Programm GENTle zur Datenqualifizierung weitergearbeitet. Hierbei wurden nur Nukleotide in der Sequenz betrachtet, die deutliche Peaks und keinen Rausch im Chromatogramm zeigen.

Tabelle 17: PCR-Ansätze, welche Zielbanden aufwiesen und sequenziert werden konnten

PCR-Ansatz	Erwartete Sequenz (bp)	DNA-Konzentration Erste Reinigung (ng/µl)	Amplifikate nach PCRxPCR (bp)	Konzentration nach PCRxPCR (ng/µl)	Sequenz-Name
ErV	200 bp	14,9	-	-	SeqCh1
ErG	900 bp	5,2	900	80 ng/µl (900 bp)	SeqCh2
Bra	1250 bp	2,2	400 und 1250	43 ng/µl (400 bp) 27 ng/µl (1250 bp)	SeqCh3
SeG2	1150 bp	6,1	350 und 1150	20,9 ng/µl (400 bp) 32 ng/µl (1150 bp)	SeqCh4 SeqCh5
SeG3	1150 bp	3,0	Viele unspezifische Banden	-	NA

In der Tabelle 17 sind alle PCR-Ansätze dargestellt, durch die die DNA-Zielbande im erwarteten Basenbereich amplifiziert werden konnte. Die erhaltenen DNA-Sequenzen SeqCh 1-5 sind der Tabelle 43 im Anhang unter 9.2.7.2. zu entnehmen.

Um die mittels PCR erhaltenen Chiasamen-Sequenzen verifizieren zu können, wurde die Methode *nested-PCR* angewandt. Hierbei wurde die DNA-Sequenz des PCR-Produktes aus der ersten Amplifikation benutzt, um ein neues Primerpaar zu entwerfen. Das neue Primerpaar

(*nested primer*), welches an Sequenzbereiche innerhalb des ursprünglichen PCR-Produkts bindet, amplifiziert ein kürzeres DNA-Fragment. Als Matritze für die PCR wird die Chiasamen-DNA eingesetzt.

Zum Primer-Design wurde das Tool „Primer Blast“ verwendet, wobei die Standard-Parameter mit Ausnahme der Mindestlänge des PCR-Produkts (120 statt 70) und der Mindestschmelztemperatur (50 °C statt 57 °C) übernommen wurden. Die PCR-Ansätze wurden wie oben beschrieben vorbereitet. Die Sequenzierung wurde ebenfalls bei der Firma GATC Biotech durchgeführt.

In Tabelle 43 im Anhang unter 9.2.7.2. sind auch die Sequenzen der PCR-Amplifikate nach *nested-PCR* dargestellt. Die neuen Primer sind in ursprünglichen Sequenzen fett und gelb markiert und die identischen Sequenzbereiche sind in den erhaltenen Sequenzen unterstrichen und grün markiert.

Wie in Tabelle 18 ersichtlich ist, konnten die ursprünglich erhaltenen Sequenzen aus Chiasamen-DNA, sehr spezifisch wieder exprimiert werden. Die Sequenzdeckung der PCR-Amplifikate lag logischerweise deutlich unter 100 %, da nicht das gesamte DNA-Produkt wieder amplifiziert wurde, sondern nur ein Teil davon. Jedoch lag die SÜ zwischen ursprünglichen und mittels der *nested-PCR* erhaltenen Sequenzen immer über 99,31 %. Dies bestätigt die Richtigkeit dieser Sequenzen und die Zugehörigkeit zur isolierten Chiasamen-DNA.

Tabelle 18: Untersuchung der Sequenzabdeckung und –übereinstimmung der durch *nested-PCR* erhaltenen Amplifikate mit den ursprünglichen PCR-Sequenzen

Sequenz	Sequenzdeckung (%)	Übereinstimmung (%)
SeqCh1	62	100
SeqCh2	94	100
SeqCh3	89	99,5
SeqCh4	87	91,6
SeqCh5	87	99,31

Der PCR-Ansatz ErV zeigte eine deutliche Bande bei ca. 180 bp, welche der Größe der ursprünglichen DNA-Sequenz entspricht (Abbildung 43). Ein PCR-Ansatz von 100 µl wurde in ein Agarosegel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (Abbildung 43, Teil 1). Die entsprechende Bande wurde anschließend rausgeschnitten und zur Sequenzierung geschickt (Abbildung 43, Teil 2). Die DNA-Konzentration lag bei 14,9 ng/µl (siehe Abbildung 42). Eine Kontrollprobe wurde auch mit aufgetragen. Nach der Sequenzierung konnte diesem PCR-Amplifikat eine Sequenzlänge von 155 bp zugeordnet werden. Diese

wurde mittels des Programms ExPASy zu einer 51-Aminosäuresequenz vollständig übersetzt (siehe Abbildung 69 im Anhang unter 9.2.7.2.).

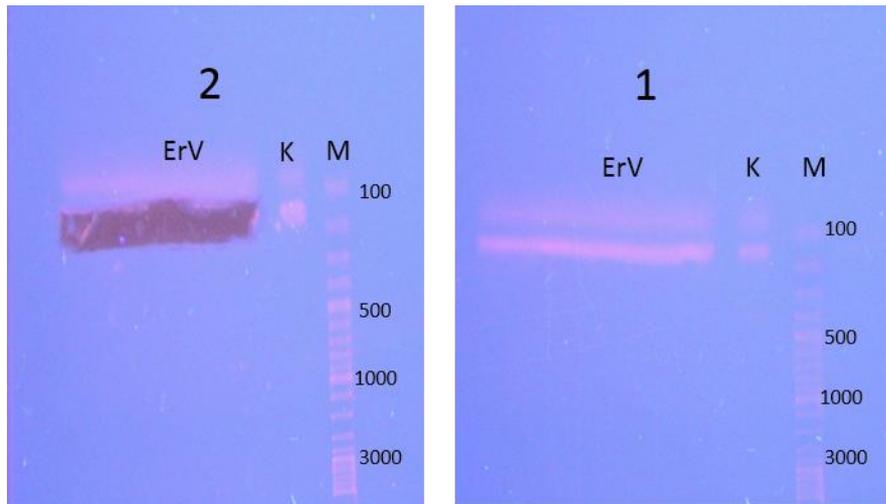


Abbildung 43: präparative Gelelektrophorese des PCR-Produkts ErV, M:Marker, K: Kontrolle, ErV: PCR-Produkt

Dieses Ergebnis zeigte, dass die entworfenen Primer an die Chiasamen-DNA andocken und das Chiasamen-Vicilin codierende Amplifikat teilweise amplifiziert werden konnte. Die Methode ist in der Literatur beschrieben und wurde zur Aufklärung der Allergensequenz von Rub i 1 aus der Himbeere (*Rubus idaeus L.*) angewandt. Hierbei wurde das codierende Gen mit isolierter DNA aus der Himbeere und Primerpaaren amplifiziert, welche auf Basis ähnlicher Allergensequenzen (Mal d 1 und Mal d 3) entworfen wurden. Die Sequenz konnte sogar eine hohe SÄ bis zu 80 % zu Allergenen der gleichen Familie (*Rosaceae*) aufweisen (Marzban et al., 2008).

Die erhaltene Chiasamen-Sequenz stellte der C-Terminus des Vicilins aus Chiasamen dar. Diese wurde mittels der FARRP-Allergendatenbank mit Proteinsequenzen bekannter Allergene verglichen. Die Vicilin-Sequenz aus Chiasamen zeigte eine Übereinstimmung von 30-86 % und eine Ähnlichkeit von 70-95 % zu 45 bekannten Allergensequenzen aus Nüssen und Samen. Die höchste Übereinstimmung zeigen putativ 7S-Globulin gi|13183177| aus Sesam (*Sesamum indicum*) mit 86 % und Vicilin (*sucrose-binding protein-like*) aus echter Walnuss (*Juglans regia*) mit 63 %.

Um relevante Epitop-Bereiche in der Vicilin-Sequenz aus Chiasamen bestimmen zu können, wurden die ähnlichsten Allergensequenzen ausgewählt und mit Chiasamen-Sequenz verglichen (Abbildung 44). Epitope sind entweder rot (aus der Epitop-Datenbank IEDB) bzw. blau markiert (Prognose der Methode KTAS).

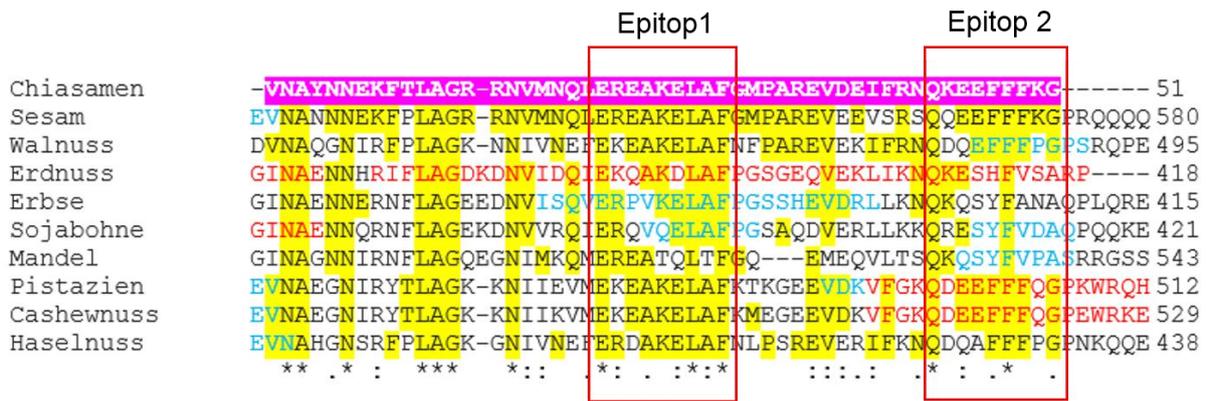


Abbildung 44: Alignment der erhaltenen Chiasamen-Sequenz mit Sequenzen bekannter Allergene (Viciline) und die Lokalisierung möglicher Epitope. Chiasamen-Sequenz ist lila markiert. Identische Aminosäuren sind gelb markiert. Epitope aus der Epitop-Datenbank IEDB sind rot markiert, die mittels Methode KTAS prognostizierte Epitope sind in blau markiert

Während Viciline aus Sesam und Haselnuss keine Epitope im Alignment aufwiesen, konnten putative Epitope in Vicilin-Sequenzen aus Erdnuss, Erbse und Sojabohne, welche eine hohe SÄ zur Chiasamen-Sequenz „EREAKELAF“ (Epitop 1) zeigten, identifiziert werden. Des Weiteren zeigt die Peptidsequenz „QKEEFFFKG“ (Epitop 2) in Chiasamen-Sequenz ein hohes Potenzial, putative Epitope zu tragen, da dieser Sequenzabschnitt bei Walnuss, Erdnuss, Sojabohne, Mandel, Pistazien und Cashewnuss relevante Epitope trägt.

Um einen größeren Teil der Vicilin-Sequenz amplifizieren zu lassen, wurde ein neues Primerpaar für ein größeres PCR-Produkt entworfen. Allerdings konnte durch die PCR mit Chiasamen-DNA kein entsprechendes PCR-Produkt amplifiziert werden. Aufgrund der fehlenden Chiasamen-Sequenzen in der NCBI-Datenbank und des *De Novo* sequenzierten Chiasamenpeptiden basierten Primer-Entwurfs war die Auswahl der Primer im Rahmen dieser Arbeit äußerst limitiert.

Eine weitere DNA-Sequenz (SeqCh2) konnte aus dem PCR-Ansatz ErG sequenziert werden (Tabelle 43 im Anhang unter 9.2.7.2). Die Sequenzlänge betrug ca. 900 bp und zeigte keine Ähnlichkeit zur ursprünglichen Sequenz des 11-Globulins aus der gelben Gauklerblume (*Erythranthe guttatus*). Hierbei handelt es sich um falsche Hybridisierung (engl. *Anealing*) der entworfenen Primer an die DNA-Vorlage aus Chiasamen. Nach Übersetzung zu Aminosäuren anhand des Tools „ExPasy-Translate“ wurde eine Proteinsequenz in Länge von 25 Aminosäuren ermittelt. Nach dem Vergleich mit Sequenzen bekannter Allergene in FARRP-Allergendatenbank wurde festgestellt, dass die Peptidsequenz eine Übereinstimmung von 57,1 % und Ähnlichkeit von 71,4 % zu einem Gräserpollenallergen (*S13 grass pollen allergen*) aus Bahiagrass (*Paspalum notatum*, gi|338930674) zeigt. Dieses Allergen ist weit verbreitet, hat ein Molekulargewicht von 55 kDa und ist zuständig für saisonale allergische Reaktion bei Patienten mit Gräserpollenallergie (Davies et al., 2011). Allerdings zeigt diese Proteinsequenz im Programm NCBI-BLAST keine Ähnlichkeiten zu allergieauslösenden Globulinen in Samen.

Jedoch könnte diese SÄ zu dem oben genannten Gräserpollenallergen eine Antwort auf die Beobachtung von Jimenez et al. (2015) sein. Die Studie beschrieb, dass ein 54-jähriger Mann mit einer Gräserpollenallergie nach dem Verzehr von Chiasamen starke allergische Symptome wie Juckreiz im Mund, Urtikaria, ein Angioödem im Gesicht, Atemnot und Schwindel gezeigt hat. Der Prick-Test mit Chiasamen war zwar positiv aber das Humanserum enthielt keine spezifischen IgEs gegen allergene 11S-Globuline Ara h 3, Cor a 9 bzw. Gly m 6. Das Humanserum wurde außerdem auf spezifische IgEs gegen Ses i 6 bzw. Ses i 7 aus Sesam (*Sesamum indicum*) getestet. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Sequenzvergleich zwischen Ses i 6 bzw. Ses i 7 einerseits und dem Grasallergen aus Bahiagrass andererseits durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten keine signifikante Übereinstimmung bzw. Ähnlichkeit. Abschließend kann von einem neuen Protein ausgegangen werden, welches eine hohe SÄ mit Gräserpollenallergenen hat und allergische Reaktion bei Patienten mit Gräserpollenallergie auslösen könnte.

Der PCR-Ansatz Bra zeigte zwei schwache Amplifikationsprodukte bei 400 bp und bei 800 bp und eine starke Bande bei 1250 bp. Da die DNA-Zielbande bei 1250 bp (SeqCh3) lag, wurde nur diese Bande nach einem größeren PCR-Ansatz (100 µl) rausgeschnitten, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und das Eluat nach der Aufreinigung für eine weitere PCR (Doppel-PCR) eingesetzt. Hierbei wurden zwei starke Banden bei 400 und bei 1250 bp detektiert, welche präparativ rausgeschnitten und aufgereinigt wurden. Die DNA-Konzentration lag bei 43 ng/µl für die 400 bp-Bande und 27 ng/µl für die 1250 bp-Bande. Die Sequenzierung der Bande bei 1250 bp war nicht erfolgreich. Jedoch wurde mit der Sequenzierung der 400 bp-Bande eine Sequenz von 297 bp ermittelt. Die DNA-Sequenz konnte mittels ExPasy zu Aminosäuren übersetzt werden. Allerdings wurden keine Ähnlichkeiten mit Sequenzen bekannter Allergene in der Allergendatenbank festgestellt. In der Datenbank NCBI konnte eine SÜ von 91 % mit dem hypothetischen Protein (engl. *hypothetical protein*) von Feuersalbei (*Salvia splendens*) bzw. 43 % mit einem nicht charakterisierten Protein aus Sesam (*Sesamum indicum*) festgestellt werden. Dies deutet auf eine hohe SÄ nicht nur unter Proteinen aus Chiasamen und anderen Pflanzen derselber Gattung *Salvia*, sondern auch zwischen Chiasamen und Sesam hin, was die Aussage in dieser Arbeit über SÄ unter Speicherproteinen in Samen und Nüssen untermauert. Allerdings erfüllt dieses Ergebnis nicht die Aufgabe dieser Methode, IgE-bindende Globulin-Sequenzen aus Chiasamen zu bestimmen. Dies liegt an der unspezifischen Hybridisierung der Primer an die DNA-Vorlage.

Zusätzlich wies der PCR-Ansatz SeG2 drei starke Banden bei 400, 800 und 1150 bp auf, wobei das Zielprodukt bei 1150 bp am stärksten detektiert wurde. Da die Konzentration zu gering war, folgte eine Doppel-PCR. Hierbei konnten zwei starke Banden bei 350 und 1150 bp beobachtet werden, deren DNA-Konzentration nach der Aufreinigung bei 20,9 und 32 ng/µl

lag. Nach Sequenzierung wies die 350 bp-Bande eine Sequenzlänge von 298 bp auf und konnte mittels ExPasy zu einer Proteinsequenz (88 Aminosäuren) übersetzt werden. Diese zeigte allerdings keine Ähnlichkeiten mit Sequenzen bekannter Allergene in der Allergendatenbank. Mittels der Suchmaschine NCBI-Blast konnte diese Proteinsequenz als hypothetisches Protein von Feuersalbei (*Salvia splendens*) mit einer Übereinstimmung von 72 % oder putative Nuklease von Raps (*Brassica raps*) mit einer Übereinstimmung von 61 % identifiziert werden.

Aus dem zweiten sequenzierten Amplifikationsprodukt aus der 1150 bp-Bande konnte mittels Sanger-Sequenzierung und dem Programm GENTle nur eine Sequenzlänge von 342 bp verifiziert werden, welche zu einer Proteinsequenz mit 112 Aminosäuren übersetzt wurde. Diese konnte in der NCBI-Datenbank als ABC-Transporter (engl. *ATP-Binding Cassete-Transporter*) aus Feuersalbei (*Salvia splendens*), Sesam (*Sesamum indicum*) und gelbe Gauklerblume (*Erythranthe guttata*) mit einer Übereinstimmung von jeweils 91 %, 80 % bzw. 78 % identifiziert werden. Es ist in der Literatur nicht bekannt, dass ABC-Transporter mit allergenen Globulinen in Zusammenhang stehen. ABC-Transporter sind für die Pflanzenentwicklung essentiell und spielen bei Prozessen wie Samenentwicklung, Organbildung und Samenkeimung eine zentrale Rolle (Do et al., 2018). Es wird vermutet, dass das Primerpaar sich unspezifisch an die Gen-Region eines ABC-Transporters gebunden hat und somit das entsprechende PCR-Produkt codiert hat.

Abschließend zeigt SeG3 eine starke Bande bei 1150 bp und mehrere schwächere Banden, wobei die DNA-Zielbande bei 1000 bp liegt. Diese wurde rausgeschnitten und als PCR-Matrize für eine weitere PCR (Doppel-PCR) eingesetzt. Hierbei wurde keine spezifische Bande aufgetrennt, weshalb dieser PCR-Ansatz nicht mehr verfolgt wurde.

Es lässt sich daraus schließen, dass diese Methode zur Bestimmung der für die Translation in die EBP bzw. GBPs verantwortlichen Gensequenzen, nur bedingt funktioniert. Der Grund dafür sind die fehlenden Chiasamen-Sequenzen in der NCBI-Datenbank, welche die Zielproteine codieren. Außerdem stellt die unspezifische Hybridisierung der entworfenen Primer an die DNA-Vorlage aus Chia eine besondere Herausforderung dar. Bei Betrachtung der Tabelle 15, wird deutlich, dass eine 100 %ige Übereinstimmung zwischen Peptidsequenzen aus Chiasamen und den Sequenzbereichen anderer Spezies, wo die Primer entworfen wurden, eine Seltenheit darstellt. Änderung einer Aminosäure in der Peptidsequenz bedeutet eine Anreihungsänderung von drei Neuklotiden in der Primer-Sequenz, wodurch die Primer-Hybridisierung beeinträchtigt wird. Im Rahmen dieser Arbeit war die Auswahl der Primer, welche nur an *De Novo* sequenzierten Chiasamenpeptiden orientiert war, limitiert. Um diese Problematik umgehen zu können, würde die Isolierung reifer mRNA aus reifen Chiasamen und die Durchführung reverser Transkription zur Erzeugung einer geeigneter cDNA-Bibliothek genauere Ergebnisse liefern. Aufgrund der reversen Transkription können Introns und

Promotoren sowie andere Genabschnitte ausgeschlossen werden, was eine bessere Hybridisierung der Primer ermöglichen kann. Diese Herangehensweise wurde von Marzban et al. (2008) angewandt, um die Allergene Rub i 1 und Rub i 3 sowie Klasse III Chitinase aus der Himbeere zu sequenzieren.

Darüber hinaus fehlt hier eine sogenannte EST-Datenbank (engl. *expressed sequence Tags data base*) für Chiasamen, wo kurze DNA-Sequenzen in einer Länge von 100-800 bp vorhanden sind. Diese Sequenzinformationen sind durch Sequenzierung von cDNA von deren 5'- oder 3'-Ende ausgehend gewonnen und stellen nur einen Sequenzabschnitt von Genen dar, die in der Expression der Zielproteine (in dem Fall EBPs bzw. GBPs in Chiasamen) involviert sind. Die ETS-Datenbank könnte zur Identifikation unbekannter Gene eingesetzt werden. So könnten die ETS-Sequenzen aus Chiasamen mit Sequenzen bekannter Allergene verglichen und somit identifiziert werden. Schließlich können Primer basierend auf ETS-Sequenzen entworfen werden und in einer cDNA-Bank (große Anzahl an cDNAs) zur Sequenzbestimmung mehrerer Isoformen der Zielproteine genutzt werden. Diese Methode wurde in der Literatur bereits zur Bestimmung weiterer DNA-Fragmente eingesetzt, welche für die Translation in 11S-Globuline und 2S-Albumine in Sesam verantwortlich sind (Hsiao et al., 2006).

5. Schlussfolgerung und Ausblick

Als Fazit lässt sich sagen, dass die Speicherproteine in Chiasamen (Viciline und Legumine) eine hohe Sequenzhomologie zu denen in anderen Samen und Nüssen aufweisen. Das bedeutet, dass Allergiker, insbesondere Sesamallergiker, bei denen eine Kreuzreaktivität unter Speicherproteinen nachzuweisen ist, durch den Verzehr von Chiasamen gefährdet sein könnten. Die Kreuzreaktivität unter Speicherproteinen ist nicht einfach auszuschließen, da sich die Proteinstruktur der Viciline (7S-Globuline) und der Legumine (11S-Globuline) über die Evolution kaum verändert hat.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die GBPs bzw. EBPs in Chiasamen anhand kommerzieller Antikörper und 38 Humansenen charakterisiert, die entweder unter Sesam- bzw. Haselnussallergie leiden. Es sollten künftig Patienten mit Chiaallergie gesucht werden, deren Blutseren zur Charakterisierung möglicher Allergene in Chiasamen herangezogen werden.

Außerdem sollten in-vitro-Verdauungsversuche durchgeführt werden, um die Stabilität der IgE- bzw. IgG-Bindung der Chiaallergene im Verdauungssystem zu überprüfen.

Zur Untermauerung der hier erbrachten Ergebnisse in Bezug auf Patientensensibilisierung, Chiaallergie sowie Kreuzreaktivität mit anderen Allergenen, sind weitere zuverlässige Methoden notwendig. Eine zuverlässige Methode könnte der sogenannte Basophilenaktivierungstest mit den isolierten Zielproteinen aus Chiasamen sein. Dabei wird *in vitro* die physikalische Situation der allergischen Reaktion Typ 1 stimuliert. Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden verschaffen erste Hinweise auf ein allergenes Potenzial der Chiasamenproteine.

Um mehr DNA-Sequenzinformationen von EBPs bzw. GBPs zu gewinnen, müsste eine sogenannte EST-Datenbank (engl. *expressed sequence Tags data base*) für Chiasamen durch die Sequenzierung von cDNA (RNA übersetzt zu DNA) produziert werden. Dadurch wird die Sequenzierung bestimmter Genbereiche, die explizit EBPs bzw. GBPs codieren, durch den Vergleich mit Sequenzen bekannter Allergene vereinfacht.

6. Material

6.1. Auswahl der zur Detektion verwendeten kommerziellen Antikörper und Humanseren

Aufgrund fehlender Daten zur Allergenität und Allergensequenzen aus Chiasamen werden auf dem Markt keine spezifischen Antikörper gegen das Chiasamenprotein angeboten. Es wird angenommen, dass Chiasamenproteine eine große Sequenzhomologie zu Speicherproteinen (Leguminen und Vicilinen) aus Sesam besitzen (siehe Abschnitt 0.). Basierend auf dieser Annahme werden in der vorliegenden Arbeit kommerzielle Antikörper gegen das Sesamprotein bzw. Blutseren von Sesamallergikern zur Detektion der EBPs bzw. GBPs aus Chiasamen herangezogen (siehe Tabelle 23 unter 9.1.4. und Tabelle 24 unter 9.1.5.1).

In Zusammenarbeit mit einem Hamburger Arzt wird fünf Patienten mit dem Hinweis auf eine Sensibilisierung gegen Sesam ca. 30 ml Blut abgenommen. Die beim Sesamverzehr beobachteten Symptome sind aus Tabelle 24 unter 9.1.5.1. zu entnehmen. Die Patienten werden über die Art der anstehenden Versuche aufgeklärt und sollen ihre Zustimmung erteilen. Die Humanseren werden nach der Blutabnahme gemäß Kapitel 4.2. gewonnen. Anschließend erfolgt die Bestimmung der EAST-Klassen mit dem Testkit „Spez. IgE ELISA TR (RV)“ nach Anweisung des Herstellers (Im Anhang unter 9.1.8.). Die Humanseren, die eine EAST-Klasse ≥ 2 aufweisen und Reaktionen im Immunoblot zeigen, werden zum Zusammensetzen eines Serumpools herangezogen. Dieses Serumpool dient in dieser Arbeit zur Bestätigung der IgE-Bindung der Chiasamenproteine, die bereits mit kommerziellen Antikörpern detektiert sind. Als Kontrollserum wird ein Serum eines Nichtsesamallergikers mit einer EAST-Klasse 0 verwendet (Tabelle 24 unter 9.1.5.1.).

Zur Verifizierung der detektierten Zielproteine werden Antikörper gegen bekannte Allergene anderer Spezies verwendet, die eine hohe Sequenzähnlichkeit zeigen (siehe Sequenzvergleich im Anhang unter Abschnitt 9.2.1.). Da Haselnussallergene eine große Sequenzähnlichkeit mit Sesamallergenen zeigen, werden ihre kommerziellen Antikörper zur Detektion der Allergene in Chiasamen verwendet. Die Antikörper sind aus Tabelle 23 im Anhang unter 9.1.4. zu entnehmen.

Außerdem werden im Rahmen dieser Arbeit 33 bereits in vorherigen Arbeiten charakterisierte Blutseren von Haselnussallergikern verwendet, die die Allergie-Abteilung im Hamburg School of Food Science (HSFS) - Institut für Lebensmittelchemie in Hamburg zur Verfügung stellt. Informationen zu diesen Humanseren sind in Tabelle 25 im Anhang unter 9.1.5.2. dargestellt.

Zwar zeigen Erdnussproteine eine Homologie zu Sesamproteinen von kleiner als 50 % auf, jedoch werden Antikörper gegen Erdnussprotein herangezogen, da deren Antikörper im HSFS bereits vorliegen (siehe Tabelle 23 im Anhang unter 9.1.4.).

6.2. Verwendete Primer

Für die PCR werden diverse Primer anhand der im Rahmen dieser Arbeit sequenzierten Peptide aus Chiasamen entworfen, um mehr Informationen über die Gensequenz der EBPs bzw. GBPs herauszufinden. Alle Primer werden bei Invitrogen™ (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) hergestellt. Im Anhang unter 9.1.22.5. sind Primersequenzen in Tabelle 26 zusammengefasst, welche anhand der Peptidsequenzen nach Detektion mit kommerziellen Sesam- und Haselnussantikörpern entworfen sind. Primersequenzen für die verschachtelte PCR sind aus Tabelle 28 im Anhang unter 9.1.22.7. zu entnehmen.

6.3. Nüsse, Sesam und Chiasamen

Chiasamen werden bei der Firma Naturya (Bath, Großbritannien) in 300 g- Packungen bestellt und eingesetzt. Haselnuss, Mandel, Erdnuss und Walnuss werden bei EDEKA von der Marke Gut&Günstig (Hamburg, Deutschland) gekauft, während die Sesamsamen aus dem Laden „Biozentrale“ (Hamburg, Deutschland) besorgt werden.

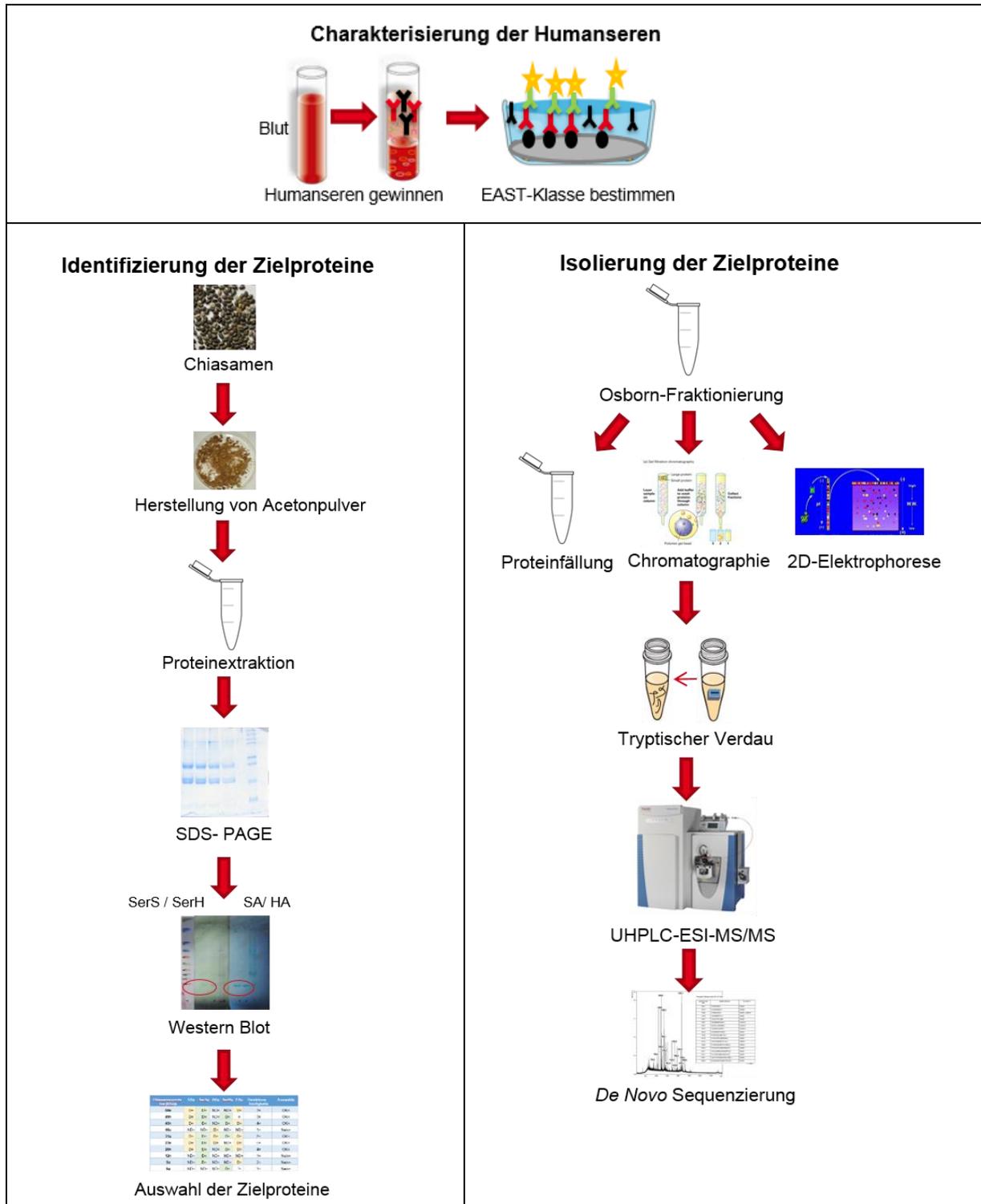
6.4. Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte sind im Anhang unter 9.1.1. (siehe Tabelle 20), 9.1.2. (siehe Tabelle 21) und 9.1.3. (siehe Tabelle 22) zusammengestellt.

7. Methoden

7.1. Methodenübersicht

Diese Arbeit hat das Ziel, IgE- bzw. IgG bindende Proteine (EBPs bzw. GBPs) der Chiasamen zu identifizieren, isolieren und charakterisieren. In Abbildung 45 sind die verwendeten Methoden dargestellt.



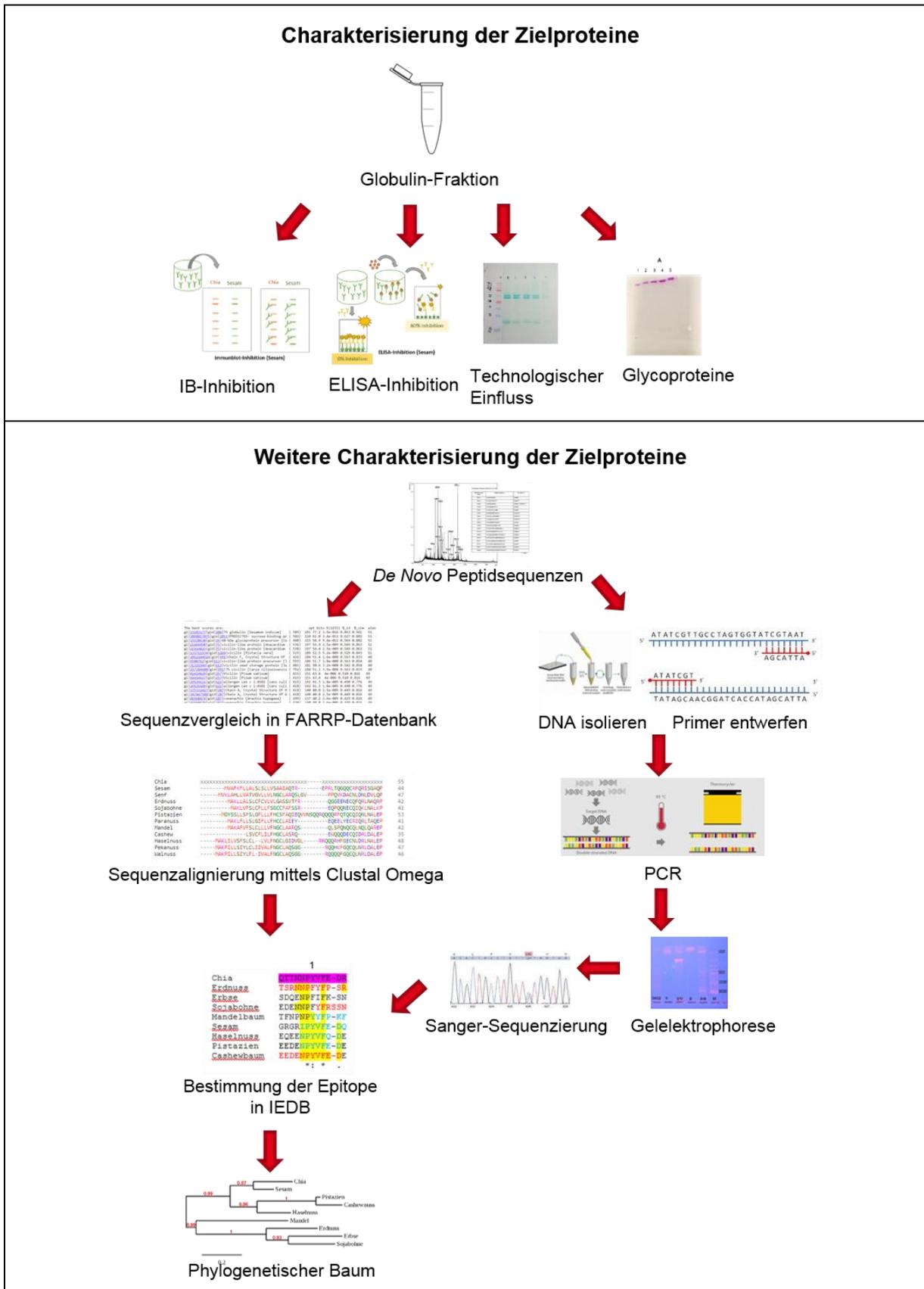


Abbildung 45: Methodenübersicht (Identifizierung und Isolierung der Zielproteine)

7.2. Gewinnung der Humanseren

Bei nicht charakterisierten Humanseren wird das Blut den Patienten mit Hilfe des sogenannten Butterfly-Systems in Laborröhrchen entnommen, das eine einfache Nadelführung sicherstellt. Die Gewinnung der Humanseren wird unter dem Punkt 9.1.6. im Anhang erklärt.

7.3. Extraktion IgE- bzw. IgG-bindender Proteine

Eine geeignete Extraktionsmethode ist eine Voraussetzung für eine hochqualitative Untersuchung der Lebensmittelallergene. Infolgedessen soll die Extraktionsmethode reproduzierbar sein und eine vollständige Isolierung aller Proteine und Glycoproteine ohne Allergenitätsverlust gewährleisten (AAS et al., 1978). Die Umsetzung von Phenolen zu Chinonen durch die Zerstörung der Zellkompartimente und die Einwirkung der Phenoloxidasen in Gegenwart von Luftsauerstoff müssen daher ausgeschlossen werden. Solche Reaktion erfolgt häufig in phosphatgepufferten Kochsalzlösungen und führt zur kovalenten Bindung zwischen Chinonen und Proteinen, wodurch die Allergenität der Proteine verloren gehen kann (McEvily et al., 1992).

Da Chiasamen eine relevante Quelle von über 27 Phenolen sind, kommt die von Clements (1965) entwickelte und durch Vieths (1992) modifizierte Tieftemperaturextraktion (TTE) zur Isolierung von EBPs bzw. GBPs zum Einsatz (Rahman, 2017).

Bei dieser Methode handelt sich um die Zerkleinerung und die Homogenisierung aller untersuchten Samen und Nüsse in Aceton bei mindestens - 40 °C. Anschließend erfolgt die Filtration der Suspension. Der Rückstand wird mit Ether/Aceton-Gemisch gewaschen und schließlich lyophilisiert. Dadurch entsteht das sogenannte Acetonpulver, welches durch Aceton frei von störenden phenolischen Verbindungen wird. Allerdings verbleiben im Extrakt eventuell Enzyme, die aber aufgrund der tiefen Temperaturen inaktiv werden. Darüber hinaus wird allen Extrakten das Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, Protease-Inhibitor, 2 mM) zugesetzt, um die Enzymaktivität der Protease während anschließender Untersuchungen auszuschließen. Die Durchführung ist im Anhang unter 9.1.7.1. zu finden.

7.4. Proteingehaltsbestimmung

Die Methode zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford (1976) beruht auf der Messung der Absorptionsänderung des Farbstoffes Coomassie Brilliantblau G-250 bei einer Wellenlänge von 595 nm in Abhängigkeit der Proteinkonzentration. Der Farbstoff bindet bevorzugt an basische und aromatische Proteine. Der Proteingehalt wird in dieser Arbeit nach der Herstellung der PBS- (engl. *Phosphate Buffered Saline*) und Tris- (engl. *tris(hydroxymethyl)aminomethane*) Extrakte aus dem Acetonpulver sowie der Extrakte nach der Osboron-Fraktionierung photometrisch bei 595 nm bestimmt.

Die quantitative Bestimmung erfolgt mit Hilfe des Rinderserumalbumins BSA (engl. *Bovine Serum Albumin*)-Kalibrierreihe mit den Konzentrationen 0,1 – 0,5 mg/ml. Die Nachweisgrenze beträgt 0,05 µg/ml. Die Proben werden analog zu den Standardlösungen behandelt und photometrisch bei 595 nm vermessen. Die Durchführung erfolgt nach Anhang 9.1.7.2.

7.5. Osborne-Fraktionierung

Ziel dieser fraktionierenden Extraktion ist es, die EBPs bzw. GBPs anhand ihrer Löslichkeit in unterschiedlichen Proteinfractionen zu unterteilen und das allergene Potenzial dieser Fraktionen zu untersuchen (Osborne, 1924). Dadurch können für die Arbeit irrelevante störende Proteine bzw. Proteinfractionen ausgeschlossen werden. Die Durchführung erfolgt nach 9.1.7.3. im Anhang.

7.6. Enzymallergosorbent-Test (EAST)

EAST ist eine enzymimmunologische Methode zur Bestimmung des Gehaltes an freiem, spezifischem IgE im Blutserum und stellt eine der wichtigsten In-Vitro-Methoden zur Diagnose der Lebensmittelallergie dar. Hierbei werden die Allergene an Cellulosescheiben gekoppelt, die mit Bromcyan (CnBr) aktiviert sind. Die Inkubation der aktivierten Cellulosescheiben mit Allergenextrakten führt zu einer kovalenten Bindung der Allergene an die Cellulosescheiben (Ceska und Lundkvist, 1972). Wiederrum werden die Allergenscheiben in Humansen inkubiert, damit die IgEs mit den Allergenen spezifisch reagieren. Anschließend erfolgt die Markierung der gebundenen IgEs mit sekundären Antikörpern, welche mit alkalischer Phosphatase gelabelt sind (Anti-IgE). Nach Zugabe von p-Nitrophenolphosphat wird dieses von der alkalischen Phosphatase zu einem gelben Produkt, p-Nitrophenol, umgesetzt, welches bei 405 nm photometrisch vermessen werden kann. Die Farbintensität ist direkt proportional zur IgE-Menge in Humansen. Über Referenzen mit bekannten IgE-Gehalt gegen Lieschgras erfolgt die Zuordnung der Humansen entsprechend ihrem IgE-Gehalt in fünf Klassen (0 bis 4, siehe Tabelle 19). Die Durchführung ist im Anhang unter 9.1.8. beschrieben.

Tabelle 19: EAST-Klassen und der dazugehörige IgE-Gehalt

EAST-Klasse	IgE-Gehalt [U/ml]
0	0-0,35
1	0,35-0,7
2	0,7-3,5
3	3,5-17,5
4	>17,5

7.7. Elektrophoretische Trennmethode

Die Elektrophorese ist eine der wichtigsten etablierten Methoden zur Auftrennung von Proteinen. Sie basiert auf dem Prinzip der Wanderung geladener Teilchen unter Einwirkung eines elektrischen Gleichstromfeldes. Die Fraktionierung der Moleküle ist durch ihre unterschiedlichen Ladungen und Massen möglich. Ihre Wanderungsgeschwindigkeit, die von der Zusammensetzung des Puffers, der Temperatur, der Feldstärke und dem Trägermaterial abhängt, ist für die Trennschärfe ein wichtiger Faktor (Westermeier, 1990).

7.7.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteinauftrennung beruht auf der Überdeckung der Eigenladung der Proteine durch das anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS, engl. *Sodium Dodecyl Sulfate*). Dadurch wird das Masse-/Ladungsverhältnis der SDS-Protein-Micellen gleich und die Proteine werden nach ihrem MG getrennt (Guttmann, 1996). Alternativ zu SDS kann auch Lithiumdodecylsulfat (LDS, engl. *Lithium Dodecyl Sulfate*) verwendet werden. Im Gegensatz zu SDS kristallisiert LDS während einer Lagerung bei 4 °C nicht aus, was die Handhabung erleichtert. Zudem führt die Verwendung von LDS aufgrund seiner höheren Löslichkeit im Gel zu einer geringeren Hintergrundfärbung (Kubo und Takagi, 1986). Die reduktive Spaltung der Disulfidbrücken wird mit 2-Mercaptoethanol erzielt, was die Sekundär- und Tertiärstruktur zerstört. Damit werden die mit SDS bzw. LDS beladenen Proteine nach der Auffaltung zu einheitlichen Micell-Strukturen (Vieths, 1992). Die Trennung solcher Proteine erfolgt in restriktiven Gelen, die aufgrund ihrer kleinen Porengröße die Wanderung von großen Micellen im Vergleich zu den kleinen erschweren. Dies führt zur Proportionalität der Wanderungsgeschwindigkeit zu dem MG der Proteine.

Als Trägermaterial dienen Polyacrylamidgele, die durch Copolymerisation von Acrylamidmonomeren mit N,N'-Methylenbisacrylamid als Vernetzer hergestellt werden. Die chemische und thermische Stabilität sowie die Reproduzierbarkeit der Darstellung zeichnen diesen Geltyp aus (Maier, 1990). Die für die Trennleistung des Gels verantwortliche Porengröße kann über die Totalamid (TA)-Konzentration und somit über den Vernetzungsgrad reproduzierbar eingestellt werden.

In der vorliegenden Arbeit werden sowohl LDS-PAGE als auch (DISK-)SDS-PAGE angewandt. Zum einen kommt LDS-PAGE unter Verwendung der Polyacrylamid-Fertiggele vom Typ NOVEXTM NuPAGE (Novex, San Diego, CA, USA) zum Einsatz. Dabei handelt es sich um Bis-Tris-HCl (Bis-(2-hydroxyethyl)-(imino-tris)-(hydroxymethyl)-methan-HCl) gepufferte Polyacrylamidgele mit einer (TA)-Konzentration von 12 %. Die Elektrophorese erfolgt mit dem MOPS (3-(N-Morpholino-)propansulfonsäure)-SDS-Puffer. Aufgrund der

hohen Kosten dienen solche Fertiggele ausschließlich der Auftrennung des gesamten Proteinspektrums. Die Durchführung ist im Anhang unter 9.1.9.2. beschrieben.

Zum anderen wird die diskontinuierliche SDS-PAGE zur Auftrennung der Proteinfractionen-, bzw. -Elate im Anschluss an eine Proteinausfällung bzw. eine chromatographische Auftrennung eingesetzt. Die Bezeichnung „diskontinuierlich“ leitet sich bei der Beschreibung der (DISK-)SDS-PAGE von der Anwendung von Gelen mit unterschiedlicher Gelstruktur, pH-Wert, Ionenstärke sowie Arten der eingesetzten Pufferionen bzw. -Lösungen ab. Ein diskontinuierliches System besteht aus einem Sammelgel (grobporig, 4 % Acrylamid) und einem Trenngel (feinporig, 12 % Acrylamid). Diese Polyacrylamidgele werden im Labor selbst gegossen und die Elektrophorese erfolgt unter Verwendung eines Tris-Glycin-Puffers. Die Proteine in einem Proteingemisch werden im Sammelgel zunächst konzentriert bevor sie im Trenngel aufgetrennt werden. Demzufolge führt das zu schärferen Banden während der Elektrophorese und erlaubt ein größeres Probenvolumen als in Gelen ohne Sammelgel (Lottspeich und Engels, 2012). Die Durchführung zur Herstellung der SDS-Gele sowie der Elektrophorese ist im Anhang unter 9.1.9.3. ausführlich beschrieben.

Die Abschätzung von MG wird durch den Vergleich mit Molekulargewichtsmarkern *Mark12* von der Firma ThermoFischer im Bereich von 2,5 - 200 kDa realisiert. Wird ein Immunblot im Anschluss an die LDS-PAGE bzw. SDS-PAGE geplant, kommt ein sogenannter Rainbow-Marker von der Firma ThermoFischer zum Einsatz. Die Marker sind in Abbildung 48 im Anhang unter 9.1.9.1. dargestellt.

7.7.2. Zweidimensionale Gelelektrophorese (2D)

Bei der zweidimensionalen (2D) Gelelektrophorese handelt es sich um die Auftrennung eines Proteingemisches anhand des isoelektrischen Punktes sowie des Molekulargewichtes. Zunächst erfolgt die 1. Dimension, die Isoelektrische Fokussierung (IEF, engl. *Isoelectric Focusing*). Hierbei werden die Proteine anhand ihres isoelektrischen Punktes (pI) innerhalb eines sogenannten immobilisierten pH-Gradienten-Streifens (IPG-Streifen) aufgetrennt (Rehm und Letzel, 2010). Dieser IPG-Streifen ist ein auf einer Oberfläche immobilisiertes Polyacrylamidgel mit einem stabilen pH-Gradienten. Beim pI eines Proteins besitzt das Protein keine Nettoladung und bewegt sich nicht im elektrischen Feld. Das bedeutet, solange das Protein im IPG-Streifen eine Nettoladung besitzt, wandert es entsprechend des elektrischen Feldes, bis der pH-Wert erreicht wird, an dem das Protein eine Nettoladung von null hat. Infolgedessen findet die erste Auftrennung der Proteine im IPG-Streifen statt (Otto, 2011). Dieser wird im Anschluss an die erste Dimension eine Umpufferung durch einen SDS-haltigen Puffer unterzogen. Folglich werden alle Proteine denaturiert und negativ beladen. Der IPG-Streifen wird daraufhin an eine Seite des Polyacrylamidgels gelegt und mit Agarosegel fixiert. Durch Anlegen eines elektrischen Gleichstromfeldes erfolgt die Auftrennung der Proteine

(SDS-PAGE) anhand des jeweiligen Molekulargewichtes in der 2. Dimension (Lottspeich *et al.*, 2012).

In dieser Arbeit werden aufgrund des unbekanntes isoelektrischen Punktes (pI) der Zielproteine mit IPG-Streifen verschiedener Längen und pH-Gradienten (Immobiline DryStrip, GE Healthcare, USA) gearbeitet. Zunächst werden die Proteine einer umfangreichen Aufarbeitung zur Entfernung von Nucleinsäuren, Salzen, Lipiden oder Detergenzien unterzogen. Die Auftragung der Proteinextrakte auf die IPG-Gelstreifen sowie das IEF-Programm hängen davon ab, ob saure oder basische Proteine aufgetrennt werden. Nähere Angaben in Bezug auf Aufarbeitung der Proben, verwendete IPG-Streifen, Auftragungsmethoden sowie verwendete IEF-Programme sind dem Anhang unter Punkten 9.1.10.1., 9.1.10.2. und 9.1.10.3. zu entnehmen.

Zum Transfer der Proteine aus dem IPG-Streifen in das SDS-Gel werden die Proben mit Hilfe des Detergenses SDS sowie Harnstoff und Glycerin äquilibriert. Die Äquilibration besteht aus zwei Schritten: Zunächst werden die Proteine durch die Zugabe von Dithiothreitol (DTT) reduziert. Danach erfolgt eine Acetylierung der Thiolgruppen durch Iodacetamid (Lottspeich *et al.*, 2012). Die Durchführung ist im Anhang unter 9.1.10.4. beschrieben.

Die in dieser Arbeit etablierte SDS-PAGE wird für die zweite Auftrennung eingesetzt. Für ein schnelles Screening des pI der Zielproteine werden große IPG-Streifen (24 cm) mit selbst gegossene SDS-Gele, ohne das Sammelgel verwendet. Hierfür werden die IPG-Streifen in vier Teile je 6 cm geschnitten und diese auf vier SDS-Gele aufgebracht. Kleine IPG-Streifen (7 cm) und 10 %ige Fertiggele vom Typ NOVEXTM NuPAGE kommen bei einer genauen Auftrennung zum Einsatz. Die Durchführung der zweiten Dimension ist im Anhang unter 9.1.10.5. beschrieben.

7.7.3. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung von Nucleinsäuren. Diese werden durch die Gelelektrophorese nach ihrer Größe getrennt, wodurch ein Vergleich der Größe und Masse mit bekannten DNA-Strängen möglich ist. Die horizontale Agarose-Gelelektrophorese wird in dieser Arbeit zum Auftrennen von PCR-Produkten verwendet. Außerdem können einzelne Banden aus dem Gel präparativ geschnitten und aufgereinigt werden, um jeweilige PCR-Amplifikate isolieren und sequenzieren zu können (Durchführung im Anhang unter 9.1.22.3.).

7.8. Färbemethoden

7.8.1. Färbung der Acrylamidgele

Zur Proteinvisualisierung der elektrophoretisch getrennten Proteine stehen viele unspezifische Methoden zu Verfügung. Das bedeutet, dass sowohl allergene als auch nicht-allergene Proteine angefärbt werden. Die Silberfärbung (AgF) nach Heukeshoven und Dernick (1986) basiert auf der Reduktion von Silberionen zu elementarem Silber und stellt mit einer Nachweisgrenze von 0,05 bis 0,1 ng Protein/mm² die empfindlichste unspezifische Färbemethode für Proteine in Acrylamidgelen dar. Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch, die nur bedingt gegebene Wiederverwendbarkeit der Proteine, da das Silber irreversibel an die Proteine gebunden ist. Für weitere Untersuchungen wie N-Terminal-Sequenzierung bzw. tryptischer Verdau und anschließend MS-Proteinanalyse stehen die angefärbten Proteine nicht mehr zu Verfügung. Im Gegensatz dazu stellt die Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung (CBBF) nach Fling und Gregerson (1986) eine reversible Proteinfärbemethode in Acrylamidgelen dar. Eine Entfärbung der zuvor durch Anlagerung des Farbstoffes CBB R-250 visualisierten Proteine ist ohne Beeinträchtigung möglich. Der Nachteil dieser Methode ist die geringere Empfindlichkeit gegenüber der AgF (Nachweisgrenze von etwa 30 ng Protein/mm²), was die Detektion der Allergene in kleinen Konzentrationen erschwert. Candiano et al. (2004) konnten die Sensitivität von CBBF um das 25-bis 30-fache verbessern, die sogar mit der von AgF vergleichbar war. Diese wird die kolloidale Coomassie-Färbung (kCF) bezeichnet und in dieser Arbeit zur Visualisierung der Proteine in Acrylamidgelen verwendet. Die Durchführung dieser Methode ist im Anhang unter 9.1.11. dokumentiert.

7.8.2. Färbung der Agarosegele

Nach Auftrennung der PCR-Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese werden die Amplifikate mit Ethidiumbromid unter Ultraviolettlicht (UV-Licht) sichtbar gemacht. Die Empfindlichkeit dieser Färbemethode beträgt 10¹⁰ Moleküle. Dies entspricht ca. 5 ng eines 500 bp langen Amplifikaten (Lottspeich und Engels, 2012). Die Durchführung wird im Anhang unter 9.1.22.3. beschrieben.

7.9. Immunologische Nachweismethoden

7.9.1. Immunoblot (IB)

Immunoblot bezeichnet die Kombination eines Proteintransfers aus einem Trägergel auf eine immobilisierende Membran durch Semidry-Blotting und der anschließenden Immunfärbung. Es handelt sich bei der Immunfärbung um die immunochemische Detektion der auf der Membran immobilisierten Allergene (Stott, 1989).

Die Semidry Blotting ist eine spezielle Art des Blottings, da die Proteine vor dem Transfer auf die Membran elektrophoretisch getrennt werden. Die Membran besteht aus Nitrocellulose (NC) und besitzt durch ihre kleine Porengröße eine sehr hohe Bindungskapazität. Der Transfer erfolgt mittels zweier horizontaler Graphitelektroden, an welchen ein Gleichstromfeld anliegt. Ein effektiver und gleichmäßiger Transfer kann gewährleistet werden, indem die Blotmembran und das Trenngel zwischen den Transferpuffer-benässten Filterpapieren angeordnet werden und ein diskontinuierliches Puffersystem mit getränkten Elektroden aufgebaut wird (Khyse-Andersen, 1984; Vieths et al., 1992). Nach dem Vorgang wird das an den Proteinen angelagerte SDS ausgewaschen. Somit können die Proteine renaturieren und nehmen teilweise ihre Sekundär- bzw. Tertiärstruktur ein aber nicht die Quartärstruktur. Das heißt, Epitope, die sich in der Primär-, Sekundär bzw. Tertiärstruktur befinden, können für spezifische Ligandenbindung, z.B. für IgEs bzw. IgGs, wieder zugänglich sein (Aalberse und Van Ree, 2000). Die Durchführung ist im Anhang unter 9.1.12. erklärt.

Unter einer Immunfärbung wird eine spezifische Visualisierung von Allergenen auf einer immobilisierenden Membran verstanden. Hierbei werden verbleibende freie Bindungsstellen der NC-Membran mit einem Tris-Tween-Puffer (TTBS, engl. *Tween-Tris-Buffered Saline*) blockiert. Danach folgt die sukzessive Behandlung der Membran mit drei unterschiedlichen kommerziellen Antikörpern und Blutseren von Sesam- und Haselnussallergikern. Der Primärantikörper bindet spezifisch an das Allergen. Um den primären Antikörper zu detektieren, wird die NC-Membran mit dem sekundären Antikörper inkubiert, der wiederum mit einem Enzym (Meerettich-Peroxidase bzw. Alkalische Phosphatase) gekoppelt ist. Abschließend wird die Membran mit einem Substrat inkubiert, das von dem Enzym in einen Farbstoff umgesetzt wird. Infolgedessen werden die Allergene sichtbar (Darstellung der Durchführung siehe Anhang unter 9.1.13.1.).

7.9.2. Immunoblot-Inhibition

Dank der Immunoblot-Inhibition können Rückschlüsse auf eine mögliche Kreuzreaktivität mit Allergenen anderer Spezies gezogen werden (Vieths et al., 1995). Hierbei liegen die Allergene aus Sesam und Haselnuss auf der NC-Membran immobilisiert vor und konkurrieren mit anderen in Lösung befindlichen Allergenen um die Bindung mit IgE- bzw. IgG-Antikörpern. Die Allergene werden zunächst elektrophoretisch getrennt und auf eine NC-Membran transferiert. Nachfolgend erfolgt die Blockierung freier Bindungsstellen auf der Membran. Nun kann die Membran mit kommerziellen Antikörpern bzw. Humansenen versetzt werden, die zuvor mit Inhibitor-Lösung d.h. Proteinextrakt aus Chiasamen, inkubiert sind. Die Allergene werden schließlich einer Immunfärbung unterzogen. Tritt eine Schwächung bzw. Eliminierung der Detektion auf, besitzen festphasengebundene und freie Allergene gleiche Epitope. In dieser Arbeit wird diese Methode zur Untersuchung der Kreuzreaktivität der Zielproteine in

Chiasamen im reduzierten Zustand verwendet (Beschreibung der Durchführung im Anhang unter 9.1.13.2.).

7.9.3. ELISA und ELISA-Inhibition

ELISA leitet sich von der englischen Bezeichnung „Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay“ ab. Bei dieser Testmethode handelt sich um ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren, um quantitativ und qualitativ ein bestimmtes Protein, in diesem Fall Allergene, nachzuweisen. Trotz verschiedener Arten von ELISA besteht das Grundprinzip darin, dass mit einem Enzym markierte Antikörper an ein Allergen gebunden werden, das auf einem soliden Träger (96-well-Mikrotiterplatte) immobilisiert ist. Zunächst werden freie Bindungsstellen der 96-well-Mikrotiterplatte nach Immobilisierung des Allergens mit einem Blockierungsreagenz (BSA, TTBS) blockiert. Danach erfolgt die Zugabe der mit einem Enzym konjugierten Antikörper, meist Meerrettichperoxidase (HRP, engl. *horseradish peroxidase*). Hierbei entsteht eine hochspezifische Bindung zwischen dem Epitop des Antigens und dem Paratop des Antikörpers. Darauf folgen Waschschriffe, um die nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Nach der Zugabe eines farblosen chromogenen Substrats katalysiert das Enzymkonjugat eine Reaktion und es entsteht ein dunkel gefärbtes Derivat. Die Farbveränderung dient der Identifizierung des Allergens in einem qualitativen Assay. Da eine photometrische Messung möglich ist, kann das Allergen einer Quantifizierung mit Hilfe einer Kalibrierreihe erfolgen (Frey et al., 2000; Luttmann et al., 2009). Die Durchführung ist im Anhang unter 9.1.13.4 erklärt.

Um das allergene Potenzial eines Proteinextrakts zu bestimmen, wird eine weitere ELISA-Variante, die sogenannte ELISA-Inhibition, angewandt. Aufgrund des Messprinzips wird die ELISA-Inhibition als ein kompetitiver Hemmtest betrachtet. Dieser basiert auf der Inkubation der Antikörper mit dem Proteinextrakt, dessen allergene Potenz vor der eigentlichen Messung untersucht werden soll. Dadurch konkurrieren die auf der 96-well-Mikrotiterplatte festgebundenen Antigene (Zielantigene) und die im Proteinextrakt, was zur Verminderung des Messsignals führt. Je größer der inhibierende Effekt eines Proteinextrakts ist, desto höher ist das allergene Potenzial. Zur relativen Quantifizierung des allergenen Potenzials des Chiasamen-Extrakts wurde der prozentuale Inhibierungsgrad (Inhibition %) der IgG-Bindung berechnet.

Um die Inhibition verschiedener Zielantigene bemessen zu können wird der sogenannte C_{50} -Wert berechnet, der den Proteingehalt des Extraktes bei einer 50 %igen Verminderung des Messsignals beschreibt. Somit ist ein Vergleich des allergenen Potenzials verschiedener Extrakte untereinander möglich. In dieser Arbeit wird diese Methode verwendet, um die IgG-Bindungsstärke der kommerziellen Sesam- und Haselnussantikörper (SA und HA) an die Chiasamenproteine zu bestimmen (Die Durchführung und die Gleichungen zur Auswertung sind im Anhang unter 9.1.13.4. zu sehen).

7.10. Fällung von Proteinen

7.10.1. Ammoniumsulfat-Fällung (AS-Fällung)

Proteine besitzen hydrophobe Regionen, an die sich Wassermoleküle anordnen können. Somit sind diese Stellen verdeckt und wechselwirken nicht miteinander. Durch das Hinzufügen von Salzen entsteht die gesättigte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung und die Hydrathülle der Proteine verschiebt sich zum hinzugefügten Salzmolekül. Dies führt zum Aggregieren der Proteine, indem die hydrophoben Regionen wieder frei werden und mit anderen Proteinen zur Aggregation zur Verfügung stehen. Folglich werden die Proteine in der Lösung ausgefällt. In dieser Arbeit wurde diese Fällung zur Auftrennung der Viciline und Legumine in der Globulin-Fraktion angewandt. Dieser Fraktion wird fein geriebenenes Ammoniumsulfat zugesetzt, bis eine 80 %ige Sättigung erreicht ist. Aufgrund des in weiteren Untersuchungen störenden hohen Salzgehalts, werden die Fraktionen mit 4-fachem Volumen an Wasser verdünnt und anschließend mit Hilfe einer Amicon Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheit (Membran <3 kDa) aufkonzentriert (Reitsma et al., 2016). Die Durchführung ist im Anhang unter 9.1.14.1. und 9.1.14.3. beschrieben.

7.10.2. PEG-Fällung

Polyethylenglykol (PEG) ist ein hydrophiles ungeladenes Polymer und kann sowohl zur Fällung als auch zur Stabilisierung von Proteinlösungen eingesetzt werden. Dieses Polymer konkurriert mit den Proteinen in wässriger Lösung um das Hydratationswasser, was ab einer bestimmten Konzentration (0-30 %) zu einer reversiblen Fällung der Proteine führt. Diese Fällung ist sehr schonend für Proteine und wird häufig bei der Proteinkristallisation verwendet. Im Gegensatz zur AS-Fällung müssen ausgefällte Proteine nicht entsalzt werden. Jedoch kann das PEG aus dem Proteinpellet durch Dialyse (bei PEG 400) entfernt werden (Polson et al., 1964).

In dieser Arbeit wird die Fällung zum Aufkonzentrieren der Proteinfractionen der GPC und IEC angewandt. Ausgefällte Proteine werden anschließend mit Globulin-Puffer aufgenommen und weiter untersucht. Die Durchführung ist im Anhang unter 9.1.14.2. beschrieben.

7.11. Chromatographische Auftrennung der Proteine in Chiasamen-Extrakt

7.11.1. Auftrennung mittels Größenausschlusschromatographie (GPC)

Bei der Größenausschlusschromatographie handelt es sich um die Trennung eines Proteingemisches nach der Molekülgröße. Die Proteine werden an einer Gelmatrix basierend auf einem sterischen Ausschlussprinzip fraktioniert und mit abnehmender Molekularmasse eluiert. Das bedeutet, dass große Moleküle im Ausschlussvolumen des Säulenmaterials eluiert werden, während kleinere Moleküle in das Gel eindiffundieren können und dadurch verzögert werden (Lottspeich und Engels, 2012). In dieser Arbeit werden zwei Säulen, HiLoad™ Superdex 200 PG und HiLoad™ Superdex 75, (GE Healthcare, USA) verwendet. Die chromatographische Trennung wird mit Hilfe des Proteinreinigungssystems *ÄKTAprime plus* durchgeführt und die Elution erfolgt isokratisch mit einem 50 mM Tris-Puffers. Der Elutionspuffer wird durch einen 0,45 µm Membranfilter gefiltert. Im Anhang unter 9.1.15. sind weitere Parameter zu finden.

7.11.2. Auftrennung mittels Ionenaustauschchromatographie (IEC)

Die IEC stellt eine schonende chromatographische Methode zur Trennung von Proteinen und Peptiden dar. Die Trennung basiert auf den unterschiedlichen Affinitäten der Proteine zu den Festionen des Säulenmaterials und ist von der Größe und die Ladung der Moleküle sowie von der Zusammensetzung der mobilen Phase abhängig. Die biologische Aktivität der getrennten Proteine bleibt nach der Trennung erhalten, was weitere Untersuchungen der Proteine ermöglicht. Während der Auftrennung konkurrieren die Proteine mit den Ionen der mobilen Phase um eine Bindungsstelle an den Festionen der stationären Phase. Generell werden Anionenaustauschersäulen zur Trennung der sauren Proteine und die Kationenaustauschersäulen zur Trennung der basischen Proteine eingesetzt.

In dieser Arbeit wird das *HiTrap™ IEX Selection Kit* (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Schweden) verwendet, um das beste Säulenmaterial zur Fraktionierung von EBPs bzw. GBPs in Chiasamen herauszufinden. Dieses Kit enthält vier Anionenaustauscher- als auch drei Kationenaustauschersäulen, die unterschiedliche Säulenmaterialien mit einem Volumen von je ein ml besitzen. Die Anionenaustauscher bestehen aus sphärischen Polymerpartikeln, die an der Oberfläche quartäre Ammonium (Q)-, Diethylaminoethyl (DEAE)- bzw. Diethylaminopropylgruppen (ANX) als Festionen tragen. Die Elution der Proteine gelingt isokratisch durch eine Pumpe (Pharmacia LKB Pumpe, siehe Abbildung 49 im Anhang unter 9.1.16.3.) bei einem konstanten pH-Wert von 8,0 mit sieben 0,05 molaren Tris-Puffern, die sich nur in der Kaliumchlorid- (KCl)-Konzentration unterscheiden (25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1000 mM). Die Eluenten werden manuell ausgetauscht (Die Durchführung ist im Anhang

unter 9.1.16.1. beschrieben). Die Kationenaustauschsäulen tragen hingegen negative funktionelle Gruppen wie Sulfopropyl (SP), Methylsulfonate (S) bzw. Carboxymethyl (CM)-Gruppen. Zur Trennung der Proteine werden ebenfalls sieben 0,05 molare Natriumcitrat-Puffer bei einem konstanten pH-Wert von 4,5 mit den sieben oben genannten Konzentrationen an KCl eingesetzt. Verwendete Lösungen und Materialien sind im Anhang unter 9.1.16.1. und 9.1.16.2. aufgelistet. Die Detektion erfolgt nach der PEG-Fällung der Proteine mittels SDS-PAGE (siehe 9.1.9.3. im Anhang). Alle eingesetzten Puffer werden anhand eines 0,45 µm Membranfilters und einer Vakuumpumpe gefiltert.

7.11.3. Auftrennung IgE- bzw. IgG-bindender Proteine mittels Immunitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie ist eines der wichtigsten Verfahren zur Trennung von Proteinen und anderen biologischen Molekülen. Sie beruht auf der hochspezifischen reversiblen Wechselwirkung zwischen zwei Molekülen (z.B. Antikörper, Antigen). Hier werden Antikörper auf eine stationäre Phase (Nanopartikeln z.B. chromatographische Matrix oder *magnetic beads*) immobilisiert. Hierfür gibt es zwei Strategien zur Kopplung der Nanopartikel an die Antikörper. Die erste Strategie stellt die beliebige chemische Ankopplung (*random chemical attachment*) dar. Dies ist eine einfache, günstige und robuste Methode und bevorzugt die ε-Aminogruppen von Lysine zur Ankopplung an die Festphase. Besitzen Antikörper solche Aminogruppen auf ihren Bindungsstellen, führt dies zur Reduzierung der Bindungsaktivität (Kortt et al., 1997). Außerdem führt diese Strategie zur Abnahme der Bindungseffizienz, da die Antikörper an den Nanopartikeln beliebig immobilisiert sind und dadurch ihre Bindungsstellen blockiert werden (Turkova, 1999). Die zweite Strategie, welche in dieser Arbeit nicht angewandt wird, vertritt die gezielte Ankopplung (*directional attachment*) der Antikörper an Protein A, Protein G oder Protein L, welche im Vorfeld an Beads immobilisiert wurden. Protein A und G sind Proteine mit einem MG von 40-60 kDa, das ursprünglich von der Zellwand des Bakteriums *Staphylococcus aureus* stammt und Immunglobuline binden können (Bjorck und Kronvall, 1984; Graille et al., 2000). Hingegen stammt das Protein L von der Zellwand des Bakteriums *Peptostreptococcus magnus* und besitzt ein MG von ca. 76 kDa (Bjorck, 1988). Proteine A und G binden am Fragment FC des Antikörpers, während das Protein L mit Kappa-Leichtketten wechselwirkt (Moser und Hage, 2010; Urh et al., 2009). Das bedeutet, die Bindungsstellen der Antikörper bleiben nach der Immobilisierung frei, was die Bindungseffizienz der Antikörper an die Antigene erhöht. Allerdings sind solche Beads teuer und binden auch irrelevante Antikörper, die sich im Proteinextrakt befinden. Darüber hinaus ist ihre Bindungsspezifität nicht universal. Beispielsweise besitzen Protein A und G unterschiedliche Affinitäten zu IgG-Typen verschiedener Spezies und Protein L bindet ausschließlich an Kappa-Leichtketten (Urh et al., 2009).

In dieser Arbeit wird die erste Strategie angewandt, da diese Methode zum einen als Bestätigung der IgE- bzw. IgG-Bindung dient und zum anderen eine schnelle und günstige Methode zur Isolierung der Zielproteine sein soll. Ein typisches Beispiel für diese Strategie ist die kovalente Ankopplung der Antikörper an die Carbonsäuregruppe von Nanopartikeln. In dieser Arbeit werden die Antikörper an die Oberfläche carboxylierter magnetic beads (MB) fixiert (SiMAG-Carboxyl, chemical, Berlin, Germany). Nach der Immobilisierung der Sesamantikörper (SA) werden die MBs zur spezifischen Isolierung von EBPs bzw. GBPs in der Globulin-Fraktion (GLO) herangezogen werden. Die Immobilisierung der Antikörper erfolgt anhand einer kovalenten Bindung zwischen der Carboxylgruppe an der Oberfläche der MBs und den Aminogruppen des Antikörpers. Dafür werden Carboxylgruppen an den MBs mit EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid) aktiviert, welches mit der Carboxylgruppe der *magnetic beads* den O-Acylisoharnstoff bildet (siehe Abbildung 46). Erfahrungsgemäß kann durch die Zugabe von 25 µg Antikörpern zu 10 mg MBs eine ausreichende Menge an immobilisierten Antikörpern gewährleistet werden. Die im Vorfeld eingeführte EDC-Modifikation stellt eine gute Abgangsgruppe dar, so dass davon auszugehen ist, dass die Bindung zwischen *magnetic bead* und Antikörper quantitativ abläuft. Die Durchführung zur Kopplung der *magnetic beads* ist im Anhang unter 9.1.17.1. ausführlich beschrieben.

Zur Verifizierung der erfolgreichen Kopplung soll eine dem ELISA ähnliche Nachweisreaktion durchgeführt werden. Durch Inkubation des entsprechenden Komplexes (Antikörper- *magnetic beads*) mit einem sekundären Antikörper (Anti-Huhn), welcher mit Meerrettichperoxidase (HRP) markiert ist, kann im Anschluss über eine Farbreaktion die Anwesenheit der primären Antikörper indirekt nachgewiesen werden. Die Durchführung des Nachweises der gekoppelten Antikörper ist im Anhang unter 9.1.17.2. beschrieben.

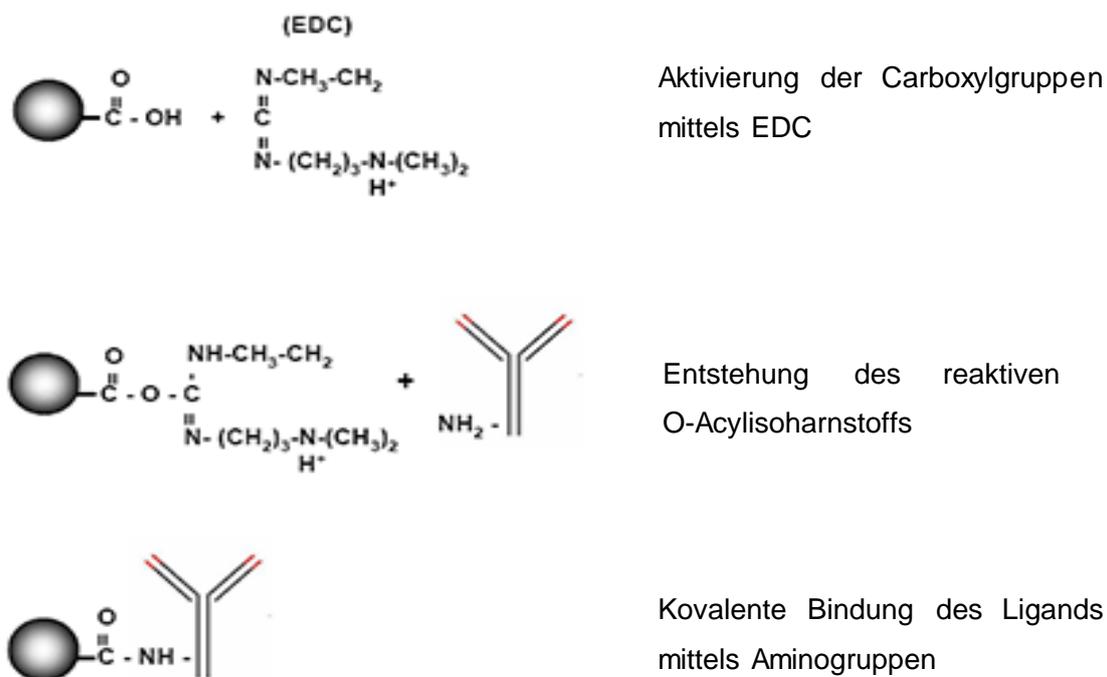


Abbildung 46: Kopplung der Antikörper an die magnetic beads

Die Entkopplung des Antigens vom Antikörper wird durch eine pH-Wert-Veränderung erzielt (Holtzhauer, 1997). Diese sorgt für die Elution der gebundenen Zielproteine. Allerdings ist bei diesem Elutionsverfahren mit einer irreversiblen (partiellen) Denaturierung des Proteins zu rechnen (Beschreibung der Durchführung ist im Anhang unter 9.1.17.3.). Demzufolge werden neun unterschiedliche Puffer zur Elution der Zielproteine eingesetzt (siehe Abschnitt 9.1.17.4. im Anhang).

7.12. Nachweis von Glycoproteinen mittels Periodsäure-Schiffsche-Färbung

Da Allergene meist Glycoproteine sind, d.h. Proteine, die kovalent gebundene Oligosaccharidketten (Glykan) enthalten, ist es sehr bedeutend herauszufinden, ob der Kohlenhydratanteil einen Beitrag zu Allergenität leistet. Der Massenanteil der Kohlenhydrate schwankt in Glycoproteinen stark und kann bis 90 % betragen. D-Galactose, L-Arabinose, L-Rahmose und D-Mannose stellen die wichtigsten Kohlenhydratkomponenten dar (Waffenschmidt und Jaenicke, 1991). Bisher ist die Bedeutung des Kohlenhydratanteils für die Allergenität noch unklar. In dieser Arbeit werden Glycoproteine mit Hilfe der Periodatspaltung nachgewiesen. Mit Periodat können vicinale Hydroxylgruppen von Kohlenhydraten oxidativ gespalten werden und es entstehen Formaldehyd und Ameisensäure. Infolgedessen können Glycoproteine nach elektrophoretischer Trennung im Gel mit Periodat behandelt werden,

wodurch Aldehyde entstehen. Diese werden mit dem Schiffschenschen Reagenz (Fuchsin, Schwefelsäure) umgesetzt, was die Glycoproteine als violette Banden im Gel visualisiert (Beschreibung der Durchführung im Anhang unter 9.1.18.).

7.13. Untersuchung verschiedener Einflüsse auf die Stabilität der IgE- bzw. IgG-Bindung

Im Rahmen dieser Arbeit wird die IgE- bzw. IgG-Bindung der Chiasamenproteine auf ihre Stabilität untersucht. Dafür werden extrahierte Zielproteine aus Chiasamen extremen Bedingungen ausgesetzt. Dazu zählen Einflüsse wie, Hitze, niedriger pH-Wert und Druck. Die IgE-Bindungsfähigkeit der Proteine wird anschließend mittels Immunoblot ermittelt. Bei der Hitze-Behandlung wird der Globulin-Extrakt mit unterschiedlichen Temperaturen (40, 60, 80, 100 °C) für je 5, 10 und 15 Min behandelt, während ihre Stabilität bei pH-Werten von 2, 4 und 6 geprüft wird. Zur Behandlung der Proteine mit einem Druck von 1,9 kbar bei 4 °C wird das Verfahren „*French Press*“ angewandt, welches in der Regel zum Zellaufschluss verwendet wird. Die Durchführung wird unter 9.1.19. im Anhang beschrieben.

7.14. Massenspektrometrische Methoden

Die massenspektrometrische Messung (MS-Analyse) wird zunächst für die Identifizierung der mittels 1D-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennten EBPs bzw. GBPs angewandt. Außerdem dient diese Methode zur Charakterisierung der mittels AS-Fällung, 2D-Gelelektrophorese und IAC-MB isolierten Proteine. Die Messung erfolgt gänzlich durch Herrn Söhnke Harder am Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Deutschland).

7.14.1. In- Gel- Trypsinverdau und UHPLC-ESI-MS/MS

Zunächst erfolgt ein In-Gel-Trypsinverdau der isolierten Proteine. Das Enzym Trypsin spaltet die Proteine nach Lysin und Arginin. Die erhaltenen Peptide werden mittels des Tandemmassenspektrometers *Q Exactive* (ThermoFisher Scientific, Deutschland) untersucht.

Das *Q Exactive benchtop* UHPLC-ESI-MS/MS kombiniert die leistungsstarke Precursor-Selektion eines Quadrupols mit der hohen Auflösung und der Massengenauigkeit des Orbitraps, was einen hohen dynamischen Bereich (4-5 Größenordnung) und eine hohe Scangeschwindigkeit im MS- und MS/MS-Modus gewährleistet. *Q Exactive benchtop* UHPLC-ESI-MS/MS ermöglicht die Erfassung, Fragmentierung und Sequenzierung vieler tryptischer Peptide in einer Messung. *Q Exactive* wird mit einer UHPLC-Anlage *nanoAcquity* (Water, Deutschland) betrieben. Hierbei handelt es sich um ein Hochleistungsflüssigkeitschromatographiesystem UHPLC (engl. *Ultra High Performance Liquid*

Chromatography), das der chromatographischen Trennung mehr Effizienz und höhere Geschwindigkeit bietet. Es werden Probenvolumina von 0,8 µl verwendet. Als Vorsäule dient hierbei eine nanoACQUITY UPLC C18 Trap Column (Innendurchmesser: 180 µm x 20 mm; Partikelgröße: 5 µm; Porengröße: 100 Ångström (Å) - Thermo Scientific). Die Trennung erfolgt über eine C18-Säule mit den Dimensionen 75 µm x 200 mm und einer Partikelgröße von 1,7 µm und Porengröße von 130 Å. Als Laufmittel A wird ddH₂O verwendet, während das Laufmittel B aus Acetonitril (ACN) besteht. Beiden Laufmitteln wird 0,1 % Ameisensäure (FA, engl. *Formic Acid*) zugesetzt. Die chromatographische Trennung erfolgt mit einer Flussrate von 250 nl/min. Die Laufzeit der Gradienten betrug 60 min (siehe Gradienten im Anhang unter 9.1.20.1.).

Die Ionen werden in einer Atmosphärendruck-Ionenquelle (API, engl. *atmospheric pressure ion source*) gebildet und gelangen durch ein Übertragungsrohr zu einer *S-Linse* und anschließend in einen gebogenen *Flatapole*. Dieser weist zwischen seinen Stäben einen Abstand von 2 mm auf und ist so ausgerichtet, dass nur Ionen ohne Cluster und Tröpfchen in den Quadrupol gelangen. Dieser ist in der Lage, Ionen bis zu einer Isolierungsbreite *m/z* von 0,4 Th zu isolieren. Die Ionen werden über zwei Linsen in einen Oktapol gebracht, welcher die Ionen zu einer Kollisions-Dissoziationszelle mit hoher Energie (HCD, engl. *Higher Energy Collisional Dissociation*) führt. Dort werden die Vorläufer-Ionen fragmentiert und es entstehen mehrere Fragmente (in dem Fall kleinere Peptide), die mittels des Massenanalysators *Orbitrap* gemessen werden (Michalski et al., 2011). Im *Q Exactive* werden die Peptide im Positivmodus gemessen. Als Kalibrierstandard wird *Pierce™ LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution* (ThermoFisher Scientific, Deutschland) eingesetzt. Die Gerätekonfiguration der verwendeten FULL-MS-Messmethode ist dem Anhang unter 9.1.20.2. zu entnehmen.

7.14.2. De Novo Sequenzierung von Peptiden

Die Sequenzen der EBPs bzw. GBPs aus Chiasamen sind in den Proteindatenbanken noch unbekannt. Folglich wird die sog. *De Novo* Sequenzierung angewandt, welche mittels FULL-MS-Methode mit anschließender *MS/MS*-Fragmentierung (FULL-MS → ddMS²) erfolgt. Diese Sequenzierungsmethode hat im Vergleich zur Edman-Sequenzierung den Vorteil, dass eine sehr kleine Proteinmenge (im Femtomol-Bereich) benötigt wird, um kleine Proteinbanden bzw. -spots zu analysieren (Aebersold und Goodlett, 2001; Yates, 1998). Außerdem liefert die auf MS-Analyse basierte Sequenzierung eine hohe Sensitivität in kurzer Zeit. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass die Sequenzierung geblockter N-Termini im Gegensatz zu Edman-Sequenzierung möglich ist. Allerdings können manche isobaren Massen wie Lysin (K) und Glytamin (Q) bzw. Leucin (L) und Isoleucin (I) nicht voneinander unterschieden werden (Lim et al., 2003).

Es entstehen aus dem fragmentierten Peptid verschiedene Fragmente weniger Aminosäuren, die durch Aneinanderreihung und Überlappung die Peptidsequenz ergeben. *De Novo* Sequenzierung wird anhand der Software PepNovo ausgewertet. Verwendete Einstellungen sind im Anhang unter 9.1.20.3. zu finden.

7.14.3. Computergestützter FARRP-Datenbankvergleich und Sequenzanalysen

Beim Vergleich zweier Proteinsequenzen spricht man entweder von einer Sequenzübereinstimmung (SÜ, engl. *identities*) oder von Sequenzähnlichkeit (SÄ, engl. *positives*). Wird eine Alignierung durchgeführt, nehmen die gepaarten Aminosäuren drei Zustände an. Sind die Zeichen der Aminosäuren gleich, kann von einer Übereinstimmung ausgegangen werden. Folglich weisen unterschiedliche Aminosäuren auf eine Nichtübereinstimmung hin. Eine Ausnahme stellen Aminosäuren dar, deren Struktur ähnlich ist. Hier spricht man von einer Sequenzähnlichkeit.

Zunächst wird eine Identifizierung der Zielproteine mittels der Suchmaschine NCBI-BLAST durchgeführt. Hierbei werden die Peptide aus Chiasamen mit allen Proteinen aus der Gruppe „Viridiplantae (taxid:33090)“ verglichen. Außerdem wird die Suche auf „Homo sapiens (taxid:9606)“ erweitert, um aus Menschen stammende Peptide bzw. Proteine auszuschließen.

Die *De Novo* sequenzierten Peptide der mittels 2D-Gelelektrophorese detektierten bzw. durch *magnetic beads* isolierten Proteine werden in der FARRP-Allergendatenbank mit ca. 1251 Sequenzeinträgen bekannter potenzieller Allergene (<http://www.allergenonline.com/>) verglichen.

7.15. Isolierung und Konzentrationsbestimmung der Chiasamen-DNA

Um die DNA aus pflanzlichem Material zu isolieren, wird die Probe zunächst homogenisiert und anschließend lysiert. Während der Lyse und der nachfolgenden Waschschriffe werden viele unerwünschte Substanzen (z.B. Inhibitoren) entfernt. Darauffolgend wird die DNA an eine Matrix gebunden, gewaschen, dabei aufgereinigt und schließlich von der Matrix eluiert. In dieser Arbeit wird das Acetonpulver zur Extraktion der DNA aus Chiasamen verwendet. Dafür kommt das Plant DNA Mini Kit, peqGOLD (PEQLAB, Erlangen, Deutschland) zum Einsatz. Die Elution erfolgt mit doppelt destilliertem Wasser (bidest. Wasser). Um die Qualität des Eluats zu überprüfen, wird die DNA-Konzentration mittels NanoDrop® (ND-1000 Spektrophotometer, ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) bei 260 nm bestimmt. Zur Isolierung der DNA aus dem Agarosegel kommt ein Gel-Extraktion Kit (QIAquick PCR & Gel Cleanup Kit, QIAGEN,

Düsseldorf, Deutschland) zum Einsatz. Die Durchführung ist dem Anhang unter 8.27. zu entnehmen.

7.16. PCR Polymerase-Kettenreaktion

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) handelt es sich um die gezielte Vervielfältigung eines kurzen genau definierten Teils der Erbsubstanz DNA in vitro (Lottspeich und Engels, 2012).

7.16.1. DNA-Struktur

DNA wird als ein langes Kettenmolekül (Polynukleotid) aus vielen Bausteinen (Nukleotiden) definiert. Das Nukleotid besteht aus Phosphorsäure bzw. Phosphat, dem Zucker Desoxyribose und einer heterozyklischen Nucleobase, worin sich Nukleotide unterscheiden. Im Gegensatz zum Säure- und Zuckerteil variiert die Base zwischen Adenin (A), Guanin (G), Thymin (T) oder Cytosin (C). Diese Abkürzungen der Basen werden auch für die entsprechenden Nukleotide verwendet. DNA besteht aus zwei Einzelsträngen (Doppelsträngig), die nach einem festen Paarungssystem ihrer Nukleotide aneinandergelagert sind (siehe Abbildung 47). Dies verleiht der DNA die Form einer Doppelhelix (B-DNA Konformation). Durch die Aneinanderlagerung stehen sich in der Mitte der Doppelhelix zwei bestimmte Basen gegenüber (Adenin gegenüber Thymin, Cytosin gegenüber Guanin), die mit Wasserstoffbrücken stabilisiert werden. Soll die Sequenz eines bestimmten DNA-Abschnittes (Amplicon) aufgeklärt werden, muss dieser anhand der PCR vervielfältigt werden. Die PCR-Produkte werden Amplifikate genannt (Berg et al., 2013).

Zum PCR-Reaktionsansatz gehören neben der DNA-Polymerase, die doppelsträngige DNA und zwei kurze 20-30 Basenpaare (bp) lange einzelsträngige Oligonukleotide (Primer). Die Sequenz der Primer ist komplementär zum 3`-Ende und 5`-Ende des Amplicons (Löffler et al., 2007).

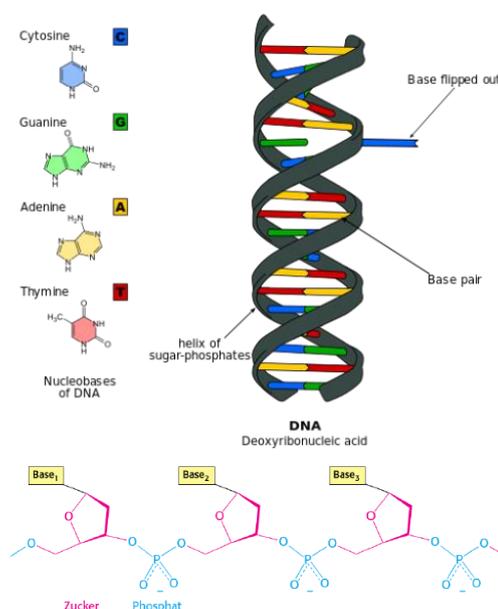


Abbildung 47: DNA-Struktur und Aufbau (Dramiga, 2017)

7.16.2. Ablauf der PCR

Ein PCR-Zyklus wird in der Regel in drei Teilschritte eingeteilt: Denaturierung der doppelsträngigen DNA, Primer-*Annealing* an die 3'-Enden des jeweiligen DNA-Einzelstranges und Elongation (Schochetman et al., 1988, Antonia Diplom). Während der *Denaturierung* wird die Temperatur des Reaktionsansatzes auf 95 °C erhöht, wodurch die doppelsträngige DNA gespalten wird und nun einzelsträngig vorliegt. Anschließend wird die Temperatur auf die Schmelztemperatur der Primer (meist 50-60 °C) abgekühlt, wodurch sie bei einer definierten Temperatur an die 3'-Enden des Amplicons binden (*Annealing*) (Matissek et al., 2010). Danach folgt das *Elongation*, wobei die Einzelstränge anhand der DNA-Polymerase mit den komplementären Nukleotiden ergänzt werden. Bei jedem Zyklus verdoppelt sich die Menge an PCR-Amplifikate (Schochetman et al., 1988).

In dieser Arbeit wird die PCR zur Sequenzierung solcher DNA-Abschnitte in der Chiasamen-DNA eingesetzt, die EBPs bzw. GBPs codieren. Zuerst wird die DNA isoliert und ihre Konzentration bestimmt (siehe Anhang unter 9.1.21.). Danach werden DNA-Sequenzabschnitte bekannter Allergensequenzen zum Entwurf der Primer herangezogen, die mit den *De Novo* sequenzierten Peptidsequenzen aus Chiasamen hohe Ähnlichkeit zeigen (siehe Tabelle 27 im Anhang unter 9.1.22.6.).

7.16.3. Aufreinigung und Sequenzierung der PCR-Produkte

Nach Durchführung der PCR werden entstandene Amplifikate durch Gelelektrophorese der Fragmentlänge nach aufgetrennt und die Banden der PCR-Produkte werden mit Ethidiumbromid unter UV-Licht visualisiert (Beschreibung der Durchführung im Anhang unter 9.1.21.) Die Zielbanden werden unter UV-Licht präparativ aus dem Agarosegel rausgeschnitten. Anschließend folgt die Aufreinigung der PCR-Amplifikate aus dem Gel mit dem PeQ Gold Gel Extraktion Kit (PEQLAB, Erlangen, Deutschland). Die Durchführung ist im Anhang unter 9.1.21.3. erklärt. Beträgt die Konzentration der eluierten DNA in der Probe mindestens 15 ng/µl, wird sie zur Sanger-Sequenzierung zur Firma BIOTECH verschickt. Liegt sie aber unter 15 ng/µl, wird das isolierte Amplifikat als Matrize für eine nachfolgende PCR verwendet (Doppel-PCR). Wenn auf dem Gel nur die Bande des Zielamplifikats zu sehen ist, wird dieses PCR-Produkt direkt aus dem Reaktionsansatz isoliert (Im Anhang unter 9.1.21.4.) Sind mehrere Banden zu sehen, wird die Bande erneut präparativ rausgeschnitten. Im Anschluss werden die Proben zur Sequenzierung geschickt.

7.16.4. Verschachtelte PCR (*nested PCR*)

Um die DNA-Sequenzen aus Chiasamen zu verifizieren, wird die verschachtelte PCR (*nested PCR*) nach Entwerfen neuer Primer innerhalb der Ursprungsequenz mittels des Tools *Primer3Plus* durchgeführt (siehe Anhang unter 9.1.22.7.). Als Matrize für die PCR wird die Chiasamen-DNA verwendet. Die Auswertung der erhaltenen DNA-Sequenzen wird anhand des Tools NCBI-BLAST durchgeführt.

8. Literaturverzeichnis

- Aalberse, R. C. (2000). Structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol* 106, 228-238.
- Aalberse, R. C., and Van Ree, R. (2000). Monoclonal antibody assays for allergens: pick your antibodies with care! *J Allergy Clin Immunol* 106, 625-626.
- AAS, K., Backmann, A., Belin, L., and 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.
- Achouri, Allaoua, and Boye, Joyce (2013). Thermal processing, salt and high pressure treatment effects on molecular structure and antigenicity of sesame protein isolate. *Food Research International* 53, 240–251.
- Aebbersold, R., and Goodlett, D. R. (2001). Mass spectrometry in proteomics. *Chemical reviews* 101, 269-295.
- Altmann, F. (2007). The role of protein glycosylation in allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 142, 99-115.
- Andorf, S., Borres, M. P., Block, W., Tupa, D., Bollyky, J. B., Sampath, V., Elizur, A., Lidholm, J., Jones, J. E., Galli, S. J., *et al.* (2017). Association of Clinical Reactivity with Sensitization to Allergen Components in Multifood-Allergic Children. *The journal of allergy and clinical immunology. In practice* 5, 1325-1334 e1324.
- Andre, F., Andre, C., Colin, L., Caccaraci, F., and Cavagna, S. (1994). Role of new allergens and of allergen consumption in the increased incidence of food sensitizations in France. *Toxicology* 93, 77-83.
- Aulepp, H., and Vieths, S. (1992). Probleme der Nahrungsmittelallergie. *Dtsch Lebensm Rundsch* 88, 171-179.
- Ayerza, R. (2009). The seed's protein and oil content, fatty acid composition, and growing cycle length of a single genotype of chia (*Salvia hispanica* L.) as affected by environmental factors. *Journal of oleo science* 58, 347-354.
- Barral, DC., and Brenner, MB. (2007). CD1 antigen presentation: how it works. *Nat Rev Immunol* 7, 929–941.
- Barre, A., Jacquet, G., Sordet, C., Culerrier, R., and Rouge, P. (2007). Homology modelling and conformational analysis of IgE-binding epitopes of Ara h 3 and other legumin allergens with a cupin fold from tree nuts. *Mol Immunol* 44, 3243-3255.
- Barre, A., Sordet, C., Culerrier, R., Rance, F., Didier, A., and Rouge, P. (2008). Vicilin allergens of peanut and tree nuts (walnut, hazelnut and cashew nut) share structurally related IgE-binding epitopes. *Mol Immunol* 45, 1231-1240.
- Bemelmans, W. J., Broer, J., Feskens, E. J., Smit, A. J., Muskiet, F. A., Lefrandt, J. D., Bom, V. J., May, J. F., and Meyboom-de Jong, B. (2002). Effect of an increased intake of alpha-linolenic acid and group nutritional education on cardiovascular risk factors: the Mediterranean Alpha-linolenic Enriched Groningen Dietary Intervention (MARGARIN) study. *Am J Clin Nutr* 75, 221-227.
- Benito, M., Jorro, G., Morales, C., Pelaez, A., and Fernandez, A. (1996). Labiatae allergy: systemic reactions due to ingestion of oregano and thyme. *Ann Allergy Asthma Immunol* 76, 416-418.
- Berg, J. M., Tymoczko, J., and Stryer, L. (2013). *Biochemie*, Vol 7. Auflage (Berlin Heidelberg, Springer-Verlag).
- Beyer, K., Bardina, L., Grishina, G., and Sampson, H. A. (2002). Identification of sesame seed allergens by 2-dimensional proteomics and Edman sequencing: seed storage proteins as common food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 110, 154-159.
- Beyer, K., Bardina, L., Grishina, G., Sampson, H. A. (2002). Identification of Four Major Sesame Seed Allergens by 2D-Proteomics and Edman Sequencing - Seed Storage Proteins as Common Food Allergens. *J ALLERGY CLIN IMMUNOL* 880.
- Beyer, K., Grishina, G., Bardina, L., and Sampson, H. A. (2007). Identification of 2 new sesame seed allergens: Ses i 6 and Ses i 7. *J Allergy Clin Immunol* 119, 1554-1556.

- Beyer, K., Morrow, E., Li, X. M., Bardina, L., Bannon, G. A., Burks, A. W., and Sampson, H. A. (2001). Effects of cooking methods on peanut allergenicity. *J Allergy Clin Immunol* 107, 1077-1081.
- BfR, Bundesinstitut für Risikobewertung (2011). Stellungnahme Nr. 039/2011 des BfR vom 26. August 2011; Allergie durch Lupineneiweiß in Lebensmitteln. <https://mobil.bfr.bund.de/cm/343/allergie-durch-lupineneiweiss-in-lebensmitteln.pdf>. Stand 28.12.2019.
- BfR, Bundesinstitut für Risikobewertung (2017). Gesundheitliche Bewertung funktioneller Lebensmittel. http://www.bfr.bund.de/de/gesundheitliche_bewertung_funktioneller_lebensmittel-152.html. Stand 28.12.2018.
- BfR, Bundesinstitut für Risikobewertung (2019). Chiasamen, Weitere Informationen zu Chiasamen. <https://www.bzfe.de/inhalt/chiasamen-554.html>.
- Biedermann, T., Heppt, W., Renz, H., and Röcken, M. (2016a). *Allergologie* (Berlin-Heidelberg, Springer), 194-196.
- Biedermann, T., Heppt, W., Renz, H., and Röcken, M. (2016b). *Allergologie* (Berlin-Heidelberg, Springer), 178.
- Biedermann, T., Heppt, W., Renz, H., and Röcken, M. (2016c). *Allergologie* (Berlin-Heidelberg, Springer), 183.
- Biedermann, T., Heppt, W., Renz, H., and Röcken, M. (2016d). *Allergologie* (Berlin-Heidelberg, Springer), 353.
- Bjorck, L. (1988). Protein L. A novel bacterial cell wall protein with affinity for Ig L chains. *J Immunol* 140, 1194-1197.
- Bjorck, L., and Kronvall, G. (1984). Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. *J Immunol* 133, 969-974.
- Blankestijn, M. A., Blom, W. M., Otten, H. G., Baumert, J. L., Taylor, S. L., Bruijnzeel-Koomen, C. A., Houben, G. F., Knulst, A. C., and Klemans, R. J. (2017). Specific IgE to Jug r 1 has no additional value compared with extract-based testing in diagnosing walnut allergy in adults. *J Allergy Clin Immunol* 139, 688-690 e684.
- Boehm, J. D., Jr., Nguyen, V., Tashiro, R. M., Anderson, D., Shi, C., Wu, X., Woodrow, L., Yu, K., Cui, Y., and Li, Z. (2018). Genetic mapping and validation of the loci controlling 7S alpha' and 11S A-type storage protein subunits in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* 131, 659-671.
- Boldt, A. (2005). Charakterisierung der Erdnussallergene Ara h 1, Ara h 3/4 und ihrer Isoformen. In *Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät (Lübeck, Universität zu Lübeck)*.
- Bourgeois, M., Jacquin, F., Savoie, V., Sommerer, N., Labas, V., Henry, C., and Burstin, J. (2009). Dissecting the proteome of pea mature seeds reveals the phenotypic plasticity of seed protein composition. *Proteomics* 9, 254-271.
- Boyce, J. A., Assa'a, A., Burks, A. W., Jones, S. M., Sampson, H. A., Wood, R. A., Plaut, M., Cooper, S. F., Fenton, M. J., Arshad, S. H., *et al.* (2011). Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: summary of the NIAID-Sponsored Expert Panel Report. *Nutrition* 27, 253-267.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Breiteneder, H., and Mills, E. N. (2005). Molecular properties of food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 115, 14-23; quiz 24.
- Breton, C. V., Byun, H. M., Wenten, M., Pan, F., Yang, A., and Gilliland, F. D. (2009). Prenatal tobacco smoke exposure affects global and gene-specific DNA methylation. *American journal of respiratory and critical care medicine* 180, 462-467.
- Brostoff, J. (1987). Enzyme deficiency and food allergy. *The Practitioner* 231, 600-605.
- Brutsch, L., Stringer, F. J., Kuster, S., Windhab, E. J., and Fischer, P. (2019). Chia seed mucilage - a vegan thickener: isolation, tailoring viscoelasticity and rehydration. *Food & function* 10, 4854-4860.
- Burks, A. W., Tang, M., Sicherer, S., Muraro, A., Eigenmann, P. A., Ebisawa, M., Fiocchi, A., Chiang, W., Beyer, K., Wood, R., *et al.* (2012). ICON: food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 129, 906-920.

- Burks, A. W., Williams, L. W., Helm, R. M., Thresher, W., Brooks, J. R., and Sampson, H. A. (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. *Advances in experimental medicine and biology* 289, 295-307.
- Cahill, J. P. (2004). diversity among varieties of chia (*Salvia hispanica* L.). *Genetic Res. Crop. Evol* 51, 773-781.
- Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G. M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L., and Righetti, P. G. (2004). Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 25, 1327-1333.
- Ceska, M., and Lundkvist, U. (1972). New and Simple Radioimmunoassay Method for Determination of Ige. *Immunochemistry* 9, 1021-+.
- Chruszcz, M., Maleki, S. J., Majorek, K. A., Demas, M., Bublin, M., Solberg, R., Hurlburt, B. K., Ruan, S., Mattison, C. P., Breiteneder, H., and Minor, W. (2011). Structural and immunologic characterization of Ara h 1, a major peanut allergen. *J Biol Chem* 286, 39318-39327.
- Chung, S. Y., Butts, C. L., Maleki, S. J., and Champagne, E. T. (2003). Linking peanut allergenicity to the processes of maturation, curing, and roasting. *J Agric Food Chem* 51, 4273-4277.
- Clements, R. L. (1965). Fruit proteins: extraction and electrophoresis. *Anal Biochem* 13, 390-401.
- Coombs, RRA., and Gell, PGH. (1963). The classification of allergic reactions underlying disease (Philadelphia, Davis), 317.
- Coquet, L., Cosette, P., and Jouenne, T. (2004). The use of 24 cm, pH 3-11 NL Immobiline DryStrips gels improves protein separation. *Life Science News Amersham Biosciences* 18.
- Crespo, J. F., and Rodriguez, J. (2003). Food allergy in adulthood. *Allergy* 58, 98-113.
- Cucu, T., Platteau, C., Taverniers, I., Devreese, B., de Loose, M., and de Meulenaer, B. (2011). ELISA detection of hazelnut proteins: effect of protein glycation in the presence or absence of wheat proteins. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 28, 1-10.
- Davies, J. M., Voskamp, A., Dang, T. D., Pettit, B., Loo, D., Petersen, A., Hill, M. M., Upham, J. W., Rolland, J. M., and O'Hehir, R. E. (2011). The dominant 55 kDa allergen of the subtropical Bahia grass (*Paspalum notatum*) pollen is a group 13 pollen allergen, Pas n 13. *Mol Immunol* 48, 931-940.
- de Leon, M. P., Glaspole, I. N., Drew, A. C., Rolland, J. M., O'Hehir, R. E., and Suphioglu, C. (2003). Immunological analysis of allergenic cross-reactivity between peanut and tree nuts. *Clin Exp Allergy* 33, 1273-1280.
- Derbyshire, E., Wright, D.J., and Boulter, D. (1976). Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. *ELSEVIER* 15, 3-24.
- Dermapharm, A. G. (2019). So agieren die Immunzellen bei einer allergischen Sofortreaktion (Typ I). <https://www.dermapharm.de/gesundheit/allergien/pathophysiologie.html>. Stand: 28.12.2019.
- Do, T. H. T., Martinoia, E., and Lee, Y. (2018). Functions of ABC transporters in plant growth and development. *Current opinion in plant biology* 41, 32-38.
- DocCheck, Medical Services GmbH. (2019). Allergie. https://flexikon.doccheck.com/de/Allergie#Klinische_Einteilung. Stand 28.12.2019.
- Dramiga, J. (2017). Dna-base-flipping.svg. S.d.W.V. mbH, ed. (Heidelberg).
- Dreborg, S., Bousquet, J., Löwenstein, H., and Frew, AJ. (1994). Reponse to what is a "major" allergen? *Clin Exp Allergy* 24, 610-611.
- Dunwell, J. M., Purvis, A., and Khuri, S. (2004). Cupins: the most functionally diverse protein superfamily? *Phytochemistry* 65, 7-17.
- Dziuba, J., Szerszunowicz, I., Nalecz, D., and Dziuba, M. (2014). Proteomic analysis of albumin and globulin fractions of pea (*Pisum sativum* L.) seeds. *Acta scientiarum polonorum. Technologia alimentaria* 13, 181-190.
- EAACI, European Academy of Allergy & Clinical Immunology (2013). LEBENSMITTELALLERGIE UND ANAPHYLAXIE ÖFFENTLICHE ERKLÄRUNG. <http://www.eaaci.org/attachments/131119%20EAACI%20Allergens%20Brochure%20ALEMAN.pdf>.

- EAACI, European Academy of Allergy & Clinical Immunology (2015). Tackling the Allergy Crisis in Europe - Concerted Policy Action Needed. https://www.eaaci.org/documents/EAACI_Advocacy_Manifesto.pdf.
- Ebo, D. G., and Stevens, W. J. (2002). IgE-mediated natural rubber latex allergy: practical considerations for health care workers. *Ann Allergy Asthma Immunol* 88, 568-575.
- EFSA, European Food Safety Authority (2009a). Scientific Opinion of the Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies on a request from the European Commission on the safety of 'Chia seed (*Salvia hispanica*) and ground whole Chia seed' as a food ingredient. *EFSA J.*, 1–2.
- EFSA, European Food Safety Authority (2009b). Opinion on the safety of 'Chia seeds (*Salvia hispanica* L.) and ground whole Chia seeds' as a food ingredient. *The EFSA Journal* 996, 1-26.
- EFSA, European Food Safety Authority (2014). Scientific Opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purposes. *The EFSA Journal* 12.
- EFSA, European Food Safety Authority (2019). Safety of chia seeds (*Salvia hispanica* L.) as a novel food for extended uses pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. *The EFSA Journal* 5657, 1-17.
- EFSA, European Food Safety Authority (2005). Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission related to the safety of chia (*Salvia hispanica* L.) seed and ground whole chia seed as a novel food ingredient intended for use in bread. *The EFSA Journal* 278, 1-12.
- Eigenmann, P. A., Burks, A. W., Bannon, G. A., and Sampson, H. A. (1996). Identification of unique peanut and soy allergens in sera adsorbed with cross-reacting antibodies. *J Allergy Clin Immunol* 98, 969-978.
- Elizur, A., Appel, M. Y., Nachshon, L., Levy, M. B., Epstein-Rigbi, N., Golobov, K., and Goldberg, M. R. (2018). NUT Co Reactivity - ACquiring Knowledge for Elimination Recommendations (NUT CRACKER) study. *Allergy* 73, 593-601.
- Faeste, C. K., Namork, E., and Lindvik, H. (2009). Allergenicity and antigenicity of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) proteins in foods. *J Allergy Clin Immunol* 123, 187-194.
- Fling, S. P., and Gregerson, D. S. (1986). Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal Biochem* 155, 83-88.
- Fontes, E. P., Moreira, M. A., Davies, C. S., and Nielsen, N. C. (1984). Urea-Elicited Changes in Relative Electrophoretic Mobility of Certain Glycinin and beta-Conglycinin Subunits. *Plant Physiol* 76, 840-842.
- Frey, A., Meckelein, B., Externest, D., and Schmidt, M. A. (2000). A stable and highly sensitive 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine-based substrate reagent for enzyme-linked immunosorbent assays. *Journal of immunological methods* 233, 47-56.
- Frias, J., Song, Y. S., Martinez-Villaluenga, C., Gonzalez de Mejia, E., and Vidal-Valverde, C. (2008). Immunoreactivity and amino acid content of fermented soybean products. *J Agric Food Chem* 56, 99-105.
- Garcia Jimenez, S., Pastor Vargas, C., de las Heras, M., Sanz Maroto, A., Vivanco, F., and Sastre, J. (2015). Allergen characterization of chia seeds (*Salvia hispanica*), a new allergenic food. *Journal of investigational allergology & clinical immunology* 25, 55-56.
- GE-Healthcare (2020). Ion Exchange Chromatography. <https://www.gelifesciences.com/en/us/support/handbooks>.
- Gillespie, D. N., Nakajima, S., and Gleich, G. J. (1976). Detection of allergy to nuts by the radioallergosorbent test. *J Allergy Clin Immunol* 57, 302-309.
- Glaspole, I. N., de Leon, M. P., Rolland, J. M., and O'Hehir, R. E. (2007). Anaphylaxis to lemon soap: citrus seed and peanut allergen cross-reactivity. *Ann Allergy Asthma Im* 98, 286-289.
- Graille, M., Stura, E. A., Corper, A. L., Sutton, B. J., Taussig, M. J., Charbonnier, J. B., and Silverman, G. J. (2000). Crystal structure of a *Staphylococcus aureus* protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5399-5404.
- Gruber, P., Suhr, M., Frey, A., Becker, W. M., and Hofmann, T. (2004). Development of an epitope-specific analytical tool for the major peanut allergen Ara h 2 using a high-density multiple-antigenic peptide strategy. *Mol Nutr Food Res* 48, 449-458.

- Guillamon, E., Rodriguez, J., Burbano, C., Muzquiz, M., Pedrosa, M. M., Cabanillas, B., Crespo, J. F., Sancho, A. I., Mills, E. N., and Cuadrado, C. (2010). Characterization of lupin major allergens (*Lupinus albus* L.). *Mol Nutr Food Res* 54, 1668-1676.
- Guttmann, A. (1996). Capillar sodium dodecyl-sulfate gel electrophoresis of proteins. *Elektrophoresis* 17, 1333-1341.
- Halligan, B. D., Ruotti, V., Jin, W., Laffoon, S., Twigger, S. N., and Dratz, E. A. (2004). ProMoST (Protein Modification Screening Tool): a web-based tool for mapping protein modifications on two-dimensional gels. *Nucleic Acids Res* 32, W638-644.
- Hansen, K. S., Ballmer-Weber, B. K., Luttkopf, D., Skov, P. S., Wuthrich, B., Bindslev-Jensen, C., Vieths, S., and Poulsen, L. K. (2003). Roasted hazelnuts--allergenic activity evaluated by double-blind, placebo-controlled food challenge. *Allergy* 58, 132-138.
- Hegenauer R, H.M. (1994). *Chemotaxonomie der Pflanze* (BASEL, BIRKHÄUSER VERLAG).
- Helm, R.-M., Cockrell, G., Connaughton, C., and Bannon, G.-A. (2000). Soybean G2 glycinin allergen 2. Identification and characterization. *Int. Arch. Allergy Immunol* 123, 213-219.
- Henzgen, M., Vieths, S., Reese, I., Erdmann, S., Fuchs, T., Jäger, L., Kleine-Tebbe, J., Lepp, U., Niggemann, B., Saloga, J., *et al.* (2005). Nahrungsmittelallergien durch immunologische Kreuzreaktionen. *Allergo J.* 14, 48-59.
- Heukeshoven, J, and Dernick, R (1986). Neue Ergebnisse zum Mechanismus der Silberfärbung. Radola, B.J. (Ed.) *Elektrophoreseforum*, 22-27.
- Hilu, K. W., Borsch, T., Muller, K., Soltis, D. E., Soltis, P. S., Savolainen, V., Chase, M. W., Powell, M. P., Alice, L. A., Evans, R., *et al.* (2003). Angiosperm phylogeny based on *matK* sequence information. *Am J Bot* 90, 1758-1776.
- Hinghofer-Szalkay, H. (2019). Hypersensitivitätsreaktionen. http://physiologie.cc/Coombs_Gell.html. Stand 28.12.2019.
- Holtzhauer, M. (1997). *Biochemische Labormethoden*, Vol 3. Auflage (Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag), 121-123.
- Hoppe, S. (2006). Charakterisierung von Allergenen der Litchi. In Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie (Hamburg, Universität Hamburg).
- Horton, H. R., Moran, L. A., Scrimgeour, K. G., Perry, M. D., and Rawn, J. D. (2010). *Biochemie*, Vol 4. Auflage (München, Pearson Verlag).
- Horton, R. E., and Vidarsson, G. (2013). Antibodies and their receptors: different potential roles in mucosal defense. *Frontiers in immunology* 4, 200.
- Hsiao, E. S., Lin, L. J., Li, F. Y., Wang, M. M., Liao, M. Y., and Tzen, J. T. (2006). Gene families encoding isoforms of two major sesame seed storage proteins, 11S globulin and 2S albumin. *J Agric Food Chem* 54, 9544-9550.
- HU, F. B. (2002). Dietary Patterns Analysis: A New Direction in Nutritional Epidemiology. *Current Opinion Lipidology* 13, 3-9.
- Huby, RDJ., Dearman, RJ., and Kimber, I. (2000). Why are some proteins allergens? *Toxicological Sciences*. 55, 235-246.
- Hunzinger, C., Schratzenholz, A., Poznanovic, S., Schwall, G. P., and Stegmann, W. (2006). Comparison of different separation technologies for proteome analyses: isoform resolution as a prerequisite for the definition of protein biomarkers on the level of posttranslational modifications. *Journal of chromatography. A* 1123, 170-181.
- Ixtania, V., Martínez, M., Sportorno, V., Mateo, M., Maestri, D., Diehl, B., Nolasco, S., and Tomás, M. (2011). Characterization of chia seed oils by pressing and solvent extraction. *J. Food Compos. Anal* 24, 166-174.
- Janeway, CA., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M. (2002). *Immunologie*, Vol 5. Auflage (Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag).
- Janeway, JR. CA. (1993). *Das molekulare Arsenal des Immunsystems* (Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag), 22-29.

- Jimenez, S. G., Vargas, C. P., de las Heras, M., Maroto, A. S., Vivanco, F., and Sastre, J. (2015). Allergen Characterization of Chia Seeds (*Salvia hispanica*), a New Allergenic Food. *J Invest Allerg Clin* 25, 55-56.
- Jin, F., Nieman, D. C., Sha, W., Xie, G., Qiu, Y., and Jia, W. (2012). Supplementation of milled chia seeds increases plasma ALA and EPA in postmenopausal women. *Plant foods for human nutrition* 67, 105-110.
- Jin, T., Guo, F., Chen, Y. W., Howard, A., and Zhang, Y. Z. (2009). Crystal structure of Ara h 3, a major allergen in peanut. *Mol Immunol* 46, 1796-1804.
- Jung, R., Scott, M. P., Nam, Y. W., Beaman, T. W., Bassuner, R., Saalbach, I., Muntz, K., and Nielsen, N. C. (1998). The role of proteolysis in the processing and assembly of 11S seed globulins. *The Plant cell* 10, 343-357.
- Jyothi, T. C., Singh, S. A., and Rao, A. G. (2007). Conformation of Napin (*Brassica juncea*) in salts and monohydric alcohols: contribution of electrostatic and hydrophobic interactions. *J Agric Food Chem* 55, 4229-4236.
- Kazatsky, A. M., and Wood, R. A. (2016). Classification of Food Allergens and Cross-Reactivity. *Current allergy and asthma reports* 16, 22.
- Khyse-Andersen, J. (1984). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 10, 203-209.
- Kim, E. J., Kwon, J. W., Lim, Y. M., Yoon, D., Seo, J. H., Chang, W. S., Kim, H. Y., Park, J. W., Cho, S. H., Hong, S. J., and Lee, J. S. (2013). Assessment of Total/Specific IgE Levels Against 7 Inhalant Allergens in Children Aged 3 to 6 Years in Seoul, Korea. *Allergy, asthma & immunology research* 5, 162-169.
- King, T. P., Hoffman, D., Lowenstein, H., Marsh, D. G., Platts-Mills, T. A., and Thomas, W. (1994). Allergen nomenclature. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee. *Int Arch Allergy Immunol* 105, 224-233.
- Kleber, N., Krause, I., Illgner, S., and Hinrichs, J. (2004). The antigenic response of β -lactoglobulin is modulated by thermally induced aggregation. *Eur Food Res Technol* 219, 105-110.
- Klein, J. (1991). *Immunologie, Vol 2. Auflage* (Weinheim, Verlag Chemie).
- Klimek, L., Vogelberg, C., and Werfel, T. (2019). *Weißbuch Allergie in Deutschland, Vol 4. überarbeitete und erweiterte Auflage 2019* (Springer Medizin Verlag).
- Kolaskar, A. S., and Tongaonkar, P. C. (1990). A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett* 276, 172-174.
- Koppelman, S. J., Knol, E. F., Vlooswijk, R. A., Wensing, M., Knulst, A. C., Hefle, S. L., Gruppen, H., and Piersma, S. (2003). Peanut allergen Ara h 3: isolation from peanuts and biochemical characterization. *Allergy* 58, 1144-1151.
- Kortt, A. A., Oddie, G. W., Iliades, P., Gruen, L. C., and Hudson, P. J. (1997). Nonspecific amine immobilization of ligand can be a potential source of error in BIAcore binding experiments and may reduce binding affinities. *Anal Biochem* 253, 103-111.
- Kreft, D., Bauer, R., and Goerlich, R. (1995). *Nahrungsmittelallergene* (Berlin, New York, de Gruyter).
- Kubo, K., and Takagi, T. (1986). Binding of lithium dodecyl sulfate to polyacrylamide gel at 4 degrees C perturbs electrophoresis of proteins. *Anal Biochem* 156, 11-16.
- L'Hocine, L., Boye, J. I., and Jouve, S. (2007). Ionic strength and pH-induced changes in the immunoreactivity of purified soybean glycinin and its relation to protein molecular structure. *J Agric Food Chem* 55, 5819-5826.
- Le Signor, C., Aime, D., Bordat, A., Belghazi, M., Labas, V., Gouzy, J., Young, N. D., Prospero, J. M., Leprince, O., Thompson, R. D., *et al.* (2017). Genome-wide association studies with proteomics data reveal genes important for synthesis, transport and packaging of globulins in legume seeds. *The New phytologist* 214, 1597-1613.
- Le Signor, C., Gallardo, K., Prospero, J. M., Salon, C., Quillien, L., Thompson, R., and Duc, G. (2005). Genetic diversity for seed protein composition in *Medicago truncatula*. *Plant Genet. Resour.* 3, 59-71.

- Lichtenstein, L. M. (1993). Allergy and the immune system. *Scientific American* 269, 116-124.
- Lim, H., Eng, J., Yates, J. R., 3rd, Tollaksen, S. L., Giometti, C. S., Holden, J. F., Adams, M. W., Reich, C. I., Olsen, G. J., and Hays, L. G. (2003). Identification of 2D-gel proteins: a comparison of MALDI/TOF peptide mass mapping to mu LC-ESI tandem mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 14, 957-970.
- Lin, J., Shewry, P. R., Archer, D. B., Beyer, K., Niggemann, B., Haas, H., Wilson, P., and Alcocer, M. J. (2006). The potential allergenicity of two 2S albumins from soybean (*Glycine max*): a protein microarray approach. *Int Arch Allergy Immunol* 141, 91-102.
- Little, M. (2015). *Antikörper in der Krebsbekämpfung* (Berlin, Heidelberg, Springer), 17-22.
- Liu, Y., Wu, X., Hou, W., Li, P., Sha, W., and Tian, Y. (2017). Structure and function of seed storage proteins in faba bean (*Vicia faba* L.). *3 Biotech* 7, 74.
- Löffler, G., Petrides, P., and Heinrich, P. (2007). *Biochemie und Pathobiochemie*, Vol 8. völlig neu bearbeitete Auflage (Heidelberg, Springer Medizin Verlag).
- Lottspeich, F., and Engels, J. W. (2012). *Bioanalytik* (Springer Spektrum).
- Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M., and Myrtek, D. (2009). *Experimentator*, Vol 3. Auflage (Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag).
- Lycett, G. W., Delauney, A. J., Gatehouse, J. A., Gilroy, J., Croy, R. R., and Boulter, D. (1983). The vicilin gene family of pea (*Pisum sativum* L.): a complete cDNA coding sequence for preprovicilin. *Nucleic Acids Res* 11, 2367-2380.
- Maier, HG. (1990). *Lebensmittel- und Umweltanalytik* (Darmstadt, Steinkopff Verlag).
- Maloney, JM., Rudengren, M., Ahlstedt, S., Bock, SA., and Sampson, HA. (2008). The use of serum-specific IgE measurements for the diagnosis of peanut, tree nut, and seed allergy. *J Allergy Clin Immunol* 122, 145-151.
- Mari, A., Iacovacci, P., Afferni, C., Barletta, B., Tinghino, R., Di Felice, G., and Pini, C. (1999). Specific IgE to cross-reactive carbohydrate determinants strongly affect the in vitro diagnosis of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 103, 1005-1011.
- Marzban, G., Herndl, A., Kolarich, D., Maghuly, F., Mansfeld, A., Hemmer, W., Katinger, H., and Laimer, M. (2008). Identification of four IgE-reactive proteins in raspberry (*Rubus idaeus* L.). *Mol Nutr Food Res* 52, 1497-1506.
- Matissek, R., Steiner, G., and Fischer, M. (2010). *Lebensmittelanalytik*, Vol vierte, vollständig überarbeitete Auflage.
- Mayer, E., Gescheidt-Shoshany, H., and Weltfriend, S. (2011). Allergic contact dermatitis caused by *Salvia officinalis* extract. *Contact dermatitis* 64, 237-238.
- Maziak, W., Behrens, T., Brasky, TM., Duhme, H., Rzehak, P., Weiland, SK., and Keil, U. (2003). Are asthma and allergies in children and adolescents increasing? Results from ISAAC phase I and phase III surveys in Münster, Germany. *Allergy* 58, 572-579.
- McEvily, A. J., Iyengar, R., and Otwell, W. S. (1992). Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Critical reviews in food science and nutrition* 32, 253-273.
- Michalski, A., Damoc, E., Hauschild, J. P., Lange, O., Wieghaus, A., Makarov, A., Nagaraj, N., Cox, J., Mann, M., and Horning, S. (2011). Mass spectrometry-based proteomics using Q Exactive, a high-performance benchtop quadrupole Orbitrap mass spectrometer. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 10, M111 011015.
- Mills, E. N., Huang, L., Noel, T. R., Gunning, A. P., and Morris, V. J. (2001). Formation of thermally induced aggregates of the soya globulin beta-conglycinin. *Biochim Biophys Acta* 1547, 339-350.
- Mills, E. N., and Mackie, A. R. (2008). The impact of processing on allergenicity of food. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 8, 249-253.
- Mills, E. N., Marigheto, N. A., Wellner, N., Fairhurst, S. A., Jenkins, J. A., Mann, R., and Belton, P. S. (2003). Thermally induced structural changes in glycinin, the 11S globulin of soya bean (*Glycine max*)-an in situ spectroscopic study. *Biochim Biophys Acta* 1648, 105-114.
- Möller, M. (1997). Charakterisierung von Allergenen tropischer Früchte unter Berücksichtigung von Kreuzreaktionen. In *Lebensmittelchemie* (Universität Hamburg).

- Möller, M., Paschke, A., Vieluf, D., Kayma, M., Vieths, S., and 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.
- Mondoulet, L., Paty, E., Drumare, M. F., Ah-Leung, S., Scheinmann, P., Willemot, R. M., Wal, J. M., and Bernard, H. (2005). Influence of thermal processing on the allergenicity of peanut proteins. *J Agric Food Chem* 53, 4547-4553.
- Moser, A. C., and Hage, D. S. (2010). Immunoaffinity chromatography: an introduction to applications and recent developments. *Bioanalysis* 2, 769-790.
- Muñoz, L. A., Cobos, A., Diaz, O., and Aguilera, J. M. (2012). Chia seeds: microstructure, mucilage extraction and hydration. *Int. J. Food Eng.* 108, 216-224.
- Muntz, K. (1998). Deposition of storage proteins. *Plant Mol Biol* 38, 77-99.
- Nadal, P., Canela, N., Katakis, I., and O'Sullivan, C. K. (2011). Extraction, isolation, and characterization of globulin proteins from *Lupinus albus*. *J Agric Food Chem* 59, 2752-2758.
- Navuluri, L., Parvataneni, S., Hassan, H., Birmingham, N. P., Kelly, C., and Gangur, V. (2006). Allergic and anaphylactic response to sesame seeds in mice: identification of Ses i 3 and basic subunit of 11s globulins as allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 140, 270-276.
- Nikokyris, P. N., and Kandyliis, K. (1997). Feed protein fractions in various solvents of ruminant feedstuffs. *Journal of the science of food and agriculture* 75, 198-204.
- Novak, N., and Bieber, T. (2003). Allergic and nonallergic forms of atopic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 112, 252-262.
- Nwaru, B. I., Hickstein, L., Panesar, S. S., Muraro, A., Werfel, T., Cardona, V., Dubois, A. E., Halken, S., Hoffmann-Sommergruber, K., Poulsen, L. K., *et al.* (2014). The epidemiology of food allergy in Europe: a systematic review and meta-analysis. *Allergy* 69, 62-75.
- O'Kane, F. E., Happe, R. P., Vereijken, J. M., Gruppen, H., and van Boekel, M. A. (2004). Characterization of pea vicilin. 1. Denoting convicilin as the alpha-subunit of the *Pisum* vicilin family. *J Agric Food Chem* 52, 3141-3148.
- Olivos-Lugo, B.L., Valdivia-Lopez, M.A., and Tecante, A. (2010). Thermal and physicochemical properties and nutritional value of the protein fraction of Mexican chia seed. *Food Science and Technology International* 61, 89-96.
- Osborne, T. B. (1924). *The Vegetable Proteins*. Longmans.
- Otto, M. (2011). *Analytische Chemie*. In (Weinheim: Wiley-VCH).
- Paiva, M., Piedade, S., and Gaspar, A. (2010). Toothpaste-induced anaphylaxis caused by mint (*Mentha*) allergy. *Allergy* 65, 1201-1202.
- Pastorello, E. A., Pompei, C., Pravettoni, V., Farioli, L., Calamari, A. M., Scibilia, J., Robino, A. M., Conti, A., Iametti, S., Fortunato, D., *et al.* (2003). Lipid-transfer protein is the major maize allergen maintaining IgE-binding activity after cooking at 100 degrees C, as demonstrated in anaphylactic patients and patients with positive double-blind, placebo-controlled food challenge results. *J Allergy Clin Immunol* 112, 775-783.
- Peiretti, P. G., and GAI, F. (2009). Fatty Acid and Nutritive Quality of Chia (*Salvia hispanica* L.) Seeds and Plant During Growth. *Animal Feed Science and Technology* 148, 267-275.
- Polson, A., Potgieter, G. M., Largier, J. F., Mears, G. E., and Joubert, F. J. (1964). The Fractionation of Protein Mixtures by Linear Polymers of High Molecular Weight. *Biochim Biophys Acta* 82, 463-475.
- Poudyal, H., Panchal, S. K., Waanders, J., Ward, L., and Brown, L. (2012). Lipid redistribution by alpha-linolenic acid-rich chia seed inhibits stearoyl-CoA desaturase-1 and induces cardiac and hepatic protection in diet-induced obese rats. *The Journal of nutritional biochemistry* 23, 153-162.
- Quiroga, A., Martinez, E. N., Rogniaux, H., Geairon, A., and Anon, M. C. (2010). Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) vicilin subunit structure. *J Agric Food Chem* 58, 12957-12963.
- Radauer, C., and Breiteneder, H. (2007). Evolutionary biology of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 120, 518-525.

- Rahman, M; de Camargo, A; Shahidi, F. (2017). Phenolic and polyphenolic profiles of chia seeds and their in vitro biological activities. *Journal of Functional Foods* 35, 622-634.
- Rehm, H., and Letzel, T. (2010). *Der Experimentator Proteinbiochemie. Proteomics 6. Auflage.*
- Reitsma, M., Bastiaan-Net, S., Sforza, S., van der Valk, J. P., van Gerth van Wijk, R., Savelkoul, H. F., de Jong, N. W., and Wichers, H. J. (2016). Purification and Characterization of *Anacardium occidentale* (Cashew) Allergens Ana o 1, Ana o 2, and Ana o 3. *J Agric Food Chem* 64, 1191-1201.
- Restani, P., Balladio, C., Corsini, E., and Fiocchi, A. (2005). Identification of the basic subunit of Ara h 3 as the major allergen in a group of children allergic to peanuts. *Ann. Allergy Asthma Immunol* 94, 262–266.
- Richter, G. (2003). *Praktische Biochemie : Grundlagen und Techniken* (Stuttgart Georg Thieme Verlag), 78-79.
- Ring, J. F.T., and Schultze-Werninghaus, G. (2004). *Weißbuch Allergie in Deutschland* (Germany, Urban & Vogel Medien und Medizin Verlagsgesellschaft mbH & Co KG München).
- Ring, J., Krämer, U., Schäfer, T., and Behrendt, H. (2001). Why are allergies increasing? . *Curr. Opin. Immunol.* 13, 701-708.
- Roitt, IM. (1993). *Leitfaden der Immunologie, Vol 4. Auflage* (Berlin, Blackwell Wissenschaft).
- Rona, R. J., Keil, T., Summers, C., Gislason, D., Zuidmeer, L., Sodergren, E., Sigurdardottir, S. T., Lindner, T., Goldhahn, K., Dahlstrom, J., *et al.* (2007). The prevalence of food allergy: a meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol* 120, 638-646.
- Salazar, F., Sewell, H. F., Shakib, F., and Ghaemmaghami, A. M. (2013). The role of lectins in allergic sensitization and allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 132, 27-36.
- Sandoval-Oliveros, M., and Paredes-Lopez, O. (2013). Isolation and Characterization of Proteins from Chia Seeds (*Salvia hispanica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61, 193-201.
- Sathe, S. K., and Sharma, G. M. (2009). Effects of food processing on food allergens. *Mol Nutr Food Res* 53, 970-978.
- Schnuch, A., Geier, J., Lessmann, H., Uter, W., Brasch, W., and Frosch, P. J. (2004). Kontaktallergene im aktuellen Zeitverlauf. *Allergo J.* 13, 57-69.
- Schnyder, B., and Pichler, W. (1999). Nahrungsmittelintoleranz und Nahrungsmittelallergie. *Schweiz. Med. Wochenschr* 129, 928-933.
- Schochetman, G., Ou, C.-Y., and Jones, W. K. (1988). Polymerase Chain Reaction. *The Journal of Infectious Diseases* 158, 1154-1157.
- Schocker, F. (2002). *Nahrungsmittelallergien: Identifizierung und Charakterisierung von nichtbirkenpollenassoziierten Allergenen der Haselnuss.* . (Kiel).
- Shewry, P. R., Halford, N. G., Belton, P. S., and Tatham, A. S. (2002). The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 357, 133-142.
- Smeekens, J. M., Bagley, K., and Kulis, M. (2018). Tree nut allergies: Allergen homology, cross-reactivity, and implications for therapy. *Clin Exp Allergy* 48, 762-772.
- Stadler, M. (2004). Lösen gentechnisch veränderte Nahrungsmittel Allergien aus? . *BioFokus Mitteilungsblatt* 66.
- Stott, DI. (1989). Immunoblotting and dot blotting. *J Immunol Meth* 119, 153-187.
- Stutius, L. M., Sheehan, W. J., Rangsihienchai, P., Bharmatee, A., Scott, J. E., Young, M. C., Dioun, A. F., Schneider, L. C., and Phipatanakul, W. (2010). Characterizing the relationship between sesame, coconut, and nut allergy in children. *Pediatr Allergy Immunol* 21, 1114-1118.
- Tamburrini, M., Cerasuolo, I., Carratore, V., Stanziola, A. A., Zofra, S., Romano, L., Camardella, L., and Ciardiello, M. A. (2005). Kiwellin, a novel protein from kiwi fruit. Purification, biochemical characterization and identification as an allergen*. *The protein journal* 24, 423-429.
- Thomas, K., Herouet-Guichenev, C., Ladics, G., Bannon, G., Cockburn, A., Crevel, R., Fitzpatrick, J., Mills, C., Privalle, L., and Vieths, S. (2007). Evaluating the effect of food processing on the potential human allergenicity of novel proteins: international workshop report. *Food Chem Toxicol* 45, 1116-1122.

- Tomas-Perez, M., Entrala, A., Bartolome, B., Caballero, M. L., and Quirce, S. (2018). Dermatitis Caused by Ingestion of Chia Seeds. *Journal of investigational allergology & clinical immunology* 28, 46-47.
- Tsumura, K. (2009). Improvement of the physicochemical properties of soybean proteins by enzymatic hydrolysis. *Food Science and Technology Research* 15, 381-388.
- Tucci, M., Capparelli, R., Costa, A., and Rao, R. (1991). Molecular Heterogeneity and Genetics of Vicia-Faba Seed Storage Proteins. *Theoretical and Applied Genetics* 81, 50-58.
- Turkova, J. (1999). Oriented immobilization of biologically active proteins as a tool for revealing protein interactions and function. *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications* 722, 11-31.
- Tzitzikas, E. N., Vincken, J. P., de Groot, J., Gruppen, H., and Visser, R. G. (2006). Genetic variation in pea seed globulin composition. *J Agric Food Chem* 54, 425-433.
- Urh, M., Simpson, D., and Zhao, K. (2009). Affinity chromatography: general methods. *Methods Enzymol* 463, 417-438.
- Usui, Y., Nakase, M., Hotta, H., Urisu, A., Aoki, N., Kitajima, K., and Matsuda, T. (2001). A 33-kDa allergen from rice (*Oryza sativa* L. Japonica) - cDNA cloning, expression, and identification as a novel glyoxalase I. *Journal of Biological Chemistry* 276, 11376-11381.
- Utsumi, S., Yokoyama, Z., and Mori, T. (1980). Comparative Studies of Subunit Compositions of Legumins from Various Cultivars of *Vicia faba* L. Seeds. *Agric. Biol. Chem.* 44, 595-601.
- van der Valk, J. P., Gerth van Wijk, R., Vergouwe, Y., Steyerberg, E. W., Reitsma, M., Wichers, H. J., Savelkoul, H. F., Vlieg-Boerstra, B., de Groot, H., Dubois, A. E., and de Jong, N. W. (2017). sIgE Ana o 1, 2 and 3 accurately distinguish tolerant from allergic children sensitized to cashew nuts. *Clin Exp Allergy* 47, 113-120.
- Vieths, S., Jankiewicz, A., Wuthrich, B., and Balmes, W. (1995). Immunoblot study of IgE binding allergens in celery roots. *Ann Allergy Asthma Immunol* 75, 48-55.
- Vieths, S., Schöning, B., Brockmann, S., Aulepp, H., and Uchida, K. (1992). Untersuchungen zur Allergie gegen Lebensmittel pflanzlicher Herkunft: Herstellung und Charakterisierung von Obst- und Gemüseextrakten für serologische Untersuchungen. *Dtsch LebensmittelRundsch* 88, 273-279.
- Vieths, S., Schöning, B., Brockmann, S., Aulepp, H. und Uchida, K. (1992). Untersuchungen zur Allergie gegen Lebensmittel pflanzlicher Herkunft: Herstellung und Charakterisierung von Obst- und Gemüseextrakten für serologische Untersuchungen. 239-43, 273-279.
- von Garnier, C., Filgueira, L., Wikstrom, M., Smith, M., Thomas, J. A., Strickland, D. H., Holt, P. G., and Stumbles, P. A. (2005). Anatomical location determines the distribution and function of dendritic cells and other APCs in the respiratory tract. *J Immunol* 175, 1609-1618.
- Waffenschmidt, S., and Jaenicke, L. (1991). Glycoproteine und Pflanzenzellkommunikation. *Chemie in unserer Zeit* 25, 29-43.
- Wallowitz, M. L., Chen, R. J., Tzen, J. T., and Teuber, S. S. (2007). Ses i 6, the sesame 11S globulin, can activate basophils and shows cross-reactivity with walnut in vitro. *Clin Exp Allergy* 37, 929-938.
- Wang, F., Robotham, J. M., Teuber, S. S., Sathe, S. K., and Roux, K. H. (2003). Ana o 2, a major cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut allergen of the legumin family. *Int Arch Allergy Immunol* 132, 27-39.
- Wang, F., Robotham, J. M., Teuber, S. S., Tawde, P., Sathe, S. K., and Roux, K. H. (2002). Ana o 1, a cashew (*Anacardium occidentale*) allergen of the vicilin seed storage protein family. *J Allergy Clin Immunol* 110, 160-166.
- Wang, J., and Sampson, H. A. (2007). Food anaphylaxis. *Clin Exp Allergy* 37, 651-660.
- Warsame, A. O., O'Sullivan, D. M., and Tosi, P. (2018). Seed Storage Proteins of Faba Bean (*Vicia faba* L): Current Status and Prospects for Genetic Improvement. *J Agric Food Chem* 66, 12617-12626.
- Weber, C. W., Gentry, H. S., Kohlhepp, E. A., and McCrohan, P. R. (1991). The nutritional and chemical evaluation of chia seeds. *Ecol. Food Nutr.* 26, 119-125.
- Westermeier, R. (1990). Elektrophorese-Praktikum. In VCH-Verlag (Weinheim).

- WHO, World Health Organization (2001a). Evaluation of the allergenicity of genetically modified foods In Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology 22 - 25 January 2001.
- WHO, World Health Organization (2001b). Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology. . In In Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- Wigotzki, M. (2001). Einfluß der technologischen Verarbeitung auf das allergene Potential der birkenpollenassoziierten Lebensmittel Haselnuß, Apfel und Karotte. In Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie (Hamburg, Hamburg University), p. 139.
- Willison, L. N., Sathe, S. K., and Roux, K. H. (2014). Production and analysis of recombinant tree nut allergens. *Methods* 66, 34-43.
- Willison, L. N., Tawde, P., Robotham, J. M., Penney, R. M. th, Teuber, S. S., Sathe, S. K., and Roux, K. H. (2008). Pistachio vicilin, Pis v 3, is immunoglobulin E-reactive and cross-reacts with the homologous cashew allergen, Ana o 1. *Clin Exp Allergy* 38, 1229-1238.
- Wolbing, F., and Biedermann, T. (2013). Anaphylaxis: opportunities of stratified medicine for diagnosis and risk assessment. *Allergy* 68, 1499-1508.
- Wolff, N., Cogan, U., Admon, A., Dalal, I., Katz, Y., Hodos, N., Karin, N., and Yannai, S. (2003). Allergy to sesame in humans is associated primarily with IgE antibody to a 14 kDa 2S albumin precursor. *Food Chem Toxicol* 41, 1165-1174.
- Wright, H. T. (1991). Sequence and structure determinants of the nonenzymatic deamidation of asparagine and glutamine residues in proteins. *Protein Eng* 4, 283-294.
- Yates, J. R., 3rd (1998). Mass spectrometry and the age of the proteome. *Journal of mass spectrometry : JMS* 33, 1-19.
- Young, E., Stoneham, M. D., Petruckevitch, A., Barton, J., and Rona, R. (1994). A population study of food intolerance. *Lancet* 343, 1127-1130.
- Yu, J., Ahmedna, M., Goktepe, I., Cheng, H., and Maleki, S. (2011). Enzymatic treatment of peanut kernels to reduce allergen levels. *Food Chem* 127, 1014-1022.
- Zhuang, Y., and Dreskin, S. C. (2013). Redefining the major peanut allergens. *Immunologic research* 55, 125-134.
- Zuidmeer, L., Goldhahn, K., Rona, R. J., Gislason, D., Madsen, C., Summers, C., Sodergren, E., Dahlstrom, J., Lindner, T., Sigurdardottir, S. T., *et al.* (2008). The prevalence of plant food allergies: a systematic review. *J Allergy Clin Immunol* 121, 1210-1218 e1214.

9. Anhang

9.1. Material und Vorschriften der Methoden

9.1.1. Verwendete Chemikalien

Tabelle 20: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Firma	Gef-Symbol	H-Sätze	P-Sätze
(3-Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure (CHAPS)	Serva			
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC)	Sigma	T, C, N, Xn	302, 311, 315, 317, 318, 373	273-280-301+312+330-302+352+312-305+351+338+310-314
3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma-Aldrich	Xi	315-319-335	261-305+351+338
5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP)	Serva	-	-	-
Agarose	Merk	-	-	-
Ameisensäure	Merk	O, C, T	226-302-314-331	210-280-303+361+353-304+340+310-305+351+338-403+233
Aminohexansäure	Merck	-	-	-
Ammoniumhydroxid	Merck		290-314-335-400	260-273-280-301+330+331-303+361+353-305+351+338
Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad		272-302-315-317-319-334-335	220-261-280-305+351+338-342+311
Ammoniumsulfat	Merk	-	-	-
Borax	sigma	Xi, Xn	319, 360	201, 261, 280.1-3+5+7, 305+351+338, 308+313
Bovine Serum Albumin pH 7, reinst (BSA)	Sigma-Aldrich	-	-	-
Bromcyan	Merck	T+/C/N	300+310+330-314-400	280-260-301+330+331+310-303+361+353-304+340+310-305+351+338
Bromphenolblau	Merck	-	-	-
Chloroform	Merk	Xn, T	302-331-315-319-351-361d-336-372	261-281-305+351+338-311
Coomassie Brilliant Blue G 250	Serva	-	-	-
Dikaliumhydrogenphosphate trihydrate				

Anhang

Chemikalien	Firma	Gef-Symbol	H-Sätze	P-Sätze
Dimethylformamid	Merk	O, Xn, Xi	226-312-332-319-360D	201-210-302+352-304+340-305+351+338-308+313
Dioclylnatriumsulfosuccinat (DONS)	Sigma-Aldrich	Xi, C	302-315-318	280-305+351+338
DTT (Dithiothreitol)				
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merk	Xi, Xn	319-332-373	280-304+340-312-305+351+338-337+313
Essigsäure	Merck	C	13-35	2-23,2-26
Ethanolamin	Merck	C, Xi	302-312-332-314-335-412	261-273-301+312+330-303+361+353-304+340+310-305+351+338
Ethidiumbromid	Merk	T+, Xi	302-330-341	P281- P304+P340-P308+P310
Glycerin	Fluka	-	-	-
Glycin	Merck	-	-	-
Harnstoff	Merck			
Iodacetamid	VWR	T, Xn	301-317-334-413	261-280-301+310-342+311
Isopropanol	Merk	Xi, F	225-319-336	210-233-240-305+351+338-403+235
Kaliumchlorid	Merck	-	-	-
Kaliummetabisulfit	Merk	Xi, C	318-335	280- P305 + P351 + P338- P313
Marker12	ThermoFischer			
Mercaptoethanol	Fluka	T, C, Xn, N	301+331-310-315-317-318-373-410	273-280-302+352-304+340-305+351+338-308+310
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Sigmaaldrich	Xi	H: 315-319-335	261-305+351+338
Methanol	Merck	T, F	11-23/25	2-7-16-24
MOPS (3-(N-Morpholino)propansulfonsäure)	Imvitrogen	-	-	-
Natriumacetat	Grüssing	-	-	-
Natriumazid	Merck	T+, N, Xn	300+310+330-373-410	262-273-280-301+310+330-302+352+310-304+340+310
Natriumcarbonat, wasserfrei	Merk	Xi	319	260-305+351+338
Natriumchlorid	Merck	-	-	-
Natriumcitrat	Merck	-	-	-
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merk	-	-	-
Natriumhydrogencarbonat	Fluka	Xi	319	305+351+338
Natriumhydroxide	Merck	C	290-314	280-301+330+331-305+351+338-308+310 [

Anhang

Chemikalien	Firma	Gef-Symbol	H-Sätze	P-Sätze
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Fluka	X	228-302+332-315-318-335-412	210-261-280-301+312+330-305+351+338+310-370+378
Natriummetaperiodat	Merk	C, F, Xi, N	271-314-372-400	210-260-280-305+351+338-370+378-371+380+375
Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)	Merk	-	-	-
Phosphorsäure, 88 %ig	Grüssing	C	290-314	280-301+330+331-305+351+338-308+310
Polyethylenglykol (PEG)	Merk	-	-	-
Rainbow-Marker	ThermoFischer	-	-	-
Salzsäure, 37 %ig HCl	Chem solutions	C, Xi	290-314-335	260-280-303+361+353-304+340+310-305+351+338
Schiff's fuchsin-sulfite Reagenz	Sigma-Aldrich	-	-	-
Schwefelsäure	Merk	C	290-314	280-301+330+331-305+351+338-308+310
Tetramethylethylen-diamin (TEMED)	Roth	F, C, Xi	225-332-302-314	210-280-305+351+338-310
Tris Base	Sigma	Xi	315-319-335	261-305+351+338
Tris(hydroxymethyl)aminomethan Tris HCl	Sigma-Aldrich	Xi	315-319-335	261-305+351+338
Tris-Acetat-Ethylendiamintetraacetat	-	-	-	-
Triethylamin	Merk	O, T, C	225-302-311+331-314-335	210-280-303+361+353-304+340-310-305+351+338-403+233
TweenTM 20	Roth			
Wasserstoffperoxidlösung 30%	Merck	C	34	28-36/39
Xylencyanoblau	Carlroth	-	-	-
Aceton	Merk	Xi, F	225-319-336	210-240-305+351+338-403+233
Phenylmethanesulfonyl flouride	Sigma	T, C	H301 - H314	P260 - P280 - P301 + P310 + P330 - P301 + P330 + P331 - P303 + P361 + P353 - P305 + P351 + P338

9.1.2. Verwendete Geräte

Tabelle 21: Verwendete Geräte

Geräte	Bezeichnung	Hersteller
Äktaprime Plus	Äkta	GE-Healthcare Life science
Bi-Destillation Apparat	Destamat	Quarzglas
Blotting-Einheit	Elektrophoresis unit	biostep GmbH
DNA/RNA Cleaner Box	UVC/T-M-AR	Kisker
Elektrophoresekammer	PowerEase500	Novex
Elektrophoresekammer	SDS-PAGE	Invitrogen
Ettan DALTsix	Elektrophoresis unit	Labinco
Fluometer	Quantus	Promega
Gefriertrocknungsanlage	Gamma A Beta 1-16	Christ (Osterode. Deutschland)
IEF-Einheit	Ettan IPGPhar 3	GE-Healthcare Life science
Kühlschrank	-	Eisfink (Asperg. Deutschland)
Kühltruhe (-20 °C)	-	Eisfink (Asperg. Deutschland)
Kühltruhe (-80 °C)	-	Kryotec (Hamburg Deutschland)
Magnetrührer	L-81	Labinco
NanoDrop	ND-1000 Spectrofotometer	molecular devices
pH-Messer	PB-11	Sartorius
Photometer	Spectramax	molecular devices
Schüttler	Swip	Edmund Bühler GmbH
SpeedVac	-	Biotech-Fischer
Thermocycler	T 3000	biometra
Trockenschrank	-	Heraeus Instruments (Hanau. Deutschland)
Ultrashall-Bad	-	VWR
Ultra-Turrax	T 25	Jahnke und Kunkel (Staufen i. Br.. Deutschland)
Vortex	Vortex-Schüttler	VWR
Waage (fein)	-	Sartorius
Waage (grob)	-	Sartorius
Wasserbad/ Thermostat	Brinkmann RM 6	MGW Lauda
Zentrifuge	Scanspeed 1534	LABOGENE

9.1.3. Verwendete Materialien

Tabelle 22: Verwendete Materialien

Verbrauchsmaterial	Bezeichnung	Hersteller
Blotmembranen	Nitrocellulose. 0.2 µm	Whatman
DryStrip cover fluid	Plusone	GE-Healthcare Life science
Filterpapier	Rundfilter 6 mm	Schleicher & Schüll (Dassel. Deutschland)
Flaschenaufsatzfilter	0.45 µm	Thermo Scientific™ Nalgene™ wiederverwendbare Flaschenaufsatzfilter aus Polysulfon
Inkubationskammer		Thermo Scientific™
IPG-Puffer	pH 3-11	GE-Healthcare Life science
Kolbenhubpipetten	0.5 µL – 5 mL	Eppendorf (Hamburg. Deutschland)
Kunststoffschalen		Bio Rad (Herkules. CA. USA)
Membranfilter	45 µm	Schleicher & Schüll (Dassel. Deutschland)
Mikrotiterplatten	Minisorb. 96 Kavitäten	Nunc (Roskilde. Dänemark)
NuPAGETM Gele	1 mm; 10&12 % 2D well	Novex (San Diego, CA, USA)
Parafilm		American National Can (Neenah. WI. USA)
Pipettenspitzen		Eppendorf (Hamburg. Deutschland)
Pufferlösungen	pH 4, 7, 10	Roth
Reaktionsgefäße (Tubes)	Safe Lock. 1 ml und 2 ml	Eppendorf (Hamburg. Deutschland)
Rehydration puffer	DeStreak	GE-Healthcare Life science
SpeedVac	Vivaspin 20	Vivascience
Zentrifugenröhrchen	15 ml, 50 ml	Nunc, Dänemark

9.1.4. Verwendete Antikörper

Tabelle 23: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper

Produkt	Allergen	Host	Produkt Nr.	Hersteller	Konz.
Kommerzielle Sesamantikörper					
Sesame protein	Sesamprotein	Huhn	AS09 568	Agrisera	1 mg/ml
Rabbit anti-Chicken IgY, HRP conjugated	IgY aus Huhn	Kaninchen	AS10 1489	Agrisera	1 mg, Lyophilisat
Kommerzielle Haselnussantikörper					
Haselnuss Corylin	Haselnussproteinen	Kaninchen	R452161	R-Biopharm Darmstadt	1 mg/ml
Rabbit Immunoglobulins	IgG aus Kaninchen	Ziege	P0448	Dänemark	1 mg/ml

Produkt	Allergen	Host	Produkt Nr.	Hersteller	Konz.
Kommerzielle Erdnussantikörper					
Anti-Peanut Agglutinin (PNA), Unconjugated	Agglutinin aus Erdnuss	Ziege	BA-0074	Vector Laboratories	1 mg/ml
Biotinylated Rabbit Anti-Goat IgG Antibody	IgG aus Kaninchen	Kaninchen	BA-5000	Vector Laboratories	1,5 mg/ml
Streptavidin, HRP conjugated	Biotin		SA-5014	Vector Laboratories	1 mg/ml
Anti human IgE-Antikörper					
Monoclonal anti-human IgE antibody (clone GE1)	Human IgE	Maus	I6510 Sigma	Sigmaaldrich	1 mg/ml

9.1.5. Verwendete Humanseren

9.1.5.1. Blutseren von 5 Sesamallergikern und einem Nichtallergiker

Tabelle 24: Informationen zu Sesamallergikern, deren Blutseren in dieser Arbeit eingesetzt wurden

Projekt-Nr.	Labor-Nr.	Alter (Jahre)	Symptome
1	S1	67	Angioödem, Nesselsucht
2	S2	69	Schnupfen, Nesselsucht
3	S3	33	Durchfall, Übelkeit
4	S4	29	Schnupfen, Bronchospasmus
5	S5	26	Nesselsucht, Übelkeit, Angipödem
6	S6 (Blank)	30	Keine Allergie

9.1.5.2. Blutseren von Haselnussallergikern

Tabelle 25: Verwendete Blutseren von Haselnussallergikern und die dazugehörigen EAST-Klassen

Projekt-Nr.	Labor-Nr.	Datum	Test	EAST-Klasse		
				Eiweis	Milcheiweis	Haselnuss
7	4-00094	08.01.2004	ADL IgE	0/1	1	4
8	4-00297	02.02.2004	ADL IgE	1	1	3
9	4-00431	16.02.2004	ADL IgE	2	2	4
10	4-00524	25.02.2004	ADL IgE	0/1	1	4
11	4-00552	01.03.2004	ADL IgE	1	2	3

Anhang

12	4-00869	05.04.2004	ADL IgE	2	2	4
13	4-00960	16.04.2004	ADL IgE	1	2	4
14	4-01101	03.05.2004	ADL IgE	0/1	0/1	4
15	4-01360	28.05.2004	ADL IgE	1	1	2
16	4-01573	22.06.2004	ADL IgE	1	1	4
17	4-01825	27.07.2004	ADL IgE	2	1	4
18	4-01909	03.08.2004	ADL IgE	2	1	4
19	4-02086	23.08.2004	ADL IgE	0/1	0/1	2
20	4-02088	23.08.2004	ADL IgE	2	2	4
21	4-02317	20.09.2004	ADL IgE	1	0/1	3
22	4-02373	24.09.2004	ADL IgE	2	1	4
23	4-02436	04.10.2004	ADL IgE	1	0/1	2
24	4-02577	20.10.2004	ADL IgE	1	0/1	4
25	4-02713	04.11.2004	ADL IgE	1	1	3
26	4-02745	09.11.2004	ADL IgE	0/1	0/1	3
27	4-02914	30.11.2004	ADL IgE	2	2	4
28	4-02966	07.12.2004	ADL IgE	1	1	2
29	4-03112	22.12.2004	ADL IgE	1	1	4
30	5-00046	10.01.2005	ADL IgE	1	1	3
31	5-00059	11.01.2005	ADL IgE	0/1	0/1	3
32	5-00225	01.02.2005	ADL IgE	0/1	0/1	4
33	5-00231	01.02.2005	ADL IgE	0/1	1	2
34	5-00265	04.02.2005	ADL IgE	0/1	0/1	4
35	5-00692	29.03.2005	ADL IgE	0/1	0/1	2
36	5-00715	30.03.2005	ADL IgE	0/1	0/1	4
37	5-01238	02.06.2005	ADL IgE	0/1	2	3
38	6-01229	04.05.2006	ADL IgE	2	2	4
39	7-00614	26.02.2007	ADL IgE	2	2	3

9.1.6. Gewinnung der Humanseren

1. 30 ml Blut mittels Serumröhrchen abnehmen
2. Übernacht bei 4 °C lagern
3. 10 min bei 2800 rpm zentrifugieren
4. Blutkuchen vom Serum vorsichtig abtrennen
5. Gewonnene Humanseren in 2 ml Reaktionsgefäßen pipettieren und bei - 80 °C lagern

9.1.7. Herstellung der Extrakte und Proteinbestimmung

9.1.7.1. Tieftemperaturextraktion

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

Lösungen:

Aceton	T= -80 °C
Diethylether	T= -80 °C
Aceton/Diethylether Gemisch 1:1	T= -80 °C
PBS (pH 7.4)	0,15 M NaCl 0,0027 M KCl 0,01 M K ₂ HPO ₄ 0,2 mM PMSF
Tris (PH 8.0)	0,1 M Tris

Durchführung:

1. 400 ml Aceton in ein 800-ml-Becherglas geben und bei -80 °C lagern
2. 200 g zerkleinerte Frucht einwiegen
3. in das Aceton geben
4. mindestens 2 Stunden bei -80 °C lagern
5. Fruchtstücke mit einem Ultra-Turrax zerkleinern
6. Homogenat über Nacht bei -20 °C äquilibrieren lassen
7. das Homogenat über Büchnertrichter absaugen
8. 3x mit je 80 ml Aceton und 3 x mit je 50 ml Ether/Aceton-Gemisch waschen
9. Rückstand trocken saugen
10. in einen Rundkolben überführen
11. 2 Stunden bei -80 °C durchfrieren lassen
12. über Nacht lyophilisieren
13. Lyophilisat vermahlen
14. das erhaltene Acetonpulver bei -80 °C lagern
15. 0,5 g Acetonpulver mit 10 ml PBS-Puffer versetzen
16. pH-Wert auf 7.4 einstellen

17. 1 Stunde unter Eiskühlung rühren
18. 1 Stunde bei 4 °C und 15000 rpm zentrifugieren
19. Rückstand abdekantieren
20. Filtrat bei -80 °C lagern

9.1.7.2. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wird nach BRADFORD (1976) durchgeführt.

Lösungen:

Bradford-Lösung (Konzentrationsbestimmung)	8,5 % (v/v) Phosphorsaure 4,8 % (v/v) Ethanol 0,01 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G 250
BSA-Standard	0,1 - 0,5 mg/mL BSA in 0,15 M Natriumchlorid-Lösung

Probelösungen: 10 µl der zu vermessenden Lösung werden direkt bzw. nach Verdünnung zur Messung eingesetzt.

Durchführung:

1. 10 µl Standard- bzw. Probelösung in eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte geben (für den Blindwert 10 µl bidest. Wasser einsetzen)
2. je mit 250 µl Lösung versetzen
3. im ELISA-Reader 10 s schütteln
4. nach 5 min bei 590 nm gegen Blindwert vermessen

9.1.7.3. Osborne-Fraktionierung

Lösungen:

Albumin-Puffer	2 mM PMSF
Globulin-Puffer	50 mM Tris 0,5 M NaCl 2 mM PMSF
Prolamin-Puffer	Isopropanol/Wasser 70:30 2 mM PMSF
Glutelin-Puffer	0,1 M Borax 2 mM PMSF

Durchführung:

1. 2,5 g Acetonpulver mit 50 ml Albumin-Puffer (2mM PMSF in Wasser) bei 4 °C rühren
2. Das Gemisch eine Stunde bei 15000 rpm zentrifugieren
3. Den Überstand in 2 ml Reaktionsgefäßen umpipettieren (Albumin-Fraktion) und bei -40 °C lagern

4. Den Rückstand wie oben beschrieben mit den oben aufgeführten Puffern behandeln
5. Globulin-, Prolamin- und Glutelin-Fractionen in 2 ml Reaktionsgefäßen geben und bei -40 °C lagern.

9.1.8. Enzymallergosorbent-Test (EAST)

9.1.8.1. Bromcyanaktivierung der Scheiben

Die Bromcyanaktivierung und das Koppeln der Scheiben erfolgt nach der von MÖLLER et al. (1997) modifizierten Methode nach CESKA und LUNDKVIST (1972). Die in dieser Arbeit verwendeten Scheiben wurden bereits in einer ehemaligen Arbeit mit Bromcyan aktiviert. Die Aktivierung der Scheiben wurde wie folgendes durchgeführt.

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

Durchführung

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

9.1.8.2. Entsorgung der Bromcyananfäße

1. BrCN-Lsg. in 10 %iger NaOH 1 h stehen lassen
2. bei einem pH-Wert von 10 - 11 einen 50 %igen Überschuss an Natriumhypochloritlsg.
3. zugeben

4. über Nacht stehen lassen
5. Lösung auf einen pH-Wert von 7 einstellen
6. Überschuss an Hypochlorit mit Hydrogensulfit zerstören
7. Lösung über das Abwasser entsorgen

9.1.8.3. Kopplung der Extrakte an die Scheiben

Lösungen

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

Durchführung:

1. Extrakte in bidest. H₂O aufnehmen und auf einen Proteingehalt von 20 µg/ml
2. verdünnen
3. 100 ml Lösung in 250-ml-Iodzahlkolben füllen
4. ca. 300 bromcyanaktivierte Papierscheiben (ca. 636 mg) zu der Lösung geben
5. über Nacht bei 4 °C rühren
6. Überstand absaugen (Wasserstrahlpumpe)
7. 100 ml Ethanolaminpuffer dazugeben
8. 2 h bei Raumtemperatur rühren
9. absaugen und mit folgenden Lösungen waschen:
 - 3 x mit 100 ml 0.1 mol/ l NaHCO₃-Lösung
 - 2 x mit 100 ml 0.1 mol/ l Natriumacetatpuffer

- 2 x mit 100 ml 0.5 mol/l NaHCO₃-Lösung

10. letzte Waschlösung absaugen
11. mit 100 ml dest. Wasser spülen
12. Scheiben mit dest. Wasser in einen 250-ml-Rundkolben überführen
13. Wasser absaugen
14. 2 h bei -80 °C einfrieren
15. über Nacht lyophilisieren
16. Scheiben bei -20 °C lagern

9.1.8.4. EAST-Bestimmung

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

Lösungen:

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

EAST-Klasse 1: 0.35 – 0.70 U/ml

EAST-Klasse 2: 0.70 – 3.50 U/ml

EAST-Klasse 3: 3.50 – 17.50 U/ml

EAST-Klasse 4: > 17.50 U/ml

Durchführung:

1. je eine Allergenscheibe in eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte geben
2. mit Inkubationspuffer befeuchten (Referenzscheiben nicht mit Inkubationspuffer
3. befeuchten
4. je 50 µl Patientenserum bzw. Kontrollserum auf die Allergenscheiben geben
5. je 50 µl Referenzserum auf die Referenzscheiben pipettieren
6. Mikrotiterplatte mit Parafilm abdecken
7. 1 h bei 37 °C unter Lichtausschluss inkubieren
8. Serum absaugen
9. 250 µl Waschlösung zu pipettieren und nach 10 min absaugen (3x)
10. 50 µl Konjugatlösung in jede Kavität pipettieren
11. Mikrotiterplatte mit Parafilm abdecken
12. über Nacht bei RT unter Lichtausschluss inkubieren
13. 250 µl Waschlösung zu pipettieren und nach 10 min absaugen (3x)
14. 200 µl Färbelösung in jede Kavität geben
15. 200 µl Färbelösung in 2 leere Vertiefungen pipettieren (Reagenzienblindwert)
16. Mikrotiterplatte mit Parafilm abdecken
17. 1 h bei 37 °C unter Lichtausschluss inkubieren
18. 100 µl Stopplösung zupipettieren
19. 10 s schütteln
20. 250 µl aus jeder Kavität analog in eine leere Mikrotiterplatte überführen
21. bei 405 nm photometrisch vermessen (ELISA-Reader)

9.1.9. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

9.1.9.1. Molekulargewichtsmarker für LDS-PAGE und SDS-PAGE

Für die LDS-PAGE und SDS-PAGE ohne anschließenden Immunoblot wird der Marker12 von der Firma ThermoFischer verwendet. Wird ein Immunoblot anschließend geplant, kommt der Rainbow-Marker von der Firma ThermoFischer zum Einsatz.

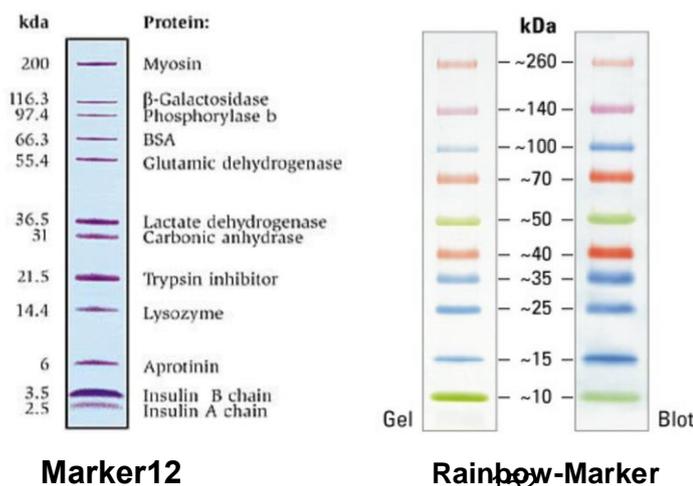


Abbildung 48: Verwendete Proteinmarker bei der Durchführung von SDS-PAGE (Marker 12) und Immunoblot (Rainbow-Marker)

9.1.9.2. LDS-PAGE

Die SDS-PAGE unter Verwendung des NuPAGETM Elektrophoresesystems und der Fertiggele und -lösungen der Firma NovexTM (San Diego, CA, USA) sowie die Aufarbeitung der Proben werden entsprechend den angegebenen Vorschriften durchgeführt.

Lösungen:	
Elektrodenpuffer (x 20) Fertiglsg. NuPAGETM MOPS-SDS Running Buffer	104.6 g MOPS (3-(N-Morpholino)propansulfonsäure) 60.6 g Tris Base 10.0 g SDS 3.0 g EDTA ad 500 ml mit bidest. Wasser vor Gebrauch mit bidest. Wasser verdünnen
Probenpuffer	1,17M Saccharose 563 mM Tris Base 423 mM Tris HCl 278 mM SDS 2,05 mM EDTA Serva Blue G250 Phenol Red ad 10 ml mit Bidest. Wasser
Reduzierungspuffer	66 % Mercaptoethanol

Probenvorbereitung:

- 60 µl Proteinextrakt + 25 µl Probenpuffer + 15 µl Reduzierungspuffer
- Lösung 5 min bei 95 °C im Wasserbad reduzieren

Durchführung:

Das NuPAGE™-Fertig-Gel wird in die NUPAGE™-Elektrophorese-Kammer eingesetzt. Die innere und die äußere Kammer wurden mit MOPS-Puffer befüllt. Anschließend werden die Taschen des Gels mit jeweils 10 µl Probenlösungen befüllt. Eine Tasche wird mit 10 µl des Markers befüllt. Die Trennung erfolgt innerhalb von 60 Minuten bei einer Spannung von 200 V, eine Stromstärke von 120 mA und einer Leistung von 25 W.

9.1.9.3. (DISK-)SDS-PAGE

Lösungen:

Trenngelpuffer	1,5 M TRIS-Base, 0,4 % SDS, pH = 8,6
Sammelgelpuffer	1,5 M TRIS-Base, 0,4 % SDS, pH = 6,8
Elektrodenpuffer	250 mM TRIS-Base, 0,02 % Natriumazid, 1,91 M Glycin, 1 % SDS, Für die Elektrophorese werden 25 mL auf 250 mL verdünnt
Probenpuffer	100 mM TRIS-Base/HCl, 20 % Glycerin, 4 % SDS, 4 % Mercaptoethanol, 0,05 % Bromphenolblau, pH = 6,8
APS-Lösung	10 % Ammoniumperoxodisulfat

Tetraethylendiamin (TEMED)	
----------------------------	--

Zusammensetzung der SDS-Gele:

Die angegebenen Mengen sind für Minigele der Dimension 0,75 mm 7,3 cm 8,3 cm berechnet

	Trenngel (12 % Acrylamid)	4 % Sammelgel (4 % Acrylamid)
Entgastes bidest. H ₂ O	4,5 ml	2 ml
Puffer	2,5 ml	2,5 ml
Acrylamid-Lösung 40 %	3 ml	0,5 ml
APS	50 µl	50 µl
TEMED	10 µl	5 µl

Trenngellösung wird zunächst nach Pipettierschema angesetzt. Anschließend wird die Gießkassette mit Trenngellösung bis ca. 1-1,5 cm unterhalb der oberen Kante der Glasplatte befüllt und anschließend mit 2-Propanol überschichtet. Das Trenngel ist in ca. 20 min auspolymerisiert. Danach wird das 2-Propanol entsorgt. In die Gießkassette wird nun der „Kamm“ eingesetzt und das Sammelgel wird nach Pipettierschema angesetzt und langsam auf das Trenngel pipettiert. Nach ca. 30 min ist das Gel polymerisiert.

Durchführung:

50 µL der Probe wird mit 25 µL Probenpuffer (2:1) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß versetzt. Die Proben werden für 5 min bei 95 °C in ein Wasserbad gekocht. Die Gießkassette wird in die Elektrophoreseapparatur eingebaut. Vor dem Auftragen der Proben wird zunächst der Kamm vorsichtig aus der Gießkassette entfernt. Die Elektrophoreseapparatur wird anschließend mit Laufpuffer befüllt und die Geltaschen mit 10 µL Probe bzw. *Marker12* bestückt. Die Trennung erfolgt innerhalb von 25 min bei einer Spannung von 300 V, eine Stromstärke von 70 mA (35 mA pro Gel) und einer Leistung von 12 W.

9.1.10. 2D-Gelelektrophorese

9.1.10.1. Probenvorbereitung

Lösungen:

Rehydrationspuffer zum Lösen des Proteinpellets nach der Aufarbeitung	8 M Harnstoff, 2 % CHAPS, 0,5 % IPG-Puffer, 20 mM DTT und 2 mM PMSF
---	---

Durchführung 1:

1. 1 ml GLO in 1,5 ml Reaktionsgefäß geben
2. Zugaben von 200 µl Chloroform
3. Vortexen 15 sec und Inkubieren für 3 min bei RT
4. Zentrifugieren bei 15000 rpm for 15 min bei 4 °C
5. Die obere Phase abpipettieren und 300 µl Ethanol dazugeben und 15 sec vortexen
6. Inkubation für 3 min bei RT und Zentrifugieren bei 2800 rpm für 15 min
7. Die Probe wird in zwei 1,5 ml- Reaktionsgefäßen je 650 µl teilen
8. Zugabe von 750 Isopropanol in beide Reaktionsgefäße und Vortexen für 15 sec
9. Inkubation bei RT für 10 min
10. Zentrifugieren bei 18000 rpm g bei 4 °C für 10 min
11. Den Überstand entfernen
12. Zugabe von 1 ml Aceton (-20 °C) und Vortexen für 1 min
13. Zentrifugieren 18000 rpm bei 4 °C für 10 min und den Überstand verwerfen
14. Schritte 12 und 13 zwei Mal wiederholen
15. Das Proteinpellet mit 100 µl Rehydrationspuffer versetzen
16. 15 sec vortexen und anschließend 1 Stunde im Ultraschalbad lösen
17. Zentrifugieren bei 15000 rpm bei 4 °C für 10 min
18. Den Überstand (2D-Probe) wird in ein neues Reaktionsgefäß umpipettiert

Durchführung 2:

1. 200 µl Proteinextrakt/Überstand in ein 2 ml Reaktionsgefäß geben
2. 800 µl Methanol dazugeben und anschließend 15 min vortexen
3. 200 ml Chloroform dazugeben und anschließend 15 min vortexen
4. 600 ml H₂O zugeben und vortexen → die Lösung wird weiß
5. Die Lösung für 1 min bei 16000 rpm zentrifugieren
6. Obere Phase entfernen (abpipettieren)
7. 800 µl Methanol zugeben
8. 5 min bei 28000 rpm zentrifugieren
9. Den Überstand abdekantieren und das Pellet mit 200 µl Rehydrationspuffer aufnehmen
10. 15 sec vortexen und anschließend 10 min im Ultraschalbad lösen
11. Zentrifugieren bei 15000 rpm bei 4 °C für 1 Stunde min
12. Den Überstand (2D-Probe) wird in ein neues Reaktionsgefäß umpipettiert

9.1.10.2. Rehydrierung

Lösungen und Materialien:

Rehydrationspuffer (Blau) für IPG-Streifen	8 M Harnstoff, 2 % CHAPS, 2 % IPG-Puffer, 0.002 % Bromophenolblau
Aufgereinigte Probe (2D-Probe)	9,3 mg/ml
IPG-Puffer	3-11, 3-7, 7-9
IPG-Streifen 7 cm (Zooming)	pH= 3-11, 3-7, 7-9
IPG-Streifen 24 cm (Screening)	pH= 3-11

Durchführung:*IPG-Streifen (7 cm):*

Das Volumen der Probelösung beträgt 125 µl und setzt sich aus 10 µl 2D-Probe, 2,5 µl IPG-Puffer und 112,5 µl Rehydrationspuffer (Blau). Die Menge an Protein beträgt in der Probelösung 200 µg. Die Anschließend wird die Probelösung kurz gevortext und gleichmäßig in die Vertiefung der dafür vorgesehenen Kunststoffbox (Immobiline™ DryStrip Reswelling Tray, GE Healthcare, USA) pipettiert. Die Immobilin™ DryStrips werden luftblasenfrei, mit der Gelseite in Richtung der Probenlösung vorsichtig in die Vertiefung gelegt und über Nacht (20 h) bei Raumtemperatur rehydratisiert.

IPG-Streifen (24 cm):

Die Probelösung (450 µl) setzt sich aus 21,77 µl 2D-Probe, 9 µl IPG-Puffer und 419 µl Rehydrationspuffer (Blau) und enthält ca. 200 µg Protein. Die Rehydratation erfolgt auf die gleiche Weise wie bei den IPG-Streifen 7 cm.

9.1.10.3. Erste Dimension – Isoelektrische Fokussierung**Lösungen:**

Silikonöl: The Immobilin™ DryStrip Cover Fluid.

Durchführung:*IPG-Streifen (7 cm):*

Nach der Rehydratisierung werden die IPG-Streifen vorsichtig in eine der vorgesehenen Kanäle auf der Keramikplatte (Manifold). Zuvor wird der Kanal mit 500 µL Silikonöl gefüllt, um eine Austrocknung des Streifens sowie die Oxidation durch Luftsauerstoff zu vermeiden. Die Streifen werden mit der Gelseite nach oben zeigend eingelegt und eventuelle Luftblasen entfernt. Passend zugeschnittene Stücke feuchtes Filterpapier werden auf obere und untere Kante des Gelstreifens. Während die Elektrodennocken in der offenen Position sind, wird der Elektrodendraht genau auf das Stück Filterpapier gelegt. Anschließend werden die Nocken unter die äußere Lippe der Keramikplatte umgeschwenkt. Der Kontakt zwischen IPG-Streifen und Elektrode hergestellt. Die Die Keramikplatte wird komplett mit ca. 7 ml Silikonöl überschichtet.

Gradientenprogramm:

pH-Interval	Spannungstyp	Spannung (V)	Zeit (h:min)	kVh
3–11	1 Step and Hold	300	0:30	0.2
	2 Gradient	1000	0:30	0.3
	3 Gradient	5000	1:20	4.0
	4 Step and Hold	5000	0:25	2.0
	Total		2:30	5.5

Anhang

4–7	1 Step and Hold	300	0:30	0.2
	2 Gradient	1000	0:30	0.3
	3 Gradient	5000	1:30	4.5
	4 Step and Hold	5000	0:24	2.0
7–11 NL	1 Step and Hold	500	1:00	0.5
	2 Gradient	1000	1:00	0.8
	3 Gradient	6000	2:30	8.8
	4 Step and Hold	6000	0:50	4.9

IPG-Streifen (24 cm):

Nach der Rehydratisierung werden die gequollenen Gelstreifen vorsichtig in ein Keramikschißchen (24 cm Ettan IPGStrip Holder, GE Healthcare, USA) überführt. Zuvor wird das Schißchen gleichmäßig mit 500 mL Silikonöl gefüllt. Den Kontakt zwischen IPG-Streifen und Elektrode wird durch ein passend zugeschnittenes Stück feuchtes Filterpapier hergestellt. Die Streifen werden mit der Gelseite nach unten zeigend eingelegt und eventuelle Luftblasen entfernt. Es wird erneut mit 1 mL Silikonöl überschichtet, das Behältnis mit einem Schutzdeckel verschlossen und in die vorgesehene Apparatur (Ettan IPGphor 3, GE Healthcare, USA) eingebracht. Um den Kontakt zwischen Elektrode und Gel zu gewährleisten, wird der Deckel des Keramikschißchens jeweils an den Polen mit einer Plastikabdeckung beschwert. Das eingesetzte Gradientenprogramm für befindet sich in der nachstehenden Tabelle.

Gradientenprogramm

pH-Interval	Spannungstyp	Spannung (V)	Zeit (h:min)	kVh
3–11	1 Step and Hold	500	8:00	0.4
	2 Gradient	1000	1:00	0.8
	3a Gradient	8000	3:00	13.5
	4a Step and Hold	8000	2:30	4.0
	3b Gradient	10000	0:25	2.0
	4b Step and Hold	10000	2:45	27.2
pH-Interval	Spannungstyp	Spannung (V)	Zeit (h:min)	kVh
3–11 optimiert	1 Step and Hold	500	8:00	0.4
	2 Gradient	1000	1:00	0.8
	3a Gradient	8000	3:00	13.5

	3b Step and Hold	8000	2:45	27.2
				44,7

9.1.10.4. Äquilibrierung

Lösungen

Äquilibrier-Stammlösung	6M Harnstoff, 75mM Tris-HCl (pH 8,8), 29,3 % Glycerin, 2 % SDS, 0,002 % Bromphenolblaulösung (1 %)
Äquilibrierlösung I	10 ml Äquilibrier-Stammlösung + 100 mg DTT
Äquilibrierlösung II	10 ml Äquilibrier-Stammlösung + 250 mg Iodacetamid

Durchführung:

IPG-Streifen (7 cm)

Die IPG-Streifen werden in eine Plastikschaale mit 10 Vertiefungen eingelegt und kurz mit bidest. Wasser gespült. In dieser Plastikschaale können bis zu 10 Gelstreifen gleichzeitig äquilibriert werden können. Zunächst werden die Streifen 20 min mit **1 ml Äquilibrierlösung I** inkubiert und im Anschluss mit dest. Wasser gewaschen. Danach werden 20 min mit **1 ml Äquilibrierlösung II** inkubieren, im Anschluss mit dest. Wasser waschen

IPG-Streifen (24 cm)

IPG-Streifen in ein Plastikröhrchen überführt und kurz mit bidest. Wasser gedpült. Anschließend werden die Streifen 20 min mit **10 ml Äquilibrierlösung I** inkubiert und im Anschluss mit dest. Wasser gewaschen. Danach werden 20 min mit **10 ml Äquilibrierlösung II** inkubieren, im Anschluss mit dest. Wasser waschen

9.1.10.5. Zweite Dimension – SDS-PAGE

Lösungen:

Agarose-Lösung	0,3 g Agarose und 3 µl Bromphenolblaulösung (5 %) in 50 ml Wasser mischen und in der Mikrowelle erwärmen, 200 µl SDS-Lösung (10 %) hinzufügen
----------------	---

Durchführung:

IPG-Streifen (7 cm)

SDS-PAGE erfolgt analog zum Abschnitt 9.1.9.3. Allerdings wird auf das Sammelgel verzichtet. Es wird ca. 1 ml Elektrodenpuffer in den Spalt zwischen Glas- und Keramikplatte pipettiert, was das Schieben des Gelstreifens in den Spalt erleichtert. Nach der Äquilibrierung wird der IPG-Streifen der Trägerfolie vorsichtig in den Spalt auf die obere Kannte des Trenngels geschoben (siehe Abschnitt 9.1.10.4.). Eventuelle Luftblasen werden mit einem dünnen Spatel herausgearbeitet. Ein Kunststoffplatzhalter wird neben das saure Ende des IPG-Streifens. Mit Hilfe einer Agaroselösung werden der IPG-Streifen sowie der Kunststoffplatzhalter fixiert.

IPG-Streifen (24 cm)

Nach Äquilibration werden die Gelstreifen in vier Teile je 6 cm geschnitten. Das saure Ende des zweiten und dritten Teils (Anode +) wird mittels einer Spritze mit Phenolrotlösung markiert. Die SDS-PAGE wird wie für die kleinen IPG-Streifen (7 cm) durchgeführt.

9.1.11. Kolloidale Coomassie-Färbung

Die Durchführung der kolloidalen Coomassie Färbung erfolgte nach der Methode von Candiano et al. (2004) Durch die Verwendung der kolloidalen Coomassie Färbung kann eine hohe Empfindlichkeit erzielt werden.

Lösung:

Coomassie-Färbelösung	12 % Phosphorsäure, 10 % Ammoniumsulfat, 0,1 % Coomassie Brilliantblau G-250
-----------------------	--

Durchführung:

- Gel in Kunststoffschale mit 50 ml Coomassie-Färbelösung Übernacht inkubieren
- Die Färbelösung in anderes Gefäß abdekantieren
- Das Gel 3x30 min mit dest. Wasser waschen
- Das Gel an dem ImageScanner III scannen

9.1.12. Semidry Blotting

Lösungen:

Anodenpuffer I	Es werden 18,15 TRIS-Base und 0,05 g Natriumazid mit 100 ml 96 %igem Ethanol versetzt und auf 500 ml mit bidest Wasser aufgefüllt.
Anodenpuffer II	Es werden und 0,05 Anodenpuffer I Ethanol versetzt und auf 500 mL mit bidest. Wasser aufgefüllt.
Kathodenpuffer	Es werden 2,6 g Aminohexansäure (EACA), 0,05 g SDS und 0,05 g Natriumazid mit 100 mL 96 %igem Ethanol versetzt und mit bidest. Wasser auf 500 mL.
Rainbow-Marker	10

Durchführung:

1. SDS-PAGE wie im Abschnitt 9.1.9. beschrieben durchführen
2. Graphitanode mit bidest. Wasser befeuchten

3. 4 Lagen Tücher mit Anodenpuffer I tränken und auf die Anode legen
4. 2 Lagen Tücher mit Anodenpuffer II tränken und luftblasenfrei legen
5. Kunststoffschablone auf die Tücher legen
6. Gel aus der Gelkassette entnehmen und Blotmembran (8 x8 cm) auflegen, beides so in die Aussparung der Kunststoffmaske legen, dass der Blot auf dem Tücherstapel aufliegt
7. 6 Lagen Tücher mit Kathodenpuffer tränken und luftblasenfrei auf den Stapel legen
8. Graphitkathode mit bidest. Wasser befeuchtet und auflegen
9. Blotvorgang: je nachdem wie viele Gele gleichzeitig geblottet werden sollen
10. Die Membran wird nach Beenden des Blotvorganges mindestens 30 min getrocknet

Einstellungen des Blotvorgangs

Anzahl der Gele	Spannung (V)	Stromstärke (mA)	Leistung (W)
1	30	60	22
2	30	120	22
3	30	180	22
4	30	240	22

9.1.13. Immunologische Methoden

9.1.13.1. Immunfärbung

Lösungen:

Kombi-Puffer	Es werden 30,3 g TRIS Base, 43,65 g NaCl und 25 ml Tween20 auf 5 L bidest. Wasser aufgefüllt.
--------------	---

Gebrauchsverdünnung der Antikörper:

Sesamantikörper	Die primären Antikörper werden als Lösung (1 µg/µl) geliefert. Die Primären Antikörper werden in einer 1:10000 Verdünnung verwendet.
	Die sekundären Antikörper werden als Lyophilisat geliefert, das zunächst mit PBS-Puffer (pH=7,4) aufgenommen wird (1 mg/ml). Die Lösung wird in einer 1:10000 Verdünnung verwendet.
Haselnussantikörper	Die Primären Antikörper werden zunächst 1:10 verdünnt. Die Zwischenverdünnung wird in einer 1:10000 Verdünnung verwendet (Endverdünnung 1:100000)
	Die sekundären Antikörper werden in einer 1:2000 Verdünnung verwendet. Dazu wird das vom Hersteller bezogene und resuspendierte Lyophilisat mit Kombi-Puffer verdünnt

Anhang

Erdnussantikörper	Die Primären Antikörper werden in einer 1:5000 Verdünnung verwendet. Die Antikörper werden als Lösung (1 mg/ml) geliefert.
	Die sekundären Antikörper werden in einer 1:5000 Verdünnung verwendet. Dazu wird das vom Hersteller bezogene und resuspendierte Lyophilisat mit Kombi-Puffer verdünnt
Streptavidin für sek. Erdnussantikörper	Dazu wird das vom Hersteller bezogene und resuspendierte Lyophilisat wird zunächst mit Kombi-Puffer verdünnt (1 mg/ml) Die Lösung wird in einer 1:5000 Verdünnung verwendet.
Humanseren (IgE)	Die Humanseren werden 1:10 mit Kombi-Puffer verdünnt
Anti-IgE Antikörper	Die sekundären Antikörper werden in einer 1:4000 Verdünnung verwendet. Sie werden als Lösung (1 mg/ml) geliefert.

Färbung mittels Meerrettichperoxidase (HRP)

Umpufferungslösung	Es werden 606 mg Tris-Base in 400 ml bidest. Wasser gelöst und der der Lösung mit verdünnter Salzsäure auf 6,0 eingestellt. Anschließend wird auf 500 ml mit bidest. Wasser aufgefüllt.
Färbelösung I	Die Färbelösung I muss immer frisch hergestellt werden. Hierzu werden 12 mg TMB und 40 mg DONS in ca. 4 ml Ethanol (96 %ig) gelöst und mit 5 ml Ethanol (99,5 %) aufgefüllt.
Färbelösung II (Citrat Puffer-Lösung)	Es werden 4,7 g Zitronensäure, 9,1 g di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat in 400 ml bidest. Wasser gelöst und ein pH-Wert von 5,0 eingestellt. Anschließend wird mit bidest. Wasser auf 500 ml aufgefüllt.
Färbereagenz (HRP)	Das Färbereagenz wird immer frisch hergestellt. Hierzu werden 5 ml Färbelösung I und 15 ml Färbelösung II vermischt und mit 10 µl 30 %iger Wasserstoffperoxidlösung versetzt.

Färbung mittels alkalischer Phosphatase (AP)

AP-Puffer	Es werden 3,03 g Tris-Base, 1,46 g NaCl und 0,25 g MgCl ₂ in 200 ml bidest. Wasser gelöst und ein pH-Wert von 9,5 eingestellt. Anschließend wird mit bidest. Wasser auf 250 ml aufgefüllt.
Dimethylformamid-Lösung 70 %	Es werden 7 ml Dimethylformamid mit bidest. Wasser auf 10 ml aufgefüllt.
BCIP-Lösung 5 %	Es werden 100 mg 5-Brom-4-Chlorindol-3-yl-phosphat in 2 ml Dimethylformamid gelöst.
NBT-Lösung 5 %	Es werden 100 mg Nitroblautetrazoliumchlorid in 2 ml der 70 %ige Dimethylformamid-Lösung gelöst.

Färbereagenz (AP)	Das Färbereagenz wird immer frisch hergestellt. Hierzu werden 20 ml AP-Puffer mit 100 µl BCIP-Lösung und 200 µl NBT-Lösung versetzt.
-------------------	--

Durchführung:

1. Membran 2 mal 15 Minuten mit Kombi-Puffer blockieren
2. über Nacht mit dem primären Antikörper inkubieren
3. 3 mal 5 Minuten mit Kombi-Puffer waschen
4. 1 Stunde mit dem sekundären Antikörper inkubieren
5. 3 mal 5 Minuten mit Kombi-Puffer waschen
6. 20 Minuten mit Streptavidin/HRP inkubieren (Nur bei der Detektion mit Erdnussantikörpern)

Mit Meerrettichperoxidase

- 7a. 1 Minute mit der Umpufferungslösung umpuffern
- 8a. Mit dem Färbereagenz (HRP) färben bis die Banden sichtbar werden

alkalischer Phosphatase

- 7b+8b. Mit dem Färbereagenz (AP) färben bis die Banden sichtbar werden

Dokumentation

9. mit destilliertem Wasser spülen und zur Dokumentation einscannen

9.1.13.2. Immunoblot-Inhibition

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

Lösungen	Verdünnung
Inhibitorextrakt (Globulin-Extrakt)	1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000
Poolserum	1:5 (20 %)
Sesamantikörper	1:5000
Haselnussantikörper	1:50000
Kontrollserum	1:10 (10 %)
BSA-Lösung	150 µg/ml

Durchführung

1. 750 µl Antikörper-Lösung (Poolserum, Sesamantikörper bzw. Haselnussantikörper) mit 750 µl je Inhibitorextrakt-Verdünnung versetzen und für 1 h bei Raumtemperatur inkubieren

2. unspezifische Inhibition: 750 µl Antikörper-Lösung mit 750 µl BSA-Lösung (150 µg/ml in Inkubationspuffer) als Inhibitor versetzen und 1 h bei Raumtemperatur inkubieren
3. Immunfärbung wie beschrieben bis zur Blockierung durchführen
4. Die Membran in 0,5 mm Blotstreifen schneiden
5. einen Blotstreifen mit 1,5 ml Kontrollserum und über Nacht
6. alle anderen Blotstreifen mit den zuvor mit Inhibitor-Lösungen inkubiertem Poolserum über Nacht inkubieren
7. Blotstreifen wie beschrieben immunfärben

9.1.13.3. Indirekte ELISA zur Detektion des Sesam- und Haselnussproteins

Lösungen:

Carbonat-Puffer (pH 9,6)	7,95 g Natriumcarbonat (75 mM) (pH 9,6), 14,7 g Natriumhydrogencarbonat (175 mM) ad 1000 mL
PBS-Tween20 (pH 9,6)	1,38 g Natriumdihydrogenphosphat–Monohydrat (10 mM), 9,94 g Dinatriumhydrogenphosphat, (70 mM) 8,78 g Natriumchlorid (150 mM) 5 mL Tween 20 ad 1000 mL
BSA-Lösung	1 % BSA in PBS-Tween20
Zitratpuffer (pH 4)	4,413 g Zitronensäure – Monohydrat (210 mM), 1,683 g Kaliumhydroxid (300 mM) ad 100 mL
TMB-Lösung	5 mg TMB in 125 µL Aceton lösen und mit 875 µL Methanol versetzen. Ggf. im Ultraschallbad lösen. (immer frisch ansetzen!)
Farbsubstrat-Lösung	19 mL Zitratpuffer + 1 mL TMB-Lösung + 200 µL 1 % H ₂ O ₂ Lösung (immer frisch ansetzen!)
Stopplösung	2 M Schwefelsäure

Konzentration der verwendeten Antikörper

	Primärantikörper (PAK)	Sekundärantikörper (SAK)
Sesam	1:10000 in PBS-Tween20	1:10000 in PBS-Tween20
Haselnuss	1:40000 in PBS-Tween20	1:4000 in PBS-Tween20

Durchführung

1. 200 µl **PBS-Extrakt (Sesam bzw. Haselnuss 10 µg/ml)** verschiedener Verdünnungen in Carbonat-Puffer im Kühlschrank (8-9 °C) über Nacht inkubieren
2. 3X mit 300 µl PBS-Tween20 waschen
3. mit 300 µl BSA-Lösung für 2 Stunden bei RT unter horizontalem Schütteln blockieren
4. 3X mit 300 µl PBS-Tween20 waschen
5. 200 µl **PAK** in PBS-Tween20 aufgeben und für 1 Stunde bei RT unter horizontalem Schütteln inkubieren
6. 3X mit 300 µl PBS-Tween20 waschen
7. 200 µl des **SAK** in PBS-Tween20 aufgeben und für 1 Stunde bei RT unter horizontalem Schütteln inkubieren
8. 3X mit 300 µl PBS-Tween20 waschen
9. 2X mit 300 µl PBS-Tween20 und 2X mit 300 µl Citratpuffer waschen
10. 200 µl Farbsubstratlösung hinzugeben und sofort mit 100 µl 2 M H₂SO₄ stoppen
11. Messung der Absorption der Standard- und Probenlösungen mittels ELISA-Reader bei 450 nm

9.1.13.4. ELISA-Inhibition

Für ELISA-Inhibition werden die Lösungen zur Durchführung des indirekten ELISAs verwendet. Die Durchführung gleicht der des indirekten ELISAs mit dem Unterschied, dass die primären Antikörper mit aufsteigender Konzentration von der Inhibitor-Lösung (GLO) (Globulin-Extrakt aus Chiasamen GLO, 5000 µg/ml).

Es werden 100 µl primären Antikörper mit 100 µl GLO-Verdünnungen vermischt und 1 Stunde in RT inkubiert. Um die gleiche Konzentration des indirekten ELISAs zu erreichen, wird die Konzentration der verwendeten primären Antikörper verdoppelt, da sie durch das Mischen mit GLO halbiert wird.

Konzentration der verwendeten Antikörper-Lösungen

	Primärantikörper		Sekundärantikörper	
Sesamantikörper	1:5000 in PBS-Tween20		1:5000 in PBS-Tween20	
Haselnussantikörper	1:20000 in PBS-Tween20		1:2000 in PBS-Tween20	
Endverdünnungen in der Mikrotiterplatte	in Inhibitorlösung GLO	Haselnussantikörper	Sesamantikörper	
unverdünnt	1:2	1:40000	1:10000	
1. Verdünnung	1:10	1:40000	1:10000	
2. Verdünnung	1:100	1:40000	1:10000	
3. Verdünnung	1:1000	1:40000	1:10000	
4. Verdünnung	1:10000	1:40000	1:10000	

Auswertung:**Berechnung von Inhibition %**

$$\text{Inhibition\%} = 100 - \left(\frac{A1}{A2} \times 100 \right)$$

Inhibition%: Inhibierungsgrad des Chiasamen-Extrakt

A1: Absorption nach Inkubation mit dem Chiasamen-Extrakt

A2: Absorption nach Inkubation mit PBS-Puffer

Berechnung von C₅₀-Wert

$$\text{C50 - Wert} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) = e^{\frac{y-b}{a}}$$

mit

$$y = a * \ln(x) + b$$

y: 50 %ige Inhibition

9.1.14. Fällungsmethoden**9.1.14.1. AS-Fällung**

30 g des zur Fällung verwendenden Salzes (NH₄)₂SO₄ wird fein zerrieben. Als Proteinlösung wird die Globulin-Fraktion eingesetzt.

Durchführung:

1. 1,588 g Ammoniumsulfat einwiegen und 9 ml Globulin-Fraktion in 15 ml Falcon zusetzen (15 % w/v)
2. 1 Stunde bei 4 °C schütteln
3. 1 Stunde bei 4 °C bei 5759 rpm zentrifugieren
4. 9 ml vom Überstand abnehmen und diesem wieder 1,588 g Ammoniumsulfat zusetzen (30 % w/v)
5. 1 Stunde bei 4 °C schütteln und anschließend bei 4 °C bei 5759 rpm zentrifugieren
6. 9 ml vom zweiten Überstand abnehmen und diesem wieder 1 g Ammoniumsulfat zusetzen (40 % w/v)
7. schütteln und zentrifugieren wie oben beschrieben
8. 9,3 ml aus dem letzten Überstand in ein neues 15 ml Röhrchen pipettieren und diesem 1,138 g (50 % w/v)
9. schütteln und zentrifugieren wie oben beschrieben
10. Aus jedem Überstand wird eine Probe (0,5 ml) entnommen und entsalzen um die enthaltenen Proteine mittels SDS-PAGE zu untersuchen

Entsalzen der SDS-Proben

1. 50 µl Proteinextrakt/Überstand in ein 1 ml REAKTIONSGEFÄß geben
2. 200 µl Methanol dazugeben und anschließend 15 min vortexen
3. 50 ml Chloroform dazugeben und anschließend 15 min vortexen
4. 150 ml H₂O zugeben und vortexen → die Lösung wird weiß
5. Die Lösung für 1 min bei 15000 rpm zentrifugieren
6. Obere Phase entfernen (abpipettieren)
7. 200 µl Methanol zugeben
8. 5 min bei 28000 rpm zentrifugieren
9. Den Überstand abdekantieren und das Pellet mit 50 µl Globulin-Puffer aufnehmen und vortexen bis das Pellet aufgelöst ist
10. Für weitere Untersuchungen bei – 20 °C lagern

9.1.14.2. PEG-Fällung

Lösungen:

33 % PEG-Lösung	200 g PEG ad. 600 ml bidest. Wasser
70 % Ethanol	70 ml Ethanol ad. 100 ml bidest Wasser

Durchführung:

1. 10 Eppendorf-Tubes wurden zunächst mit 100 µl Globulin versetzt.
2. Der ersten Tube wurde 10 µl PEG-Lösung versetzt, deren Volumen in anderen Tubes in 10 µl Schritten erhöht wird (siehe Tabelle unten)
3. 10 min bei RT stehen lassen und anschließend für 5 min bei 15000 zentrifugieren
4. Das erhaltene Pellet mit 70 %igem Ethanol waschen
5. Für 5 min bei 15000 zentrifugieren.
6. Das Pellet mit 25 µl Globulin-Puffer aufnehmen
7. SDS-PAGE und kCF

Tube-Nummer	Volumen GLO (µl)	Volumen PEG-Lösung (µl)	PEG-Menge (µg)	Endkonzentration (%)
1	100	10	3,3	3
2	100	20	6,6	5,5
3	100	30	9,9	7,6
4	100	40	13,2	9,4
5	100	50	16,5	11
6	100	60	19,8	12,4
7	100	70	23,1	13,5
8	100	80	26,4	14,6
9	100	90	29,7	15,6
10	100	100	33	16,5

So wurden 10 Eppendorf-Tubes mit 100 µl GLO und jeweils 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µl 33 %ige PEG-Lösung versetzt

9.1.14.3. Aufkonzentrieren

Durchführung:

1. Die Ammoniumsulfat-Fraktion mit 4-fachem Volumen bidest. Wasser verdünnen
2. 5 ml der verdünnten Fraktion in die Amicon Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheit geben und für 10 min bei 4500 rpm zentrifugieren
3. Den Durchlauf entsorgen
4. Den Schritt wiederholen bis das ganze Volumen der AS-Fraktion filtriert ist
5. Das Filtrat 6-mal mit je 5 ml bidest. Wasser waschen (Wasser zugeben und zentrifugieren)
6. 20 min Zentrifugieren und das Konzentrat (ca. 0,5 ml) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß umpipettieren und bei -20 °C lagern

9.1.15. Auftrennung mittels GPC

Lösungen und Materialien

Spezifikation	
Säulenmaterial	HiLoad™ S-200 High Resolution
Eluat	50 mM Tris-Puffer
Fluss	3 mL/min
Fraktionsvolumen	10 mL
Laufmittel	Puffer C, isokratisch
Detektion	UV-Spektroskopie
Wellenlänge	280 nm
Dauer	120 min

9.1.16. Auftrennung mittels IEC

9.1.16.1. Aninonenaustauschchromatographie

Lösungen:

Pumpe	Pharmacia LKB Pumpe P-1
Flow	1 ml/min
Probe	1 ml Globulin-Extrakt, verdünnt mit 19 ml Wasser (20 ml, 25 mM KCl)
Equilibrierpuffer	50 mM Tris-Puffer, 25 mM KCl
Equilibriervolumen	20 ml
Eluent 1	50 mM Tris-Puffer, 50 mM KCl
Eluent 2	50 mM Tris-Puffer, 100 mM KCl

Eluent 3	50 mM Tris-Puffer, 200 mM KCl
Eluent 4	50 mM Tris-Puffer, 300 mM KCl
Eluent 5	50 mM Tris-Puffer, 400 mM KCl
Eluent 6	50 mM Tris-Puffer, 500 mM KCl
Eluent 7	50 mM Tris-Puffer, 1000 mM KCl
Fraktionsvolumen	3 ml bei jedem Eluat

Materialien:

Trennsäulen	Struktur der Beads	geladene Gruppe	Gesamtaustausch-Kapazität
Q Sepharose Fast Flow	6 % hoch vernetzte Agarose	-N+(CH ₃)	0,18-0,25 mmol Cl ⁻ /ml Medium
Q Sepharose XL	6 % hoch vernetzte Agarose mit gebundenem Dextran	-N+(CH ₃) ₃	0,18-0,26 mmol Cl ⁻ /ml Medium
DEAE Sepharose Fast Flow	6 % hoch vernetzte Agarose	-N+H ₂ (C ₂ H ₅) ₂	0,11-0,16 mmol Cl ⁻ /ml Medium
ANC Sepharose 4 Fast Flow	4 % hoch vernetzte Agarose	-N+H(C ₂ H ₅) ₂	0,13-0,17 mmol Cl ⁻ /ml Medium

9.1.16.2. Kationenaustauschchromatographie

Lösungen:

Pumpe	Pharmacia LKB Pumpe P-1
Flow	1 ml/min
Probe	1 ml Globulin-Extrakt, verdünnt mit 19 ml Wasser (20 ml, 25 mM KCl)
Equilibrierpuffer	50 mM Natriumcitrat-Puffer, 25 mM KCl
Equilibriervolumen	20 ml
Eluent 1	50 mM Natriumcitrat-Puffer, 50 mM KCl
Eluent 2	50 mM Natriumcitrat-Puffer, 100 mM KCl
Eluent 3	50 mM Natriumcitrat-Puffer, 200 mM KCl
Eluent 4	50 mM Natriumcitrat-Puffer, 300 mM KCl
Eluent 5	50 mM Natriumcitrat-Puffer, 400 mM KCl
Eluent 6	50 mM Natriumcitrat-Puffer, 500 mM KCl
Eluent 7	50 mM Natriumcitrat-Puffer, 1000 mM KCl
Fraktionsvolumen	3 ml für jeden Eluat

Materialien:

Trennsäulen	Struktur der Beads	geladene Gruppe	Gesamtaustausch-Kapazität
SP Sepharose Fast Flow	6 % hoch vernetzte Agarose	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ SO ₃ ⁻	0,18-0,25 mmol H ⁺ /ml Medium

SP Sepharose XL	6 % hoch vernetzte Agarose mit gebundenem Dextran	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	0,18-0,25 mmol H ⁺ /ml Medium
CM Sepharose Fast Flow	6 % hoch vernetzte Agarose	$-\text{O}-\text{CH}_2\text{COO}^-$	0,09-0,13 mmol H ⁺ /ml Medium

9.1.16.3. Durchführung der IEC

1. Alle Puffer durch einen Membranfilter mittels einer Vakuumpumpe filtern
2. Die Säule anschließen und mit 20 ml Equilibrierpuffer equilibrieren
3. Die Probe (1 ml Globulin-Fraktion) mit 19 ml Wasser verdünnen
4. Pumpe ausschalten und die Kapillare in den Falcon der verdünnten Probe geben, damit die Kapillare keine Luft zieht und auf die Säule aufträgt
5. Warten bis die Probe komplett auf die Säule gegeben wird und den Durchlauf der Probe in ein Röhrchen sammeln und später mituntersuchen
6. Die Pumpe ausschalten und die Kapillare in den Falcon des ersten Eluats stecken und befestigen
7. Pumpe anschalten und eine 3 ml Fraktion sammeln
8. Den Schritt 6 und 7 bei jedem Eluat wiederholen
9. Fraktionen und Durchlauf mit PEG ausfällen (3 ml 30 % PEG-Lösung dazu geben und unter 9.1.14.2. fortfahren)
10. Die Säule mit 10 ml von Eluat 7 waschen und dann mit 20 ml Equilibrierpuffer equilibrieren
11. Zum Schluss die Säule mit 20 %-Ethanol bei 4 °C lagern

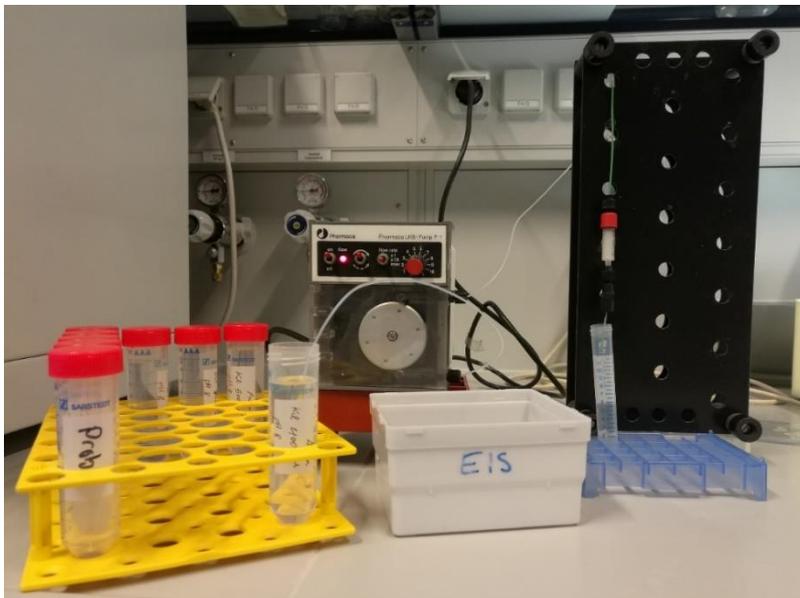


Abbildung 49: Die bei der Durchführung der IEC- verwendete Pumpe

9.1.17. Auftrennung mittels IAC-MB

9.1.17.1. Kopplung der Sesamantikörper an die *magnetic beads*

1. 200 µL (10 mg) SiMAG-Carboxyl Beads (chemicell) zweimal mit je 1 ml MES-Puffer (0,1 M MES, pH 5,0) waschen, indem der Puffer zu den SiMAG-Beads gegeben wird, kurz gevortext wird und der Überstand im Magnetrack abgenommen wird
2. Beads in 250 µL (EDC-)MES-Puffer (0,1 M MES, pH 5,0, 10 mg EDC, frisch angesetzt) aufnehmen und 10 Minuten bei Raumtemperatur vortexen
3. Zugabe von etwa 25 µg der Sesamantikörper und anschließend 2 Stunden bei Raumtemperatur vortexen
4. SiMAG-Beads dreimal mit je 1 ml PBS-Puffer waschen, indem der Puffer zu den Beads gegeben wird, kurz gevortext wird und der Überstand im Magnetrack abgenommen wird
5. Aufnahme der Beads in 1000 µl Blocking&Storage-Puffer (PBS-Puffer, 0,1 % Ethanolamin, 0,05 % Natriumazid). Beadkonzentration also 10 mg/ml bzw. 1,8·10¹⁰ Beads/ml
6. Vor der Benutzung müssen 100 µl der SiMAG-Beads gewaschen werden, indem die Beads kurz gevortext werden und der Überstand im Magnetrack abgenommen wird. Anschließend werden die Beads in 100 µl bidest. Wasser aufgenommen

9.1.17.2. Nachweis der gekoppelten Antikörper an den magnetic beads (ELISA-*magnetic beads*)

1. Zugabe von 20 µl Magnetic Beads in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß
2. Zugabe von 200 µl sekundären Antikörpern (Konzentration 1:2000)
3. Inkubieren in RT für 1 Stunde
4. Die Beads für 10 Sekunden bei 12000 rpm Zentrifugieren
5. Den Überstand verwerfen und die Beads mit Kombi-Puffer 3-mal mit je 250 µl und anschließend bei 12000 rpm für 10 Sekunden zentrifugieren. Die Beads werden beim dritten Waschschrift in anderes Reaktionsgefäß umpipettiert
6. Färbelösung zur Immunfärbung herstellen: 12 mg TMB, 40mg DONS in 1 ml Ethanol lösen und zu 19 ml Citrat-Puffer und dazu 10 µl H₂O₂
7. 100 µl Färbelösung auf die Magnetic Beads pipettieren
8. 100 µl Stopplösung 2 M H₂SO₄

9.1.17.3. Auftrennung der IgE- bzw. IgG-bindende Proteine:

1. Zugabe von 20 µl SiGMA-Carboxy Beads gekoppelt mit Sesamantikörpern in 1,5 ml Reaktionsgefäß

2. Zugabe von 20 µl bidest. Wasser und den Überstand im Magnettrack abnehmen
3. Zugabe von 80 µl Globulin-Extrakt
4. Kurz vortexen und Übernacht bei 4 °C inkubieren
5. Extrakt im Magnettrack abnehmen und die Beads 3 mal je mit 200 µl PBS-Puffer waschen
6. Zugabe von 20 µl Elutionspuffer und 3 Stunden in RT inkubieren
7. 5 min bei 15000 rpm zentrifugieren und 15 µL vom Überstand abnehmen
8. Für weitere Untersuchungen bei – 20 °C lagern.

9.1.17.4. Pufferzusammensetzungen zur Elution der an die gekoppelten Antikörper gebundenen Proteine im Chiaextrakt

Puffer-Nr	Bezeichnung	Puffer	pH-Wert
Puffer 1	G-HCl	0,1 M Glycin-HCl	1,5-2,8
Puffer 2	G-Na-HCl	0,1 M Glycin-HCl, 0,5 M NaCl	2,5
Puffer 3	Acetat-NaCl	0,1 M Na-Acetat, 0,15 NaCl, HCl	1
Puffer 4	Citrat-Po4	0,1 M Na-Citrat/Phosphat	3- 3,5
Puffer 5	ES-AM	0,1 M Essigsäure/Ameisensäure	2,2
Puffer 6	ESS	0,5 M Essigsäure	
Puffer 7	PrS	1 M Propionsäure	
Puffer 8	NaCl-NH4	0,15 M NaCl/NH4OH	11,0
Puffer 9	TTA	0,1 M Trithylamin	11,5

9.1.18. Nachweis von Glycoproteinen mittels Periodsäure-Schiffsche-Färbung

Lösungen

Fixierlösung	40 % Ethanol und 7 % Eisessig in Wasser
Oxidationslösung	1 % Natriummetaperiodat und 3 % Eisessig in Wasser
Schiff's fuchsin-sulfite Reagenz	Gebrauchsfertige Lösung von Sigma-Aldrich
Waschlösung	0,58 % Kaliummetabisulfit und 3 % Essigsäure in destilliertem Wasser

Durchführung

1. Es wurden 50 µL der Probe mit 25 µL des Probenpuffers versetzt, bei 95 °C für 5 min hitzedenaturiert und anschließend wurden die verschiedenen Volumina (2 µL, 4 µL, 6 µL, 8 µL und 10 µL) in die Probenaschen des Gels pipettiert.
2. SDS-PAGE wurde wie 9.1.9.3. durchgeführt
3. Nach der SDS-PAGE das SDS-Gel vier Mal mit je 50 ml Fixierlösung für je 30 min inkubieren und beim vierten Mal über Nacht inkubieren

4. Das Gel zweimal je 30 min mit der Fixierlösung spülen
5. Das Gel für eine Stunde in der Oxidationslösung inkubieren
6. Das Gel zehn Mal je 10 min mit Wasser spülen
7. Zum Färben des Gels eine Stunde mit 50 ml Schiff's Reagenz unter Lichtausschluss inkubieren
8. Gele mit der Waschlösung dreimal je 10 min gewaschen

9.1.19. Extreme Bedingungen zur Untersuchung der IgE-Bindung

Durchführung

Für alle Behandlungsarten wird der Globulin-Extrakt (GLO) mit einer Konzentration von 5 mg/ml eingesetzt.

Hitzebehandlung					
30 µl GLO im Wasserbad wie folgendes behandeln					
	20 °C	40 °C	60 °C	80 °C	100 °C
5 min		G40-5	G60/5	G80/5	G100/5
10 min		G40-15	G60-10	G80-10	G100-10
15 min	Blank	G40-15	G60-15	G80-15	G100-15
Nach der Behandlung werden die Proben für 5 min bei 95 °C gekocht und danach erfolgen SDS-PAGE und anschließender Immunfärbung mit Sesamantikörpern					
Niedriger pH-Wert					
Lösung: HCl-Lösung (100 mM)					
Die Proben (20 µl) in Lösungen pH-Werten von 2, 4, 6, 8 vorbereitet					
pH-Wert	(HCl) µl	(H ₂ O) µl	(Glo) µl	Endvolumen	
pH=2	0	10	10	20 Blank	
pH=4	2,45	7,55	10	20	
pH=6	2,9	7,1	10	20	
pH=8	4,5	5,5	10	20	
Nach der Behandlung werden die Proben für 5 min bei 95 °C gekocht und danach erfolgen SDS-PAGE und anschließender Immunblot mit Sesamantikörpern					
Druckbehandlung					
Lösung: Natronlauge					
Die Probe (10 ml) wird zunächst mit Hilfe von einem Spritzenfilter (Filtropur S 0.45µm) gefiltert und anschließend mit <i>French Press</i> behandelt. Als Blindprobe wird der unbehandelte GLO eingesetzt. Vor und nach der Behandlung wird die <i>French Press</i> mit dest. Wasser, Natronlauge und abschließend mit Wasser gespült. Danach erfolgt die Untersuchung der Proben durch SDS-PAGE und die Immunoblot mit Sesamantikörpern.					

9.1.20. MS-Analyse**9.1.20.1. UPLC-Parameter:**

Pre-column	nano Acequity UPLC 20-VMTrap 5 um Symmatry C18 180umX20mm
Column	Aciquity UPLC BEH C18 10 K psi, 130A, 1,7 um 75 umX200 mm, 1/pKg
Calibration kit	Pierce LTQ Velos ESI positive ion calibration
Pressure limits	0-500 bar
Run time	60 min
Buffer A	Water
Buffer B	ACN

Gradienten				
time	flow	A%	B%	Curve
40	0,25	30	70	6
41	0,25	10	90	6
42	0,25	10	90	6
42	0,25	98	2	6
60	0,25	98	2	6

9.1.20.2. MS-Parameter:

Global Setting	
Chrom. Peak width	6 s

Time	
Method duration	60 min

Properties of full MS/ dd-MS²		Full MS	
Runtime	0 to 60 min	Resolution	70.000
Polarity	positive	AGC target	1,00E+06
Default charge state	2	Maximum IT	120 ms
		Scan range	400 to 1300 m/z

dd-MS² /dd-SIM		dd Settings	
Resolution	17.500	Underfill ratio	24.0%
AGC target	5,00E+05	Intensity threshld	2,00E+06
Maximum IT	60 ms	Apex trigger	to 16 s
Loop count	12	Charge exclusion	1.4 - 8.>8
Isolation window	2.0 m/z	Peptide match	
Fixed first mass	100.0 m/z	Exclude isotops	14.0 s
NCE /stepped NCE	25	Dynamic exclusion	

9.1.20.3. Parameter der De Novo Sequenzierung:

General Settings	Modifications
-------------------------	----------------------

Precursor Mass Tolerance	10 ppm	Name	Mass
#Solutions (max. 20)	10	Carbamidomethylation of C	57.02
#Threads/Cores	12	Oxidation of M	15.99
Fragment Mass Tolerance	0,5 Da		
Use Spectrum Precursor m/z	yes		
Use Spectrum Charge State	No		

9.1.21. DNA-Isolierung und Konzentrationsbestimmung

9.1.21.1. DNA-Isolierung aus Acetonpulver

1. Ca. 100 mg Acetonpulver einwiegen
2. die Probe mittels *DNeasy Plant Mini Kit* nach Angaben des Herstellers aufarbeiten (mini protocol)
3. Zum Schluss erfolgt die Eluation mit 30 µl bidest. Wasser
4. Die Probe nach Bestimmung der DNA-Konzentration bei 4 °C lagern

9.1.21.2. Konzentrationsbestimmung der DNA

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte mittels photometrischer Messung an einem NanoDrop®. Dazu wurde je 1 µl der zu bestimmenden Probe auf die Messvorrichtung des NanoDrops® pipettiert und die Absorption bei 260 nm gemessen. Als Blindwert wurde bidest. Wasser gemessen.

9.1.21.3. Isolierung der PCR-Produkte aus dem Agarosegel

1. Die Zielbande aus dem Agarosegel unter UV-Licht rausschneiden.
2. Das Gelstück mittels *PeQ Gold Gel Extraktion Kit* nach Angaben des Herstellers aufarbeiten (Arbeitsanleitung von VWR auf Seite 4-6)
3. Zum Schluss erfolgt die Eluation mit 30 µl bidest. Wasser
4. Die Probe nach Bestimmung der DNA-Konzentration bei 4 °C lagern

9.1.21.4. Isolierung der PCR-Produkte aus Reaktionsansätzen

1. Den Reaktionsansatz mit *PeQ Gold Gel Extraktion Kit* nach Angaben des Herstellers behandeln (Arbeitsanleitung von VWR auf Seite 7)
2. Zum Schluss erfolgt die Eluation mit 30 µl
3. Die Probe nach Bestimmung der DNA-Konzentration bei 4 °C lagern

9.1.22. PCR**9.1.22.1. Reagenzien für die Polymerasekettenreaktion:**

Bezeichnung	Spezifikation	Hersteller
Taq-Polymerase	5 U/μL	Fisher Scientific-Germany GmbH, Schwerte, Deutschland
Dream-Taq-Puffer	10-fach, unbekanntes Zusammensetzung	
dNTPs	1/1/1/1 (je 25 mM)	Bioline, Luckenwalde, Deutschland
Primer	100 μM	Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland

9.1.22.2. PCR-Pipettierschema und Durchführung:

MasterMix	Ansatz A (klein) 50 μl	Ansatz B (groß) 100 μl
Bidest. Wasser	34	68
Dream-Taq-Puffer (10-fach)	5	10
dNTP-Mix (10 mM)	4	8
BSA-Lösung	0,5	1
Fw-Primer (100 μM)	0,5	1
Rw-Primer (100 μM)	0,5	1
Dream-Taq-Polymerase (0,5 U/μL)	0,5	1

1 μl DNA-Lösung (10 ng/μl) + 9 μl MasterMix = 10 μl DNA-Probe

Bidest. Wasser 1 μl + 9 μl MasterMix = 10 μl Blindprobe

Wichtig: die Reihenfolge soll eingehalten werden. Nach der Zugabe von TAG-Polymerase wird nicht mehr geschüttelt oder zentrifugiert (Mischen sanft mit der Hand). Bei größeren Ansätzen zu Sequenzierung der PCR-Fragmente (z.B. 200 μL) werden 4 Reaktionsgefäße jeweils 50 μL eingesetzt.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	94,0 °C	5 min	1x
Denaturierung	94,0 °C	1 min	1x
Annealing	Primer abhängig	45 s	1x
Elongation	72,0 °C	1 min	30x
Finale Elongation	72,0 °C	7 min	1x
Hold	4,0 °C		

9.1.22.3. Agarosegelelektrophorese**Lösungen:**

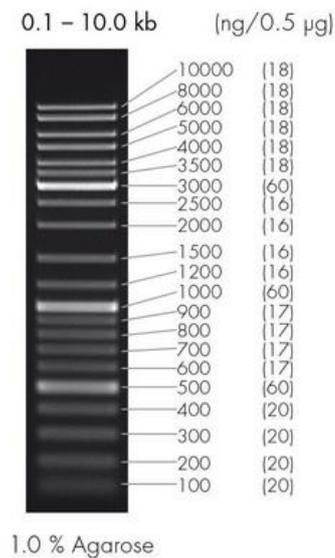
TAE-Puffer	40 mM Tris-HCl 2 mM EDTA (mit Eisessig auf pH 8 eingestellt)	
Loading Dye	50 % Glycerin 50 % TAE-Puffer	Eigene Herstellung

	0,05 % Xylencyanoblauf	
DNA-Leiter Mix, peqGOLD	Größenbereich: 21 Fragmente, 100 – 10 000 bp	Peqlab, Erlangen, Deutschland

Durchführung:

Für die Herstellung eines 1,5 %-igen Agarosegels werden 0,75 g Agarose eingewogen, mit 50 mL 1-fach Tris-Acetat-Ethylendiamintetraacetat-Puffer versetzt und zum Auflösen in der Mikrowelle für 2 min erhitzt. Die Agarose wird auf etwa 50 °C abgekühlt und in einen Gelschlitten gegossen. Danach werden ein bzw. zwei Kämme platziert. Nach vollständigem Aushärten des Gels werden die Kämme entnommen und in die Elektrophoreseeinheit eingesetzt. Diese wird DNA mit 1-fachem TAE-Puffer gefüllt. Zur Herstellung der Probenlösung werden 10 µl PCR-Probe mit ca. 2 µl LoadingDye versetzt. Die Probenaschen werden mit jeweils 10 µl der Probenlösung bzw 5 µL des DNA-Leiters pipettiert und einer elektrophoretischen Analyse (170 V, 1000 mA, 20 min) unterzogen.

Die Detektion der DNA-Amplifikate erfolgt nach 10 minütiger Inkubation des Gels in einem 0,001 %-igen Ethidiumbromidbad unter UV-Licht bei 312 nm.

9.1.22.4. Marker für die PCR**Abbildung 50: DNA-Ladder (100-10000 bp)**

9.1.22.5. Verwendete Primer

Tabelle 26: Im Rahmen dieser Arbeit entworfene Primer

Anhand der Peptidsequenzen detektiert mit Sesamantikörpern		Anhand der Peptidsequenzen detektiert mit Haselnussantikörpern	
	Primersequenz	Bezeichnung	Primersequenz
Arah3Fw	GCTGATATCTACAACCCTCTC	SesLegFw	GGCAACAGGGCCAGTGCCG
Arah3Rev	CGTGAAGGGGTTATTGTT	SesLegRev	GCAGGGTTTCCGGCCAGG
VicilinlikeFw	AACGCGTACAACAACGAGAAGTTC	SesGloFw1	TACCACCCCTCTCCCCG
VicilinlikeRev	CCCCTTGAAGAAAACTCCTCTTTCTG	SesGloRev1	CCGATGTGTAACCAGCCAG
		SesGloRev2	CCGGAGACAGCAAGAACTCTG
11SglobulinFw	GTGGACCACAACGGACAA	PriLegFW	GTTCCAATGCGCCGGCGTCG
11SglobulinRev	CTGATACGAATTTGTGATGACCTG	PriLegRev	GGGAACTCCTCCGGCCAAG
7Svicilinsesi3Fw	CGGGTCCTTCAGAAATTCACG	CorGloFw1	CACTTCTACCTTGCCGGG
7Svicilinsesi3Rev	ACATCCCCACCGCTTCCAACATG	CorGloRev1	CCTGATGGCTGAGGTTCG
11globulinsesi6Fw	GGCGACGCCCAGGTCCAAGTA	CorGloFw2	CAGCAATTCCAGTGCGCTG
11globulinsesi6Rev	AAACCCACAGCCTCTAGCGCT	CorGloFw2	CCTGATGGCTGAGGTTCG
11globulinsesi7Fw	GTTTACAACCCGCACGGC	BraCruFw	GTCAGCTAGACCAGCTCAATG
11globulinsesi7Rev	GGGCTTAGGCATATACGACAT	BraCruRev	TTGTGGGTTGTTCCGGCTAAG
VicilinlikeFw2	CCGTATGTATTCGAGGAAAGGCAT	NicGloFw	TTCCAGTGTGCTGGAGTTG
VicilinlikeRw2	CCCCTTGAAGAAAACTCCTCTTTCTG	NicGloRev	CTGGTACTCCACCAGCCAAG

Anhang

		NicGloRev2	TCACTTGTTGTCCGCTGTGG
		EryGloFw	CGCCAGCCCACTCAGAG
		EryGloRev	CCTTTCGTCACGTACACGATCG

9.1.22.6. Entwurf der Primer anhand der Sequenzähnlichkeit zu Speicherproteinen anderer Spezies

Tabelle 27: Entwurf der Primer anhand der Sequenzübereinstimmung zwischen Chiasamenpeptiden und Peptiden bekannter Allergene

Name	Spezies	ID	Chiasamenpeptide	Peptide mit Identität über 65%	Nr.	Primer-Bezeichnung	Primersequenz aus identischen Peptiden	Annealing Temperatur	Erwartetes Amplifikat	Spezifische PCR-Fragment
Erdnuss	<i>Arachis hypogaea</i>	Q647H2.1	A D L Y N P	A D I Y N P	1	ArahFw	GCTGATATCTACAACCTCTC	45,5	453	nein
			N N E Q F T	N N N P F T		ArahRev	CGTGAAGGGGTTATTGTT			
Gelbe Gauklerblume	<i>Erythranthe guttata</i>	XP_012854379.1	N A Y N N E K F	N A Y N N E K F	2	EryVicFw1	AACGCGTACAACAACGAGAAGTTC	54,3	155	ja
			Q K E E F F F E G	Q K E E F F F K G		EryVicRev1	CCCCTTGAAGAAAACTCCTCTTTCTG			
			N P Y V F E D R	N P Y V F E E R	3	EryVicFw2	CCGTATGTATTCGAGGAAAGGCAT	53,3	1122	nein
		Q K E E F F F E G	Q K E E F F F K G	EryVicRw1		CCCCTTGAAGAAAACTCCTCTTTCTG				
XP_012831308.1	A Q Q P T L R	A A Q P T Q R	4	EryGloFw	CGCCAGCCCACTCAGAG	54	954	Ja		
T V V Y V T K	T I V Y V T K	EryGloRev		CCTTTCGTCACGTACACGATCG						
Sesam	<i>Sesamum indicum</i>	XP_011083024.1	Q Q G E C	Q Q G Q C	5	SesLegFw	GGCAACAGGGCCAGTGCCG	58	493	nein
			F L A G N P	F L A G N P		SesLegRev	GCAGGGTTTCCGGCCAGG			
		Q9XHP0.1	V D H S G Q	V D H N G Q	6	SesGloFw1	GTGGACCACAACGGACAA	49,7		nein
			Q V L T N A Y Q	Q V I T N S Y Q		SesGloRev1	CTGATACGAATTTGTGATGACCTG			
7+8	Y H P N P R	Y H P S P R	7+8	SesGloFw2	TACCACCCTCTCCCCG	52	994	Ja		
	M A G Y T S A	L A G Y T S V		SesGloRev2	CCGATGTGTAACCAGCCAG					
			Q T F L L S P	Q S F L L S P		SesGloRev3	CCGGAGACAGCAAGAACTCTG	54	1055	
Perilla	<i>Perilla frutescens</i>	AAF19607.1	F Q C A G V	F Q C A G V	9	PriLegFW	GTTCCAATGCGCCGGCTCG	58	406	nein
			Y L A G S A P	Y L A G G V P		PriLegRev	GGGAACTCCTCCGGCCAAG			
		AAL73404.1	F Y L A G	F Y L A G	10+11	CorGloFw1	CACTTCTACCTTGCCGGG			nein

Anhang

Gemeine Hasel	<i>Corylus avellana</i>		Q Q F E C A	Q Q F Q C A		CorGloFw2	CAGCAATTCCAGTGCCTG	52	807	
			Y T S A L R	R T S A I R		CorGloRev	CCTGATGGCTGAGGTTCTG	52	1191	
Raps	<i>Brassica napus</i>	CAA3269 2.1	Q C Q L Q Q L S A	E C Q L D Q L N A	12	BraCruFw	GTCAGCTAGACCAGCTCAATG	52	587	Ja
			Y L A G S Q P O	Y L A G N N P Q		BraCruRev	TTGTGGGTTGTTCCGGCTAAG			
Tabak	<i>Nicotiana tabacum</i>	XP_01645 5279.1	F Q C A G V	F Q C A G V	13-14	NicGloFw	TTCCAGTGTGCTGGAGTTG	52	406	nein
			Y L A G S A P Q	Y L A G G V P E		NicGloRev1	CTGGTACTCCACCAGCCAAG			
			V N H S G Q E H	V D H S G Q Q V		NicGloRev2	TCACTTGTGTCCGCTGTGG			

9.1.22.7. Primer für verschachtelte PCR

Tabelle 28: Verwendete Primer für verschachtelte PCR

Bezeichnung	Primersequenz
SeqCh1nestFw	AGCAGGGAAGAGGAATGTGA
SeqCh1nestRev	GGCATCGGTCTTTCTCCTCA
SeqCh2nestFw	GGTTGTCTGGACGACTCGC
SeqCh2nestRev	CCCATCTAAACCAATCCC
SeqCh3nestFw	GAGCACTCGGATACACTGGA
SeqCh3nestRev	GGAGAGAGAGAGAGAGAACCC
SeqCh4nestFw	ATGTTCGAACCTGCAACACC
SeqCh4nestRev	AGTAGGGACCCTTTGACACG
SeqCh5nestFw	TGCCTAGTCCCACAATAGCC
SeqCh5nestRev	AAGAGCTTCGTGTA CT CGGA

9.2. Ergebnisse

9.2.1. Sequenzübereinstimmung und -ähnlichkeit zwischen Sesamallergenen und anderen bekannten Allergenen

Tabelle 29: Alle in die Tabelle aufgeführten Sequenzen sind unter <http://www.uniprot.org> zu finden. Die Sequenzübereinstimmung und -ähnlichkeit wurden unter <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> berechnet, „—“, bedeutet: Sequenz ist nicht vorhanden.

Spezies	Biochemischer Name	Viciline	Übereinstimmung	Ähnlichkeit	Biochemischer Name	Legumine	Übereinstimmung	Ähnlichkeit
Sesam	Ses i 3	7S Vicilin-ähnliches Globulin	100 %	100 %	Ses i 7.0101	11 Globulin Speicherprotein	100 %	100 %
Haselnuss	Cor a 11	Glykoprotein	54 %	74 %	Cor a 11	11S-Globulin-ähnliches Protein	49 %	62 %
Pistazie	Pis v 3.0101	Vicilin	48 %	66 %	Pis v 2.0101	11S-Globulin-ähnliches Protein	51 %	70 %
Cashewnuss	Ana o 1.0101	Vicilin-ähnliches Protein	46 %	67 %	Ana o 1.0101	11S-Globulin-ähnliches Protein	51 %	69 %
Englische Walnuss	Jug r 2.0101	Vicilin-ähnliches Protein	47 %	68 %	Jug r 4.0101	11S-Globulin-ähnliches Protein	52 %	67 %
Schwarze Walnuss	Jug n 2.0101	Vicilin	47 %	68 %	---	---	---	---
Erdnuss	Ara h 1.0101	Vicilin-like protein	34 %	54 %	Ara h 3.0101	Glycinin	37 %	52 %
Linse	Len c 1.0102	Vicilin-like protein	33 %	55 %	---	---	---	---
Mungbohne	Vig r 2.0101	8S Globulin beta Isoform	33 %	55 %	---	---	---	---
Erbse	Pis s 1.0101	Vicilin	33 %	56 %	---	---	---	---
Lupine	Lup an 1	Conglutin beta	35 %	58 %	---	---	---	---
Mandel	---	---	---	---	Pru du 6.0101	Prunin 1	50 %	69 %

9.2.2. Charakterisierung der Humanseren

9.2.2.1. Kalibrierreihe und –Gradienten

Tabelle 30: EAST-Kalibrierreihe

Referenz	Spez. IgE-Konzentration	1. Bestimmung	2. Bestimmung	Mittelwert
Blank	0	0,0679	0,0710	0,0695
1	0,35	0,3728	0,3826	0,3083
2	1	0,5307	0,5565	0,4742
3	3,5	1,0137	1,0503	0,9626
4	10	1,8236	1,6582	1,6715
5	50	2,8778	3,2206	2,9798

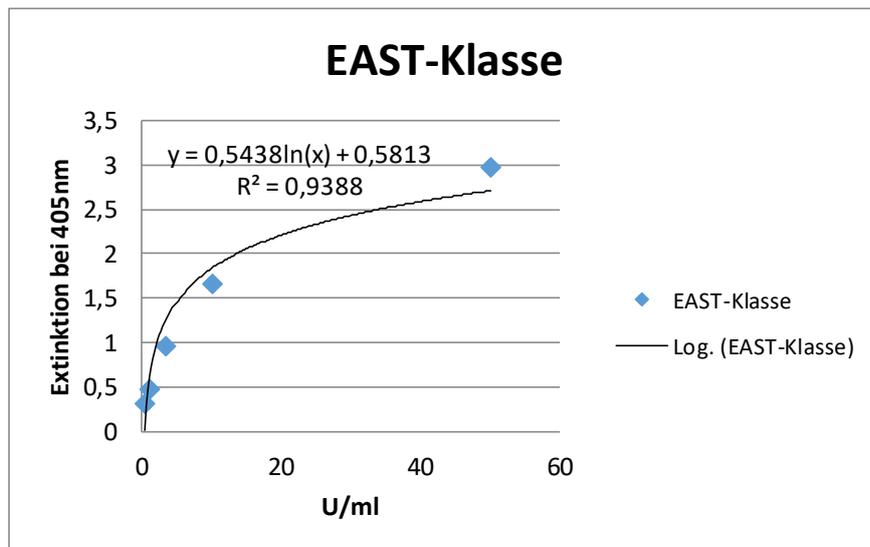


Abbildung 51: Gradienten zur Berechnung der EAST-Klasse

9.2.2.2. Bestimmung der spezifischen IgEs gegen Sesam

Tabelle 31: berechnete Konzentration der spezifischen IgEs gegen Sesam in Humanseren (1-5)

Bezeichnung	Projekt-Nr.	1. Bestimmung	2. Bestimmung	Mittelwert nach Abzug Blindsignal	Berechnete Spez. IgE-Konzentration (U/ml)	EAST-Klasse
D.H.	1	1,323	1,423	1,303	3,77	3
A.M.	2	1,565	1,713	1,569	6,16	3
L.K.	3	0,423	0,523	0,403	0,72	2
S.A.	4	0,443	0,482	0,393	0,70	2
M.R.	5	0,243	0,282	0,193	0,49	1
B.A.	6	0,07	0,072	0,00055	0,34	0

9.2.2.3. Bestimmung der spezifischen IgEs gegen Haselnuss

Tabelle 32: Berechnete Konzentration der spezifischen IgEs gegen Haselnuss in Humanseren 1-5

Bezeichnung	Projekt-Nr.	1. Bestimmung	2. Bestimmung	Mittelwert nach Abzug Blindsignal	Berechnete Spez. IgE-Konzentration (U/ml)	EAST-Klasse
D.H.	1	0,9632	0,9432	0,88375	1,75	2
A.M.	2	1,534	1,492	1,44355	4,89	3
L.K.	3	0,0653	0,0732	-0,0002	0,34	0
S.A.	4	0,0769	0,082	0,01	0,35	1
M.R.	5	1,3852	1,3254	1,28585	3,65	3
B.A.	6	0,07	0,072	0,0015	0,34	0

9.2.3. Proteingehaltsbestimmung

Tabelle 33: Proteinbestimmung der verwendeten Extrakte

Kalibrierreihe	1. Bst*	2. Bst*	3. Bst*	Mittelwert	Blank-Abzug		
Blank	0,0172	0,0130	0,0043	0,0114	0		
1. Standard	0,0927	0,0409	0,0633	0,0656	0,0542		
2. Standard	0,1362	0,1710	0,0328	0,1133	0,1019		
3. Standard	0,1670	0,1590	0,1610	0,1623	0,1509		
4. Standard	0,2590	0,3142	0,2787	0,2839	0,2725		
5. Standard	0,3227	0,2864	0,3440	0,3177	0,3063		
Verdünnung 1:20						Konz. Ver* (µg/ml)	Konz. Ext* (mg/ml)
Haselnuss-Extrakt	0,2734	0,3830	0,3372	0,3312	0,3198	493	9,85
Mandel-Extrakt	0,3257	0,4278	0,4261	0,3932	0,3818	582	11,63
Sesam-Extrakt	0,3518	0,3771	0,3402	0,3563	0,3449	529	10,57
Walnuss-Extrakt	0,1957	0,2371	0,1937	0,2088	0,1974	318	6,36
Erdnuss-Extrakt	0,2179	0,2521	0,2327	0,2342	0,2228	354	7,08
Chiasamen-Extrakt	0,2346	0,2653	0,2215	0,2404	0,2290	363	7,26
GLO Chia	0,3509	0,3800	0,3456	0,3588	0,3474	532	10,64
GLO Sesam	0,3044	0,3389	0,2980	0,3137	0,3023	468	9,36

*Best: Bestimmung

*Konz.Ver.: Konzentration der 1:20 Verdünnung

*Konz. Ext: Konzentration der ursprünglichen Extrakte

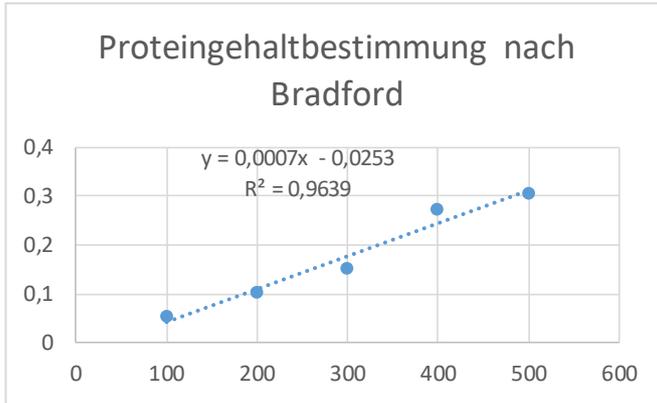


Abbildung 52: Kalibrierfunktion zur Bestimmung des Proteingehaltes

9.2.4. Identifizierung der IgE-bindenden Proteine

9.2.4.1. Detektion der IgE-bindenden Proteine in Chiasamen mittels Blutseren von Sesamallergikern

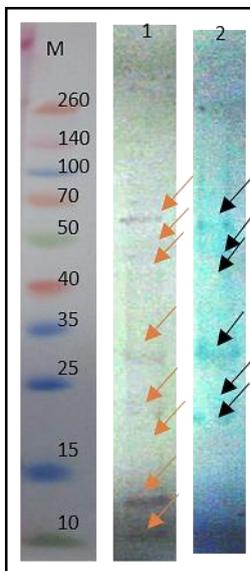


Abbildung 53: Immunblots detektiert mittels 1: Serum S1 (Projekt Nr.1), 2: kommerziellen Antikörper

9.2.4.2. Detektion der IgE-bindenden Proteine in Chiasamen mittels Blutseren von Haselnussallergikern

Die rot markierten Projekt-Nummern der Humanseren sind aus dem Serumpool ausgeschlossen.

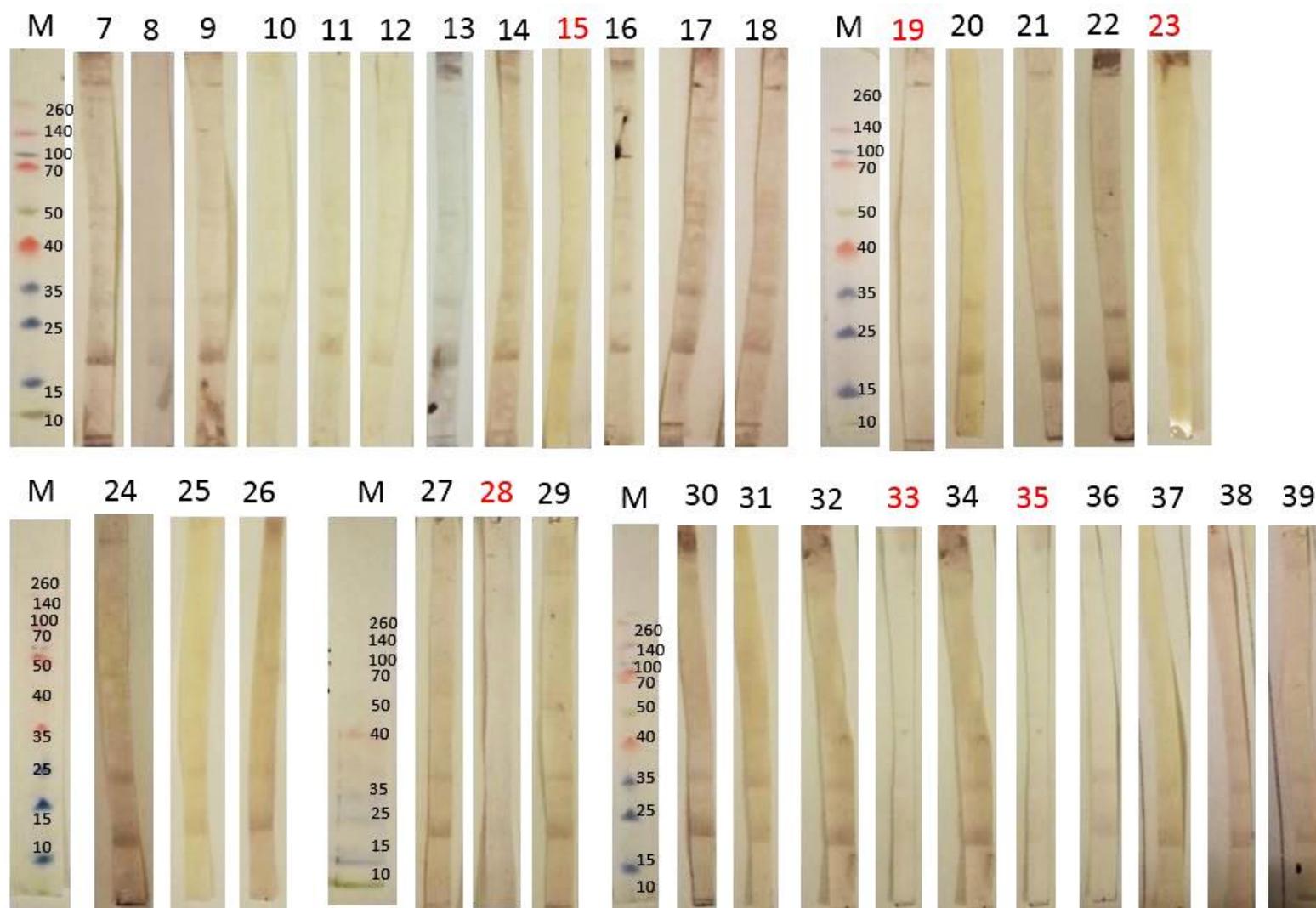


Abbildung 54: Detektion der IgE-bindenden Proteine in Chiasamen mittels Seren von Haselnussallergikern, rot markierte Nummer sind im Serumpool nicht betrachtet.

9.2.4.3. Charakterisierung der detektierten Proteine mittels UHPLC-ESI-MS/MS nach 1D-Gelelektrophorese

Tabelle 34: Sequenzen der Chiasamenpeptide, die nach SDS-PAGE und Immunfärbung detektiert, mittels UHPLC-ESI-MS/MS und De Novo Sequenzierung sequenziert sind

Protein-bande	Peptidsequenz	Sequenz-ID	Proteinname	Familie	Pflanzenname
B1	GLPVEVVANSFQISR	U5FED6	Uncharacterized protein 11S seed storage protein	<i>Populus trichocarpa</i>	Westliche Balsam-Pappel
	LTAQEPTIR	Q9AUD2	11S-Globulin	<i>Sesamum indicum</i>	Sesam
	NTLRPNALSLPNYHPNPR	Q9SE84	Legumin-like protein	<i>Perilla frutescens</i> / <i>Perilla ocymoides</i>	Minze / Perilla
	LNAQEPSFR	Q9ZNY2	11S storage protein	<i>Coffea arabica</i>	Arabica-Kaffee
	SLSLSLGR	M0SNH6	Uncharacterized protein	<i>Musa acuminata</i>	Wildbanana
	WVDADLNGLR	P85487	Unknown protein 3	<i>Pinus halepensis</i>	Aleppo-Kiefer
B2	SGTLFDNVLVSDDEPEYAK	A0A068VBQ5	Uncharacterized protein	<i>Coffea canephora</i>	Robusta-Kaffee
	ETLEVDAALIATGR	A0A072V6A3	Dihydroipoamide dehydrogenase	<i>Medicago truncatula</i>	Medicago truncatula
	ALAENEGLAK				
	AIGVDILTGFGTILGPQK				
	IEEELGSEAVYAGASFR	M0ZSD6	Uncharacterized protein	<i>Solanum tuberosum</i>	Kartoffeln
	NMVLVPVPAFNVINGGSHAGNK	Q43130	Enolase	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	Eiskraut
	VNQIGSVTESIEAVK				
	NMVLVPVPAFNVINGGSHAGNK				
	AAVPSGASTGIYEALRLR	D7T227	Uncharacterized protein Enolase	<i>Vitis vinifera</i>	Weinrebe
	LAMQEFMLPIGASSFK				
	GLPVEVVANSFQISR				
	AFDYDLVIIGAGVGGHGAALHAVEK	D7SY46	Uncharacterized protein Oxidoreductase	<i>Vitis vinifera</i>	
	QGQVVIVPQNFAVVK	K4CSI2	Uncharacterized protein 11S seed storage protein	<i>Solanum lycopersicum</i>	Tomate
	VGLTGLTVAEHFR	A9NUR7	ATP synthase subunit beta	<i>Picea sitchensis</i>	Sitka-Fichte
EAPSFVEQSTEQEILVTGIK					

Anhang

Protein-bande	Peptidsequenz	Sequenz-ID	Proteinname	Familie	Pflanzenname
B2	VNEGDVFWIPR	Q42390	globulin-like protein	<i>Daucus carota</i>	Möhre
	GLLLPHYNNAPQLLYVVR				
	TGPFEFFGFTTSAR	A0A022R853	11S-Globulin	<i>Erythranthe guttata</i>	Gelbe Gauklerblume
	SPMHIGFITMEPK				
	SLFIPQYLDSSLILFVR				
	ADIYNPQAGR				
	AILNESSEFVGDK	P48491	Triosephosphate isomerase, cytosolic	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Acker-Schmalwand
	VIGPNEVEVIQLDGTK	E3NYI5	Glutathione reductase	<i>Ipomoea batatas</i> (Sweet potato)	
	IVEGVISHQMK	M4CRN7	Uncharacterized protein	<i>Brassica rapa subsp. Pekinensis</i>	Rübsen / Chinakohl
	TGVLSLSESLDK	A0A022Q158	Uncharacterized protein	<i>Erythranthe guttata</i>	Gelbe Gauklerblume
	IINEPTAAAIAYGLDKK	N1R361	Heat shock cognate 70 kDa protein 1	<i>Aegilops tauschii</i> / <i>Aegilops squarrosa</i>	Tausch-Ziegengras /Dreizölliger Walch
	AFSGSPIVGEIR	M7YR18	Putative aminotransferase y4uB	<i>Triticum urartu</i> / <i>Crithodium urartu</i>	roter wilder Einkornweizen
	IYDPGYLNTAPVR	K3YR77	Citrate synthase	<i>Setaria italica</i>	Kolbenhirse
	VESFVQDAISK	B9SUZ1	Succinate semialdehyde dehydrogenase	<i>Ricinus communis</i>	Wunderbaum
	TNFSYFFTTR	A0A022R5D9	Uncharacterized protein oxidoreductase	<i>Erythranthe guttata</i>	Gelbe Gauklerblume
	VAIVTGGDSGIGR				
	VVDEVVNSFGR				
	TGVLSLSESLDK				
	IVGVSEETTTGVK	V4ML83	Adenosylhomocysteinase	<i>Eutrema salsugineum</i>	
TGIIVLAEGR					
NMVLPVPAPFNVINGGSHAGNK	Q43130	Enolase	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	Eiskraut	
VNQIGSVTESIEAVK					
LAMQEFMILPLGASSFK					
AAVPSGASTGIYEALRLR					
VNQIGSVTESIEAVK	D7T227		<i>Vitis vinifera</i>	Weinrebe	

Anhang

Protein-bande	Peptidsequenz	Sequenz-ID	Proteinname	Familie	Pflanzenname
B3	LAMQEFMILPLGASSFK		Uncharacterized protein		
	AAVPSGASTGIYEALRLR		Enolade		
	LGVRPAPVVASFSAR	F6HXP0	Uncharacterized protein		
	GLPVEVVANSFQISR	U5FED6	Uncharacterized protein 11S seed storage protein	<i>Populus trichocarpa</i>	Westliche Balsam-Pappel
	VNEGDVFWIPR	Q42390	globulin-like protein	<i>Daucus carota</i>	Möhre
	GLLLPHYNNAPQLLYVVR	Q9AUD2	11S-Globulin	<i>Sesamum indicum</i>	Sesam
	LTAQEPTIR				
	TGPFEEFFGFTTSAR	A0A022R853	11S-Globulin	<i>Erythranthe guttata</i>	Gelbe Gauklerblume
	GPDAYNIYDR				
	SPMHIGFITMEPK				
	TNIFYFFTTR	A0A022RLJ6	Uncharacterized protein		
	VAIVTGGDSGIGR				
	VVDEVVNSFGR				
	DGQLYDNLAQDVEKR	A0A022QY94	Uncharacterized protein		
	AILNESSEFVGDK	P48491	Triosephosphate isomerase, cytosolic	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Acker-Schmalwand
	FDGILGLGFK	K8EM17	Cathepsin D (Lysosomal aspartyl protease)	<i>Bathycoccus prasinus</i>	
	VIHDNFGIVEGLMTTVHAITATQK	P48491	Triosephosphate isomerase cytosolic	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Acker-Schmalwand
	IMRPAQVYTG VWLR	A0A068VGE1	Citrate synthase	<i>Coffea canephora</i>	Robusta-Kaffee
	LAEEVFSIVGR				
	KLYPNVDFYSGLIYR				
APTIAAAA YLR					
MAGYLSHWR					
AALSDEYFVKR					
LYDPGYLNTAPVR					
AMGFPTTEFFPVLFAIPR					

Anhang

Protein-bande	Peptidsequenz	Sequenz-ID	Proteinname	Familie	Pflanzenname				
B3	HQGVMVGMGQKDSYVGDEAQSQR	F2D4P0	Predicted protein	<i>Hordeum vulgare</i> <i>subsp. Vulgare</i>	(Domesticated barley)				
	SYELPDGQVITIGNER								
	AVFPSLVGRPR								
	ISGLIYEETR	F2E7L1	Histone H4	<i>Hordeum vulgare</i> <i>subsp. Vulgare</i>	Gerste				
	NTLRPNALSLPNYHPNPR	A0A0B2SR52	Legumin-like protein	<i>Perilla frutescens</i> / <i>Perilla ocymoides</i>	Minze / Perilla				
	IINEPTAAAIAYGLNK								
	NAVVTVPAYFNDAQR	H9BFL0	Putative luminal binding protein 7B4	<i>Tetragonia</i> <i>tetragonioides</i>	Neuseeländer Spinat				
	FLQGLLTNDVR	U5D9W6	Uncharacterized protein	<i>Amborella trichopoda</i>					
	IINEPTAAAIAYGIDK								
	VTRAVVTVPAYFNDAQR	J3M6G0	Uncharacterized protein	<i>Oryza brachyantha</i>					
	ITPSWVAFTDAGER								
	ILNEPTAAAIAYGLDKK	Q42434	Luminal-binding protein	<i>Spinacia oleracea</i>	Spinat				
	IKDAVVTVPAYFNDAQR								
	VFSPEEISAMILTK								
	DYFNGKEPNK								
	FEELNNDLFR								
	VEIESLFDGVDSEPLTR								
	ILNEPTAAAIAYGLDKK								
	QIDEIVLVGGSTR								
	VAPEEHPVXLTEAPLNPK					L7UXE6	B-actin	<i>Bidens laevis</i>	
	TTGIVMDSGDGVTHTVPIY- EGYALPHAILR								
	GNLIVEYPGTQPGK	K4CN59	Uncharacterized protein	<i>Solanum lycopersicum</i>	Tomate				
	AINPLELAMEALK								
VMSQHEEGGIWPFGGESK	K4CUH3	Uncharacterized protein	<i>Solanum lycopersicum</i>	Tomate					
QGDVLALPAGITLWFYNNQQR	M1BFT6	Uncharacterized protein	<i>Solanum tuberosum</i>	Kartoffeln					
AMPEEVLMSYQISR									

Anhang

Protein-bande	Peptidsequenz	Sequenz-ID	Proteinname	Familie	Pflanzenname
B3	LNAQEPSFR	Q9ZNY2	11S storage protein	<i>Coffea arabica</i>	Arabica-Kaffee
	ADIYNPQAGR	Q41128	Legumin	<i>Quercus robur</i>	Stieleiche
	QGQLVVVPQNFVVK	Q06AW2	11S seed storage globulin A	<i>Chenopodium quinoa</i>	Quinoa
	IIGVDLNNR	Q40249	Alcohol dehydrogenases homologous	<i>Lactuca sativa (Garden lettuce)</i>	Gartensalat
	ETADALVSTGLAK	A0A072V0K8	Alpha-galactosidase	<i>edicago truncatula</i>	
	ISGLIYEETR	F2E7L1	Histone H4	<i>Hordeum vulgare subsp. Vulgare</i>	Gerste
	VLGGSSAINAGFYSR	R0IE10	Uncharacterized protein	<i>Capsella rubella</i>	rosa Hirtengeldbörse
	QITVNDLPVGR	A0A087SL52	Peroxiredoxin-2	<i>Auxenochlorella protothecoides</i>	
	LGLMSGFVK	M0TWH6	Uncharacterized protein	<i>Musa acuminata subsp. malaccensis</i>	Wildbanana
	VQIIANDQGNR	A0A067EJK7	Uncharacterized protein	<i>Citrus sinensis</i>	Orange
	VTSHPLQELQPTK	A0A022RLJ6	Uncharacterized protein	<i>Medicago truncatula</i>	
B4	GLPVEVVANSFQISR	U5FED6	Uncharacterized protein 11S seed storage protein	<i>Populus trichocarpa</i>	Westliche Balsam-Pappel
	TNDNAQVSELAGR				
	EPVFSFWLNR				
	VNEGDVFWIPR	Q42390	globulin-like protein	<i>Daucus carota</i>	Möhre
	ASQDEGLEWISFK	Q9AUD2	11S-Globulin	<i>Sesamum indicum</i>	Sesam
	GLLLPHYNNAPQLLYVVR				
	SPMHIGFITMEPK	A0A022R853	11S-Globulin	<i>Erythranthe guttata</i>	Gelbe Gauklerblume
	GPDAYNIYDR				
	SLFIPQYLDSSLILFVR				
	TGPFEFFGFTTSAR				
	DGQLYDNLAQDVEKR				
	AGENGFEWVAFK	A0A022S2J1	Uncharacterized protein		
	DALTNSGKEISAR	A0A022QR06	Uncharacterized protein		

Anhang

Protein-bande	Peptidsequenz	Sequenz-ID	Proteinname	Familie	Pflanzenname
B4	NLTRPNALSLPNYHPNPR	A0A0B2SR52	Legumin-like protein	<i>Perilla frutescens</i>	Minze
	QGDVLALPAGITLWFYNNQGER	M1BFT6	Uncharacterized protein	<i>Solanum tuberosum</i>	Kartoffeln
	AMPEEVLMSYQISR				
	LNAQEPSFR		11S storage protein	<i>Coffea arabica (Arabian coffee)</i>	Arabica-Kaffee
	ADIYNPQAGR		Legumin	<i>Quercus robur (English oak)</i>	Stieleiche
	FDGILGLGFK				
	VVDEVNSFGR	A0A059D3Z6	Uncharacterized protein	<i>Eucalyptus grandis</i>	Flooded Gum
	LNENPSRADXYNPR	A0A0D3F3E3	Uncharacterized protein	<i>Oryza barthii</i>	Barth-Reis
	QGQLVVVPQNFVVK	Q06AW3	11S seed storage globulin A	<i>Chenopodium quinoa</i>	Quinoa
	IPGLNTLGVSLAR	A0A0B0NZJ1	Germin-like protein subfamily 2 member 4	<i>Gossypium arboreum</i>	Baumwolle
	ASEIEVGVVR	A0A061QSP3	Proteasome subunit alpha type	<i>Tetraselmis sp. GSL018</i>	
	VAPEVVAEYTVR	M4DL52	Fructose-bisphosphate aldolase	<i>Brassica rapa subsp. pekinensis</i>	Rübsen
	ALLEVVEGGK	A0A078G005	Alpha-mannosidase	<i>Brassica napus (Rape)</i>	Raps
	QSQLGCSVPVPPDFRCPLSLELMTD-PVIVTSGQTYER	A0A0D3E2H8	RING-type E3 ubiquitin transferase	<i>Brassica oleracea var. oleracea</i>	Gemüsekohlrabi
	YIGLLATGLTADAR	Q10QW8	Proteasome subunit alpha type	<i>Oryza sativa subsp. Japonica</i>	Reis
B5	GLPVEVVANSFQISR	U5FED6	Uncharacterized protein 11S seed storage protein	<i>Populus trichocarpa</i>	Westliche Balsam-Pappel
	TNDNAQVSELGR				
	GHNIELEIQKAIQQSK	Q19PK8	TIR-NBS type disease resistance protein		
	QGQVVIVPQNFVVK	K4CSI2	Uncharacterized protein 11S seed storage protein	<i>Solanum lycopersicum</i>	Tomate
	GLLLPHYNNAPQLLYVVR	Q9AUD2	11S-Globulin	<i>Sesamum indicum</i>	Sesam
	ASQDEGLEWISFK				
	NLTRPNALSLPNYHPNPR		Legumin-like protein	<i>Perilla frutescens</i>	Minze / Perilla
	AMPEEVLMSYQISR	M1BFT6	Uncharacterized protein	<i>Solanum tuberosum</i>	Kartoffeln
ADIYNPQAGR		Legumin	<i>Quercus robur</i>	Stieleiche	

Anhang

Protein-bande	Peptidsequenz	Sequenz-ID	Proteinname	Familie	Pflanzenname
B5	QGQLLVIPQNFVAVIK	Q9M4R4	Glutelin	<i>Elaeis guineensis</i> var. <i>tenera</i>	Ölpalme
	TNDNAMNSQLAGR	A0A022PS35	Uncharacterized protein	<i>Erythranthe guttata</i>	Gelbe Gauklerblume
	LNIENPSRADXYNPR		Uncharacterized protein	<i>Oryza barthii</i>	Barth-Reis
	QGQLVVVPQNFVAVK	Q06AW4	11S seed storage globulin A	<i>Chenopodium quinoa</i> (<i>Quinoa</i>)	Quinoa
	INQIVVDPSLHLQK	B9HK46	Proteasome subunit alpha type	<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>Japonica</i>	Reis
	EGQVVVIPQNFVAVIK	P19084	11S-Globulin seed storage protein G3	<i>Helianthus annuus</i>	Sonnenblume
	AGQNGFEWVAFK	T1WKB1	11S-Globulin		
	GLGFSLQIQSR	W1P1N2	Uncharacterized protein	<i>Amborella trichopoda</i>	
	AAAPSGGGAAAAPSR	D8U8X5	Uncharacterized protein	<i>Volvox carteri</i> f. <i>nagariensis</i>	
	HNINKPSEADIYNPR	B9T5E7	Glutelin type-A 3, putative	<i>Ricinus communis</i> (<i>Castor bean</i>)	Wunderbaum
	QGELIVSLTQEALIR	N1QSZ1	Acyl-coenzyme A thioesterase 8	<i>Aegilops tauschii</i>	

9.2.5. Isolierung der IgE/IgG-bindende Proteine

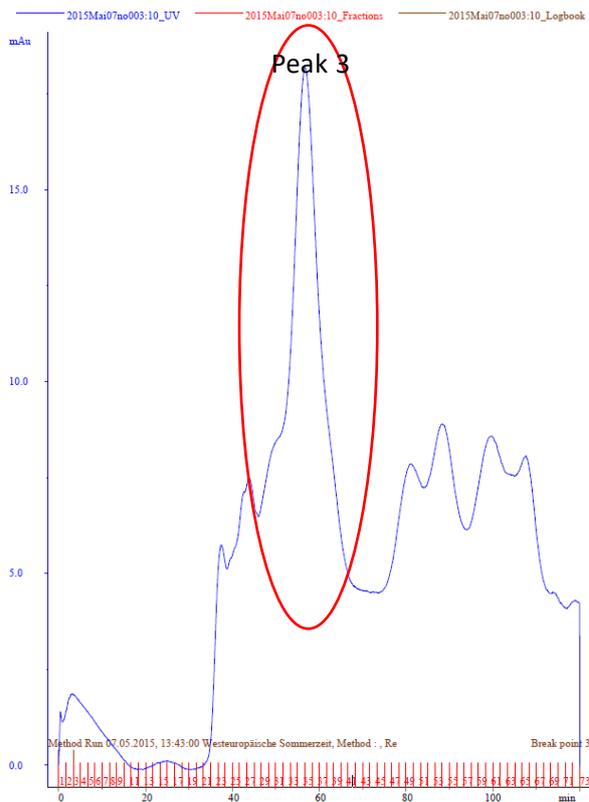
9.2.5.1. Isolierung mittels Ammoniumsulfat-Fällung

Tabelle 35: MS-Analyse der mittels Ammoniumsulfat-Fällung isolierten Proteinbanden

	Peptidsequenz Chiasamen	Ähnliche Peptidsequenz	Sequenz-ID	Übereinstimmung	Proteinname
45 kDa	VNADNNEQFTLAG	VNANNNEKFPLAG	NP_001291343.1	77 %	vicilin-like protein
	NNPYVFEDR	NPYVFEDR	XP_011032788.1	100 %	vicilin-like protein
	YEVSSQFR	FEVDSSQFR	XP_012854379.1	78 %	vicilin-like protein
49 kDa	NNPYVFEDR	NPYVFEDR	XP_011032788.1	100 %	vicilin-like protein
	YGQYYEVSSQ	YGQLFEVDSSQ	XP_012854379.1	73 %	vicilin-like antimicrobial
	SQKEEFFFEQGR	SQKEEFFFKGP	7S-Globulin	81,80 %	7S-Globulin

9.2.5.2. Isolierung mittels GPC

Zweite Aufreinigung:



Peak	Ausgewählte Fraktionen
Peak 3	25-41

Abbildung 55: Chromatogramm der GPC Trennung von GLO, zweite Aufreinigung

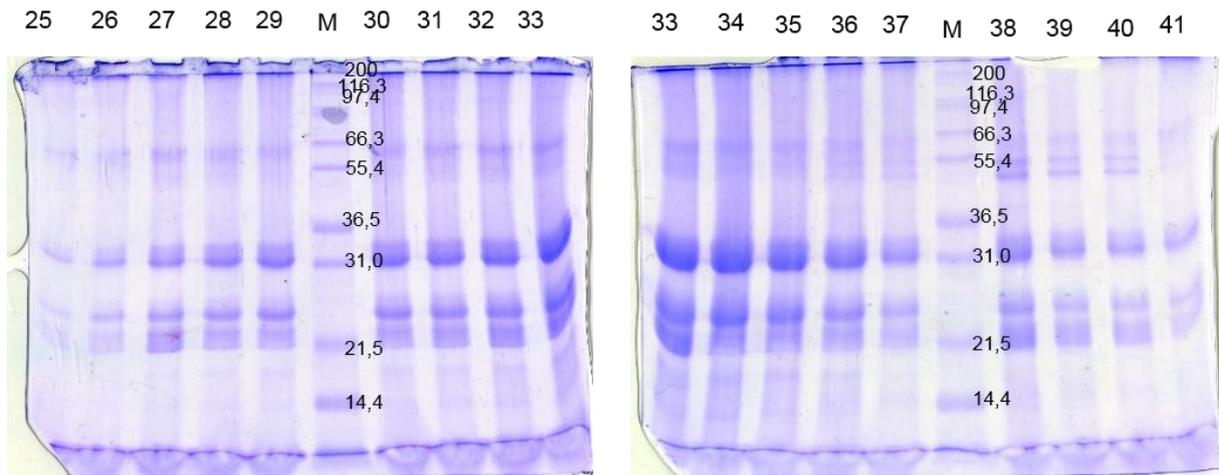


Abbildung 56: Auftrennung der Fraktionen unter Peak 3 mittels SDS-PAGE

9.2.5.3. Isolierung mittels IEC

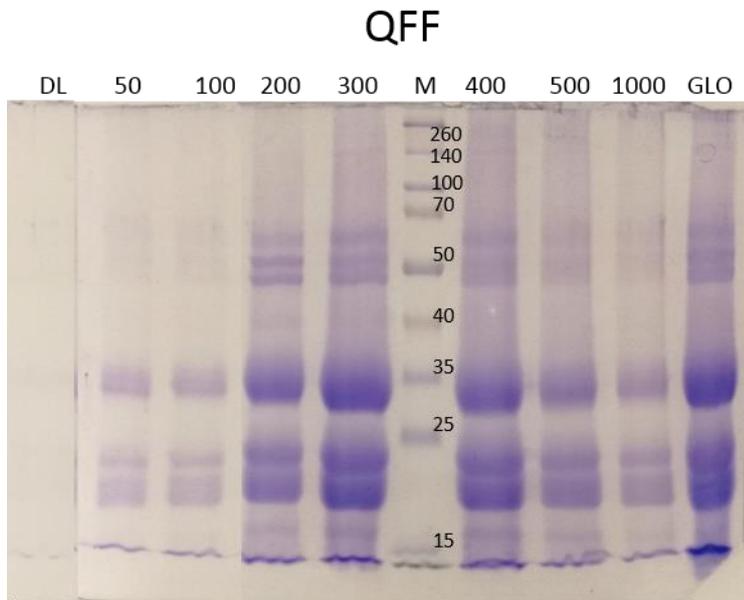


Abbildung 57: Fraktionen der chromatographischen Trennung mittels QFF-Säule. Zur Elution wurden verschiedene KCl-Konzentrationen (50-1000 mM) verwendet. M: Marker, DL: Durchlauf, 50-1000: Fraktionen, G: GLO

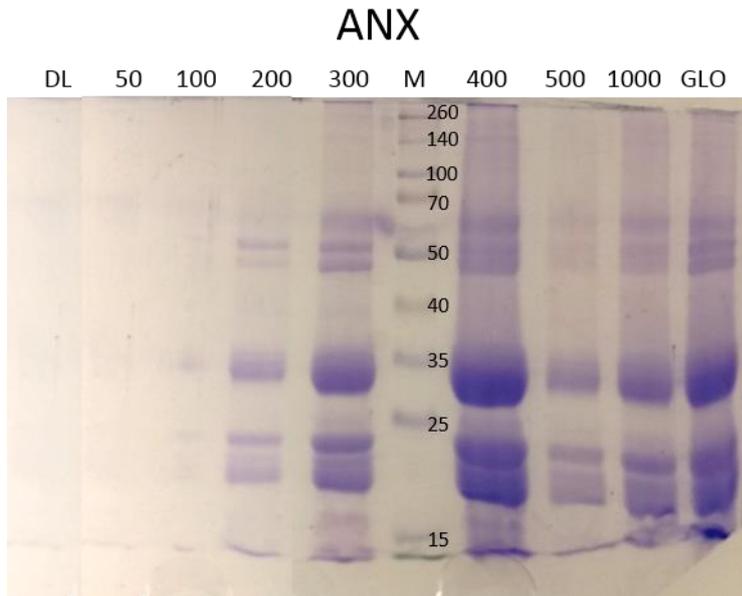


Abbildung 58: Fraktionen der chromatographischen Trennung mittels ANX-Säule. Zur Elution wurden verschiedene KCl-Konzentrationen (50-1000 mM) verwendet. M: Marker, DL: Durchlauf, 50-1000: Fraktionen, G: GLO

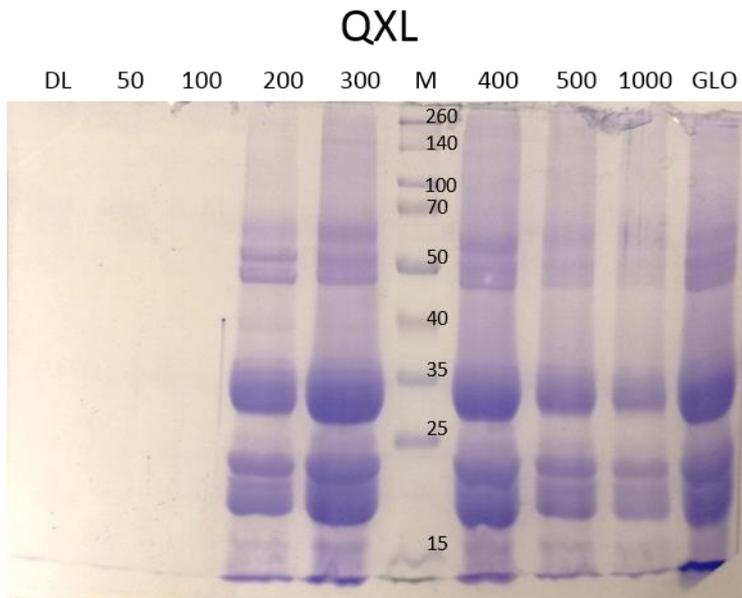


Abbildung 59: Fraktionen der chromatographischen Trennung mittels QXL-Säule. Zur Elution wurden verschiedene KCl-Konzentrationen (50-1000 mM) verwendet. M: Marker, DL: Durchlauf, 50-1000: Fraktionen, G: GLO

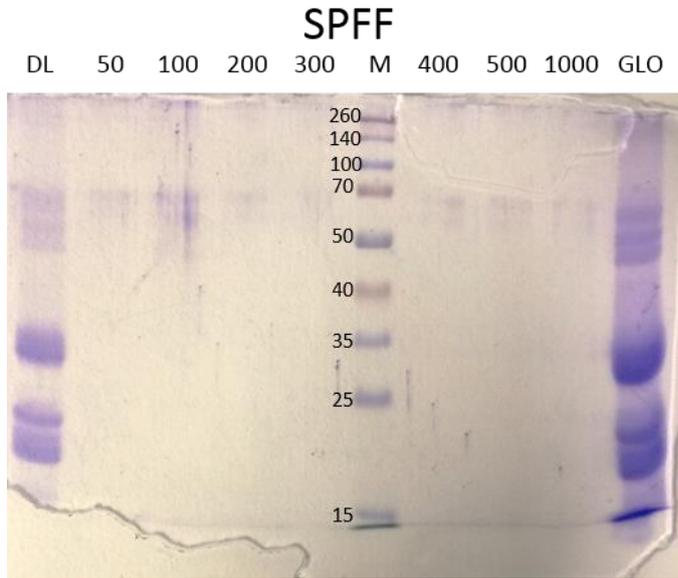


Abbildung 60: Fraktionen der chromatographischen Trennung mittels SPFF-Säule. Zur Elution wurden verschiedene KCl-Konzentrationen (50-1000 mM) verwendet. M: Marker, DL: Durchlauf, 50-1000: Fraktionen, G: GLO

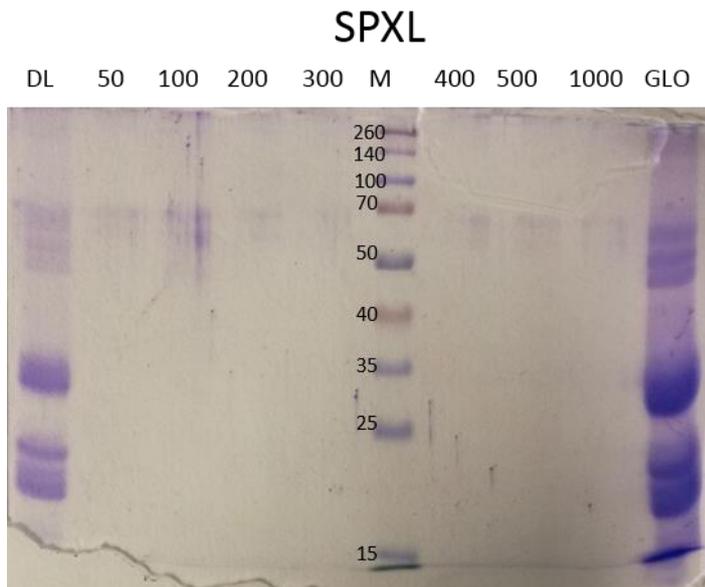


Abbildung 61: Fraktionen der chromatographischen Trennung mittels SPXL-Säule. Zur Elution wurden verschiedene KCl-Konzentrationen (50-1000 mM) verwendet. M: Marker, DL: Durchlauf, 50-1000: Fraktionen G: GLO

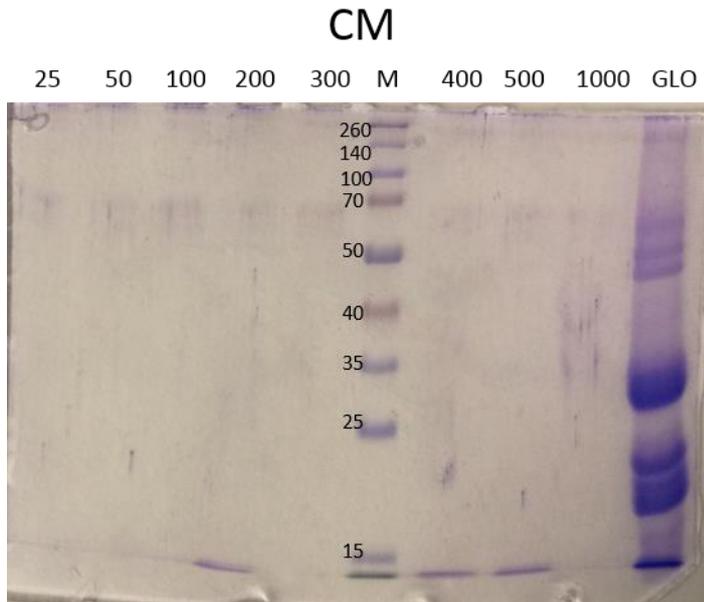


Abbildung 62: Fraktionen der chromatographischen Trennung mittels CM-Säule. Zur Elution wurden verschiedene KCl-Konzentrationen (50-1000 mM) verwendet. M: Marker, DL: Durchlauf, 50-1000: Fraktionen, G: GLO

9.2.5.4. Isolierung mittels IAC-MB

Nachweis der Kopplung von SA an *magnetic beads*

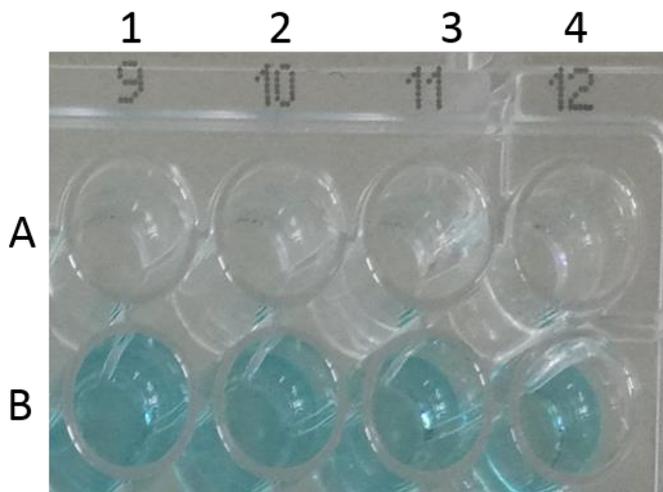


Abbildung 63: A1: Zweifachbestimmung mit der 1.Blindprobe (durchgeführt mit nicht gekoppelten magnetic beads), A2: Zweifachbestimmung mit der 2.Blindprobe (durchgeführt mit magnetic beads), B1-4: Vierfachbestimmung mit gekoppelten magnetic beads)

Tabelle 36: De Novo sequenzierte Peptide nach Isolierung mittels IAC-MB sortiert nach Proteinbanden

Proteinbande	Peptidsequenz Chiasamen	Ähnliche Peptidsequenz	Sequenz-ID	Übereinstimmung	Proteinname	Familie	Pflanze
49 kDa	VNADNNEQFTLAG	VNANNNEKFPLAG	NP_001291343.1	77 %	vicilin-like protein	Sesamum indicum	Sesam
	YEVSSQFR	FEVDSSQFR	XP_012854379.1	78 %	vicilin-like protein	Erythranthe guttata	Gelbe Gauklerblume
	NNPYVMEDER	NNPYVFEER	XP_012854378.1	78 %	vicilin-like antimicrobial	Erythranthe guttata	Gelbe Gauklerblume
	YYLAGSAPQG	FYLAGSAPSG	CAA90641.1	80 %	Legumin 11S-globulin	Ginkgo biloba	Ginkgo
	GLVLPFYTNARP	GLLLPFYTNAPR	ABK92181.1	90 %	11S seed storage globulin	Arachis hypogaea	Erdnuss
	FLAGNPQS-LESQ	FLAGNPQRELQSQ	XP_011046348.1	76 %	legumin B-like	Populus euphratica	Euphrat-Pappel
	YGQLYEVDSSHF	YGQYYEVSSQF	KZV22527.1	75 %	sucrose binding protein	Doroceras hygrometricum	Boea
45 kDa	HAGTTYLVNR	HAGTTAYLINR	XP_016464014.1	82 %	vicilin-like protein	Nicotiana tabacum	Tabak
	NNPYVFEDR	NPYVFEDR	XP_011032788.1	100 %	vicilin-like protein	Populus euphratica	Euphrat-Pappel
	YGQYYEVSSQ	YGQLFEVDSSQ	XP_012854379.1	73 %	vicilin-like antimicrobial	Erythranthe guttata	Gelbe Gauklerblume
	YYLAGSAPQG	FYLAGSAPSG	CAA90641.1	80 %	Legumin 11S-globulin	Ginkgo biloba	Ginkgo
	TQCQLQQLSAR	TECQVQLTAR	NP_001291327.1	73 %	Legumin B like precursor	Sesamum indicum	Sesam
	QY---YEVSSKFR	QYGQLYEVDSSHFR	KZV22527.1	65 %	Sucrose-binding Protein	Doroceras Hygrometricum	Boea
31 kDa	YYLAGSAPQG	FYLAGSAPSG	CAA90641.1	80 %	11S-Globulin	Ginkgo biloba	Ginkgo
	DNALVSPLAGR	DNAMISPLAGR	XP_008364259.1	82 %	Legumin A-like Protein	Malus domestica	Kulturapfel
	DNALVSPLAGR	DNAMISPLAGR	XP_015067952.1	82 %	Legumin B-like	Solanum pennellii	Tomate
	TQCQLQQLSAR	TECQVQLTR	NP_001291327.1	81 %	Legumin B-like Precursor	Sesamum indicum	Sesam
	FVLAGNPQS-LESQ	FFLAGNPQRELQSQ	XP_006370929.1	71 %	Legumin family Protein	Populus trichocarpa	Westliche Balsam-Pappel
23 kDa	RLEALPQL	RLEALPQL	CAN66342.1	100 %	hypothetical protein	Vitis vinifera	Weinrebe
	TQCQLEQLSAR	TECQVQLTAR	NP_001291327.1	64 %	Legumin B-like recursor	Sesamum indicum	Sesam
	QCQLEQLSAR	ECQLDQLQAR	XP_004289945.1	70 %	Legumin type B like	Fragaria vesca	Wald-Erdbeere
	GLVLPFYTNAPR	GLLPFYTNAPR	XP_015949663.1	92 %	Legumin B-like recursor	Arachis duranensis	Erdnuss
	ALSLPNYHNPPR	ALSLPNYHPAPR	XP_012831308.1	83 %	11 S globlin seed storage	Erythranthe guttata	Gelbe Gauklerblume
	SEYLAGSEP	SFYLAGGEP	CAA64762.1	89 %	Legumin-Like Protein	Asarum europaeum	Heimischer Haselwuz
	CQLQQLSAR	CQVQLTAR	NP_001291327.1	78 %	Legumin B-Like Precursor	Sesamum indicum	Sesam

Anhang

Protein- bande	Peptidsequenz Chiasamen	Ähnliche Peptidsequenz	Sequenz-ID	Überein- stimmung	Proteinname	Familie	Pflanze
23 kDa	HETLGEPLNTL	HEALGETLSTL	XP_012088948.1	73 %	Kinesin-4-Like	Jatropha curcas	Purgiemuss
	LAGNPQS-LESQ	LAGNPQRELQSQ	XP_011046348.1	75 %	Legumin B-Like	Populus euphratica	Euphrat-Pappel
	NNQQFECAGVAAVR	NNQQFQCAGVSAVR	XP_012828564.1	86 %	11S-Globulin subunit beta-like	Erythranthe guttata	Gelbe Gauklerblume
	NNQQFECAGVAAVR	NNEEFECAGVAAVR	XP_01643938.1	86 %	11S-Globulin subunit beta-like	Nicotiana tabacum	Tabak
	QVLVVP--FGNAAVVK	QVLVVPQNF--AIVK	XP_008447425.1	63 %	11S-Globulin subunit beta-like	Cusumis melo	Zuckermelone
	KFVLGNPQS	KFFLAGNPQS	KVH31060.1	90 %	11S seed storage protein	Cynara cardunculus	Wilde Artischocke
	ETFEAGQQQ	ETFESSQQQ	ABB60055.1	78 %	11S-Globulin precursor 4	Sesamum indicum	Sesam
	ETFEAGQQQ	ETFESSQQQ	XP_011083024.1	78 %	Legumin B-like	Sesamum indicum	Sesam
	FVLGNPQSL	FVLGGNPQGL	XP_011001810.1	80 %	O-acyltransferase WSD1-like	Populus euphratica	Euphrat-Pappel
	NELDPELQK	NELTPELQK	XP_011071165.1	89 %	oxysterol-binding-related protein	Sesamum indicum	Sesam
20 kDa	TQCQLQQLSAR	TECQVQLTAR	NP_001291327.1	73 %	Legumin B-like precursor	Sesamum indicum	Sesam
	FYLAGSAPQG	FYLAGSAPSG	CAA90641.1	90 %	Legumin 11S-Glonulin	Ginkgo biloba	Ginkgo
	YYLAGSAPEG	FYLAGSAPSG	CAA90641.1	90 %	Legumin 11S-Globulin	Ginkgo biloba	Ginkgo
	DNALVSPLAGR	DNAMISPLAGR	XP_008364259.1	82 %	Legumin A-like	Malus domestica	Kulturapfel
	DNALVSPLAGR	DNAMISPLAGR	XP_004234041.1	82 %	legumin B-like	Solanum lycopersicum	Tomate
	VLPMYTNA	VLPMYANA	ABL74552.1	88 %	glutelin	Oryza sativa Japonica Group	Reis
	SFYLAGSEP	SFYLAGGEP	CAA64762.1	89 %	Legumin-like Protein	Asarum europaeum	Heimischer Haselwuz
	FYLAGSEPQAS	FYLAGSETTAS		78 %	11-S seed storage protein	Macleaya cordata	Federmohn
	FVLGNPQS-LESQ	FFLAGNPQRELQSQ	XP_011046348.1	71 %	Legumin B-like	Polpilus euphatica	Euphrat-Pappel
	VLVSSAAVAVV	ILVVSSAAAAAV	BAD61360.1	77 %	Hypothetical protein	Oryza sativa Japonica Group	Reis
	VVSSAAVAAV	IVSSAAVAAV	XP_010036887.1	90 %	ribulose bisphosphate carboxylase small chain	Eucalyptus grandis	Gumi
	NELDPELQK	NELTPELQK	XP_011071165.1	100 %	oxysterol-binding-related protein 1D	Sesamum indicum	Sesam
	GSSGSAVVSNDK	GSNGTAVVTNDK			Xaa-pro aminopeptidase P	Medicago tuncatula	
	RLEALPQL	RLEALPQL	CAN66342.1	100 %	hypothetical protein	Vitis vinifera	Weinrebe

Anhang

Protein-bande	Peptidsequenz Chiasamen	Ähnliche Peptidsequenz	Sequenz-ID	Übereinstimmung	Proteinname	Familie	Pflanze
20 kDa	LGASLSAVAGP	LGAELSAVAGP	XP_002989772.1	90 %	Hypothetical protein	Selaginella moellendorffii	

Tabelle 37: Auswertung der Peptidsequenzen isoliert mittels IAC-MB und sortiert nach Spezies und Proteintyp

Organismus	Anzahl der Hits	Anzahl der Chiasamenpeptide (insgesamt)	Allergenbezeichnung	Anzahl der homologe Peptide	Allergen-ID	Proteintyp
Sesam	9	8	7S-Globulin	3	13183177	7S-Globulin
			11S-Globulin	4	13183173	11S-Globulin
			11S-Globulin precursor	2	5381325	11S-Globulin
Cashewnuss	8	7	vicilin-like protein	3	21666498, 21914823	7S-Globulin
			Allergen Ana O2	4	25991543	11S-Globulin
Pistazien	15	6	vicilin	3	133711974	7S-Globulin
			Pis v 2.0201 allergen 11S-Globulin precursor	8	110349085, 110349083	11S-Globulin
			11S-Globulin	2	156001070	11S-Globulin
Gemeinsame Hasel	8	5	48-kDa glycoprotein precursor	2	19338630	7S-Globulin
			Cor a 9 allergen	3	557792009	11S-Globulin
			11S-Globulin-like protein	3	18479082	11S-Globulin
Mandel	16	5	putative Pru du 6 allerge	3	523916668	11S-Globulin
			Pru Du 6 Amandin	5	258588247	11S-Globulin
			prunin 1 precursor	5	307159112	11S-Globulin
			prunin 2 precursor	3	523916668	11S-Globulin
Erdnuss	22	3	conarachin	1	46560474, 46560472, 46560476	conglutin

Anhang

			Allergen Ara h 1	1	375332427, 347447588, 1168390, 312233063, 1168391	7S-Globulin
			trypsin inhibitor	2	22135348	11S-Globulin
			glycinin	2	5712199, 3703107	glutelin
			Ara h 3 allergen	2	312233065, 224036293	11S-Globulin
			Arachin Arah3 isoform	2	199732457, 112380623	11S-Globulin
			Allergen Arah3/Arah4	2	21314465	11S-Globulin
Sojabohne	12	3	conglycinin	1	9967357, 9967361, 169927, 9967357, 9967361	7S-Globulin
			glycinin	2	18639, 18609, 218265, 18615, 169973, 169969, 10566449	11S-Globulin
Echter Buchweizen	10	3	13S globulin	3	29839419, 2983925, 29839255	13S Globulin
Pekannuss	6	3	11S legumin protein	3	158998780, 158998782	11S-Globulin
Weißer Senf	5	3	11S-Globulin precursor	3	62240390, 62240392	11S-Globulin
Paranuss	3	3	11S-Globulin	3	30313867	11S-Globulin
Echter Walnuss	3	3	seed storage protein	3	56788031	11S-Globulin
tatarischer Buchweizen	3	3	allergenic protein	3	113200131	Glutelin
Erbse	2	2	Vicilin	1	42414627, 42414629	7S-Globulin
Kiwi/Strahlengriffel	10	1	kiwellin	1	441482356, 441482358, 441482360, 441482362, 441482364, 441482366, 441482354, 441482350, 441482346, 441482352	Lipoprotein
Mungbohne	2	1	8S globulin beta isoform precursor	1	108743976	8S Globulin
			8S globulin alpha subunit	1	158251953	8S Globulin
Chinesischer Strahlengriffel	1	1	11S-Globulin-like protein	1	82469930	11S-Globulin-like
Beifuß	1	1	art v2 allergen	1	148887203	Pathogenesis-related protein PR-1

9.2.5.5. Isolierung mittels 2D-Gelelektrophorese

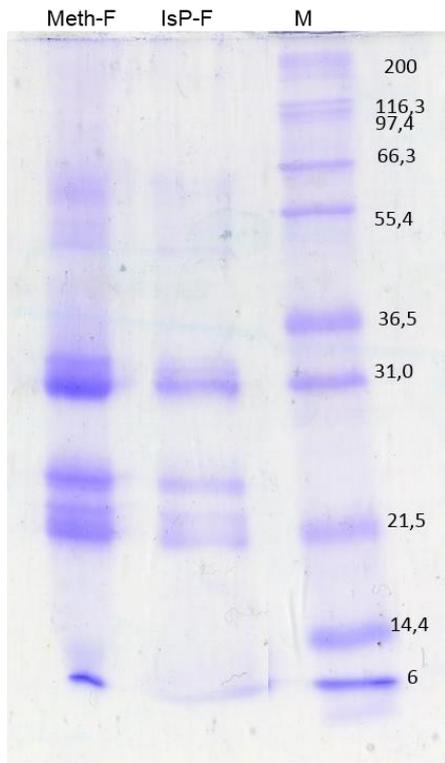


Abbildung 64: Vergleich Fällungsmethoden. *M: Marker, IsP-F: Fällung mittels Isopropanol, Meth-F: Fällung mittels Methanol*

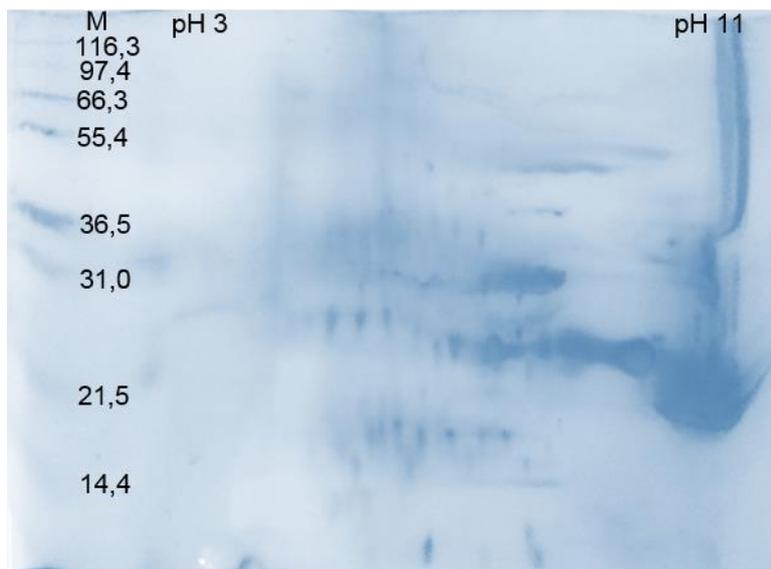


Abbildung 65: Auftrennung von GLO mittels 2D-Gelelektrophorese. *IPG-Gel-Streifen 3-11, Proteinmenge 450 µg, M: Marker*

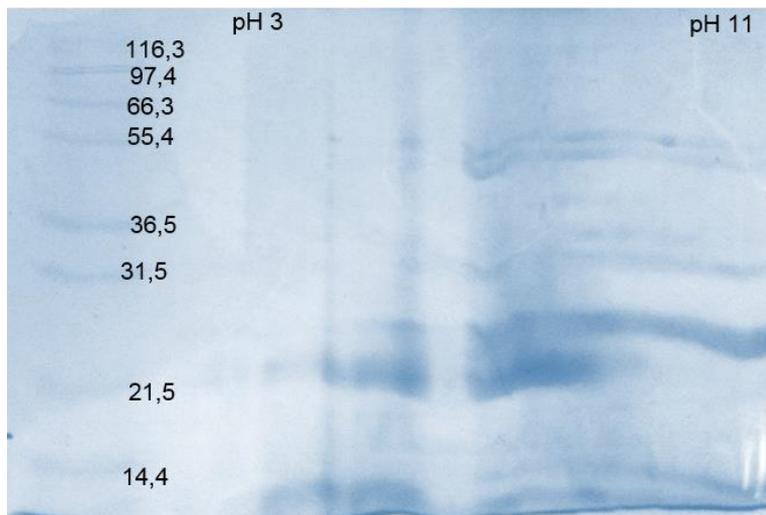


Abbildung 66: Zu hohe Spannung bei der 2D-Elektrophorese bis zu 10000 volt und die Folge als heller Balken, der die Detektion der Proteinspots stört

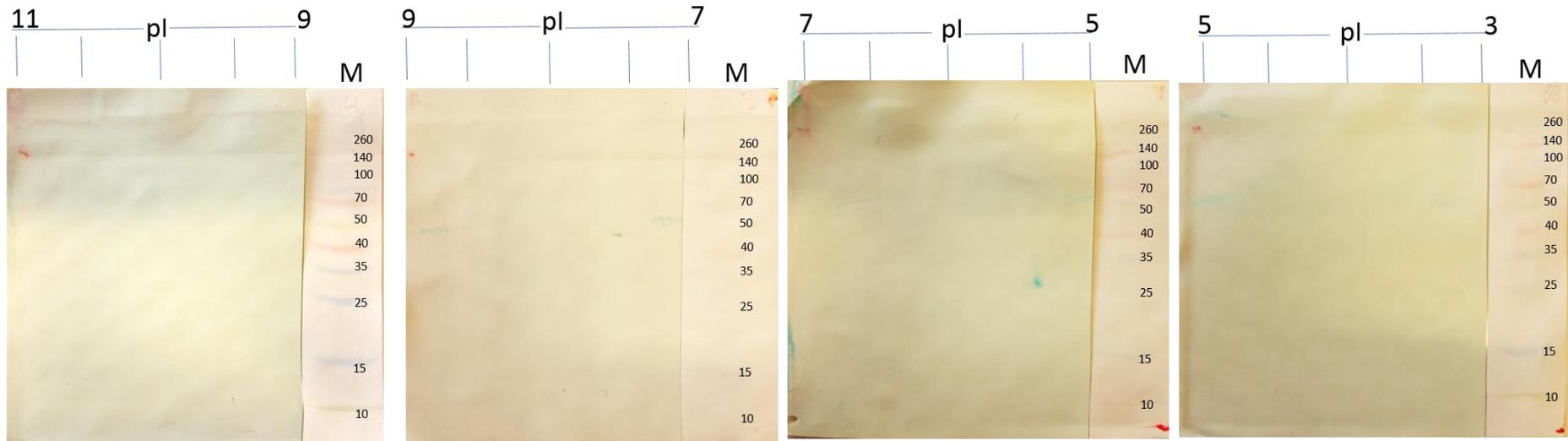


Abbildung 67: Screening der Zielproteine mittels 24cm- IPG-Gelstreifens und anschließende SDS-PAGE und Immunblotting auf vier kleinen SDS-Gelen

Anhang

Tabelle 38: De Novo sequenzierte Peptide nach Isolierung mittels 2D-Gelelektrophorese sortiert nach Proteinbanden und Proteinspots

Protein-Cluster	MG (kD)	PS	Chiasamen-Sequenzen	Ähnliche Sequenzen	Übereinstimmung	NCBI-ID	Proteinname	Gattung	Start	Ende	NG-Stelle
1	60	PS1	GLLLPHYNNAPQLLYVVR	GLLLPHYNNAPQLLYVVR	100 %	Q9AUD2	11S-Globulin	Sesamum indicum	96	113	289-290
			QGQLVVVPQNFVVK	QGQLVVVPQNFVVK	100 %	Q06AW2	11S seed storage globulin A	Chenopodium quinoa	390	404	293-294
			LVNHSGQEHLNDR	VDHSGQQVMNDR	67 %	XP_016455279.1	11 S globulin seed storage protein 2-like	Nicotiana tabacum	392	403	308-309
			ADLYNPQQR	ADLYNPQ	86 %	P05190.1	Legumin Typ B	Vicia faba	319	328	298-299
			ADIYNPQAGR	ADIYNPQAGR	100 %	Q41128	Legumin	Quercus robur	443	449	303-304
			NTLRPNALSLPNYHPNPR	NTLRPNALSLPNYHPNPR	100 %	Q9SE84	Legumin-like protein	Perilla frutescens	81	98	
2	49	PS2	NPYVFEDR	IPYVFEDQ	100 %	13183177	7S-Globulin	Sesamum indicum	194	201	
			VNADDNEQFTLAG	NNEQFTLAG	77 %	XP_012833200.1	vicilin-like antimicrobial peptides 2-2	Solanum tuberosum	530	542	
			VNADDNEQFTLAG	VNAYNNEKFTLAG	77 %	XP_012833200.1	vicilin-like antimicrobial peptides 2-2	Erythranthe guttata	542		
			SQKEEFFFEQGR	SQKEEFFFEQGP	83 %	XP_006349767.1	vicilin-like antimicrobial peptides 2-2	Solanum tuberosum	465		
	45	PS3	NNPYVFE	DNPVFE	71 %	P0843.1	Vicilin	Pisum sativum	n	n	
			LHAGTTYLVNR	LHAGTTYLVN	82 %	P13919.2	Convicilin	Pisum sativum	294	304	
			QTTNPNYVFEDR	QSDNPYYFDER	81 %	Q9SPL4.1	Vicilin-like antimicrobial peptides 2-2	Macadamia integrifolia	249	257	
		PS4	SQKEEFFFEQGR	SQKEEFFFEQGP	83 %	XP_006349767.1	vicilin-like antimicrobial peptides 2-2	Solanum tuberosum	454	465	
			HAGTTYLVNR	HAGTTYLVNR	82 %	XP_016464014.1	vicilin-like antimicrobial peptides 2-2	Nicotiana tabacum	190	200	
			VNADDNEQFTLAG	NNEQFTLAG	77 %	XP_012833200.1	vicilin-like antimicrobial peptides 2-2	Solanum tuberosum	530	542	

Anhang

Protein-Cluster	MG (kD)	PS	Chiasamen-Sequenzen	Ähnliche Sequenzen	Übereinstimmung	NCBI-ID	Proteinname	Gattung	Start	Ende	NG-Stelle	
3	40	PS5	YQMSPAQAQSLK	YQISPNQAQALK	75%	Q9XHP0.1	11S-globulin seed storage protein	Sesamum indicum	431	442	277-278	
			AGYTSALR	AGYTSVIR	75%	Q9XHP0.1	11S-globulin seed storage protein 2	Sesamum indicum	413	420	277-278	
	31	PS6	AGGDVLAL	AGGDVLAL	100 %	OEL19649.1	Phenolic glucoside malonyltransferase 2	Dichantheium oligosanthes	158	165		
			YLAGSAPQG	YLAGSAPSG	89 %	CAA90641.1	11S-Globulin Legumin	Ginkgo biloba	193	201	273-274	
			QHQFGNLFRR	QHQFGNVFR	89 %	XP_011083024.1	Legumin B-like	Sesamum indicum	209	217		
			TQCQLQQLSAR	TECQVQQLTAR	73 %	NP_001291327.1	Legumin B-like	Sesamum indicum	48	58	307-308	
			QQGECDLTR	QQGECQLNR	78 %	XP_009803568.1	Legumin A-like	Nicotiana glauca	28	36	286-287	
			FVLGNPQ	FFLAGNPQ	88 %	P19084.1	11Globulin seed storage protein	Helianthus annuus	184	191	235-236	
			PQTFESPQQQ	PETFEDPQQQ	80 %	AAL73404.1	11S-globulin-like protein	Corylus avellana	115	124	320-321	
			FLAGNP-QSLQSQ	FLAGNPQQQLQSQ	85 %	XP_002530185.1	Legumin B	Ricinus communis	194	206		
			NNQKMCAGVAVAR	NNQQLQCAGVAVVR	79 %	XP_010652369.1	Legumin A-like	Vitis vinifera	60	73	305-306	
			QCQLQKLSA	QCQLQNLNA	78 %	XP_016699481.1	Legumin B	Gossypium hirsutum	49	57	335-336	
			PS7	LTAQQPTLR	LTAQEPTIR	78 %	XP_012828564.1	11S-globulin subunit beta like	Erythranthe guttata	55	63	
				YLAGSAPQG	YLAGSAPSG	89 %	CAA90641.1	11S-Globulin	Ginkgo biloba	193	201	273-274
				TQCQLQQLSAR	TECQVQQLTAR	73 %	NP_001291327.1	Legumin B-like precursor	Sesamum indicum	48	58	307-308
				QQGQCDLTR	QQGQCQLNR	78 %	XP_015086518.1	12S seed storage protein CRA1-Like	Solanum pennellii	28	36	
				NNQKMECAGVAAVR	NNEEFECAGVAAVR	79 %	XP_016439381.1	11S-Globulin subunit beta-like	Nicotiana glauca	77	90	
			PS8	LTAQQPTLR	LTAQEPTIR	78 %	XP_012828564.1	11S-Globulin subunit beta-like	Erythranthe guttata	55	63	
				QCQLQKLSA	ECQLDQLNA	67 %	P33523.2	Cruciferin BnC1	Brassica napus	29	37	300-301
				FLAGNPQS-LQSQ	FLAGNPQRELQSQ	84 %	XP_011046348.1	Legumin B-like	Populus euphratica	194	206	305-306

Anhang

Protein-Cluster	MG (kD)	PS	Chiasamen-Sequenzen	Ähnliche Sequenzen	Übereinstimmung	NCBI-ID	Proteinname	Gattung	Start	Ende	NG-Stelle
3	31	PS8	TQCQLQQLSAR	TECQVQQLTAR	73 %	NP_001291327.1	Legumin B-like precursor	Sesamum indicum	48	58	307-308
			FVLAGNPQ	FFLAGNPQ	88 %	P19084.1	11S-Globulin seed storage protein	Helianthus annuus	184	191	235-236
		PS9	YLAGSAPQG	YLAGSAPSG	89 %	CAA90641.1	11S-Globulin	Ginkgo biloba	193	201	273-274
			TQCQLQQLSAR	TECQVQQLTAR	73 %	NP_001291327.1	Legumin B-like precursor	Sesamum indicum	48	58	307-308
			SFYLAGSP	SFYLAGGEP	89 %	CAA64762.1	Legumin-like protein	Asarum europaeum	192	197	278-279
			FLAGNPQS-LQSQ	FLAGNPQRELQSQ	85 %	XP_011046348.1	Legumin B-like	Populus euphratica	194	206	305-306
			QQFECAGVAV	QQFQCAGVAV	90 %	AAL73403.1	11S-Globulin-like protein	Corylus avellana	N		
			AGNPGN-QQEQ	AGNPGNPGQEQQ	69 %	XP_012828922.1	Legumin B-like	Erythranthe guttata	195	207	220-221
			LESLSAVQPR	LELLSAVQPR	90 %	EMT08231.1	Fimbrin-like protein 2	Aegilops tauschii			
		PS10	SLPNYHPNPR	SLPNYHPSPR	90 %	Q9XHP0.1	11S-Globulin seed storage protein	Sesamum indicum	83	92	277-278
			FQCAGVAEFR	FQCAGVAEFR	100 %	XP_004152047.1	11 S Globulin	Cucumis sativus	69	78	280-281
			EQFQCAGVAAMR	EQFQCAGVAAMR	100 %	CAA6476.1	Legumin-like protein	Asarum europaeum	63	75	278-279
				DQFQCAGVAAMR	92 %	XP_011628164.1	11 Globulin seed storage protein 2	Amborella trichopoda	83	92	277-278
			YLAGSAPQG	YLAGSAPSG	89 %	CAA90641.1	11S-Globulin	Ginkgo biloba	193	201	273-274
			PS11	MAGYTSALR	LAGYTSVIR	67 %	Q9XHP0.1	11S-Globulin seed storage protein	Sesamum indicum	142	420
		AGYTSALR		AGYTSALR	100 %	AAF19607.1	Legumin-like protein	Perilla frutescens	421	428	285-286
		QTFLLSP		QSFLLSP	86 %	Q9XHP0.1	11S-Globulin seed storage protein	Sesamum indicum	448	454	277-278
		EQFQCAGVAAMR		EQFQCAGVAAMR	100 %	CAA6476.1	Legumin-like protein	Asarum europaeum	63	75	278-279
		EQFQCAGVAAMR		DQFQCAGVAAMR	92 %	XP_011628164.1	11 Globulin seed storage protein 2	Amborella trichopoda	388	399	
		SLPNYHPNPR		SLPNYHPSPR	90 %	Q9XHP0.1	11S-Globulin seed storage protein	Sesamum indicum	83	92	277-278
		LSYMDYSAQK		LKYMDLSAEK	70 %	Q9XHP0.1	11S-Globulin seed storage protein	Sesamum indicum	319	328	277-278

Anhang

Protein-Cluster	MG (kD)	PS	Chiasamen-Sequenzen	Ähnliche Sequenzen	Übereinstimmung	NCBI-ID	Proteinname	Gattung	Start	Ende	NG-Stelle
3		PS11	GNFLVVAHDLVTNG	GNFLVPAEDLSTNG	79 %	XP_016692085.1	peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA	Gossypium hirsutum	99	112	
		PS12	SFYLAGSP	SFYLAGGEP	89 %	CAA64762.1	Legumin-like protein	Asarum europaeum	192	197	278-279
			EQFQCAGVAAMR	EQFQCAGVAAMR	100 %	CAA6476.1	Legumin-like protein	Asarum europaeum	388	399	
				DQFQCAGVAAMR	92 %	XP_011628164.1	11 Globulin seed storage protein 2	Amborella trichopoda	457	466	308-309
			SLPNYHPNPR	SLPNYHPSPR	90 %	Q9XHP0.1	11S-Globulin seed storage protein	Sesamum indicum	83	92	277-278
			VLTNAYQFSP	VLTNAYQISP	90 %	XP_016455279.1	11 S globulin seed storage protein 2-like	Nicotinana tabacum	457	466	308-309
4	23	PS13	VVTVSLP	VVTVTLP	86 %	Q9SVM9.1	Protein ECERIFERUM	Arabidopsis thaliana	403	409	
			AVFDGQVR	AVFDGNVR	88 %	Q9LQK7.1	Protein ABC17	Arabidopsis thaliana	368	375	
			YQMSPAQAQSLK	YQISPNQAQALK	75 %	Q9XHP0.1	11S-Globulin seed storage protein	Sesamum indicum	431	442	277-278
			VFEGQVR	VFDGEVR	71 %	P13744.1	11S-Globulin subunit beta	Cucurbita maxima	387	393	296-297
			FFETFCTMK	FEETFCTMK	100 %	XP_010046000.1	11S-Globulin seed storage protein 2	Eucalyptus grandis	310	316	302-303
			AGYTSALR	AGYTSVIR	75 %	Q9XHP0.1	11S-Globulin seed storage protein 2	Sesamum indicum	413	420	277-278
			LPLLSYMDMSAQ	LPILKYMDLSA	64 %	Q9XHP0.1	11S-Globulin seed storage protein	Sesamum indicum	316	327	277-278
				LPILSFMDMSAE	75 %	XP_012085320.1	11S-Globulin storage protein 2-like	Jatropha curcas	329	340	290-291
				LPILSFMDMSAE	75 %	XP_010046000.1	11S-Globulin storage protein	Eucalyptus grandis	345	356	302-303
			QTFLLSP	QSFLLSP	86 %	Q9XHP0.1	11S-Globulin seed storage protein 2	Sesamum indicum	448	454	277-278
			EETMCT	EETLCT	83 %	P15456.2	12S seed storage protein CRB	Arabidopsis thaliana	272	277	268-269
			ENAMISTLAGR	NAMVSTLAGR	80 %	Q02498	Cruciferin PGCRURSE5	Raphanus sativus	418	427	289-290
				NAMVSTLAGR	80 % 90 %	P33525	Cruciferin CRU1	Brassica napus	448	457	
				ENAMISTLAGR	64 % 100 %	Q96318.1	12S seed Storage protein CRC	Arabidopsis thaliana	461	471	
			LVDHSGQTYFNDR	VDHNGQALMNDR	67 %	Q9XHP0.1	11S-Globulin seed storage protein 2	Sesamum indicum	361	372	277-278

Anhang

Protein-Cluster	MG (kD)	PS	Chiasamen-Sequenzen	Ähnliche Sequenzen	Übereinstimmung	NCBI-ID	Proteinname	Gattung	Start	Ende	NG-Stelle
4	23	PS13	PLQVLTNAYQFS	PLQVITNSYQIS	75 %	Q9XHP0.1	11S-Globulin seed storage protein 2	Sesamum indicum	423	434	277-278
		PS14	AALYNPQAGR	ADLYNPRAGR	80 %	P05692.1	Legumin J alpha chain	Pisum sativum	343	352	322-323
			ADLYNP	ADLYNP	100 %	P05692.1	Legumin J alpha chain	Pisum sativum	343	348	322-323
			NLDHPTSADLYNRP	NIAQPARADLYNRP	64 %	P16080.1	Legumin type B alpha chain	Vicia faba	168	179	303-304
			NLDHPTSADLYNRP	NIAQPARADLYNRP	64 %	P16079.1	Legumin type B alpha chain	Vicia faba	162	175	
			ESTLFSPS	ESSLFSPS	88 %	Q6TBX7.1	Carotene epsilon monoxygenase	Arabidopsis thaliana	2	9	
		PS15	FLAGNPQS-LQSQ	FFLAGNPQRELQSQ	79 % 85 %	XP_011046348.1	Legumin B-like	Populus euphratica	194	206	305-306
			LTAQQPTLR	LTAQEPTIR	78 %	XP_012828564.1	11S-Globulin subunit beta-like	Erythranthe guttata	55	63	
			YLAGSAPQG	YLAGNPPQG	78 %	P11090.1	Curciferin 11S-Globulin	brassica napus	218	226	300-301
			NNQKMQCAGVAVAR	NNQLQCAGVAVVR	79 %	XP_010652369.1	Legumin A-like	Vitis vinifera	60	73	305-306
			QCQLQQLSA	ECQLDQLNA	67 %	P33523.2	Cruciferin BnC1	Brassica napus	29	37	300-301
			FLAGNPQS-LQSQ	FLAGNPQRELQSQ	84 %	XP_011046348.1	Legumin B-like	Populus euphratica	196	209	
			TQCQLQQLSAR	TECQVQQLTAR	81 % 73 %	NP_001291327.1	Legumin B-like precursor	Sesamum indicum	48	58	307-308
			FVLAGNPQ	FFLAGNPQ	87 %	P19084.1	11S-Globulin seed storage protein	Helianthus annuus	184	191	235-236
			FVLAGNPQS-LQSQ	FFLAGNPQRELQSQ	78 %	XP_006370929.1	Legumin B-like	Populus euphratica	196	209	
			YLAGSAPQG	YLAGSAPSG	89 %	CAA90641.1	Legumin 11S-Globulin	Ginkgo biloba	193	201	273-274
			TQCQLQQLSAR	TECQVQQLTAR	81 %	NP_001291327.1	Legumin B-like precursor	Sesamum indicum	48	58	307-308
			TVVYVTK	TIVYVTK	86 %	XP_012831308.1	11S-Globulin seed storage protein 2- like	Erythranthe guttata	351	357	
			NLQQFECAGVA	NNQQFECAGVA	90 %	NP_001291328.1	uncharacterized protein	Sesamum indicum	76	86	289-290
			NLQQFECAGVAV	NNQQFQCAGVAV	91 %	AAW29810.1	seed storage protein	Juglans regia	63	74	315-316
QQFECAGVAV	QQFQCAGVAV		91 %	AAL73403.1	11S-Globulin-like protein	Corylus avellana	2RAU S				

Anhang

Protein-Cluster	MG (kD)	PS	Chiasamen-Sequenzen	Ähnliche Sequenzen	Übereinstimmung	NCBI-ID	Proteinname	Gattung	Start	Ende	NG-Stelle
4	23	PS15	AGNPGN-QQEQ	AGNPGNPGQEQQ	84 % 69 %	XP_012828922.1	Legumin B-like	Erythranthe guttata	195	207	220-221
			LESLSAVQPR	LELLSAVQPR	90 %	EMT08231.1	Fimbrin-like protein 2	Aegilops tauschii	585	594	
			LVNHSGQEHLNDR	VDHSGQQVMNDR	67 %	XP_016455279.1	11 S globulin seed storage protein 2-like	Nicotinana tabacum	392	403	308-309
			FQCAGVAAFR	FQCAGVAAFR	100 %	XP_004152047.1	11 S Globulin	Cucumis sativus	69	78	
			AGYTSALR	AGYTSALR	100 %	AAF19607.1	Legumin-like protein	perilla frutescens	421	428	285-286
			YQMSPAQAQSLK	YQISPNQAQALK	75 %	Q9XHP0.1	11S-Globulin seed storage protein	Sesamum indicum	431	442	277-278
			YLAGSQPO	YLAGKNPQ	71 %	P11090.1	Cruciferin	Brassica napus	218	224	300-301
	20	PS16	ADLYNP	ADLYNP	100 %	P05692.1	Legumin J alpha chain	Pisum sativum	343	348	322-323
			QDGFEWLTFK	QNNFEWISFK	60 %	P33525.1	Cruciferin, 12S storage protein	Brassica napus	435	444	
			ASQDGFEWLTFK	AGNNGFEWVAFK	58 %	Q9XHP0.1	11S-Globulin seed storage protein 2	Sesamum indicum	391	402	277-278
			PVDVVANAY	PVDYVANAY	89 %	P12615.1	12S seed storage globulin 1 acidic	Avena sativa	463	471	
			QTFLLSP-AH	QTFLLSPTRAH	82 %	AAF19607.1	Legumin-like protein	Perilla frutescens	456	466	285-286
			PVDVVANAYQVSR	PVDVLANAYRISR	77 %	P14812.1	12S seed storage globulin 2 acidic	Avena sativa	463	475	317-318
			PTSADLYNPR	PARADLYNPR	80 %	P05190.1	Legumin type B alpha chain	Vicia faba	321	330	303-304
5	12	PS18	NLRPNALSPLPNYHPNPR	NLRPNALSPLPNYHPNPR	100 %	Q9SE84	Legumin-like protein	Perilla frutescens	81	98	
			TNDNAQVSELAGR	TNDNAQVSELAGR	100 %	U5FED6	11S seed storage protein Uncharacterized protein	Populus trichocarpa	434	446	
			ADIYNPQAGR	ADIYNPQAGR	100 %	Q41128	Legumin	Quercus robur	319	328	298-299
			ASQDEGLEWISFK	ADVYNPHGGR	70 %	Q9AUD2	11S-Globulin	Sesamum indicum	310	319	289-290
				NPQGGR	100 %						

9.2.6. Charakterisierung der IgE- bzw. IgG-bindende Proteine

9.2.6.1. ELISA-Inhibition

Tabelle 39: Ermittlung der für die ELISA-Inhibitionstests geeigneten Antigen-Konzentration (Sesamprotein)

Konz. Antigen	1.Bestimmung	2.Bestimmung	3.Bestimmung	Mittelwert
0	0,058	0,056	0,055	0,056
10	0,779	0,703	0,783	0,755
20	0,872	0,797	0,902	0,857
50	0,924	0,771	0,941	0,878
100	1,024	0,962	1,061	1,016
200	0,945	0,786	0,852	0,861
500	0,956	0,761	0,888	0,868
1000	0,884	0,909	0,808	0,867
2000	0,868	0,761	0,881	0,837
5000	0,727	0,742	0,734	0,734
10000	0,530	0,507	0,479	0,505
100000	0,243	0,257	0,256	0,252

Tabelle 40: Berechnung der ELISA-Inhibition sowie des C₅₀-Werts

Inhibitionstest mit Sesamantikörpern						
Konzentration des Antigens (Sesamprotein): 100 µg/ml						
Verdünnung des primären Antikörpers: 1:10000						
Verdünnung von GLO	1.Bestimmung	2.Bestimmung	3.Bestimmung	Mittelwert	Inhibition %	
0	0,827	0,834	0,830	0,830		Blank=0,051
1	0,768	0,774	0,771	0,771	7,17	0,771
10	0,766	0,774	0,770	0,770	7,26	0,770
100	0,673	0,685	0,679	0,679	18,23	0,679
1000	0,363	0,372	0,367	0,367	55,75	0,3673875
5000	0,164	0,168	0,166	0,166	78,46	0,166020833
Berechnung von C₅₀-Wert						
y = 50 % Inhibition= 0,415	Funktion	y = -0,073ln(x) + 0,8271		C₅₀-Wert= 282 µg/ml = 0,282 mg/ml		
Inhibitionstest mit Haselnussantikörpern						
Konzentration des Antigens (Haselnussprotein) 100 µg/ml						
Verdünnung des primären Antikörpers: 1:10000						
Verdünnung von GLO	1.Bestimmung	2.Bestimmung	3.Bestimmung	Mittelwert	Inhibition %	
0	1,2307	1,2955	1,2631	1,1931		Blank=0,07
1	1,179	1,173	1,176	1,106	7,33	
10	1,135	1,031	1,083	1,013	15,08	
100	0,949	0,985	0,967	0,897	24,82	
1000	0,948	0,954	0,951	0,881	26,18	
5000	0,838	0,904	0,871	0,801	32,90	
Berechnung von C₅₀-Wert						
y= 50 % Inhibition =0,597	Funktion	y = -0,034ln(x) + 1,0688		C₅₀-Wert= 1077017 µg/ml = 1077 mg/ml		

9.2.6.2. Computergestützter Sequenzvergleich mittels der FARRP-Datenbank

Tabelle 41: Sequenzvergleich der mittels MS-Analyse und De Novo Sequenzierung erhaltenen Peptide mit Peptidsequenzen bekannter Allergene in der FARRP-Datenbank

Chiasamen-Sequenzen	Ähnliche Sequenzen	Allergentyp	Sequenz-ID	SÜ	Sequenz-ähnlichkeit	Gattung	Organismus
Ähnliche Peptidsequenzen der 11S-Globuline (Legumine)							
DNALVSPLAGR	ENAFINTLAGR	Chain A Pru Du Amandin	258588247	42,9 %	78,6 %	Prunus dulcis	Mandel
NNQKMECAGVAAR	NQGDFQCAGVAASR	Chain A Pru Du Amandin	258588247	57,1 %	85,7 %	Prunus dulcis	Mandel
PLQVLTNAYQFS	PDEVLANAYQIS	Chain A Pru Du Amandin	258588247	66,7 %	91,7 %	Prunus dulcis	Mandel
NLDHPTSADLYNPR	NIGNPERADIFSPR	Chain A Pru Du Amandin	258588247	42,9 %	78,6 %	Prunus dulcis	Mandel
TQCQLQQLSAR	QCQLNQLQAR	Chain A Pru Du Amandin	258588247	80,0 %	100,0 %	Prunus dulcis	Mandel
SFYLAGSP	FYLAGNP	Chain A Pru Du Amandin	258588247	85,7 %	100,0 %	Prunus dulcis	Mandel
FQCAGVAAFR	FQCAGVAASR	Chain A Pru Du Amandin	258588247	90,0 %	90,0 %	Prunus dulcis	Mandel
SFYLAGSP	FYLAGNP	putative Pru du 6 allergen, partial	523916668	85,7 %	100,0 %	Prunus dulcis	Mandel
PQTFESPQQQ	PQQFQQQQQQ	putative Pru du 6 allergen, partial	523916668	60,0 %	80,0 %	Prunus dulcis	Mandel
FVLAGNPQ	FYLAGNPQ	prunin 2 precursor, partial	307159114	87,50 %	87,50 %	Prunus dulcis	Mandel
LPLLSYMDMSAQ	LPILRYLRLSAE	prunin 2 precursor, partial	307159114	50,0 %	83,3 %	Prunus dulcis	Mandel
NLQQFECAGVAV	NQEDFQCAGVA	prunin 1 precursor	307159112	63,6 %	90,9 %	Prunus dulcis	Mandel
EQFQCAGVAAMR	EDFQCAGVAASR	prunin 1 precursor	307159112	83,3 %	91,7 %	Prunus dulcis	Mandel
SFYLAGSP	FYLAGNP	prunin 1 precursor	307159112	85,7 %	100,0 %	Prunus dulcis	Mandel
TQCQLQQLSAR	QCQLNQLQAR	prunin 1 precursor	307159112	80 %	100 %	Prunus dulcis	Mandel
PLQVLTNAYQFS	PDEVLANAYQIS	prunin 1 precursor	307159112	66,7 %	91,7 %	Prunus dulcis	Mandel
NNQKMQCAGVAVAR	NQEDFQCAGVAASR	prunin 1 precursor	307159112	57,1 %	92,9 %	Prunus dulcis	Mandel
DNALVSPLAGR	ENAFINTLAGR	prunin 1 precursor	307159112	54,5 %	90,9 %	Prunus dulcis	Mandel
NLDHPTSADLYNPR	NIGNPERADIFSPR	prunin 1 precursor	307159112	42,9 %	78,6 %	Prunus dulcis	Mandel
NNQKMQCAGVAVAR	NEEQLQCANVAVFR	Pis v 2.0201 allergen 11S-Globuli	110349085	57,1 %	92,9 %	Pistacia vera	Pistazien

Anhang

Chiasamen-Sequenzen	Ähnliche Sequenzen	Allergentyp	Sequenz-ID	SÜ	Sequenz-ähnlichkeit	Gattung	Organismus
FQCAGVAAFR	LQCANVAVFR	Pis v 2.0201 allergen 11S-Globulin precursor	110349085	70,0 %	100,0 %	Pistacia vera	Pistazien
EQFQCAGVAAMR	EQLQCANVAVFR	Pis v 2.0201 allergen 11S-Globulin precursor	110349085	66,7 %	100,0 %	Pistacia vera	Pistazien
NLDHPTSADLYNPR	NINDPSRADVYNPR	Pis v 2.0201 allergen 11S-Globulin precursor	110349085	57,1 %	85,7 %	Pistacia vera	Pistazien
TQCQLQQLSAR	TQCQIQLNA	Pis v 2.0101 allergen11S-Globulin precursor	110349083	70,0 %	100,0 %	Pistacia vera	Pistazien
NNQKMQCAGVAVAR	NEEQLQCANVAVFR	Pis v 2.0101 allergen11S-Globulin	110349083	57,1 %	92,9 %	Pistacia vera	Pistazien
EQFQCAGVAAMR	EQLQCANVAVFR	Pis v 2.0101 allergen11S-Globulin precursor	110349083	66,7 %	100,0 %	Pistacia vera	Pistazien
NNQKMQCAGVAVAR	NEEQLQCANVAVFR	11S-Globulin	156001070	57,1 %	92,9 %	Pistacia vera	Pistazien
TQCQLQQLSAR	TQCQIQLNA	11S-Globulin	156001070	70,0 %	100,0 %	Pistacia vera	Pistazien
EQFQCAGVAAMR	EQLQCANVAVFR	11S-Globulin	156001070	66,7 %	100,0 %	Pistacia vera	Pistazien
NLDHPTSADLYNPR	NINDPSRADVYNPR	11S-Globulin	156001070	57,1 %	85,7 %	Pistacia vera	Pistazien
PQTFESPQQQ	PETFEPQQQ	glycinin A3B4 subunit	10566449	80,0 %	100,0 %	Glycine max	Sojabohne
SFYLAGSP	FYLAGNP	Glycinin-like protein product	732706	85,7 %	100,0 %	Glycine max	Sojabohne
SFYLAGSP	FYLAGNP	A5A4B3 subunit	806556	85,7 %	100,0 %	Glycine soja	Wilde Sojabohne
PQTFESPQQQ	PETFEPQEQ	Glycinin-like protein product	732706	70,0 %	90,0 %	Glycine max	Sojabohne
PQTFESPQQQ	PETFEPQQQ	glycinin	169969	80,0 %	100,0 %	Glycine max	Wilde Sojabohne
SFYLAGSP	FYLAGNP	glycinin	169969	85,7 %		Glycine max	Sojabohne
SFYLAGSP	FYLAGNP	glycinin	18641	85,7 %	100,0 %	Glycine max	Sojabohne
PQTFESPQQQ	PETFEPQEQ	glycinin	18641	70,0 %	90,0 %	Glycine max	Sojabohne
PQTFESPQQQ	PSTFEPQQ	glycinin A-1a-B-x subunit	169973	77,8 %	88,9 %	Glycine max	Sojabohne
NNQKMQCAGVAVAR	NNKPFQCAGVALSR	glycinin A-1a-B-x subunit	169973	64,3 %	92,9 %	Glycine max	Sojabohne
QCQLQKLSA	ECQIQLNA	glycinin A-1a-B-x subunit	169973	66,7 %	100,0 %	Glycine max	Sojabohne
NLQQFECAGVAV	NNKPFQCAGVAL	glycinin A-1a-B-x subunit	169973	58,3 %	83,3 %	Glycine max	Sojabohne
EQFQCAGVAAMR	FQCAGVALSR	glycinin A-1a-B-x subunit	169973	80,0 %	80,0 %	Glycine max	Sojabohne
EQFQCAGVAAMR	FQCAGVALSR	glycinin A2B1a subunit	218265	80,0 %	80,0 %	Glycine max	Sojabohne

Anhang

Chiasamen-Sequenzen	Ähnliche Sequenzen	Allergentyp	Sequenz-ID	SÜ	Sequenz-ähnlichkeit	Gattung	Organismus
QCQLQKLSA	ECQIQKLNA	glycinin A2B1a subunit	218265	66,7 %	100,0 %	Glycine max	Sojabohne
NNQKMQCAGVAVAR	NNKPFQCAGVALSR	glycinin A2B1a subunit	218265	64,3 %	92,9 %	Glycine max	Sojabohne
NNQKMQCAGVAVAR	NNKPFQCAGVALSR	glycinin subunit G3	18639	64,3 %	92,9 %	Glycine max	Sojabohne
EQFQCAGVAAMR	FQCAGVALSR	glycinin subunit G3	18639	80,0 %	80,0 %	Glycine max	Sojabohne
LPLLSYMDMSAQ	FPALSWLKLSAQ	glycinin subunit G3	18639	50,0 %	83,3 %	Glycine max	Sojabohne
NLQQFECAGVAV	NNKPFQCAGVAL	glycinin subunit G3	18639	58,3 %	83,3 %	Glycine max	Sojabohne
QCQLQKLSA	ECQIQKLNA	Glycinin A2B1a subunit-like	18609	66,7 %	100,0 %	Glycine max	Sojabohne
EQFQCAGVAAMR	FQCAGVALSR	Glycinin A2B1a subunit-like	18609	80,0 %	80,0 %	Glycine max	Sojabohne
QQFECAGVAV	KPFQCAGVAL	Glycinin A2B1a subunit-like	18609	60,0 %	90,0 %	Glycine max	Sojabohne
NNQKMQCAGVAVAR	NNKPFQCAGVALSR	Glycinin A2B1a subunit-like	18609	64,3 %	92,9 %	Glycine max	Sojabohne
QCQLQKLSA	ECQIQKLNA	Glycinin-like	18615	66,7 %	100,0 %	Glycine max	Sojabohne
NNQKMECAGVAAVR	NNKPFQCAGVALSR	Glycinin-like	18615	57 %	79 %	Glycine max	Sojabohne
EQFQCAGVAAMR	FQCAGVALSR	Glycinin-like	18615	80,0 %	80,0 %	Glycine max	Sojabohne
QQFECAGVAV	KPFQCAGVAL	Glycinin-like	18615	60,0 %	90,0 %	Glycine max	Sojabohne
SFYLAGSP	FYLAGNP	11S-Globulin-like protein	18479082	85,7 %	100,0 %	Corylus avellana	Haselnuss
PQTFESPQQQ	PETFEDPQQQ	11S-Globulin-like protein	18479082	80,0 %	100,0 %	Corylus avellana	Haselnuss
NNQKMQCAGVAVAR	NDQQFQCAGVAVIR	11S-Globulin-like protein	18479082	71,4 %	92,9 %	Corylus avellana	Haselnuss
NLQQFECAGVAV	NDQQFQCAGVAV	11S-Globulin-like protein	18479082	83,3 %	91,7 %	Corylus avellana	Haselnuss
NNQKMECAGVAAVR	NDQQFQCAGVAVIR	11S-Globulin-like protein	18479082	57 %	100 %	Corylus avellana	Haselnuss
PLQVLTNAYQFS	PDDVLANAFQIS	11S-Globulin-like protein	18479082	58,3 %	91,7 %	Corylus avellana	Haselnuss
DNALVSPLAGR	DNAQISPLAGR	11S-Globulin-like protein	18479082	81,8 %	90,9 %	Corylus avellana	Haselnuss
PQTFESPQQQ	PETFEDPQQQ	Cor a 9 allergen	557792009	80,0 %	100,0 %	Corylus avellana	Haselnuss
NNQKMQCAGVAVAR	NDQQFQCAGVAVIR	Cor a 9 allergen	557792009	71,4 %	92,9 %	Corylus avellana	Haselnuss
SFYLAGSP	FYLAGNP	Cor a 9 allergen	557792009	85,7 %	100,0 %	Corylus avellana	Haselnuss

Anhang

Chiasamen-Sequenzen	Ähnliche Sequenzen	Allergentyp	Sequenz-ID	SÜ	Sequenz-ähnlichkeit	Gattung	Organismus
NLQQFECAGVA	NDQQFQCAGVA	Cor a 9 allergen	557792009	81,8 %	90,9 %	Corylus avellana	Haselnuss
NLQQFECAGVAV	NDQQFQCAGVAV	Cor a 9 allergen	557792009	83,3 %	91,7 %	Corylus avellana	Haselnuss
QQFECAGVAV	QQFQCAGVAV	Cor a 9 allergen	557792009	90,0 %	100,0 %	Corylus avellana	Haselnuss
FQCAGVAAFR	FQCAGVAVIR	Cor a 9 allergen	557792009	80,0 %	100,0 %	Corylus avellana	Haselnuss
EQFQCAGVAAMR	QQFQCAGVAVIR	Cor a 9 allergen	557792009	75,0 %	100,0 %	Corylus avellana	Haselnuss
NNQKMECAGVAAVR	NDQQFQCAGVAVIR	Cor a 9 allergen	557792009	57 %	100 %	Corylus avellana	Haselnuss
PLQVLTNAYQFS	PDDVLANAFQIS	Cor a 9 allergen	557792009	58,3 %	91,7 %	Corylus avellana	Haselnuss
DNALVSPLAGR	DNAQISPLAGR	Cor a 9 allergen	557792009	81,8 %	90,9 %	Corylus avellana	Haselnuss
EQFQCAGVAAMR	QQLQCAGVAVVR	11S legumin protein	158998782	66,7 %	100,0 %	Corylus avellana	Haselnuss
EQFQCAGVAAMR	QQLQCAGVAVVR	11S legumin protein	158998780	66,7 %	100,0 %	Corylus avellana	Haselnuss
LTAQQPTLR	LTAQEPTIR	11S-Globulin	13183173	77,80 %	100 %	Sesamum indicum	Sesam
FVLGNPQ	FFLAGNPQ	11S-Globulin	13183173	87,50 %	87,50 %	Sesamum indicum	Sesam
NLQQFECAGVAV	NNQQFECAGVA	11S-Globulin	13183173	90,9 %	90,9 %	Sesamum indicum	Sesam
EQFQCAGVAAMR	QQFECAGVAAVR	11S-Globulin	13183173	75,0 %	100,0 %	Sesamum indicum	Sesam
LPLLSYMDMSAQ	LPVLSWLRLSAE	11S-Globulin	13183173	50,0 %	91,7 %	Sesamum indicum	Sesam
LTAQQPTLR	LTAQEPTIR	11S-Globulin	13183173	77,80 %	100 %	Sesamum indicum	Sesam
NNQKMECAGVAAVR	NNQQFECAGVAAVR	11S-Globulin	13183173	86 %	100 %	Sesamum indicum	Sesam
DNALVSPLAGR	DNAMTSQLAGR	11S-Globulin	13183173	72,7 %	90,9 %	Sesamum indicum	Sesam
NLDHPTSADLYNPR	NLDEPARADVYNP	11S-Globulin	13183173	69,2 %	92,3 %	Sesamum indicum	Sesam
QQFECAGVAV	EQFQCAGI	11S-Globulin precursor	5381325	62,5 %	100,0 %	Sesamum indicum	Sesam
SLPNYHPNPR	SLPNYHPSPR	11S-Globulin precursor	5381325	90 %	100 %	Sesamum indicum	Sesam
EQFQCAGVAAMR	EQFQCAGIVAMR	11S-Globulin precursor	5381325	83,3 %	100,0 %	Sesamum indicum	Sesam
MAGYTSALR	LAGYTSVIR	11S-Globulin precursor	5381325	66,70 %	100 %	Sesamum indicum	Sesam
YQMSPAQAQSLK	YQISPNQAQALK	11S-Globulin precursor	5381325	75 %	91,70 %	Sesamum indicum	Sesam
QTFLLSP	QSFLLSP	11S-Globulin precursor	5381325	85,70 %	100 %	Sesamum indicum	Sesam

Anhang

Chiasamen-Sequenzen	Ähnliche Sequenzen	Allergentyp	Sequenz-ID	SÜ	Sequenz-ähnlichkeit	Gattung	Organismus
LPLLSYMDMSAQ	LPILKYMDLSAE	11S-Globulin precursor	5381325	66,7 %	100,0 %	Sesamum indicum	Sesam
TVVYVTK	TIVYVTR	11S-Globulin precursor	5381325	71,40 %	100 %	Sesamum indicum	Sesam
AGYTSALR	AGYTSVIR	11S-Globulin precursor	5381325	75 %	100 %	Sesamum indicum	Sesam
FFETFCTMK	ETFCTMK	11S-Globulin precursor	5381325	100 %	100 %	Sesamum indicum	Sesam
VNHSGQEHLNDR	VDHNGQALMNDR	11S-Globulin precursor	5381325	58,30 %	83,30 %	Sesamum indicum	Sesam
LVDHSGQTYFNDR	VVDHNGQALMNDR	11S-Globulin precursor	5381325	61,50 %	92,30 %	Sesamum indicum	Sesam
PLQVLTNAYQFS	PLQVITNSYQIS	11S-Globulin precursor	5381325	75,0 %	100,0 %	Sesamum indicum	Sesam
PQTFESPQQQ	PQQHQSPQQQ	D-type LMW glutenin subunit	208605346	70,0 %	80,0 %	Triticum aestivum	Sesam
PQTFESPQQQ	PQQHQSPQQQ	D-type LMW glutenin subunit	208605348	70,0 %	80,0 %	Triticum aestivum	Weichweizen
PQTFESPQQQ	PQQHQSPQQQ	omega-5 gliadin	73912496	70,0 %	80,0 %	Triticum aestivum	Weichweizen
PQTFESPQQQ	QPFQQPQQQ	omega-gliadin, partial	508732623	66,7 %	88,9 %	Triticum aestivum	Weichweizen
NNQKMQCAGVAVAR	NNQEFECAGVALSR	trypsin inhibitor	22135348	64,3 %	100,0 %	Arachis hypogaea	Erdnuss
PQTFESPQQQ	PSTYEPAQQ	trypsin inhibitor	22135348	60,0 %	80,0 %	Arachis hypogaea	Erdnuss
NNQKMECAGVAAR	NNQEFECAGVALSR	arachin Ara h3 isoform	199732457	71 %	86 %	Arachis hypogaea	Erdnuss
NNQKMQCAGVAVAR	NNQEFECAGVALSR	Chain A, Peanut Major Allergen Ara h 3	224036293	64,3 %	100,0 %	Arachis hypogaea	Erdnuss
NNQKMQCAGVAVAR	NNQEFECAGVALSR	glycinin	5712199	64,3 %	100,0 %	Arachis hypogaea	Erdnuss
NNQKMQCAGVAVAR	NNQEFQCAGVALSR	Ara h 3 allergen	312233065	71,4 %	100,0 %	Arachis hypogaea	Erdnuss
EQFQCAGVAAMR	QEFQCAGVALSR	Ara h 3 allergen	312233065	66,7 %	83,3 %	Arachis hypogaea	Erdnuss
LPLLSYMDMSAQ	LPILGWLGLSAQ	Ara h 3 allergen	312233065	50,0 %	91,7 %	Arachis hypogaea	Erdnuss
EQFQCAGVAAMR	QEFQCAGVALSR	iso-Ara h3	112380623	66,7 %	83,3 %	Arachis hypogaea	Erdnuss
LPLLSYMDMSAQ	LPILGWLGLSAQ	iso-Ara h3	112380623	50,0 %	91,7 %	Arachis hypogaea	Erdnuss
NNQKMQCAGVAVAR	NNQEFQCAGVALSR	iso-Ara h3	112380623	71,4 %	100,0 %	Arachis hypogaea	Erdnuss
NLQQFECAGVAV	NNQEFECAGVAL	glycinin	3703107	75,0 %	91,7 %	Arachis hypogaea	Erdnuss
NNQKMECAGVAAR	NNQEFECAGVALSR	glycinin	3703107	71 %	86 %	Arachis hypogaea	Erdnuss

Anhang

Chiasamen-Sequenzen	Ähnliche Sequenzen	Allergentyp	Sequenz-ID	SÜ	Sequenz-ähnlichkeit	Gattung	Organismus
EQFQCAGVAAMR	QEFECAGVALSR	trypsin inhibitor	22135348	58,3 %	83,3 %	Arachis hypogaea	Erdnuss
PQTFESPQQQ	PETYQAPQQ	allergen Ana 0 2	25991543	55,6 %	100,0 %	Anacardium occidentale	Cashewnuss
NLQQFECAGVAV	NHEQFRCAGVAL	allergen Ana 0 2	25991543	66,7 %	91,7 %	Anacardium occidentale	Cashewnuss
NNQKMECAGVAAR	NHEQFRCAGVALVR	allergen Ana 0 2	25991543	57 %	93 %	Anacardium occidentale	Cashewnuss
PLQVLTNAYQFS	PEEVLANAFQIS	allergen Ana 0 2	25991543	58,3 %	91,7 %	Anacardium occidentale	Cashewnuss
DNALVSPLAGR	DRAMTSPLAGR	allergen Ana 0 2	25991543	72,7 %	90,9 %	Anacardium occidentale	Cashewnuss
NLDHPTSADLYNPR	NINDPARADIYTP	allergen Ana 0 2	25991543	46,2 %	84,6 %	Anacardium occidentale	Cashewnuss
NNQKMQCAGVAVAR	NHQQLQCAGVAVVR	11S legumin protein	158998780	71,4 %	100,0 %	Carya illinoensis	Pekannuss
SFYLAGSP	NFYLAGNP	11S legumin protein	158998780	75,0 %	100,0 %	Carya illinoensis	Pekannuss
PLQVLTNAYQFS	PEEVLVNAFQ	11S legumin protein	158998780	60,0 %	90,0 %	Carya illinoensis	Pekannuss
DNALVSPLAGR	ENAMVSPLAGR	11S legumin protein	158998780	81,8 %	100,0 %	Carya illinoensis	Pekannuss
PLQVLTNAYQFS	PEEVLVNAFQ	11S legumin protein	158998782	60,0 %	90,0 %	Carya illinoensis	Pekannuss
DNALVSPLAGR	ENAMVSPLAGR	11S legumin protein	158998782	81,8 %	100,0 %	Carya illinoensis	Pekannuss
NNQKMQCAGVAVAR	NHQQLQCAGVAVVR	11S legumin protein	158998782	71,4 %	100,0 %	Carya illinoensis	Pekannuss
SFYLAGSP	NFYLAGNP	11S legumin protein	158998782	75,0 %	100,0 %	Carya illinoensis	Pekannuss
NNQKMQCAGVAVAR	NNQQFQCAGVAVVR	seed storage protein	56788031	78,6 %	100,0 %	Juglans regia	Walnuss
SFYLAGSP	NFYLAGNP	seed storage protein	56788031	75,0 %	100,0 %	Juglans regia	Walnuss
NLQQFECAGVAV	NNQQFQCAGVAV	seed storage protein	56788031	83,3 %	91,7 %	Juglans regia	Walnuss
DNALVSPLAGR	ENAMVSPLAGR	seed storage protein	56788031	81,8 %	100,0 %	Juglans regia	Walnuss
NNQKMQCAGVAVAR	NHPQIRCAGVSIAR	11S-Globulin precursor	62240390	50,0 %	92,9 %	Sinapis alba	Weißer Senf
MAGYTSALR	LAGRTSALR	11S-Globulin precursor	62240390	77,80 %	88,90 %	Sinapis alba	Weißer Senf
LPLLSYMDMSAQ	LPILQYIRLSA	11S-Globulin precursor	62240390	54,5 %	90,9 %	Sinapis alba	Weißer Senf
VLTNAYQFSP	VITNAYQIS	11S-Globulin precursor	62240390	77,80 %	100 %	Sinapis alba	Weißer Senf
PLQVLTNAYQFS	PLEVITNAYQIS	11S-Globulin precursor	62240390	75,0 %	100,0 %	Sinapis alba	Weißer Senf
DNALVSPLAGR	NAMISTLAGR	11S-Globulin precursor	62240390	70,0 %	90,0 %	Sinapis alba	Weißer Senf

Anhang

Chiasamen-Sequenzen	Ähnliche Sequenzen	Allergentyp	Sequenz-ID	SÜ	Sequenz-ähnlichkeit	Gattung	Organismus
NLDHPTSADLYNPR	NIDDPARADIYKP	11S-Globulin precursor	62240390	53,8 %	84,6 %	Sinapis alba	Weißer Senf
PLQVLTNAYQFS	PLEVITNAFQIS	11S-Globulin precursor	62240392	66,7 %	100,0 %	Sinapis alba	Weißer Senf
DNALVSPLAGR	NAMISTLAGR	11S-Globulin precursor	62240392	70,0 %	90,0 %	Sinapis alba	Weißer Senf
APVDVVANAVGLAHR	DVIANTPGSAH	11S-Globulin precursor	62240392	63,60 %	81,80 %	Sinapis alba	Weißer Senf
MAGYTSALR	LAGRTSALR	11S-Globulin precursor	62240392	77,80 %	88,90 %	Sinapis alba	Weißer Senf
NLDHPTSADLYNPR	NIDDPARADIYKP	11S-Globulin precursor	62240392	53,8 %	84,6 %	Sinapis alba	Weißer Senf
APVDVVANAVGLAHR	DVIANTPGSAH	11S-Globulin precursor	62240392	63,60 %	81,80 %	Sinapis alba	Weißer Senf
NNQMQCAGVAVAR	NNPQIRCAGVSIAR	11S-Globulin precursor	62240392	57,1 %	92,9 %	Sinapis alba	Weißer Senf
PLQVLTNAYQFS	PIPVLSNSYQIS	13S globulin	584592116	58,3 %	91,7 %	Fagopyrum esculentum	Echter Buchweizen
LPLLSYMDMSAQ	LPILEFIDMSAE	13S globulin	584592116	58,3 %	91,7 %	Fagopyrum esculentum	Echter Buchweizen
NNQKMECAGVAAVR	QFQCAGVAAMR	13S globulin	584592116	64 %	100 %	Fagopyrum esculentum	Echter Buchweizen
LPLLSYMDMSAQ	LPILEFIDMSAE	13S globulin	584592120	58,3 %	91,7 %	Fagopyrum esculentum	Echter Buchweizen
VLTNAYQFSP	VLSNSYQISP	13S globulin	584592120	70 %	100 %	Fagopyrum esculentum	Echter Buchweizen
NNQKMECAGVAAVR	QFQCAGVAAMR	13S globulin	584592120	64 %	100 %	Fagopyrum esculentum	Echter Buchweizen
LVDHSGQTYFNDR	IVDDNGQTVLDDR	13S globulin	584592120, 584592116	53,80 %	84,60 %	Fagopyrum esculentum	Echter Buchweizen
PLQVLTNAYQFS	PIPVLSNSYQIS	13S globulin	584592120	58,3 %	91,7 %	Fagopyrum esculentum	Echter Buchweizen
PLQVLTNAYQFS	PVEVLANSYDIS	13S globulin seed storage protein 2 precursor (Legumin-like protein 2)	29839255	50,0 %	100,0 %	Fagopyrum esculentum	Echter Buchweizen
DNALVSPLAGR	NAITSPIGGR	13S globulin seed storage protein 2	29839255	60,0 %	100,0 %	Fagopyrum esculentum	Echter Buchweizen
NLDHPTSADLYNPR	NFNTPTNTYVFNPR	13S globulin seed storage protein 2 (Legumin-like protein 2)	29839255	42,9 %	85,7 %	Fagopyrum esculentum	Echter Buchweizen
LPLLSYMDMSAQ	LPILEFLQLSAQ	allergenic protein	113200131	50,0 %	91,7 %	Fagopyrum tataricum	Tatarischer Buchweizen
NLDHPTSADLYNPR	NVNRPSHADVFNPR	allergenic protein	113200131	50,0 %	92,9 %	Fagopyrum tataricum	Tatarischer Buchweizen
DNALVSPLAGR	DNAITSPIAGR	allergenic protein	113200131	72,7 %	100,0 %	Fagopyrum tataricum	Tatarischer Buchweizen
PLQVLTNAYQFS	PVEVLANSYDIS	allergenic protein	113200131	50,0 %	100,0 %	Fagopyrum tataricum	Tatarischer Buchweizen

Anhang

Chiasamen-Sequenzen	Ähnliche Sequenzen	Allergentyp	Sequenz-ID	SÜ	Sequenz-ähnlichkeit	Gattung	Organismus
LPLLSYMDMSAQ	LPILEFIQLSAQ	13S globulin seed storage protein 1	29839254	50,0 %	91,7 %	Fagopyrum esculentum	Echter Buchweizen
PLQVLTNAYQFS	PVEVLANSYDIS	13S globulin seed storage protein 1 precursor (Legumin-like protein 1)	29839254	50,0 %	100,0 %	Fagopyrum esculentum	Echter Buchweizen
DNALVSPLAGR	DNAITSPIAGK	13S globulin seed storage protein 1	29839254	63,6 %	100,0 %	Fagopyrum esculentum	Echter Buchweizen
LPLLSYMDMSAQ	LPILEFIQLSAQ	13S globulin seed storage protein 3	29839419	50,0 %	91,7 %	Fagopyrum esculentum	Echter Buchweizen
PLQVLTNAYQFS	PVEVLANSYDIS	13S globulin seed storage protein 3 precursor (Legumin-like protein 3)	29839419	50,0 %	100,0 %	Fagopyrum esculentum	Echter Buchweizen
DNALVSPLAGR	DNAITSPIAGK	13S globulin seed storage protein 3	29839419	63,6 %	100,0 %	Fagopyrum esculentum	Echter Buchweizen
NLDHPTSADLYNPR	NVNRPSRADVFNP R	13S globulin seed storage protein 3 precursor (Legumin-like protein 3)	29839419	50,0 %	92,9 %	Fagopyrum esculentum	Echter Buchweizen
NNQMQCAGVAVAR	DQQFRCAGVAALR	11S-Globulin	30313867	53,8 %	92,3 %	Bertholletia excelsa	Paranuss
NNQKMECAGVAAR	DQQFRCAGVAALR	11S-Globulin	30313867	62 %	100 %	Bertholletia excelsa	Paranuss
DNALVSPLAGR	DNALFSTAAGR	11S-Globulin	30313867	72,7 %	72,7 %	Bertholletia excelsa	Paranuss
NLDHPTSADLYNPR	NIDNPAEADFYNPR	11S-Globulin	30313867	64,3 %	92,9 %	Bertholletia excelsa	Paranuss
Ähnliche Peptidsequenzen der 7S-Globuline (Viciline)							
NPYVFEDR	PYVFEDQ	7S-Globulin	13183177	85,70 %	100,00 %	Sesam indicum	Sesam
VNADDNEQFTLAG	VNANNNEKFLAG	7S-Globulin	13183177	69,20 %	92,30 %	Sesam indicum	Sesam
SQKEEFFEGPGR	SQKEEFFKGP	7S-Globulin	13183177	81,80 %	100,00 %	Sesam indicum	Sesam
LHAGTTTYLVNR	INAGTTAYLINR	7S-Globulin	13183177	66,70 %	100 %	Sesam indicum	Sesam
NPYVFEDR	NPYVFQD	48-kDa glycoprotein precursor	19338630	85,70 %	100,00 %	Corylus avellana	Haselnuss
SQKEEFFEGPGR	NQDQAFFFPGNK	48-kDa glycoprotein precursor	19338630	46,20 %	76,90 %	Corylus avellana	Haselnuss
LHAGTTTYLVNR	AGTPVYMINR	48-kDa glycoprotein precursor	19338630	60 %	90 %	Corylus avellana	Haselnuss
QTTNNPYVFEDR	NPYVFQD	48-kDa glycoprotein precursor	19338630	85,70 %	100 %	Corylus avellana	Haselnuss
NPYVFEDR	NPYVFED	vicilin-like protein	21666498, 21914823	100,00 %	100,00 %	Anacardium occidentale	Cashewnuss

Anhang

Chiasamen-Sequenzen	Ähnliche Sequenzen	Allergentyp	Sequenz-ID	SÜ	Sequenz-ähnlichkeit	Gattung	Organismus
VNADDNEQFTLAG	VNAEGNIRYTLAG	vicilin-like protein	21666498, 21914823	61,50 %	84,60 %	Anacardium occidentale	Cashewnuss
SQKEEFFFEGPGR	QDEEFFFQGP	vicilin-like protein	21666498, 21914823	80 %	90 %	Anacardium occidentale	Cashewnuss
QTTNNPYVFEDR	NPYVFED	vicilin-like protein	21666498, 21914823	100 %	100 %	Anacardium occidentale	Cashewnuss
NPYVFEDR	NPYVFED	vicilin	133711974	100,00 %	100,00 %	Pistacia vera	Pistazie
VNADDNEQFTLAG	VNAEGNIRYTLAG	vicilin	133711974	61,50 %	84,60 %	Pistacia vera	Pistazie
SQKEEFFFEGPGR	QDEEFFFQGP	vicilin	133711974	80 %	90 %	Pistacia vera	Pistazie
QTTNNPYVFEDR	NPYVFED	vicilin	133711974	100 %	100 %	Pistacia vera	Pistazie

Tabelle 42: Auswertung der Peptidsequenzen isoliert mittels 2D-Gelelektrophorese und sortiert nach Spezies und Proteintyp

Spezies	Anzahl der Chiasamenpeptide (insgesamt)	Anzahl der Hits	Allergenbezeichnung	Anzahl der zur Ähnlichkeit beitragenden Peptide	Allergen-ID
Sesam	26	30	7S-Globulin	5	13183177
			11S-Globulin	8	13183173
			11S-Globulin precursor	14	5381325
Haselnuss	10	18	48-kDa glycoprotein precursor	5	19338630
			11S legumin protein	1	158998782
			11S legumin protein	1	158998780
			Cor a 9 allergen	6	557792009
			11S-Globulin-like protein	6	18479082

Anhang

Spezies	Anzahl der Chiasamenpeptide (insgesamt)	Anzahl der Hits	Allergenbezeichnung	Anzahl der zur Ähnlichkeit beitragenden Peptide	Allergen-ID
Mandel	10	18	vicilin	1	1757285428
			putative Pru du 6 allerge	3	523916668
			Pru Du 6 Amandin	5	258588247
			prunin 1 precursor	6	307159112
			prunin 2 precursor, partial	2	307159114
Pistazien	10	21	Vicilin	4	133711974
			Pis v 2.0101 allergen11S-Globulin	4	110349085, 110349083, 156001070
Cashewnuss	9	13	vicilin-like protein	3	21666498, 21914823
			Allergen Ana O2	6	25991543
Sojabohne	8	26	beta-conglycinin beta-subunit	2	15425637, 121282
			beta-conglycinin-alpha subunit	1	169927, 9967357, 9967361
			glycinin	6	218265, 18639, 18609, 18615, 18641, 10566449, 732706, 169969, 169973, 169971
Weißer Senf	8	5	11S-Globulin precursor	8	62240390, 62240392
Buchweizen	7	25	13S globulin	5	584592120
			13S globulin	5	584592116
			13S globulin seed storage protein 2	3	29839255
			allergenic protein	3	113200131
			13S globulin seed storage protein 1	4	29839254
			13S globulin seed storage protein 3	4	29839419
Erdnuss	4	19	Ara h 1	1	46560474, 46560472, 375332427, 347447588, 46560476, 1168390, 312233063, 1168391
			allergen Arah3/Arah4	1	21314465
			trypsin inhibitor	2	22135348
			arachin Arah3 isoform	1	199732457
			Chain A, Ara H 3	1	224036293

Anhang

Spezies	Anzahl der Chiasamenpeptide (insgesamt)	Anzahl der Hits	Allergenbezeichnung	Anzahl der zur Ähnlichkeit beitragenden Peptide	Allergen-ID
			glycinin	1	5712199
			Ara h 3 allergen	2	312233065
			iso-Ara h3	2	112380623
			glycinin	1	3703107
Paranuss	4	3	11S-Globulin	4	30313867
Pekannuss	3	6	11S legumin protein	2	158998780, 158998782
Echter Walnuss	3	3	seed storage protein	3	56788031
Erbse	2	2	Vicilin	1	42414629, 42414627, 7339551
Tatarischer Buchweizen	1	1	allergenic protein	1	113200131
Mungbohne	1	2	8S globulin beta isoform	1	108743976
			8S globulin alpha subunit	1	158251953
Chinesischer Strahlengriffel	1	1	11S-Globulin-like protein	1	82469930
Beifuß	1	1	art v2 allergen	1	148887203
Linsen	1	2	allergen Len c 1.0102	1	29539111, 29539109
Kautschukbaum	1	1	latex profilin Hev b 8	1	6979169
Blaue Lupine	1	1	conglutin beta	1	149208403
Weichweizen	1	1	D-type LMW glutenin subunit	1	208605346 208605348
			omega-5 gliadin	1	73912496 508732623
Kiwi/Strahlengriffel	1	10	kiwellin	1	441482356, 441482358, 441482360, 441482362, 441482364, 441482366, 441482354, 441482350, 441482346, 441482352

Alignment der allergenen Viciline mit Chiasamenpeptiden mittels ClustalOmega

Chia	-----	0
Erdnuss	-----	0
Erbse	-----	0
Sojabohne	-----	0
Mandel	MAIKITIKASYKLPFFFFFLSTLFLASSVTPPLINALSD-----YHNQK----CQ	46
Sesam	----MSCGRLCLVLFALLLASAVVASESKDPELQCKKHQCKAQQQISKEQKEACIQACK	56
Haselnuss	-----MLPKEDPELKKCKHKCRDERQFDEQQRRDGKQICE	35
Pistazien	-----KTDPELQCKKHQCKVQRQYDEEQKEQCAKGC	32
Cashewnuss	AIMGPPTKFSFSLFLVSVLVLCIGFALAKIDPELQCKKHQCKVQRQYDEEQKEQCVKECE	56
Chia	-----	0
Erdnuss	-----	0
Erbse	-----	0
Sojabohne	-----	0
Mandel	QSIICRGVGGRRHSL-----LR-----SKDHPQDAREEYFYCSQSCGTSED---P	86
Sesam	EYIRQKHQGEHGRGGDILEEEVWN-----RKSPIERLRECSRGCEQQHGE-QR	104
Haselnuss	EKARERQQ-----E-----	44
Pistazien	KYYKEKKGREQEE---E-EEEEWGSGRGRGDEFSTHEPGEKRLSQCMKQCERQDGGQK	87
Cashewnuss	KYYKEKKGREHEH---E-----WGTC--GVDEPSTHEPAEKHLSQCMRQCERQEGGQK	110
Chia	-----	0
Erdnuss	-----	0
Erbse	-----	0
Sojabohne	-----MMRVRFPL-LVLLGTVFLASVC-----	21
Mandel	EQCETECRERFDEQLKKEAE-----	106
Sesam	EECLRRCQEYQREKGRQDDNPTDPEKQYQQCRLQCRROGEGGGSREHCERRREEKYR	164
Haselnuss	-----	44
Pistazien	QLCRFRQCQEKYKKERREHSYSRDE-----	111
Cashewnuss	QLCRFRQCQERYKKERGHNYKRED-----	134
Chia	-----QTTNNPYVFE-DR-----	12
Erdnuss	-----TSRNNPFYFP-SRRFSTRYGNQNGRIRVLQRFQDR	33
Erbse	-----SRSDQENPFIFK-SNRFQTLYENENGHIRLLQKFDKR	36
Sojabohne	-----VSLKVRDENNPFYFRSSNSFQTLFENQNGRIRLLQRFNKR	62
Mandel	-----EQQKGQEEEEEGPTFNPYFP-KFGLRPRFLAEEGAYFVLGSAFARL	154
Sesam	EQQGREGGRGEMYEGREREQEEQGRGRIPYVFE-QHFITGFRTQHGMRVLQKFTDR	223
Haselnuss	-----EGNSSEESYGKEQENPYVFP-DEHFESRVKTEEGRVQVLENFTKR	89
Pistazien	-----EEEEEGDEEEDENPYVFE-DEHFTTRVKTEQKQVVVLPKFTKR	156
Cashewnuss	-----DEDED-EDEAEEEDENPYVFE-DEDFTTKVKTEQKQVVVLPKFTQK	178
	* : *	
Chia	-----	12
Erdnuss	SRQFQN-LQNHRIVQIEAKPNTLVLPKHADADNIIQVQGGQATVTVANGNNRKSFNLDEG	92
Erbse	SKIFEN-LQNYRLLEYKSKPRTLFLPQCTDADFLLVVLGSGKATLTVLKSNDNRNSFNLERG	95
Sojabohne	SPQLEN-LRDYRIVQFQSKPNTIILPHHADADFLFVLSGRAILTLVNNDDRDSDYNLHPG	121
Mandel	SHLLRGRIQNYRAALLQTPGTFVLPYHLDAESIFVWNGRGTTLVMDTKQSFKIENG	214
Sesam	SELLRG-IENYRVAILEAEPQTFIVPNHWAESVVFVAKGRGTISLVRQDRRESLNIKQG	282
Haselnuss	SRLLSG-IENFRLAILEANPHTFISPAHFDAELVLFVAKGRATITMVREEKRESFNVEHG	148
Pistazien	SKLLRG-LEKYRLAFLVANPQAFVVPNHMDADSIFFVSWGRGTITKIRENKRESMNVKQG	215
Cashewnuss	SKLLHA-LEKYRLAVLVANPQAFVVPNHMDADSIFFVSWGRGTITKILENKRESINVRQG	237
Chia	-----LHAGTTTYLVNR-----	24
Erdnuss	HALRIPSGFISYLLNRHDNQLRVAKISMPVNTPGQFEDFFPASSRDQ-----	140
Erbse	DTIKLPAGTTIAYLANRDDNEDLRVLDLTIIPVKNFQGLQSFLLSSTQNG-----	143
Sojabohne	DAQRIPAGTTYLVNPHDHQNLKI I KLAIPVNPKSRYDDFFLSSTQAQ-----	169
Mandel	DVIRVPAGATTYLLINNHTTENLSLVQLFPVNTPDLFEEFFPAGYKDPPEPGSDYSFLHGT	274
Sesam	DILKINAGTTAYLINRDNNERLVLAKLLQPVSTPGEFELFFGAGGENP-----	330
Haselnuss	DIIRIPAGTPVYMINRDENEKLFIVKILQPVSAFGHFEAFY GAGGEDP-----	196
Pistazien	DIIRIRAGTPFYIVNTDENEKLYIVKLLQPVNLP GHYEVFHGPGGENP-----	263
Cashewnuss	DIVSISSTPFYIANNENEKLYLVQFLRPVNLPGHFEVFGH GPGGENP-----	285
	: :* *:* *	
Chia	-----	24
Erdnuss	SSYLQGFSRNTLEAAFNAEFNEIRRVLLEENAGGEQEERGQRRWSTRSSENNEGVIVKVS	200
Erbse	PSSLSGFSKNILEAFNTNYYEIEKVLLEQQEQEPQHRSL--KDRRQEIINEENVIVKVS	201
Sojabohne	QSYLQGFSHNI LETSFHSEFEEINRVLFGEERQR-----QQEGVIVELS	214
Mandel	ESYYSVFSNDLLEAAFDVPREQLEKAFGQQ-----KREGMIRAS	314
Sesam	ESFFKFSFSEIIEAAFNTRRDRLQRIFGQQ-----RQGVIVKAS	369
Haselnuss	ESFYRAFSEVLEAALKVRLEQLEKVFGEQ-----SKGSIIVKAS	235
Pistazien	ESFYRAFSEVLEAALKTPRDKLEKLFEQ-----DEGAIIVKAS	302
Cashewnuss	ESFYRAFSEVLEAALKTSKDTLEKLFEQ-----DQGTIMKAS	324

Anhang

```

Chia -----YGQLYEVDSS-HF----- 36
Erdnuss KEHVEELTKHAKSVSKKGSEEEGDITNPINLREGEPLDLSNNFKLFEVYKPKDKNPQLQDL 260
Erbse REQIEELSKNAKSSSSKKSVSSE---SGPFNLRSRNPIYSNKFCKFFEITPE-KNQQLQDL 257
Sojabohne KEQIRQLSRRRAKSSSRKTISSSE---DEPFNLRSRNPIYSNFKKFFEITPE-KNPQPRDL 270
Mandel KEQLDALSKQAYPWWRKLVPSMGSDLNFNLLSQRPLHSNNYKGFYEASPO-EFKQLQDM 373
Sesam EQQVRAMSRHEEG--GIWPFGGESKGTINIYQQRPTHSNQYGQHEVDAAS-QYRQLRDL 425
Haselnuss REKIRALSQHEEG-PPRIWPFGGESSGPINLLHKKHPSQSNQFGRLYEAHPD-DHKQLQDL 293
Pistazien KEQIRAMSRREG--PSIWPFTGKSTGTFNLFKKDPSQSNNYGQLFESEFK-DYPPLOEL 359
Cashewnuss KEQVRAMSRREG--PKIWPFTTEESTGSFKLFKKDPSQSNKYGQLFEAERI-DYPPLEKL 381
:*.:.*

```

```

Chia ----- 36
Erdnuss DMMLTXVEIKEGALVLPFHNSKAMVIVVNKGTGNLELVAVRKEQQQRREEEDEDEE 320
Erbse DIFVNSVDIKEGSLLLPNYNSRAIVIVVTTEGKDFELVQGNENQKENDKE---EEQ 313
Sojabohne DIFLSSVDINEGALLLPHFNSKAIIVILVINEGDANIELVGIKEQQQKQ-----K 319
Mandel NVSVAMLDINPEAMMVPYNSKATYLMVVDGMGYFEMACPKFTIPASEE--EMEYQEEQ 431
Sesam DLTVSLANITQGAMTAPHYNSKATKIALVVDGEGYFEMACPHMSRSRGS-----YQG-- 477
Haselnuss DLMVSFANITKGS MAGPYNSRATKISVVEGEGFFEMACPHLSSSS----- 340
Pistazien DIMVSYVNI TKGMSGPFYNSRATKIAIVVSGEGRLEIACPHLSSSSKNS-----G-- 409
Cashewnuss DMVVSYANITKGGMSVPPYNSRAACPHLSSSKS----- 429

```

```

Chia -----VNAD 40
Erdnuss EEGSNREVRRYTARLKEGDFVIMPAAHVPVAINASSE-----LHLLGFGINAE 367
Erbse EEETSQVQLYRAKLS PGDFVFI PAGHPVAINASSD-----LNLI GFGINAE 360
Sojabohne QE EEPLEVQRYRAELSEDDVFVIPAAYPFVFNATSN-----LNFLAFGINAE 366
Mandel ADQQSGVFSKVS GKLS LGDFVFI PAGHPVSI V AQNNNNNNNNNGNQKLRIVGFGINAG 491
Sesam ETRGRPSYQRVASRLTRGTVVII PAGHPFVAVAS SN-----QNLQVLCFEVNAE 526
Haselnuss -----GSYQKISARLRRGVVFPAGHPVAVIASQN-----NNLQVLCFEVNAE 384
Pistazien QEKSGPSSYKLLSSIR TDSVFVVPAGHPFVTVASGN-----QNL EILCFEVNAE 458
Cashewnuss ---SHPSYKLLRARIRKDTVFIVPAGHPFATVASGN-----ENLEIVCFEVNAE 475
:*.:.*

```

```

Chia -----SQKEFFFECPGR----- 62
Erdnuss NNHRIFLAGDKDNVIDQIEKQAKDLAFPGSGEQVEKLIKNOKESHFVSARP----- 418
Erbse NNERNFLAGEEDNVISQVERPVKELAFPGSSHEVDRL LKNQKQSYFANAQPLQRE---- 415
Sojabohne NNQRNFLAGEKDNVVRQIERQVQELAFPGSAQDVERLLKQRESYFVDAQPQKEEGSKG 426
Mandel NNIRNFLAQEGNIMQMEREATQLTFGQ--EMEQLTSQKQSYFVPASRRGSSTEKA- 547
Sesam NNEKFFLAGR-RNVMNQLEREAKELAFGM PAREVEEVSRSQQE EFFFKGRQQQQ--GRA 583
Haselnuss GNSRFP LAGK-GNIVNEFERDAKELAFNLPSREVERIFKNQDQAFFFP GPNKQQE EGGRG 443
Pistazien GNIRYTLAGK-KNIEVMEKEAKELAFKTKGEEVDKVF GKQDE EFFFQGP KWRQHQQGRA 517
Cashewnuss GNIRYTLAGK-KNIEVMEKEAKELAFKMEGEEVDKVF GKQDE EFFFQGP EWRKEKEGRA 534
.* : *** . * : . * .

```

Chia	-----	62
Erdnuss	-----	418
Erbse	-----	415
Sojabohne	RKGFPPSILGALY	439
Mandel	-----	547
Sesam	DA-----	585
Haselnuss	GRAF-E-----	448
Pistazien	DE-----	519
Cashewnuss	DE-----	536

Anhang

Chia	-----	58
Buchweizen	-----EGKSQKLNFNNILSAFETKLLAEA--LGTEETVTRKMQESD---ERGIIVK	247
Senf	-----GGPQQQPQQNILNGFDPOVIAQA--LKIDVRLAQELQNKQD--SRGNIVR	299
Sojabohne	SQK---GKHQQEEENE GGSILSGFTLEFLEHA--FSVDKQIAKNLQGENEGEDKGAIVT	257
Erdnuss	HYRQISPRVRGDEQENEGSNIFSGFAQEFLOHA--FQVDRQTVENLRGENEREQGAIVT	277
Sesam	---SYFGRPQTEKQQGETKNI FNGFDDEILADA--FGVDVQTARRLKGQDD--LRGRIVR	263
Pistazien	-----RSSRKQQSNNILSAFDEEILAQS--FNIDTQLVKKLQREK--QRGIIVR	267
Paranuss	-----LRGGQILADNVFKGFNMEALADVLFMGMDTETARKVRGEDD--QRGHIVR	253
Mandel	QHQPFPGRPRQEQQSGSNNVFSGFNTQLLAQA--LNVNEETARNLQGDND--NRNQIIR	326
Cashew	-----HQSRRGNLFSGFDTPELLAEA--FQVDERLIKQLKSE-D---NRGGIVK	233
Haselnuss	QHSR-G-KEGEQEQGEGNNVFSGFDAEFLADA--FNVDVDTARRLQSNQD--KRRNIVK	273
Pekannuss	QHQQ--RRGEHGEQQRDLGNVFSGFDAEFLADA--FNVDTE TARRLQSEND--HRGSIVR	269
Walnuss	QRQQ--RPEGHGQQRGLGNVFSGFDAEFLADA--FNVDTE TARRLQSEND--HRSIVR	268

Chia	-----	60
Buchweizen	ARKNRMQMVTPPRFGREQ-----DEDETNGLE	274
Senf	VKGP-FQVVRPPLRQA YESEQW-----RHRGPPQSPQDNGL	336
Sojabohne	VKGG-LSVIKPPTEDEQQRPQEEEE---EEDKPKCKGDKKHCQRPRGSQSKSRRNGID	313
Erdnuss	VKGG-LRILSPDEEDESRSPPNRREEFDEDRSRPQQRGKY-----DENRRGYKNGIE	329
Sesam	AER--LDIVLFGEEEE---RWERDPYSGANGL	292
Pistazien	VKED-LQVLSFQRQE-----KEYSDNGLE	290
Paranuss	VEQG-LKVIRPPIREEELEQQ-----EGGGYNGLE	282
Mandel	VRGN-LDFVQPPRGRQEREHEERQQEQL-----Q-----QERQQQGQLMANGLE	370
Cashew	VKDDELRVIRPSRSQSERGESEEEES-----E-----DEKRRWQRDNGL	274
Haselnuss	VEGR-LQMVPERSRQEWERERERERERERES-----ERRQG-GRGRDVNGLE	321
Pekannuss	VEGRQLQVIRPRWSREEQEHEERERERERES-----ERRQSRGGRDDNGLE	319
Walnuss	VEGRQLQVIRPRWSREEQEHEERERERERES-----ERRQSRGGRDDNGLE	318

Chia	ETFCMTK---NLDHPTSADLYNPR-----LPLLSYMDMSAQ-----	93
Buchweizen	ESFCNMFRHNLGPRTEADIASRQAGRIHSDQNKLP ILEFIDMSAEKGHLLPNAMLAPA	334
Senf	ETICSMRTHENIDDPARADIYKPNLGRVTSVNSYTIHILQ IRLSATRGILQGSAMVLPK	396
Sojabohne	ETICTMRLRHNIQOTSSPDIYNPQAGSVTTATSLDFPALS WLRLSAEFGSLRKNAMFVPH	373
Erdnuss	ETICSASVKKNLGRSSNPDIYNPQAGSLRSVNELDLF ILGWLGLSAQHGTIYRNAMFVPH	389
Sesam	ETLCTAKLRENLDPEPARADVYNPHGGRISS LNSLTLEVL SWLRLSAEKGVLRYNGLVAPH	352
Pistazien	ETFCMTLTKLNINDPSRADVYNPRGGRVTSINALNLE IILRFQLSVEKGVLYQNAIMAPH	350
Paranuss	ETICSATFIQINDNPAEADFIYNPAGRLTIVNSLKVFIITFLQLS AMKGVLYENAMMAPL	342
Mandel	ETFCSLRLKENIGNPERADIFSPRAGRISTLNSHNLPI LRFLRLSAERGFYRNGIYSPH	430
Cashew	ETICTMRLKENINDPARADIYTPVEVGRLLTINSLNLE IILKWLQLSVEKGVLYKNALVLPH	334
Haselnuss	ETICSLRLMENIGSRADITYEQVGRINTVNSNTLFLVLRWLQLS AERGDLOREGLYVPH	381
Pekannuss	ETICTLSLRENIIGDPSRADIYTEEAGRISTVNSHNLPI LRWLQLS AERGALYSDALYVPH	379
Walnuss	ETICTLRLRENIIGDPSRADIYTEEAGRISTVNSHTLFLVLRWLQLS AERGALYSDALYVPH	378

Chia	-----TVVYVTK-----LVDHSGQTYFNDR-----	113
Buchweizen	WPLSGHRVYVYLRGEAQMQIVDNDGQTVLDDRVSESGMVVI PQFYISTCRAG-RDGLYV	393
Senf	YNMNAEILYCTQGQARIQVVDNDGQNVLDQQVQKGLVVI PQGFAYVVQSQ--NNFEWI	454
Sojabohne	YNLNANSIYALNGRALIQVVCNCGERVEFDGELQEGRVLIVPQNFFVAARSQ--SDNFEYV	432
Erdnuss	YTLNAHTIYVALNGRAHVQVVDNSGNRVYDEELQEGHVLVVPQNFVAAKAQ--SENYEYL	448
Sesam	WNLNAHSIIYITRSGRFQVYVGHGTGRSVFDGVVREGQLIIVPQNVYVAKRASQDEGLEWI	412
Pistazien	WNMNAHSIYITRGNRGMQIVSENGESVFDDEEIREGQLVVVPQNFVAVKRAS--SDGFVW	409
Paranuss	WRLNANSVYAVRGEARVQIVDHRGETVFDNLRREGQMVVVPQNFVAVKQAG--SRGFVW	401
Mandel	WNVNAHSVYVIRGNARVQVVDNNGDAILDQEVQQGLFIVPQNHGVIQQAG--NQGFVYF	489
Cashew	WNLNSHSIIYGCYKGGQVQVVDNFGNRVFDGEVREGQMLVVPQNFVAVKRAR--EERFEWI	393
Haselnuss	WNLNAHSVYAIRGRARVQVVDNNGTVFDDELREGQVLTIPQNFVAVAKRAE--SEGFEWV	440
Pekannuss	WNLNAHSVYALRGRAEVQVVDNFGQTVFDDELREGQLLTI PQNFVAVKRAR--DEGFVW	438
Walnuss	WNLNAHSVYALRGRAEVQVVDNFGQTVFDDELREGQLLTI PQNFVAVKRAR--NEGFEWV	437

Chia	-----DNALVSPLAGRTSALR-----PLOVLTNAYQFSPAQAQSLK---EEQTFLLSPQR---	160
Buchweizen	SFETTANPMS SPLNGHASVFKGMPIPVLSNSYQISPRAAAYELKQTRSHEHGLFS PFGGRS	453
Senf	SFKTNANAMIS TLAGRTSALRALPLEVI TNAFOISLEEARIKFNTLE-TTLTRARGGQQ	513
Sojabohne	SFKTNDTPMIGTLAGANSLNALPEEVIQHTFNLSQQARQIKNNNPF-KFLVPPQESQK	491
Erdnuss	AFKTDSPRSIANQAGENSIIIDNLPPEEVANSYRLPREQARQLKNNNPF-KFVPPFDHQS	507
Sesam	SFKTNDNAMTSQLAGRLSAIRAMPBEEVMTAYQVSRDEARRLKYNREE-SRVFSSTSRYS	471
Pistazien	SFKTNGLAKISQLAGRISVMRGLPLDVIQNSFDISREDAWNLKE SRSE-MTIFAPGSRSQ	468
Paranuss	VFNTNDNALFSTAAGRTSPLRGIPIVGLANAYRLS QEEARRIKLNRDE-AVLFQPGSRSR	460
Mandel	AFKTEENAFINTLAGRTSFLRALPDEVLANAYQISREQARQLKYNRQE-TIALSSSQRR	548
Cashew	SFKTNDRAMTSPLAGRTSVLGGMPPEVLANAFQISREDAWKIKFNNQO-TTLTSGESSHH	452
Haselnuss	AFKTDNAQISPLAGRTSAIRALPDDVLANAFQISREEARLKYN RQE-TTLARSSRSSS	499
Pekannuss	SFKTNDNAMVSPLAGRTSAIRALPEEVLVNAFQIPREDARRLKFNRQE-STLVRSRS---	494
Walnuss	SFKTNDNAMVSPLAGRTSAIRALPEEVLATAFQIPREDARRLKFNRQE-STLVRSRPSRS	496

Chia	-----	598
Buchweizen	-----	453
Senf	PQLI-----EEIVEV----	523
Sojabohne	RAVA-----	495
Erdnuss	MREVA-----	512
Sesam	WPRSSRPMSYMPKPF FEYVLDVI KSM	497
Pistazien	RQRN-----	472
Paranuss	GRASA-----	465
Mandel	AVV-----	551
Cashew	MRDDA-----	457
Haselnuss	ERMRRRSESEGRAEA-----	514
Pekannuss	RSSR---- SERRAEV -----	505
Walnuss	RSSR ---- SERRAEV -----	507

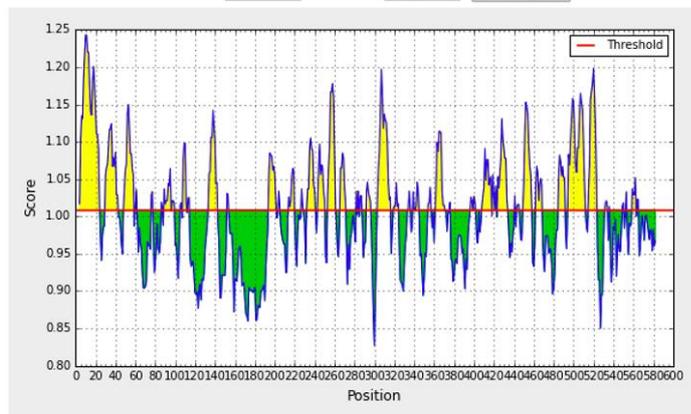
Kolaskar & Tongaonkar Antigenicity Results

Input Sequences

```

1 MSCGRLCLV LFALLASAV VASESKPEL KQCKHQCKAQ QQISKEQKEA CIQACKEYIR
61 QKHQGEHGRG GGDILEEE VMNRKSPIER LRECSRGCEQ QHGEQREEL RRCQEEYQRE
121 KGRQDDNDPT DPEKQYQQR LQ CRRQGE GGFSSREHCE RRREEKYREQ QGREGGRGEM
181 YEGREREEEQ EEQGRGRIPY VFEDQHFITG FRQ HGRM RVLQKFTDRS ELLRGIENYR
241 VAILEAEPQT FIVPNHDAE SVFVAKGRG TISLVRQDRR ESLNIK QG DILKINAGTT
301 AYLINRDNNE RLVLAKLLQP VSTPGFELF FGAGGENPES FFKSFSDEIL EAAFNTRR
361 DRLQRIFGQQ RQGVIVKASE EQVRAMRHE EGGIWPFGGE SKGTINIYQQ RPTHSNQYQQ
421 LHEVDASQYR QLRDLDT VSLANITQGA MTAPHYNKA TKIALVVDGE GYFEMACPHM
481 SRSRGSYQRE TRGRPSYQYR AS RLTRGT VVIIPAGHPF VAVASSINQL QVLCFEVNIAN
541 NNEKFPLAGR RNVNQLERE AKELAFGMPA REVE EVSR SQQEFFFFKG PRQQQGRAD
601 A
    
```

Center position: 4 Window size: 7 Threshold: 1.009 Recalculate



Average: 1.009 Minimum: 0.827 Maximum: 1.243

Predicted peptides:

No.	Start	End	Peptide	Length
1	4	24	GGRLCLVLFALLASAVVASE	21
2	30	42	LKQCKHQCKAQ	13
3	49	58	EACIQACKEY	10
4	89	95	LRECSRG	7
5	134	142	YQQRLQCR	9
6	194	201	IPYVFEDQ	8
7	214	219	MRVLQK	6
8	232	240	NYRVAILEA	9
9	243	250	QTFIVPNH	8
10	253	261	AESVVFVAK	9
11	266	271	ISLVRQ	6
12	303	316	RLVLAKLLQPVSTP	14
13	319	324	FELFFG	6
14	362	370	QGVIKASE	9
15	408	417	YQLHEVDAS	10
16	424	433	DLDLTVSLAN	10
17	449	458	TKIALVVDGE	10
18	462	468	EMACPHM	7
19	485	491	YQRVASR	7
20	494	511	RGTVVIIPAGHPFVAVAS	18
21	515	523	NLQVLCFEV	9

Abbildung 68: Beispiel für die Darstellung der prognostizierten Epitope in der Proteinsequenz des Sesam-Vicilins mittels der Methode KTAS

9.2.7. Amplifizierung der DNA-Sequenzen von EBPs bzw. GBPs

9.2.7.1. Herangehensweise des Primer-Entwurfs

Arachin Ahy-3 (*Arachis hypogaea*, Erdnuss)

- NCBI-ID (Protein) AAD47382.1
- NCBI-ID (DNA): AF086821.1

Sequenz:

```

atggcgggggaaccacacaataacaatcatagcagccatggctaagcttcttgcgctttct
  G R G T T T I T I I A A M A K L L A L S
gtttgcttttgccttctagttctgggagctagcagcgtcaccttcaggcagcagggggag
  V C F C F L V L G A S S V T F R Q Q G E
gagaatgagtgccagttccagcgcctcaatgccagagacccgacaactgcattgagctc
  E N E C Q F Q R L N A Q R P D N C I E S
gaaggcggttacattggaacttggaaaccaaacaaccaggagttccagtgccgcccgtc
  E G G Y I E T W N P N N Q E F Q C A G V
Gcctctctcgtctcgtcctccgccgaacgccttcgaaggcctttctactccaatgct
  A L S R F V L R R N A L R R P F Y S N A
ccccaggagatcttcatccaaggaggagtggttattttgggtgatattccctggttgt
  P Q E I F I Y Q G S G Y F G L I F P G C
cctggcacatttgaagagccaattcagggatctgaacaattccaaagaccatcaagacat
  P G T F E E P I Q G S E Q F Q R P S R H
tttcaaggcagacccaagccaaaggccactggacactcaccaaaaggttcaggcgttc
  F Q G Q D Q S Q R P L D T H Q K V H G F
agagaggtgatctcatcgctgttccccacggtgttgctttctggatctacaacgaccaa
  R E G D L I A V P H G V A F W I Y N D Q
gacactgatgttggcatttctggttttacacaccaacagcctccacaaccaacttgac
  D T D V V A I S V L H T N S L H N Q L D
cagttccccaggaggttcaatttagctggaagcaagcaagaattcctaagataccag
  Q F P R R F N L A G K Q E Q E F L R Y Q
caacgaagtggtcgtcgtcaaaaggcgaagaagaacaagaacaagaacaagaacgaa
  Q R S G R Q S P K G E E Q E Q E Q E N E
ggcggcaacgtcttagcggcttctcaacagaattcctctcacatggcttccaagtgaac
  G G N V F S G F S T E F L S H G F Q V N
gaggacatagtgaggaaactaagaggagaaaacgaacgcgaggagcaaggagcattgtc
  E D I V R N L R G E N E R E E Q G A I V
acagtaaagggaggacttagcatcttagttccaccagagtgaggcagagctaccaacaa
  T V K G G G L S I L V P P E W R Q S Y Q Q
cctggaagaggcgaalaaactcaacaacggcattgaagaaaccattgcaactgcaact
  P G R G D K D F N N G I E E T I C T A T
gttaagatgaacattggcaaatccacatctgctgatatctacaaccctcaagctggtagc
  V K M N I G K S T S A D I Y N P
                        A D L Y N P
  
```

```

Gtcagaactgtaaacgaacttgacctccaatcctcaatcgactcggactcagtgccgag
  V R T V N E L D L P I L N R L G L S A E
tatggatccattcagggatgcaatggtttgttctcactacaacatgaacgcaaacagc
  Y G S I H R D A M F V P H Y N M N A N S
atgatatatgcattgcacggaggagctcatgtccaagtgggtgactgcaatggcaataga
  M I Y A L H G G A H V Q V V D C N G N R
gtgttcgacgagactcaagaggggtaactcgctgggtggtgccacaaaacttcgcccgtg
  V F D E E L Q E G Q S L V V P Q N F A V
gctgcaaaagtacagagcagcacttctgtacgtggcattcaagacaactcaagggcc
  A A K S Q S E H F L Y V A F K T N S R A
agcatatccaaccttgctggcaaaaattcctacatgtggaacttgcgggaagatgtgggt
  S I S N L A G K N S Y M W N L P E D V V
  
```

```

gcaaattcatatggcctacaatatgagcaagcaaggcaactcaagacaataacccttc
  A N S Y G L Q Y E Q A R Q L K N N N P F
                        N N E Q F
  
```

```

acgttcttggttccacctcaagactctcagatgatcaggactgtggcttagggctgctct
  T F L V P P Q D S Q M I R T V A - G R S
  T
  
```

```

tcatgcatgcacatcagctatgtatgtatgtgtgtgttatatgtccaccactttt
  S C M H H M H V C M Y V C V I C P P T F
tgccacaactgaataaataacgtagttttgtagtaataaataagatatgagagaatata
  C H N - I N N V V L - - - I R Y E R I Y
atacacaaggggcttgatggcctttttgttaacatgtgaaattgagatgtaacataa
  I H K G A W M A F L F N M - N - D V T -
aatgagtagtgcaccttttttaaccccgagttaaccttgtgcaagcaagtgttgaataat
  
```


tcgaacaaccagaacctgcagctgctctgcttcgaagtgaacgcgtacaacaacgagaag
 S N N Q N L Q L L C F E V N A Y N N E K
 V N A D D N E Q

ttcaccgcttgcgggaggaggaacgtgatgaaccagctggagaggaggcgaaggagtgtg
 F T L A G R R N V M N Q L E R E A K E L
 F T L A G

Gcgttcggaatgccggcgagagaagtcgatgagatcttcaggaacagaaagaggagttt
 A F G M P A R E V D E I F R N Q K E E F
 Q K E E F

Ttcttcaagggtccaccgtcagcagggcgccgctccgatgagtaagatcggaataaag
 F F K G P R Q Q G G R S D E - R S E I K
 F F E G P G

Atgtggctggttatgtggatgaatctgtgtagtgttttatgtaatgtaactctacgata
 M W L V M W M N L C S V F M - C N S T I
 gtacaagttatc
 V Q V I

Primer-Paar ErV(1)

NAYNNEKF
 EryVicFw1: aacgcgtacaacaacgagaagtctc
 QKEEFFFKG
 EryVicRev1: cccttgaagaaaaactcctctttctg

Primer-Paar ErV(2)

NPYVFEER
 EryVicFw2: ccgtatgtatttcgaggaaaggcat
 QKEEFFFKG
 EryVicRev1: cccttgaagaaaaactcctctttctg

11S globulin seed storage protein 2-like (*Erythranthe guttatus*, Gelbe Gauklerblume)

- NCBI-ID (Protein): XP_012831308.1
- NCBI-ID (DNA): XM_012975854.1

Sequenz

cacttcttctccacagtgtgtttcaaacatataacaatggccgctcttataagtttctt
 H F F S T V C F K H I T M A A S Y K F L
 ctgacactctctctctcctcctagctctcgtccgctttcgccgtaaggcagcaatccctc
 L A L S L S L L V S S A F A V R Q Q S L
 cgctcagcgaccagcagcagtgccgcttccaacgcctcaccgcccagcccactcag
 R L S D Q Q Q C R F Q R L T A A Q P T Q
 L T A Q Q P T L

aggatcgaatccgaaggcggcaccaccgagctctgggacgaaaaccaccaccagttccaa
 R I E S E G G T T E L W D E N H H Q F Q
 R

tgcgcggcggttgttgccatgagaaaagctcctcaaggctaacgccctctccttgcccaat
 C A G V V A M R N V L K A N A L S L P N
 taccacctgcccctcgcctgttttcacgaaaatggcagggtttcataggatcagc
 Y H P A P R L V F I E N G Q G F I G I S
 ttcccagggtgtgcagaacataccatgcatacaagagccaatacacacgtgagagcaca
 F P G C A E T Y H A Y K S Q Y T R E S T
 gaagcttgggagcagaaaagggaaagcgtgagggatttgaccagaaagtccaccgc
 E A W E Q K Q K G S V R D L H Q K V H R
 gttcgtagaggcgacatcatcgtatctccggctgggtgcgcccactggttctacaacgat
 V R R G D I I A I P A G A A H W F Y N D
 ggaagcgaagaagtgtgcatctccatcaacgacctcaaccaccaatccaaccagctc
 G S E E V V A I S I N D L N H Q S N Q L
 gaccaaaaattcagagcatttacctggcgggtggagtacccaaaagcgggcagcagcag
 D Q K F R A F Y L A G G V P K S G Q H E
 cagtcgagggagacattccagaacattttccaggctttcgaactcgaactgatggctgag
 Q S R E T F Q N I F Q A F D S N L M A E
 gcgttcaatgtgccggaggagattgtgaggaagatgcaaacagagcaaccaggagagagg
 A F N V P E E I V R K M Q T E Q Q E R G
 ctacgcttatcgttcgagaacgaatgagcttcattagggcagaagaagaacaagaacaa

L S V I V R E R M S F I R P E E E Q E Q
 gaacgagaacgagaaggaagcagatcgaggatgacaatggcttgaagaagcttctgc
 E R E R E G R R S E D D N G L E E S F C
 gccatgaaatcagcacaacactgaaaacaggagagaagctgatatctactccagagaa
 A M K I S T N T E N R R E A D I Y S R E
 gccgaaaagtacacctcatcgacagccacaagctccccattttgaagtacatggatag
 A G K V H L I D S H K L P I L K Y M D M
 agcgcagaaagaggaaaacctttaccgaatgctttgttgagcccggactgggcatgctg
 S A E R G N L Y P N A L L S P D W A M L
 ggccacacgatcggtgacgtgacgaaaggcgatgccaggtccaagtgggtggaccacagc
 G H T I V Y V T K G D A Q V Q V V D H S
 T V V Y V T K

ggccaatccctgatgaacgataggggtgaacaaaggtgacatggttgggtgccgcagtac
 G Q S L M N D R V N K G D M F V V P Q Y
 tacacctccaccgcagcgcggagagaacgggttcgagtggtggcgttcaagaccacc
 Y T S T A R A G E N G F E W V A F K T T
 ggtggccgatgcgaaacccgctggccggatacacgctcgggtgctgagagcgcgatgccgatt
 G W P M R N P L A G Y T S V L R A M P I
 caggttctgacgaatgcttaccagatatcgccgaaccaggcccagagcttgaagatgaac
 Q V L T N A Y Q I S P N Q A Q S L K M N
 aggggtagccagagtttctgtgtccccggcggaacagttttagatggtttgttt
 R G S Q S F L L S P G G K Q F - M C L F
 gcaactacggtatgtaaaatgggtaagaaaaacctttgtttttcattggttgatgctg
 A T T L C K I L G K K N L C F S W L M S
 agcaaacctgcagatatgtgtctgtctgtactcatttcaataatattcaataagagtaa
 S K P A D M C L S V L I S I I F - - E -
 taagagccggccgctcgacgctttttttgttctttctttaattc
 - E P A G V D A F F V P F F N

Primer-Paar ErG:

LTAAQPTQ

EryGloFw: cgcccagcccactcagag

TIVYVK

EryGloRev: cctttcgtcacgtacacgatcg

11S globulin seed storage protein 2 (Sesamum indicum, Sesame)

- NCBI-ID (Protein): XP_012831308.1
- NCBI-ID (DNA): XM_012975854.1

Sequenz

ctacacaagaagaatgggtggcgttcaagttttcttctgtctctctctgtcccttttagtc
 T Q E R M V A F K F L L A L S L S L L V
 tcagctgccatcgctcaaaactcgggagccacggctgacacagggacaacaatgccgcttc
 S A A I A Q T R E P R L T Q G Q Q C R F
 caacgcattctccggggcgcagccctccctcaggatccaatccgagggcggcaccaccgag
 Q R I S G A Q P S L R I Q S E G G T T E
 ctctgggacgaaacggcaggaacagttccagtgccgagcattgtcgccatgaggagcacc
 L W D E R Q E Q F Q C A G I V A M R S T
 atcaggcctaattggcctctctgtgcccaatcaccaccctctccccgcttggtttacatc
 I R P N G L S L P N Y H P S P R L V Y I
 S L P N Y H P N P R

gaacgaggtcagggttgataagcatcatgggtccccggctgtgctgaaacgtatcaggtc
 E R G Q G L I S I M V P G C A E T Y Q V
 cacaggagccagagaacctggagcgcacagaggcatcggagcagcaagatagaggaagc
 H R S Q R T M E R T E A S E Q Q D R G S
 gtgagggatttgcacagaaggtgcaccgccttcgccaaggagacattgttgctattccg
 V R D L H Q K V H R L R Q G D I V A I P
 tctggtgctgcacattgggtgctacaacgacgggagcgaagatttagtcgccgtctccatc
 S G A A H W C Y N D G S E D L V A V S I
 aatgacgtcaaccacctctcaaaccagctggatcaaaaattcagagcattttacctggcc
 N D V N H L S N Q L D Q K F R A F Y L A
 ggcggagtccaagaagcggggagcaagagcagcaggctagacagaccttccacaacatt
 G G V P R S G E E Q E Q Q A R Q T F H N I
 ttccgggcttttgacgaggagctgctatccgagccttcaatgtgccgaggagactatc
 F R A F D A E L L S E A F N V P Q E T I
 aggcggatgcaatcgggaggaagagagagggctcatcgctatggccagagaacgcattg
 R R M G S E E E R G L I V M A R E R M
 acatttgcggcccgatgaagaagaaggagagcaagagcataggggaagacaattggac
 T F V R P D E E E G E Q E H R G R Q L D

aacggcctggaagaaactttctgcaccatgaaattccgcaccaacggttgagagccggagg
 N G L E E T F C T M K F R T N V E S R R
 gaagcagatattttctcccagaggccggaagagtgcacgtcgtcgacaggaacaagctt
 E A D I F S R Q A G R V H V V D R N K L
 cccatcctcaaatatcatggatttgagtctgaaaaaggcaatctttactcgaacgcactc
 P I L K Y M D L S A E K G N L Y S N A L
 gtcagcccagattgggtccatgacaggccacacgattgtatacgtgacaagaggcgacgcc
 V S P D W S M T G H T I V Y V T R G D A
 caggtccaagtagtgggaccacaacgggacaa gccctgatgaacgacagggatgaatcagga
 Q V Q V V D H N G Q A L M N D R V N Q G
 V D H S G Q T Y F N D R

gaaatgtttgtggtgcctcagactatacctcgacggcccgtgcagggaaacaacggcttt
 E M F V V P Q Y Y T S T A R A G N N G F
 A S Q D G F

gaatgggttgctttcaagaccaccgggagtcctgatgacgcagccctctggctggttacaca
 E W V A F K T T G S P M R S P L A G Y T
 E W L T F K M A G Y T

tcgggtgatcagagcaatgcctcttcaggatcacaaaattcgtatcagatttcgccgaac
 S V I R A M P L Q V I T N S Y Q I S P N
 S A L R Q V L T N A Y Q M S P A

caggctcagggcctgaagatgaacagggggcagccagagtttcttgcctgtctccgggaggg
 Q A Q A L K M N R G S Q S F L L S P G G
 Q T F L L S P

cgcgatcttagatgtctctgctgctaattactagcgctagaggtgtgggtttgtgtaa
 R R S - M S L L L I T S A R G C G F V -
 aattctatgtaagaaatcgtttggttttccatggtaatgggttggtgctgagaaataaac
 N S M - E N R L F S M V M G W C R E I N
 tgtactgagtgaagtcctataaaaataagagcgccctccactgttttcaatggcaaaa
 C T E - S P I K I R A A L H C F Q W Q K
 aaaaaaaaaaaaaa
 K K K K

Primer-Paar (1):

VDHNGQ
 SesGloFw1: gtggaccacaacgggacaa
 QVITNSYQ
 SesGloRev1: ctgatcgaatgttgatgacctg

Primer-Paar (2):

YHPSPR
 SesGloFw1: taccaccctctccccg
 LAGYTSV
 SesGloRev1: ccgatgtgtaaccagccag

Primer-Paar (3):

YHPSPR
 SesGloFw1: taccaccctctccccg
 QSFLSP
 SesGloRev2: cgggagacagcaagaaactctg

Legumin B-like (*Sesamum indicum*, Sesam)

- NCBI-ID (Protein): XP_011083024.1
- NCBI-ID (DNA): XM_011084722.1

Sequenz

tcgccacttcacatcttcagcccacaatcacctgcatctctaattcctaagtgtttcctcc
 R H F T S S A H N H L H L - F L S V S S
 accatggctaagctcttctctctcttcttaacctttcttctctctcagcctcagcttt
 T M A K L F L S L L T F L L L F S L S F
 gctcttcgagggagcacctggcaacagggccagtgcgctatctcaagaatcaacgcccag
 A L R G S T W Q Q G Q C R I S R I N A Q
 Q Q G E C

gagcccactcgtcgatccaagctgaaggcggagtttctgagttctgggatcacaacagc
 E P T R R I Q A E G G V S E F W D H N S
 gatgaattccagtggtgcggcgtctccattcatcgccaccgctgcaggccccgagccctc
 D E F Q C A G V S I H R H R L Q A R A L
 atgctgcccgcctaccacaatgccccGattctagcctacgttcaacaaggtagaggaatg
 M L P A Y H N A P I L A Y V Q Q G R G M
 tatggggtatgatcttccgggttgcggcggaaactttcgagtcattcaacaacagtttgag
 Y G V M I S G C P E T F E S S Q Q Q F E
 gaggggagagggcgagagattcaggaccgcatcagaaaaatcgacagttccgggag
 E G R G A Q R F R D R H Q K I G Q F R E
 ggtgatattctggttccctgcgggctgctcactgggcttacaacaatggtgatcag
 G D I L A F P A G A A H W A Y N N G D Q
 gagcttgttattgttcttgcagacaatgccaataatgccaaccaacttgatcccaat
 E L V I V V L Q D N A N N A N Q L D P N
 ccaaggtcgtttttcctggccgaaaccctggcaggaaggggacaagagcagcaggagtac
 P R S F **F L A G N P** A G R G Q E Q Q E Y
F L A G N P

gcgccacaactcggagcgaagcgcggccaacaccaattcggcaatgtttccggggattt
 A P Q L G R K R G Q H Q F G N V F R G F
 gatgtccaaatattgagtgaggtgttccggggtgatgagcagagcaagaagcctccag
 D V Q I L S E V F G V D E Q T A R S L Q
 ggcgaaaacgatgaaagggacacataatcacagtcgcaagaggccttcaggtatcagc
 G E N D E R G G H I I T V A R G L Q V I S
 ccacctctccagagaggaatggtcggcaggaggagagccatattacggccgccc
 P P L Q R E E Y G R Q E E E P Y Y G R R
 gataatgggcttgaggagaccatttgcagcggccaagctgagagaaaacatcgacaaccc
 D N G L E E T I C S A K L R E N I D K P
 tcacgcccacatctacaacccacgtgcccggggttctccaccatcaacagcctcacc
 S R A D I Y N P R A G R F S T I N S L T
 ctccaaattctcagtttccctccagctcagcgcggcccgtggtgttctttacaggaacgga
 L P I L S F L Q L S A A R G V L Y R N G
 ataatggcggcacactggtgctgtaaacgcccacagcgtaatctacgtgacccgagggcag
 I M A P H W C V N A H S V I Y V T R G E
 tccgacatgcagatagtgaaaccacaacgggcaagcgttttccaggggagagtcaggagag
 S D M Q I V N H N G Q A V F D G R V R E
 ggtcaggtggtggtggtgccacagaacttcgcggtggtgaagcgggcccggagaaacagggc
 G Q V V V V P Q N F A V V K R A G E Q G
 tgcgagtggtgagtttaacaccaacgacaacgccttaataacaccctgagcggcagg
 C E W V E F N T N D N A L I N T L S G R
 acctcggcgttgggggctgcccgggacgtgatcgcaatgcttatcagatatcaagg
 T S A L R G L P A D V I A N A Y Q I S R
 gagggggcagagggctcaagtactcgaggaggagacgatgatgttcagnnnnnnnnnn
 E E A Q R L K Y S R R E T M M F X X X X

Primer-Paar SeLG:

QQQC
 SesLegFw: **ggcaacagggccagtgccg**
FLAGN
 SesLegRev: **gcagggtttccggccagg**

legumin-like protein (*Perilla frutescens*, Prilla)

- NCBI-ID (Protein): AAF19607.1
- NCBI-ID (DNA): AF180392.1

aattcggcagcaggtctctctctctctcaagtctaaactaatcaaatggcgtccaagctt
 I R H E S L S L S L N - L T M A S K L
 ctctctcgtctctctctctccctcctagtttcaacttgcagtcagagcagagaactaccga
 L L A L S L S L L V S L A V R A E N Y R
 gccgacgcaaggatgggectgcggtgagccgcaaccagcaatgccgcatccagcgcac
 A D A R M G L R L S R N Q Q C R I Q R I
 tccgctgagccccaccaccagattcaatccgagggcggcctaaccgagctctgggac
 S A V Q P H H Q I Q S E G G L T E L W D
 gaaatggaggctca**gttccaatgcggcgctcg**tcgcatgaggaacactctccgcct
 E M E A Q **F Q C A G V** V A M R N T L R P
F Q C A G V

aatgcctctctctcccaactaccacctaatacctcgtctcgtttacatcgagagaggt
 N A L S L P N Y H P N P R L V Y I E R G
 gagggattcatcggcgtcatcttccccggctgcgcccagacataaccacggcggtagggag
 E G F I G V I F P G C A E T Y H G G E E

gcctcgttcgagggcagaaggaaggcgagcagaaggaaggaggaagagcgagagactcg
 A S F E G R R E G E Q K E G G R A R D S
 caccagaagatccaccgcatcctcgtcaaggcgacatcgtggttctgccaccggcgagtc
 H Q K I H R I R Q G D I V V L P P G A V
 cactggtgccacaacgaaggcgagcagacttggtcgcccgttccatcaacgatctcaac
 H W C H N D G S E D L V A V S I N D L N
 catcaatcaaaccagctggaccagaaattcagagcatttta **cttggccggaggagtcc**
 H Q S N Q L D Q K F R A F **Y L A G G V P**
Y L A G S A P
 tcaggacaagagcaaggacaaggaagcaggagcaggcagggagtcgttccacaacatt
S G Q E Q G Q G K Q E A G R E S F H N I
Q G

ttcggagcgttcgacgcagagctgatggcggaggcgttcaacgtgtcacccggacatcatt
 F G A F D A E L M A E A F N V S P D I I
 aggcgtatgcaggcgtcggaggagagagggctaagcgtgatggctcatgagagcatg
 R R M Q A S E E E R G L S V M A H E S M
 aggtacatccgccccgaagaatgaggaacatagcagaagatcatcatcaaatgaaaat
 R Y I R P E E M R E H S R R S S S N E N
 ggattggaagaatctttctgctccatgaaaatcatgtccaacctcgacaacacaagagaa
 G L E E S F C S M K I M S N L D N T R E
 gcagatgtgtattcacgacagggcggaaaactcaacgtcgtcgcacatgataagcttccc
 A D V Y S R Q A G K L N V V D M H K L P
 atcctcagggccgtcgcacatgagcgcagagaaaggaaccttttccccaacgcaatgctg
 I L R A V D M S A E K G T L F P N A M L
 agcccagactggcgatgcaagggcacacgatcgtctactgtgacacgggaaacgccaag
 S P D W A M Q G H T I V Y V T R G N A K
 gtccaagtgggtgatcacaagggcagagcctgatgaacgacaggggtcagcagggagag
 V Q V V D H K G Q S L M N D R V Q Q G E
 atgttcgtggtgcccagttctacacctctacggctgaggctggaaacgaggggttcgag
 M F V V P Q F Y T S T A E A G N E G F E
 tgggtggcgttcaagaccagtggttccccatgcaaccaggtggccggatacacgtcg
 W V A F K T S G F P M R N Q V A G Y T S
 gccttgagagcaatgcccgtccaagtcttgaccaacgcctaccagatgtctccaacgag
 A L R A M P L Q V L T N A Y Q M S P N E
 gctagggcagatcaagaccaatcgaggtagccagactttctgtgtcaccaccggcgcc
 A R A I K T N R G S Q T F L L S P T R A
 catggaagaaagcactattaggctagtgtcattttatgttttaagaaaaaccttagttt
 H G R K H Y

Primer-Paar:

FQCAGV
 PriLegFW: **gttccaatgcgccggcgtcg**
YLAGGVP
 PriLegRev: **gggaactcctccggccaag**

11S globulin-like protein (*Corylus avellana*, Haselnuss)

- NCBI-ID (Protein): AAL73404.1
- NCBI-ID (DNA): AF449424.1

aaacaacatcagatatataattaccatggccaaacttatcttggctctctttttctctgtgc
 K Q H Q I Y I T M A K L I L V S F S L C
 cttcttggctcttcaatggctgctgggtatcaatgtaggactaaggcggcagcaacag
 L L V L F N G C L G I N V G L R R Q Q Q
 cgatatttggcgagtgcacacctcgacaggtcaatgccccttgaaccacaaaccgcatc
 R Y F G E C N L D R L N A L E P T N R I
 gaggtgaagcttggcagatcgagtcttgggaccacaacgac **cagcaattccagtggcgt**
 E A E A C Q I E S W D H N D **Q Q F Q C A**
Q Q F E C A

ggggttgcgctcatccggcgaaccattgagcccaatggccttctcttggc ccaatacagc
G V A V I R R T I E P N G L L L P Q Y S
G V A V

aatgctccagaactcatatacatgagagaggtaggggaatcaccggggtcctgtttcct
 N A P E L I Y I E R G R G I T G V L F P
 ggggtgtcccgaacttgaagatcctcaacaacaatctcaacagggacagagacagggga
 G C P E T F E D P Q Q Q S Q Q G Q R Q G
 cagggacagagccagaggtctgaacaagaccggcatcagaagattcgacacttccgagag

tcacacgtacttaaggetgaggetggtgcgcatcgaggtgtgggaccaccacgctcctcag
 S H V L K A E A G R I E V W D H H A P Q
 ctacggttgcctctggtgtctcctttgtacgttacatcatcgagtctaaggtctctacttg
 L R C S G V S F V R Y I I E S K G L Y L
 ccctctttctttagcaccgaggtctccttcggtgtaaaaggagaaggtcttatgggg
 P S F F S T A R L S F V A K G E G L M G
 agagtggtcctgtgcccagacattccaggactcatcagtggtttcaaccaagcggtggt
 R V V L C A E T F Q D S S V F Q P S G G
 agccccctcgagaaggtcagggccaaaggacaacaaggtcagggccaaaggccaccaaggt
 S P F G E G Q G Q G Q Q G Q G Q G H Q G
 caaggccaaggacaacagggccaaagggtcagcaaggacaacagagtcaggccagggt
 Q G Q G Q Q G Q Q G Q Q G Q Q S Q G Q G
 ttccgtgatatgcaccagaaagtgagcacataaggactggggacaccatcgctacacat
 F R D M H Q K V E H I R T G D T I A T H
 cccggtgtagcccaatggttctacaacgacggaaccaaccacttgctatcgttccgctc
 P G V A Q W F Y N D G N Q P L V I V S V
 ctcgatttagccagccaccagaatcagctcgaccgcaaccaaggccatttttagtagcc
 L D L A S H Q N Q L D R N P R P F Y L A
 Y L A

ggaaacaaccacaaggccaagtatggatagaaggacgcgagcaacagccacaaaagaac
 G N N P Q G Q V W I E G R E Q Q P Q K N
 G S Q P Q

atccttaatggcttcacaccagaggttcttgctaaagctttcaagatcgatgtaggaca
 I L N G F T P E V L A K A F K I D V R T
 gcgcaacaacttcagaaccagcaagacaaccgtggaacattatccgagtcacaaggcca
 A Q Q L Q N Q Q D N R G N I I R V Q G P
 ttcagtgctcattaggccgctttgaggagtcagagaccgaggaagtaacgggtta
 F S V I R P P L R S Q R P Q E E V N G L
 gaagagaccatagcagcgcgaggtgcaccgataacctcgatgacccatctaagctgac
 E E T I C S A R C T D N L D D P S N A D
 gtatacaagccacagctcgggttacatcagcactctgaacagctatgatctccccatcctt
 V Y K P Q L G Y I S T L N S Y D L P I L
 cgcttccttcgctctcctcagccctccggtgatctatccgtcaaaacgcgagtggtgcttcca
 R F L R L S A L R G S I R Q N A M V L P
 cagtggaacgcaaacgcaaacgggttctctacgtgacagacggggaagccatgtgcag
 Q W N A N A N A V L Y V T D G E A H V Q
 gtggttaacgacaacgggtgacagagtggttcgacggacaagtcctcaaggacagctactt
 V V N D N G D R V F D G Q V S Q G Q L L
 tccataccacaaggtttctccggtgaaacgcgcaacaagcgcaacagttccggtggatc
 S I P Q G F S V V K R A T S E Q F R W I
 gagttcaagacaacgcaaacgacagatcaacacacttgctggacgaacctcggtcttg
 E F K T N A N A Q I N T L A G R T S V L
 agaggtttaccattagaggtcatatccaatgggtaccaaatctcactcgaagaagcaaga
 R G L P L E V I S N G Y Q I S L E E A R
 agggtttaagttcaacagatcgagaccactttgacgcacagcagtgccagctagctac
 R V K F N T I E T T L T H S S G P A S Y
 ggagggccaaggaaggtgatgcttaa
 G G P R K A D A -

Primer-Paar:

ECQLDQLNA

BraCruFw: gtcagctagaccagctcaatg

YLAGNNPQ

BraCruRev: ttgtgggttgtttccggctaag

11S globulin seed storage (Nicotiana tabacum, Tabak)

- NCBI-ID (Protein): XP_016455279.1
- NCBI-ID (DNA): XM_016599793.1

aagaaggaggcctcagtttctccaaatctcatccatctttttagttaaacaatcaatcc
 R R R P Q F L Q I S S H L L - L T N Q S
 taattagcctggcgtcaccactaaactccttttagctatactcctcactgcttttctc
 - L A M A V T T K L L L A I L L T A F L
 ttgtccgcaacaatgcagtttagagactttcagggccagcaaggccgctcaggagggtcag
 L S A T N A V R D F Q G Q Q G R Q E G Q
 agaggcactcgtctgactgaagcccaacaatgccggttaacaaggctcactgctagccag
 R G T R L T E A Q Q C R L T R L T A S Q
 cccactaacccaattgagtcagagggcggcgtcactgagctgtgggacgagaacaggag

Anhang

P T N R I E S E G G V T E L W D E N E E
caa **ttccagtgctggagttg**ctcccatgaggagtgatcccgccgcaattctctttcc
Q **F Q C A G V** A P M R S V I R R N S L S
F Q C A G V

ctgcctaatttccatcccatgcctcgcttggtttacattgagcggggccagggactgatt
L P N F H P M P R L V Y I E R G Q G L I
ggcattacttacctggctgtgctgagactttccaatctcagctcagcccttccaggct
G I T Y P G C A E T F Q S Q S Q P F Q A
ggccgagagccaagggaaagagagggccaagggccgagaagtgaccaacaccagaaggtc
G R E P R E E R G Q G R R S D Q H Q K V
caccgcattcgccaaggagatgctgctggcacttccagctggctgctcattggtggtat
H R I R Q G D V V A L P A G A A H W C Y
aatgatggtgaggagagctcgttgcctctctgtcaatgacctcaaccaccgggtccaac
N D G E E E L V A V S V N D L N H R S N
cagcttgatcagaacttgaggcattctta **cttggctggtggagtaccag**aaagtggaagg
Q L D Q N L R A F **Y L A G G V P E** S G R
Y L A G S A P Q G

caacaaactcaagcaggtcaagactacagagcagggcagaggttccagaacattttccgt
Q Q T Q A G Q R L Q S R Q R F Q N I F R
gcttttcgacacagaattgatggctgaggccttcaacatcccagccgagattgtaaggaga
A F D T E L M A E A F N I P A E I V R R
atgcaagaagagcagcagagcgaacgtggactaattgtgaatgtgaggaaggaatgaga
M Q E E Q Q S E R G L I V N V R E G M R
atgattaggcccagcaagaagaaggagaatttgaagaagagcaagggcgaccacgacga
M I R P D E E E G E F E E E Q G R P R R
ggacagcaatggtggggaagcaaccggaatggcttgaagaaaacatttgcacaatg
G Q Q W W E E A T G N G L E E N I C T M
aaaatccgcaccaaccttgaacacccaacagaagctgacatcttctcaaggcaagccggc
K I R T N L E H R T Q A D I F S R Q A G
aaaattaacctgtcaatcgccaaaaacttccatccttaatacatggacatgagtgct
K I N H V N R Q K L P I L K Y M D M S A
tctagagccacctctatccgaatgcattggtgacccacattggtccgtgaacagccac
S R G T L Y P N A L L T P H W S V N S H
tgcgtgtatagtgcaagaggagagggcacaagtgcagtagtaga **ccacagcggacaa**
C V V Y V Q R G E A Q V Q V **V D H S G Q**
V N H S G Q

caagtgatgaacgacagagtaaacaccagggagaaatgtttggttcctcagtagtctgcc
Q V M N D R V N Q G E M F V V P Q Y F A
E H L N D R

tcaacagtgagagcaggacagaatggattggaatgttggtggtggaggacaagcagtgag
S T V R A G Q N G L E F V V W R T S S E
ccaatgaacagccaacttgcaggttacacatcagtgattagagcaatgctgttgaagtc
P M N S Q L A G Y T S V I R A M P V E V
ctcacaacgcctaccaaaatttctccaaacgaggctcagcgccttgaagatgaacaggggt
L T N A Y Q I S P N E A Q R L K M N R G
ggagaaagcttctctatctcctcagcgaaggtccatctaaaatggatgatgatgtagcc
G E S F L L S P Q R R S I - N G Y D V A
atgtctagtagtactcgttctcgtcttctgttttttaggcaaagacaagcgagagcgactt
M S S S T R F S S L F L G K D K R E R L
gtaattaggagcaataataatgtaactaataaagctcctgcctttttgtttcttaatgt
V I R S K - - C N - - S S C L F V S - C
gatccaagatttttctcta
D P R F S

Primer-Paar (1)

FQCAGV

NicGloFw1: **ttccagtgctggagttg**

YLAGGVPE

NicGloRev1: **ctggtactccaccagccaag**

Primer-Paar (2)

FQCAGV

NicGloFw1: **ttccagtgctggagttg**

VDHSGQQVM

NicGloRev2: **tcacttggttgcgctgtgg**

9.2.7.2. PCR-Amplifikate und nested-PCR-Produkte

Tabelle 43: Die in dieser Arbeit erhaltenen PCR-Amplifikate und deren nested-PCR-Produkte

PCR-Amplifikat	DNA-Sequenz	Anzahl der Basen (bp)	Proteinsequenz	Anzahl der Aminosäure	Nested PCR	Anzahl der Basen (bp)
SeqCh1	TAACGCGTACAAC AACGAGAAGTTC ACTCT AG CAGGGAAG AGGA AATGTGA TGAAC CAGCTGGA GAGGGAGGCC AAGGAGCTGGCGTTTCGGGAT GCCGGCGAGAGAGGTGGAGGAGGTGCT CCG TAGCCAGAAAG AGGAGT TTTTCTTCAAGGGG A	155	NAYNNEKFTLAGRRNVMN QLEREAKELAGMPAREVD EIFRNQKEEFFFKG	51	CCACGGG CAAGGG AGCAT GAG CTGGCGTTCGGGAT GCCGGCG AGAGAGGTGGAGGAGTGCTC CGTAGCCAGAAAGAGGAGTA	83
SeqCh2	GANCCNGC GGTTGTCTGGACGACTCGC CGGA NGGTGGTTTGGCGGGGGTCTCCCTTCTTC GCGGTGGTATCCTGTGCTTTCTTCATGGTGTT CCTGCAAACTCACAGTTTCTG GGGTAGATT GGTTAGGG TTTGAAACAATTTTGGGAAACAT TATTGAGAAAGAGAGATNATTTGTGANAGTAN AGAGAGAACTGA	202	KKAQDTTAKKGDPAAPXS GESSRQ	31	GCAC GGTGGTTTGGCGGGGGG GTCTCCCTTCTTCGCGGTGGTA TCCTGTGCTTCTTCATGGTGT TCCTGCAAACTCACAGTTTCT GGGGTAGATTGGTTAGGGTT	108
SeqCh3	ATTTTAGCCAAATGCAGCTGAGCTCCACCTTC CAGATCCACAATCTCTAC GAGCACTCGGATA CACTGGA TTCTCTCCTCTCCTCCCCACCATTG CCGTTTTCTGCCACAACCACAATCTCGATTGC AACTTTCTTAAACCACCGACATTATCAGAATC AGCTGCAGATTCCAAATCCGCATTACTGGGTT CTTGTAAAGTTTGCATCTTTGGATAAACCCAG GTGAAAAATCTTCATGTAATGCTAAATACAAT CAATATCATCAATAA CCTCTCTCTCTCTCTT GGG GGT	297	MQLQEPSNADLESAADS DNVGLRKAIVVVAEN GNGGEERRESSVSECSVEI VDLEGGQQLHLAK	69	TTGCCGTTTTCTGCCNCAACCA CAATCTCGATTGCAACTTTCCT TAAACCACCGACATTATCAGAA TCAGCTGCAGATTCCAATCCG CATTACTGGGTTCTTGTAAAGT TTGCATCTTTGGATAAACCCAG GTGAAAAATCTTCATGTAATG CTAATAACAATCAATATCATCAA TAACCTCTCTCTCTCTCTTTG GGA	202
SeqCh4	TACCACCCCTCTCCCCGGCACTCATCATTGAA GATAGGCGACGACTGCAGAACGTTGATGTCG ATGTTCGAACCTGCAACAC CGAAATACGCAT GCCAGATCCACAAACGGTAGTCAGCAACGAC TTCCAGGATCATTGAAGGATGATTGCTTTTGA AACCAGTAGTGAAGTGGCCTTTCCACGCCACC GGGCAGTTTTTCCACTCCCAATACATGCAATC AATGCTGCCCA TCATCCCTGGGAAACTGTGC ACCGCACCGTGCATATCTGGCAGTCTCTGGCT GGTTACACATCGGA	298	MHGAVHSFPGMMGSIDCM YWEWKNCVAVKQFTT GFKSNHPSMILEVVADYRL WIWHAYFGVAGSNIDINVL QSSPIFNDECRGEGW	88	GGGCAXTGAXTGCTGCATTGG GAGTGGAAA XXCTGCCCGGTG GCGTGGAA XGGCCAGTTCACT ACCGGTTCAAACGCAAACTC CTTCGATGATCCTCGAAGCCGT TGCTGACTACCGTTTCCGGATC TGGCATGCGTATTTCCGGTGTG CAGGTTCGAACAT	159

Anhang

SeqCh5	<p>TCCAACNGCGTCATTTGCNACCTGGCTGGCTT NTTTCGTNCATGGCCTTNGCATCTGCNTGAAG CCCTTCATGAACCTTGATNTGCAACTCCACT GAGTCNTATGAGAGGTATCATAGCAAGTATGA TTAGTGCCAACTGCCAACTTGCTTGAAAAGCA ATGCCTAGTCCCACAATAGCCGAGGACAAGT CTTGAACCATTGGGGCTAGCGCGTCGCCTACT AGAGCACGGACTAGCAGCATCAGATGACA GCCTTGCTCCGATCATACCACTTGAGTGCTCA GGCTCATCATACCAAGAAACCTCCATCCNAAC CGCCTTCTCGAAGCACATGAGCCT</p>	342	<p>MCFEKAVXME VSWYDEPE HSSGMIGARLSSDAASVRA LVGDALQMVQDLSSAIVG LGIAFQASWQLALILAMIPLI XLSGVVXIKFMKGFADXK AMXEXASQXANDXVG</p>	112	<p>GGAGATTGACCATTGGGCTAG CGCGTCGCCTACTAGAGCACG GACACTAGCAGCATCAGATGA CAGCCTTGCTCCGATCATACCA CTTGAGTGCTCAGGCTCATCAT ACCAAGAAACCTCCATCCTAAC CGCCTTCTCGAAGCACATGAG CCTC</p>	154
--------	--	-----	---	-----	---	-----

5'3' Frame 1 —
 -RVQQREVVHSSREEECDEPAGEGGQAGVRDAGERGGGGAP-**P**ERGVFLQG

5'3' Frame 2 —
 NAYNNEKFTLAGKRN**VMNQLEREAKELAF**GM**PAREVEEVLRSQKEEFF**FKG

5'3' Frame 3 —
TRTTTRSSL-**Q**GR**M**--**T**SWRGRPRSWRSGCRRERWRRC**S**VARKRSFSSRG

3'5' Frame 1 —
SP-**R**K**T**PLSGYGAPPPPLSPASRTPAPWPPSPAGSSHSS**L**LE-**T**SR**C**CTR

3'5' Frame 2 —
 PLEEKLLFLATEHLLHLSRRH**P**ERQLLGLPLQLVHHI**P**L**P**C-**S**ELLVVVRV

3'5' Frame 3 —
PLKKNSSFWLRSTSSTSLAGIPNASSLASLSSW**F**ITFL**P**PARVNF**S**LLYAL

Abbildung 69: Übersetzung der erhaltenen Amplifikate mittels "EXPASY translate tool"

10. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Hamburg, den 20.06.2021



Ben Abdulrahman Albunni