

Aus dem Forschungszentrum Borstel
vertreten in der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät durch das
Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften
Abteilung Klinische Medizin
Prof. Dr. Peter Zabel

Charakterisierung der Erdnussallergene Ara h 1, Ara h 3/4 und ihrer Isoformen

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät -

vorgelegt von

Andrea Boldt

aus Giekau

Lübeck, 2005

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1. Allergien | 1 |
| 1.2. Pathomechanismus der Typ I-Allergie | 2 |
| 1.2.1. Nahrungsmittelallergien | 4 |
| 1.2.2. Erdnussallergie | 5 |
| 1.3. Zielsetzung | 7 |
| 2. Material und Methoden | 9 |
| 2.1. Material | 9 |
| 2.1.1 Chemikalien | 9 |
| 2.1.2 Monoklonale Antikörper und Patientenserum | 14 |
| 2.1.3 Protein-Marker | 18 |
| 2.1.4 Materialien zur Extrakterstellung | 18 |
| 2.2 Methoden | 20 |
| 2.2.1 Herstellung von Erdnussextrakten | 20 |
| 2.2.1.1 Extrakte aus keimfähigen und gerösteten Erdnüssen | 20 |
| 2.2.1.2 Extrakte aus gekochten und frittierten Erdnüssen | 21 |
| 2.2.1.3 Extrakte aus verarbeiteten Erdnuss-Produkten | 21 |
| 2.2.1.4 Herstellung von Extrakten aus Nahrungsrohmaterial zum Vergleich mit verarbeiteten Produkten | 21 |
| 2.2.2 Proteinbestimmung | 22 |
| 2.2.3 Chromatographische Auftrennung des Erdnussextraktes mit der HPLC | 22 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------|--|----|
| 2.2.3.1 | Gelfiltrations-Chromatographie | 22 |
| 2.2.3.1.1 | Entsalzung der Proteinlösungen | 22 |
| 2.2.4 | Elektrophoretische Trennmethoden | 23 |
| 2.2.4.1 | SDS- und LDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS- / LDS-PAGE) | 23 |
| 2.2.4.2 | Blue-Native Gelelektrophorese (BN-PAGE) | 25 |
| 2.2.4.3 | Isoelektrische Fokussierung (IEF) | 29 |
| 2.2.4.4 | Doppelt 1 dimensionale Gelelektrophoresen (D-1D) | 30 |
| 2.2.4.5 | Zweidimensionale Gelelektrophoresen (2D) | 31 |
| 2.2.5 | Proteinfärbungen | 34 |
| 2.2.5.1 | Coomassie-Färbung | 34 |
| 2.2.5.1.1 | Gelfärbung | 34 |
| 2.2.5.1.2 | Kolloidale Gelfärbung | 35 |
| 2.2.5.1.3 | Nitrozellulose-Membranfärbung (NC) | 36 |
| 2.2.5.1.4 | Proteinfärbung auf PVDF-Membranfärbung für die Sequenzierung | 36 |
| 2.2.5.2 | Silberfärbung | 36 |
| 2.2.6 | Transfertechniken | 37 |
| 2.2.6.1 | Thermoblotting auf NC-Membranen (Kapillarblot) | 38 |
| 2.2.6.2 | Semi-Dry-Blotting | 38 |
| 2.2.6.3 | Blotting auf PVDF-Membranen (Tankblot) | 39 |
| 2.2.7 | Immunologische Nachweise | 40 |
| 2.2.7.1 | Immunnachweise auf NC-Membranen | 40 |
| 2.2.7.2 | Nachweise auf PVDF-Membranen | 41 |
| 2.2.7.3 | Verstärkung der Immunnachweise durch Chemilumineszenz | 42 |
| 2.2.8 | N-terminale Sequenzierung | 43 |
| 2.2.9 | Massenspektrometrie mit MALDI-TOF | 43 |
| 2.2.10 | Epitopmapping von Membran-gebundenen synthetischen Peptiden | 45 |
| 2.2.11 | Versuche zur simulierten Passage durch den Gastrointestinaltrakt | 46 |
| 2.2.11.1 | Kauversuche von gerösteter Erdnuss | 46 |
| 2.2.11.2 | Kauversuche mit gekochten und fritierten Erdnüssen sowie Erdnussprodukten | 48 |

| | |
|---|-----|
| 3. Ergebnisse | 50 |
| 3.1 Isolierung der Allergene Ara h 1, Ara h 3/4 und ihrer Isoformen aus dem Erdnussextrakt | 50 |
| 3.1.1 Isolierung von Ara h 1 und Ara h 3/4 aus Erdnussextrakt mittels Gelfiltration | 50 |
| 3.1.2 Charakterisierung der Allergene durch verschiedene Gelelektrophoresetechniken, Proteinfärbungen und N-terminale Sequenzierungen | 52 |
| 3.1.2.1 SDS-PAGE und LDS-PAGE | 52 |
| 3.1.2.2 Blue native PAGE (BN-PAGE) | 58 |
| 3.1.2.3 Doppelt 1 dimensionale PAGE (D-1D) | 60 |
| 3.1.2.4 Zweidimensionale PAGE (2D) | 60 |
| 3.1.3 Charakterisierung der Allergene durch immunologische Nachweise | 70 |
| 3.1.4 Detektion der Allergene durch Chemilumineszenz | 71 |
| 3.1.5 Massenspektrometrische Bestimmung der Allergene mittels MALDI-TOF | 78 |
| 3.2 Charakterisierung der Erdnussallergene Ara h 3/4 und ihrer Isoformen mittels Epitopmapping | 85 |
| 3.2.1 Alignment der veröffentlichten Sequenzen von Ara h 3/4 und ihren Isoformen und Konstruktion der Filter für das Epitopmapping | 85 |
| 3.2.2 Bestimmung der Epitope von monoklonalen Antikörpern.. | 90 |
| 3.2.3 Bestimmung der IgE-Epitope von Patientenseren | 93 |
| 3.3 Charakterisierung der Erdnussallergene nach <i>in vitro</i> Simulation des menschlichen Gastrointestinaltraktes | 95 |
| 3.3.1 Untersuchung der Passage von gerösteten Erdnüssen | 95 |
| 3.3.2 Untersuchung der Passage von gekochten und fritierten Erdnüssen | 95 |
| 3.3.3 Untersuchung der Passage von verschiedenen Erdnussprodukten | 106 |

| | |
|---|-----|
| 4. Diskussion | 113 |
| 4.1 Isolierung der Allergene Ara h 1, Ara 3/4 und ihrer Isoformen aus dem Erdnussextrakt | 113 |
| 4.2 Charakterisierung von Ara h 3/4 und Isoformen durch Epitopmapping | 120 |
| 4.3 Charakterisierung der Erdnussallergene durch <i>in vitro</i> Simulation des menschlichen Gastrointestinaltraktes | 125 |
| 5. Ausblick | 130 |
| 6. Zusammenfassung | 131 |
| 7. Summary | 133 |
| 8. Literaturverzeichnis | 134 |
| 9. Anhang | 148 |
| 9.1 Auswertung der MALDI-TOF-Ergebnisse | 148 |
| 9.2 Farbige Darstellung des Epitopmappings | 153 |
| Danksagung | |
| Veröffentlichungen | |
| Lebenslauf | |
| Erklärung | |

Abkürzungsverzeichnis

Neben den SI-Einheiten wurden folgende Abkürzungen verwendet:

| | |
|------------|--|
| % C | Vernetzungsgrad eines Polyacrylamidgeles |
| % T | Acrylamid / Bisacrylamid-Gesamtkonzentration |
| Abb. | Abbildung |
| ACA 750 | Aminocaprinsäure |
| AK | Antikörper |
| AP | Alkalische Phosphatase |
| APC | Antigen-presenting cell (Antigen-präsentierende Zelle) |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| Ara h | Allergene der Erdnuss (<i>Arachis hypogaea</i>) |
| AS | Aminosäure |
| BCIP | 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-Kaliumsalz |
| Bet v | Allergene des Birkenpollens (<i>Betula verrucosa</i>) |
| Bis-Tris | (Bis[2-Hydroxyethyl]imino-tris[hydroxy-methyl]methan) |
| BN-PAGE | Blue-Native PAGE |
| BSA | Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin) |
| CABS | 4-[Cyclohexylamino]-1-butansulfonsäure |
| CAP | <i>In vitro</i> -Test zur Bestimmung des spezifischen IgE |
| CAPS | 3-[Cyclohexylamino]-1-propansulfonsäure |
| CBS | Citrate-buffered Saline (Citrat-gepufferte Kochsalzlösung) |
| CHAPS | 3-[3-Cholamidopropyl]-dimethylammonio-1-propansulfonat |
| C-terminal | Carboxy-terminal |
| D-1D | Doppelt eindimensional |
| 2D | Zweidimensional |
| DBPCFC | Double Blind Placebo Controlled Food Challenge (Doppelt-blind Placebo-kontrollierte Nahrungsmittelprovokation) |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|---|
| DMF | Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DTE | Dithioerythrit |
| DTT | 1,4-Dithiothreitol |
| EEx | Erdnussextrakt |
| EEx-gek | Erdnussextrakt aus gekauten Erdnüssen |
| EEx-k | Erdnussextrakt aus keimfähigen Erdnüssen |
| EDTA | Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat |
| FCS | Fetal calf serum (Fetales Kälberserum) |
| FPLC | Fluid phase liquid chromatography (Flüssigphasenchromatographie) |
| H | Hour (Stunde) |
| H ₂ O | Aqua bidest. |
| HPLC | High performance liquid chromatography (Hochdruckflüssigkeitschromatographie) |
| HRP | Horseradish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase) |
| IEF | Isoelektrische Fokussierung |
| IgA, IgE, IgG | Immunglobuline A, E, G |
| IL | Interleukin |
| KDa | kilo-Dalton |
| LDS | Lithium Dodecylsulfat |
| LM | Low Molecular Weight Marker |
| LTP | Lipidtransferprotein |
| mAK | Monoklonaler Antikörper |
| MALDI-TOF | Matrix assisted laser desorption/ ionization time-of-flight mass spectrometry (Matrix-unterstützte Laser Desorptions-Ionisations-Massenspektroskopie) |
| MES | 2-(N-morpholino)-Ethansulfonsäure |
| MG | Molekulargewicht |
| MHC | Major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex) |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------|--|
| Min | Minute |
| MM | Multi Mark Marker |
| MOPS | 3-(N-morpholino)-Propansulfonsäure |
| MTT | (Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid |
| NBT | 4-Nitroblautetrazoliumchlorid |
| NC | Nitrocellulose |
| N-terminal | Amino-terminal |
| OAS | Orales Allergie Syndrom |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| pAK | Polyklonaler Antikörper |
| PBS | Phosphate-buffered Saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung) |
| PI | Isoelektrischer Punkt |
| PTH | 3-Phenyl-2-thiohydantoin |
| PP | Probenpuffer |
| PR-protein | Pathogenesis-related protein |
| PVDF | Polyvinylidendifluorid |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| TBS | Tris-buffered Saline (Tris-gepufferte Kochsalzlösung) |
| TBS-T | TBS-Puffer mit Tween 20 |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| v/v | Volume per volume (Volumenprozent) |
| w/v | Weight per volume (Gewichtsprozent) |
| x g | Vielfaches der Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²) |

1. Einleitung

1.1 Allergien

In den letzten Jahren konnte eine stete Zunahme allergischer Erkrankungen vor allem bei den Menschen aus Industrienationen beobachtet werden (Bachert *et al.*, 2001).

Der Begriff Allergie wird dabei als die spezifische Änderung der Immunitätslage im Sinne einer krankmachenden Überempfindlichkeit gegen normalerweise harmlose und nicht-infektiöse Substanzen definiert (Amon *et al.*, 1996). Diese können z. B. Gras- und Baumpollen, Hausstaubmilben, Tierepithelien und –federn, Schimmelpilze, Nahrungs- und Arzneimittel, sowie Insektengifte sein. Die z. B. durch Pollen ausgelöste allergische Erkrankung kann sich dabei auf bestimmte Organsysteme beschränken wie die oberen Atemwege und Lunge bei Asthma bronchiale und Rhinitis. Sie kann aber auch als Urtikaria oder auch Kontaktdermatitis, atopische Dermatitis oder generalisiert in fast allen Organsystemen des Menschen auftreten und z. B. durch Nahrungsmittel- oder Arzneimittelallergien ausgelöst werden.

Die Schwere der Symptome ist dabei sehr unterschiedlich ausgeprägt und kann von Mundkribbeln (Orales Allergie Syndrom (OAS)), Juckreiz, Störungen des Gastrointestinaltraktes, Atemnot bis hin zu anaphylaktischen Schockreaktionen reichen. Die schwerwiegenden Symptome werden am häufigsten von Nahrungsmitteln wie Leguminosen (Erdnuss, Soja) oder verschiedenen Nüssen (Haselnuss, Walnuss, Pekanuss, Paranuss und Cashewkern) ausgelöst.

An der Ausbildung einer Allergie sind viele Einflussfaktoren beteiligt. Die Neigung zur Entwicklung einer Allergie kann genetisch bedingt sein. In diesem Fall spricht man von Atopie, also einer familiär bedingten allergischen Erkrankung. Mittlerweile leidet fast ein Drittel der Bevölkerung in den Industrienationen an Beschwerden aus dem atopischen Formenkreis und zwar mit zunehmender Tendenz (Ring *et al.*, 2001). Dies ist ein Ausdruck für die veränderten Lebensgewohnheiten der Bevölkerung und die zunehmende Belastung der Umwelt mit problematischen Substanzen. Gerade in den Industriestaaten spielt der Umwelteinfluss für das Auftreten von neuen Allergenen eine wichtige Rolle. Vor allem neue Chemikalien können im beruflichen Alltag und Haushalt auch Allergien auslösen (Schnuch *et al.*, 2003).

Synergie-Effekte aus einer Kombination vieler verschiedener Stoffe, die jeweils alleine auftretend kein allergenes Potential haben, zusammen aber wiederum allergiefördernd sind, können auftreten. Außerdem können vor allem Luftschadstoffe wie Schwefeldioxid, Stickstoffoxid, Ozon, Tabakrauch sowie Rußpartikel bei den Patienten zu ausgeprägten allergischen Reaktionen führen oder möglicherweise auch die Entstehung neuer Erkrankungen unterstützen (Weißbuch Allergie, 2004; Ring, Kongressbericht Aachen, 2004).

Die allergischen Erkrankungen lassen sich nach ihrem immunologischen Reaktionsverhalten in vier Kategorien unterteilen. Diese sind nach Gell & Coombs (1973), verändert nach Medizinfo (<http://www.medizinfo.de/allergie/path/allergietypen.htm>) in einer Übersicht dargestellt:

Schema 1: Mechanismen der vier Allergietypen.

| Allergie-Typ | Beschreibung | Reaktionsablauf | |
|--------------|--|--|--|
| Typ I | Sofortreaktion, Anaphylaktischer Typ der Überempfindlichkeit, IgE-vermittelte Immunantwort | Das Allergen bindet IgE auf Mastzellen oder Basophilen und Entzündungsmediatoren werden freigesetzt. | <p>Sensibilisierung Allergen, B-Zelle, IgE, Mastzelle</p> <p>Allergische Reaktion Allergen, B-Zelle, Mastzelle, Histamin</p> |
| Typ II | Zytotoxischer Typ der Antikörper-abhängigen Überempfindlichkeit | Das Antigen ist Zell-gebunden. Die Zelle wird zerstört durch Antigen-spezifische Antikörper (IgM und IgG) | <p>Typ 2 Reaktion IgG, Antigen gebunden an Körperzelle, Komplementsystem führt zur Zellauflösung.</p> |
| Typ III | Überempfindlichkeit wird durch Immunkomplex vermittelt | Der Antigen-Antikörper Komplex wird an die Blutgefäßwand gebunden und das Komplementsystem wird aktiviert. | <p>Typ 3 Reaktion Ablagerung von Immunkomplexen, Komplementsystem führt zu Entzündungen</p> |
| Typ IV | Spätreaktion, Überempfindlichkeit wird durch Zellen vermittelt | Das Antigen aktiviert die Lymphozyten, diese setzen Entzündungsmediatoren frei. | <p>Typ 4 Reaktion Aktivierter T-Lymphozyt, aktiviert Makrophagen, Zytokine → Gewebeschädigung</p> |

In der vorgelegten Arbeit steht ausschließlich die Typ I-Allergie im Vordergrund. Diese soll im Folgenden näher beschrieben werden.

1.2 Pathomechanismus der Typ I-Allergie

Als Typ I-Allergien werden alle überempfindlichen Schutzreaktionen bezeichnet, die zur Allergie vom Soforttyp gehören und auf einer IgE-vermittelten Immunantwort beruhen. Die Freisetzung von Entzündungsmediatoren erfolgt meistens in Minuten oder wenigen Stunden und kann bis hin zu einem anaphylaktischen Schock führen. Die Auslöser für eine Typ I-Allergie können dabei Gras- und Baumpollen, Insektengifte und vor allem auch Bestandteile von Nahrungsmitteln sein. Die häufigsten Allergien sind gegen Gras- und Baumpollen gerichtet und meistens durch milde Symptome wie Rhinitis gekennzeichnet. Hymenopterenstiche können neben Juckreiz in seltenen Fällen auch zu einem anaphylaktischen Schock führen.

Einleitung

Nahrungsmittelallergien können sich im OAS, gastrointestinalen Störungen, Neurodermitis bis hin zu einem anaphylaktischen Schock manifestieren (Sampson, 1999).

Der Pathomechanismus der Typ I-Allergie lässt sich in zwei Abschnitte unterteilen (Abb. 1, verändert nach Petersen, 1999).

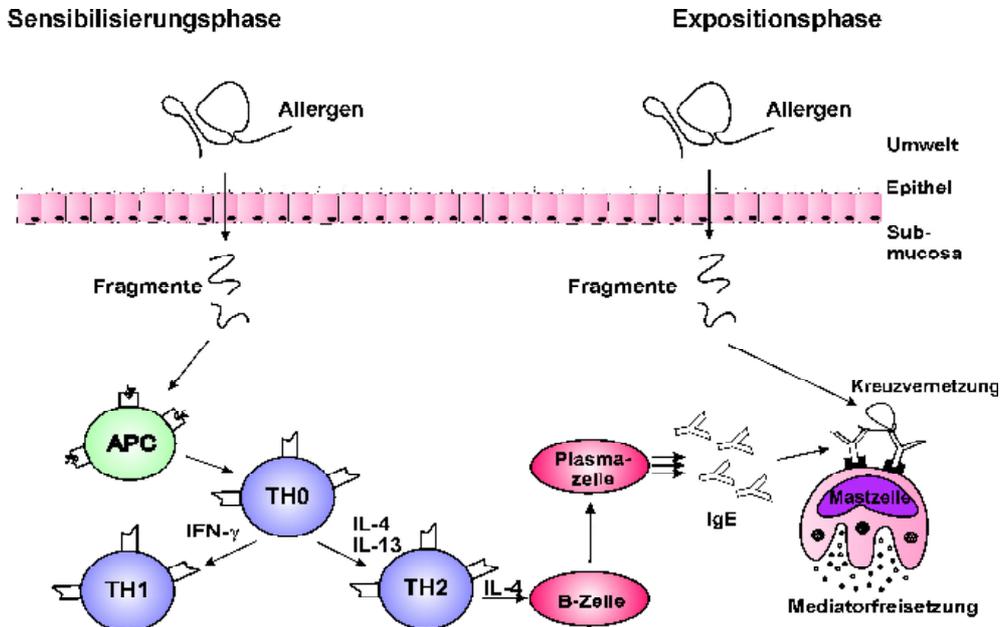


Abb. 1: Pathomechanismus der Typ I-Allergie

Zunächst findet in der Sensibilisierungsphase ein Eindringen der Antigene über die Schleimhäute in den Körper statt. Die Antigene liegen meist in geringer Dosis vor und werden von den Abwehrzellen des Körpers, den Makrophagen und dendritischen Zellen, sowie den B-Lymphozyten zunächst symptomlos phagozytiert und dabei proteolytisch prozessiert. Die bei dieser Spaltung entstandenen Peptide werden dann von den Zellen durch Proteine des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) Klasse II auf der Zelloberfläche präsentiert. An diese Strukturen docken T-Helferzellen ($CD4^+$ -T-Zellen) mit ihren spezifischen T-Zell-Rezeptor an (Rammensee *et al.*, 1993). Durch die Präsentation der APCs werden die unreifen T-Zellen (T_H0 -Zellen) zur Ausdifferenzierung in T_H2 -Zellen veranlasst. Dabei ist das umgebende Cytokinmilieu entscheidend. So führt vor allem Interleukin-4 (IL-4) zu einer Ausdifferenzierung in T_H2 -Zellen, wobei diese weitere Wachstumsfaktoren wie Interleukin-5 (IL-5) und Interleukin-13 (IL-13) freisetzen (Janeway *et al.*, 2002).

Interleukin-4 und Interleukin-13 können nun zusammen mit co-stimulatorischen Molekülen wie z. B. dem CD40 der B-Zellen und dem CD40-Liganden der T_H2 -Zellen die Ausreifung von B-Zellen zu Immunglobulin E-produzierenden Plasmazellen induzieren, welches Antigen-spezifisch ist (Janeway *et al.*, 2002).

Kommt es nun nach der Sensibilisierungsphase zu einem erneuten Kontakt (Expositionsphase) mit demselben Antigen, dann erfolgt die allergische Reaktion mit klinischen Symptomen. Die IgE-Antikörper aus dem Blutstrom binden an ihre Rezeptoren, insbesondere die hochaffinen IgE-Rezeptoren Fc ϵ RI auf Mastzellen und basophilen Granulozyten.

Die Antigene, jetzt Allergene genannt, aktivieren Mastzellen durch die Bindung an die zellständigen IgE-Antikörper mit nachfolgender Vernetzung. Durch die Kreuzvernetzung werden Mediatoren wie Histamin freigesetzt und die Bildung von Prosta-

Einleitung

glandinen und Leukotrienen induziert. Durch die Mediator-Ausschüttung kommt es zu einer Kontraktion der Muskulatur, einer Zunahme der Mukussekretion und einer verstärkten Durchblutung einzelner Organsysteme. Dadurch bedingt können Rhinitis, allergisches Asthma oder auch ein anaphylaktischer Schock auftreten.

Dieser ersten allergischen Reaktion vom Soforttyp kann zeitverzögert Stunden nach der Allergenexposition eine allergische Spätreaktion folgen. Diese wird durch die fortgesetzte Ausschüttung von anderen Mediatoren wie Chemokinen und Cytokinen durch die bereits aktivierten Mastzellen und Eosinophilen verursacht. Dies kann zu einem chronischen Asthma führen (Janeway *et al.*, 2002).

1.2.1. Nahrungsmittelallergien

Die Nahrungsmittelallergien sind unter den Typ I-Allergien durch die mögliche Schwere der Reaktion von besonderer Bedeutung.

Dabei können nahezu alle bekannten Nahrungsmittel auch als Allergenquelle wirken. Die wichtigsten sind Kuhmilch, Hühnereier, Meeresfrüchte (Fische und Schalentiere), Nüsse (Haselnuss, Walnuss, Pekanuss, Paranuss und Cashewkern), Leguminosen wie Erdnüsse und Soja, Sellerie, Senf, Früchte und Sesam.

Durch ihren differenzierten Sensibilisierungsweg können drei Typen der Nahrungsmittelallergie unterschieden werden (Schnyder *et al.*, 1999).

Der Typ A lässt sich bei Kindern unter 3 Jahren finden, die sich direkt über den Gastrointestinaltrakt mit hitzestabilen, gegen enzymatischen Abbau resistente Proteine wie Milch- und Hühnereiproteine, aber auch Erdnüsse sensibilisieren, da ihr Immunsystem, speziell ihre orale Toleranz noch nicht vollständig entwickelt ist. Mit der weiteren Entwicklung ihres Immunsystems klingen diese ersten Allergien z. B. gegen Milch oftmals wieder ab und verschwinden schließlich vollständig.

Bei älteren Kindern, Jugendlichen und Erwachsenen tritt häufig der Typ B auf. Hierbei findet zunächst eine orale Sensibilisierung z. B. gegen Baumpollen (Birke, Hasel) statt. Durch kreuzreaktive Allergene in den Lebensmitteln wird die orale Toleranz umgangen und es manifestiert sich z. B. eine Nahrungsmittelallergie gegen die entsprechenden Bet v 1-homologen Proteine in Obst, Gemüse und Nüssen. Dabei erkennen die Mastzellen verwandte Epitope der Proteine auf den Nahrungsmitteln wieder und reagieren entsprechend mit der Ausschüttung von Mediatoren.

Der Typ C stellt eine Besonderheit für die erwachsene Bevölkerung dar, da hier eine direkte Sensibilisierung über den Gastrointestinaltrakt erfolgt, nachdem die orale Toleranz und das Immunsystem vollständig entwickelt sind. Dabei wird dann ein Nahrungsmittel als Allergen erkannt, welches sich häufig durch Hitzestabilität und Stabilität gegen enzymatischen Abbau auszeichnet.

Für den Allergiker ergeben sich bei der Nahrungsaufnahme einige Probleme. So sind allergieauslösende Zutaten nicht ohne weiteres in einer fertigen Speise erkennbar. Die Deklaration ist häufig unvollständig oder es liegt eine unbeabsichtigte Kontamination während des Herstellungsprozesses oder beim Verkauf der Speisen vor. Auf Grund der Schwere von Nahrungsmittelallergien müssen geeignete Detektionssysteme weiterentwickelt werden, die einen empfindlicheren Nachweis für „versteckte“ Allergene in Lebensmitteln erlauben.

Einleitung

Die von Nahrungsmitteln ausgelösten Symptome lassen sich dabei in vier Schweregrade unterteilen, die in der folgenden Übersicht zusammengefasst sind:

| | |
|---------|--|
| 1. Grad | Juckreiz, Rötung und Urtikaria der Haut |
| 2. Grad | Übelkeit, Bauchkrämpfe, Atemnot, beschleunigter Herzschlag und Blutdruckabfall |
| 3. Grad | Erbrechen und Durchfall, Bronchospasmus, Schock und Bewusstlosigkeit |
| 4. Grad | Atem- und Kreislaufstillstand mit Todesfolge |

Für alle Nahrungsmittelallergien gilt dabei, dass eine sofortige ärztliche Notfallversorgung mit Adrenalin notwendig ist, um eine Reaktion dritten und vierten Grades rechtzeitig abwenden zu können.

1.2.2. Erdnussallergie

Die wichtigste Nahrungsmittelallergie mit der höchsten Prävalenz von Betroffenen in der westlichen Welt ist die Erdnussallergie.

Botanisch gehört die Erdnuss (*Arachis hypogaea*) zu der Familie der Hülsenfrüchtler (*Leguminosae*), die ursprünglich aus Südamerika, vor allem aus Brasilien stammt und dort bereits von den Inkas als Kulturpflanze genutzt wurde. Weitere bekannte Leguminosen, die in über 13000 Arten vorkommen, sind wichtige Nahrungsmittel wie Soja (*Glycine max.*), Erbsen (*Pisum sativum*), Linsen (*Lens culinaris*) und Bohnen (*Phaseolus vulgaris*).

Zu den wichtigsten Reservestoffen der Leguminosen gehören Proteine wie Albumin, Legumin und Conglutinin. In den meisten Fällen handelt es sich bei den Erdnussallergenen um hitzestabile, wasserlösliche Speicherproteine mit einer Größe zwischen 7 und 65 kDa. Die Proteine lassen sich in Proteinfamilien und Superfamilien nach ihrer Löslichkeit, ihrem strukturellen und molekularen Aufbau und ihrem Sedimentationskoeffizienten, der in Svedberg-Einheiten (S) angegeben wird, unterteilen (Mills *et al.*, 2002).

Die Superfamilie der Prolamine umfasst die wichtigsten Pflanzenallergene, die in Samen verbreitet sind. Sie haben eine konservierte 3D-Struktur, die durch eine konservierte Lage von Cysteinresten und die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen ihren α -Helices mit flexiblen Loops stabilisiert wird. Sie sind in Wasser löslich. Zu ihnen gehören die Erdnussallergene Ara h 2 und Ara h 6 (Beardslee *et al.*, 2000).

Die Superfamilie der Cupine verfügt hingegen über β -Faltblattstrukturen, die namensgebend waren („Cupa“ (lat.) bedeutet Faltblatt). Sie sind hitzestabil und bilden große variable Aggregate, die sogar nach proteolytischer Spaltung über Disulfidbrückenbindungen zusammengehalten werden. Sie sind in verschiedenen Salzlösungen löslich und zeichnen sich durch eine große Sequenzhomologie aus (www.ifr.ac.uk/PROTALL). Zu ihnen gehören die Erdnussallergene Ara h 3/4 und ihre Isoformen.

Es gibt 9 Allergene der Erdnuss, die hier zur Vollständigkeit kurz aufgelistet werden sollen.

Einleitung

Tab. 1: Übersicht der Erdnussallergene (Becker *et al.*, 2005, Boldt *et al.*, 2005; Breiteneder *et al.*, 2000; Hoffmann-Sommergruber, 2002, Mittag *et al.*, 2004, Pons *et al.*, 2002)

| Allergen (Accession Nr.) | MW (kDa) | pI | Aufbau des Proteines | Funktion und Besonderheiten |
|------------------------------------|-------------|-----|--|--|
| Albumine (synonym Conglutine) (2S) | | | | |
| Ara h 2 (L77197) | 17,3 | 5,7 | Monomere Proteine | Trypsin Inhibitor |
| Ara h 6 (AF092846) | 14,5 | 5,2 | Heterodimere Proteine, 2 Polypeptidketten (~3 kDa und ~9 kDa) über Disulfidbrücken verknüpft | Stabil gegen proteolytische Spaltung, Lipidbindung |
| Ara h 7 (AF091737) | 15,8 | 5,6 | | |
| Viciline (7S) | | | | |
| Ara h 1 (L34402) | 63,5 | 5,4 | Bildung von sehr stabilen Di- und Trimeren von 210 kDa | N-Glykosilierung vom High-Mannose- Typ |
| Legumine (Glycinine) (11S) | | | | |
| Ara h 3/4 (Q8LKN1) | 61,7 | 5,5 | Hexamere hetero-oligomere Proteine von 300-450 kDa, über Disulfidbrücken verknüpfte monomere Untereinheiten aus sauren (~ 40 kDa) und basischen (~ 20 kDa) Anteilen | Synthese eines Polypeptides, Unter- einheiten werden über konservierte Protease-Schnitt- stelle (NGLEET) posttranslational geschnitten. Selten glykosiliert. |
| Gly 1 (Q9FZ11) | 60,5 | 5,5 | | |
| iso-Ara h 3 (Q6IWG5) | 58,1 | 5,4 | | |
| Ara h 3 (AF093541) | 58,4 | 5,7 | | |
| Ara h 4 (AF086821) | 61,0 | 5,5 | | |
| Trypsin Inhibitor (Q8LLO3) | 25,5 | 6,7 | | |
| Profiline (Bet v 2-Homologe) | | | | |
| Ara h 5 (AF059616) | 14,0 | 4,6 | Komplexer Aufbau, immer mit Actin im Verhältnis 1:1 verbunden. Actinmonomere bindendes Protein | Reguliert Actin- Polymerisation nach extrazellulären Signalen |
| Pathogenesis-related (PR)-Proteine | | | | |
| Ara h 8 (AY328088) | 16,9 | 5,0 | Familie der Bet v 1-Homologen PR-10 Proteine, intrazellulär ohne Signalpeptid | Abwehr gegen Pathogene, unbekannte enzymatische Funktion |

Einleitung

| | | | | |
|---------------------------------|-------|------|--|---|
| Erdnuss-LTP | ? | ? | Lipid Transfer Proteine Kleine Proteine aus 91-95 Aminosäuren, acht konservierte Cysteinreste, die vier Disulfidbrücken bilden | Abwehr von Patho- genen und Umge- bungstress, sehr stabil gegen enzy- matischen Abbau |
| Oleosine | | | | |
| Erdnuss- Oleosin (Q9AX10) | 16-18 | 9-10 | Kleine Familie, die Oligomere bildet | Hoch konservierter Aufbau, an der Entstehung der Öltropfen beteiligt |

Warum weist gerade die Erdnuss eine so hohe Allergenpotenz auf?

In den USA ist die höchste Prävalenz von Erdnussallergikern mit 0,6 % der Gesamtbevölkerung vorhanden, hier haben 100 % aller Kinder bereits im Alter von 2 Jahren Erdnuss-haltige Lebensmittel konsumiert (Sampson, 2004). Der Trend zu Erdnuss-haltigen Nahrungsmitteln hat auf Europa übergegriffen und auch hier nimmt die Häufigkeit von Erdnussallergien stark zu; so sind in Großbritannien bereits 0,5 % der Bevölkerung Erdnussallergiker (Sampson, 2004).

Die einzige bekannte Therapie ist die komplette Vermeidung von Erdnuss-Produkten. Denn im Unterschied zu anderen Allergien, wie z. B. gegen Kuhmilch, die sich im Laufe der Jahre abschwächen können, besteht diese Allergie zumeist zeitlebens (Sampson, 1999). Neue Untersuchungen gehen allerdings von einem „Auswachsen“ der Erdnussallergie von bis zu 20 % aus (Skolnick *et al.*, 2001). Es genügen bereits Erdnussmengen im Mikrogrammbereich (100 µg), um schwerwiegende Reaktionen auszulösen (Hourihane *et al.*, 1997 und 1998).

Die Allergenität bleibt auch beim Erhitzen und weiterer Verarbeitung der Nüsse erhalten (Beyer *et al.*, 2001). Erdnusskontaminationen können in sehr unterschiedlichen Produkten auftreten (Lorenz *et al.*, 2001). Teilweise können Erdnussproteine als Verunreinigungen in Maschinen, die mehrfach für verschiedene Herstellungsprozesse genutzt werden, vorkommen (Lepp *et al.*, 2004). So kann auch ein völliger Verzicht auf Erdnuss-haltige Produkte einen versehentlichen Konsum nicht ausschließen.

Ein weiteres Problem der Erdnussallergie ist, dass diese häufig nicht als Nahrungsmittelallergie erkannt wird, so dass eine Behandlung zu spät erfolgt. Häufig sind die Patienten unter 20 Jahre alt und die Nahrungsmittelallergie tritt an öffentlichen Plätzen, Schulen oder Universitäten auf. Erschwerend kommt hinzu, dass nach einem ersten Abklingen der Symptome eine erneute schwerwiegende Reaktion mit zeitlicher Verzögerung auftreten kann, die beschriebene Spätreaktion, und viele Patienten dann bereits aus ärztlicher Obhut entlassen wurden (Niggemann *et al.*, 1998).

Somit müssen die Mechanismen, die die Erdnussproteine zu so hochpotenten Nahrungsmittelallergenen machen, genau untersucht werden. Dabei ist es wichtig, auch die Proteinbausteine zu charakterisieren, die zu einer Erdnussallergie führen können.

1.3 Zielsetzung

Die Zielsetzung dieser Arbeit ist die Charakterisierung der Erdnussallergene Ara h 1, Ara h 3/4 und Isoformen. Um die Zusammensetzung zu erhalten, sollte die Trennung unter natürlichen, nicht denaturierenden Bedingungen erfolgen. Damit können die Allergene in ihrer natürlichen Form, in der sie auch dem menschlichen Körper

Einleitung

zugeführt werden und Nahrungsmittelallergien auslösen, charakterisiert werden. Im Gegensatz dazu stehen die meisten bisher veröffentlichten Untersuchungen (Sampson, 1996-2002; Burks *et al.*, 1998, Koppelman *et al.*, 2004) über die Erdnuss und ihre Allergene, bei der diese immer unter den denaturierenden Bedingungen der SDS-PAGE analysiert wurden.

Für die Charakterisierung sollten dabei nicht nur die isolierten Proteine aus der Erdnuss untersucht werden, sondern auch die Prozessierung der Erdnussallergene bei einer *in vivo* und *in vitro* simulierten Passage durch den menschlichen Gastrointestinaltrakt verfolgt werden. Dabei galt es vor allem Hinweise zu finden, warum allergische oder sogar anaphylaktische Schockreaktionen noch lange nach der Aufnahme des Nahrungsmittels auftreten können. Zusätzlich sollten die IgE-reaktiven Epitope der Allergene identifiziert werden. Um die Relevanz der einzelnen Erdnussallergene ermitteln zu können, sollte die IgE-Prävalenz mit DBPCFC-positiven Seren eines europäischen Patientenkollektivs bestimmt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

| | |
|--|------------|
| Acetonitril | Roth |
| Acrylamid | Roth |
| Acrylamid (49,5T/3C) | AppliChem |
| Acrylamid / Bis-Tris-Acrylamid | Roth |
| Agarose (0,5 %) | Pharmacia |
| Ameisensäure | Merck |
| Aminocaprinsäure (ACA 750) | Merck |
| 6-Aminohexansäure | Merck |
| Ammoniumhydrogencarbonat | Merck |
| Ammoniumpersulfat (APS) | BioRad |
| Ammoniumsulfat | Serva |
| Ampholyte, Servalyt ® 3-10, 4-7 | Serva |
| Antioxidant | Invitrogen |
| Aqua bidest. (demineralisiert >18 Ω) | Millipore |
| Arginin (L-) | Sigma |
| Bicine | Sigma |
| Bisacrylamid | Roth |
| Bis-Tris (Bis[2-Hydroxyethyl]imino-tris[hydroxy-methyl]methan) | Sigma |
| 10 x Blocking Puffer | Sigma |
| Borsäure | Sigma |
| 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-Kaliumsalz (BCIP) | Roth |
| Bromphenolblau | Serva |
| n-Butanol | Merck |
| C ₁₈ -Säulen (ZipTip-Spitzen) | Millipore |
| Calciumchlorid | Merck |

Material und Methoden

| | |
|--|------------------------|
| 4-[Cyclohexylamino]-1-butansulfonsäure (CABS) | Sigma |
| 3-[Cyclohexylamino]-1-propansulfonsäure (CAPS) | Sigma |
| 3-[3-Cholamidopropyl]-dimethylammonio-1-propansulfonat (CHAPS) | Sigma |
| Citronensäure-Monohydrat | Merck |
| CNBr-aktivierte Sepharose 4B | Pharmacia |
| Complete ® Proteinase-Inhibitor | Boehringer Mannheim |
| Con A Sepharose® für kleine Säule | Pharmacia Biotech |
| Condimed | Roche |
| Coomassie-Brilliant-Blau R-250 | Serva |
| Coomassie Protein Reagenz (PIERCE Reagenz) | PIERCE, Perbio Science |
| Crocein Scarlet | Serva |
| Cyanbromid | Merck |
| Deoxycholsäure-Natriumsalz | Sigma |
| Dialyseschlauch, Visking ® | Serva |
| Dimethylformamid (DMF) | Merck |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Merck |
| (Dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) | Sigma |
| Dithioerythrit (DTE) | Merck |
| 1,4-Dithiothreitol (DTT) | Merck |
| n-Dodecylmaltosid | Merck |
| Einmalküvetten | Sarstedt |
| Enzynorm forte | Nordmark |
| Essigsäure (Eisessig) | Roth |
| Ethanol vergällt | Merck |
| Ethanolamin | Sigma |
| Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA), Titriplex ® III | Merck |
| Fetales Kalbserum (FCS) | Gibco |
| Formaldehyd 37 % | Merck |

Material und Methoden

| | |
|--|-------------|
| GelBond PAG-Film | Pharmacia |
| Glutaminsäure (L-) | Serva |
| Glutamin (L-) | Gibco |
| Glutaraldehyd 25 % | Merck |
| Glycerin 87 % und 100 % | Merck |
| Glycin | Merck |
| Harnstoff | Merck |
| HiTrap-Desalting-Säule | Pharmacia |
| Hybridomed-Medium | Biochrom AG |
| IEF-Marker (Katalog-Nr. 39211) | Serva |
| Imidazole (1,3-Diaza-2,4-cyclopentadiene) | Sigma |
| Immobilon ® (PVDF-Membran) | Millipore |
| India Ink | Pelikan |
| Isoelektrische Fokussierung mit Fertiggelstreifen pH 3-10 oder pH 4-7 | Invitrogen |
| Isoelektrische Fokussierung mit Fertiggelstreifen pH 3-6 | Bio-Rad |
| Jodacetamid | Merck |
| Kaliumchlorid | Merck |
| Kaliumhydrogenphosphat | Merck |
| Kreon 25000® | Solvey |
| Kryoröhrchen | Nunc |
| Kupfersulfat | Merck |
| Lithiumdodecylsulfat (LDS) | Sigma |
| Lysin (L-) | Merck |
| Magermilchpulver | Glücksklee |
| Magnesiumchlorid | Merck |
| Magnesiumsulfat | Merck |
| Membran-Blocking-Puffer-Konzentrat | Sigma |
| 2-Mercaptoethanol | Merck |
| Methanol | Merck |
| α-D-Methylmannopyranosid | Fluka |

Material und Methoden

| | |
|--|---|
| Mini Q-Säule | Amersham Biosciences |
| MultiMark-Proteinmarker, prestained | Invitrogen |
| Natriumacetat | Merck |
| Natriumazid | Merck |
| Natriumcarbonat | Merck |
| Natriumchlorid | Merck |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | ICN Biochemicals GmbH |
| Natriumdihydrogenphosphat | Merck |
| Natriumhydroxid | Merck |
| Natriumthiosulfat | Serva |
| Nickel-Chelat-Säule | Amersham Biosciences |
| Nickelchlorid | Merck |
| 4-Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) | Roth |
| Nitrocellulose-Membran, 0,45 µm | Schleicher & Schüll |
| 2-(N-morpholino)-Ethansulfonsäure (MES) | Serva |
| MES-Puffer | Invitrogen |
| 3-(N-morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS) | Fluka |
| MOPS-Puffer | Invitrogen |
| Novex- und NuPAGE-Fertiggele 8 %, 10 %, 12 %, 4-12 %, 4-20 % | Invitrogen |
| NP40 | Roche |
| Orange G | Sigma |
| PD-10-Säulen | Pharmacia |
| Penicillin / Streptomycin | Gibco |
| Phenolrot | Serva |
| ortho-Phosphorsäure | Serva |
| 2-Propanol | Merck |
| ProSieve® 50 Gellösung (25-40 % Acrylamid, 5 % N-Methylolacrylamid) | Biozym (BioWhittaker Molecular Applications) |
| ProSieve® Proteinmarker | Biozym (BioWhittaker Molecular Applications) |
| Protein L in Säule | Sigma |

Material und Methoden

| | |
|--|----------------------|
| Pyronin G | Pharmacia |
| Pyruvat (Natrium-) | Gibco |
| RPMI-Medium (1640) | Gibco |
| Saccharose | Merck |
| SDS-Marker (Low Range, High Range) | BioRad |
| Sephadex 25-Säule | Amersham Biosciences |
| Servablau G-250 | Serva |
| Source Q-Säule | Amersham Biosciences |
| Silbernitrat | Fluka |
| Sterilfilter 0,45 µm | Merck |
| Sucrose | Sigma |
| Superdex HR 200-Säule | Amersham Biosciences |
| Superdex TM 200 prep grade | Amersham Biosciences |
| Taurodeoxycholsäure (Natriumsalz) | ICN Biomedicals |
| N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) | Roth |
| Trifluoressigsäure (TFA) | Merck |
| Tricine | Merck |
| Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) | Serva |
| Tris-Base | Sigma |
| Tris-HCl | Sigma |
| Trypsin | Promega |
| Tween®-20 | Merck |
| Westran-Membran (PVDF) | Schleicher & Schüll |
| Zelluloseacetatfilter 0,2 µm, 0,45 µm, 0,8 µm, 8 µm | Sartorius |

2.1.2 Monoklonale Antikörper und Patientenseren

Die verwendeten Antikörper sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Tab. 2: Liste der verwendeten monoklonalen und polyklonalen Antikörper (Buschmann⁴, 1996; Gruber⁵ *et al.*, 2004; Maid³, 1998; Mittag⁸ *et al.*, 2004; Reese¹ (Paul-Ehrlich-Institut, Langen), Suhr⁷ *et al.*, 2004; Uhlemann², 1991; Wörle⁶, 2001)

| Monoklonaler (mAK) / polyklonaler (pAK) Antikörper | Antikörpername | Allergenspezifität |
|--|--------------------------------|--------------------|
| mAK | PEI-7B2 ¹ | Ara h 3/4 |
| mAK | Pn-b ² | Ara h 3/4 |
| mAK | Pn-r ³ | Ara h 3/4 |
| mAK | Pn-x ³ | Ara h 3/4 |
| mAK | Pn-c ² | Ara h 1 |
| mAK | Pn-t ⁴ | Ara h 1 |
| pAK | MAP3 ⁵ | Ara h 2 |
| pAK | Carmen ⁶ | Ara h 2 |
| pAK | α -Ara h 6 ⁷ | Ara h 6 |
| pAK | α -Ara h 7 | Ara h 7 |
| pAK | Sam22 ⁸ | Ara h 8 |

Verwendete Sekundärantikörper:

| | |
|---------------------------------|-----------------|
| anti-human-IgE-AP | (Allergopharma) |
| anti-human-IgA-AP | (Dianova) |
| anti-human-IgG-AP | (Dianova) |
| Ziege-anti-Maus IgG /IgM H+L-AP | (Dianova) |
| Ziege-anti-Kaninchen IgG-AP | (Dianova) |
| Streptavidin-AP | (Dianova) |

Patientenseren von Erdnussallergikern (Blutspendern) wurden freundlicherweise von Frau Dr. U. Lepp aus der Ambulanz der Medizinischen Klinik Borstel zur Verfügung gestellt.

Tab. 3: Liste der Erdnussallergikerseren aus Borstel

| Kürzel | Geburtsjahr | CAP- Klasse | Spezifisches IgE | Gesamt IgE |
|--------|-----------------|------------------------------------|------------------|-----------------|
| JG3 * | 1974 | 6 | >100 | 3693 |
| KP28 | 1981 | 5 | 80,7 | 1696 |
| OH | Nicht angegeben | 6 | >100 | 1469 |
| BS | Nicht angegeben | 6 | >100 | Nicht angegeben |
| PG | Nicht angegeben | 6 (Nussmischung inkl. Erdnuss) | >100 | 124 |
| | | 5 (Kindernahrung inkl. Erdnuss) | 73,1 | |

* Aufgrund ihrer starken Reaktionen (nach Anamnese) konnte keine Doppelt-Blind Placebo Kontrollierte Nahrungsmittelprovokation (DBPCFC) durchgeführt werden.

Material und Methoden

Die Patientin wurde nur über positiven Skin-Prick-Test und spezifisches IgE eingeschlossen.

Im Rahmen des EU-Projektes FAREDAT (Quality of Life and Management of Living Resources of European Commission, QLK4-CT-2001-00301) konnten verschiedene DBPCFC-Patientenserum aus Dänemark (Herr Prof. Dr. B. Bindslev-Jensen), der Schweiz (Frau PD Dr. B. Ballmer-Weber), sowie nicht näher charakterisierte Seren aus Italien (Herr Prof. Dr. Ortolani) untersucht werden.

Tab. 4: Liste der Erdnussallergikerseren aus dem FAREDAT-Projekt

| Seren aus Dänemark | | | |
|--------------------|-----------------|-------------|------------------|
| Nr. | Geburtsdatum | CAP- Klasse | Spezifisches IgE |
| 1 | 6.2.96 | 3 | 11,3 |
| 2 | 6.2.96 | 3 | 16,6 |
| 3 | 1.3.00 | 4 | 34,2 |
| 4 | 26.9.99 | 3 | 7,26 |
| 5 | 8.3.97 | 2 | 0,7 |
| 6 | 18.7.00 | 3 | 12,9 |
| 7 | 3.11.00 | 6 | >100 |
| 8 | 8.4.98 | 2 | 1,52 |
| 9 | 3.10.85 | 5 | 62,7 |
| 10 | 14.4.97 | 2 | 0,73 |
| 11 | 7.10.98 | 1 | 0,44 |
| 12 | 19.12.95 | 5 | 61,1 |
| 13 | Nicht angegeben | 5 | 68,5 |
| 14 | Nicht angegeben | 3 | 15,9 |
| 15 | Nicht angegeben | 5 | 61,4 |
| 16 | Nicht angegeben | 5 | 70,9 |
| 17 | 3.11.95 | 6 | >100 |
| 18 | 15.8.98 | 2 | 1,29 |
| 19 | 3.9.99 | 3 | 15,5 |
| 20 | 31.1.00 | 2 | 3,31 |
| 21 | Nicht angegeben | 6 | >100 |
| 22 | 24.10.00 | 4 | 40,7 |
| 23 | 16.2.99 | 2 | 1,52 |
| 24 | 6.8.96 | 0 | <0,35 |
| 25 | 23.1.93 | 6 | >100 |
| 26 | 19.9.00 | 2 | 3,39 |
| 27 | 28.11.88 | 6 | >100 |
| 28 | 10.4.93 | 6 | >100 |
| 29 | 15.12.92 | 2 | 0,88 |
| 30 | 19.6.97 | 6 | >100 |
| 31 | 9.1.90 | 4 | 46,1 |
| 32 | 14.9.96 | 2 | 0,88 |
| 33 | 16.10.00 | 3 | 6,88 |
| 34 | 14.7.00 | 2 | 1,67 |
| 35 | 19.12.99 | 6 | >100 |
| 36 | 4.11.96 | 3 | 8,15 |
| 37 | 6.5.95 | 4 | 29,2 |

Material und Methoden

| | | | |
|-----------------------|-----------------|-------------|------------------|
| 38 | 5.8.96 | 3 | 5,55 |
| 39 | 16.2.02 | 2 | 3,04 |
| 40 | 12.11.95 | 3 | 16,1 |
| 41 | 15.6.90 | 6 | >100 |
| 42 | 16.8.00 | 4 | 32,9 |
| 43 | 25.9.78 | 3 | 15,3 |
| 44 | 6.12.99 | 6 | >100 |
| 45 | 2.12.97 | 5 | 66,3 |
| 46 | 15.8.99 | 2 | 3,32 |
| 47 | 11.11.00 | 3 | 5,03 |
| 48 | 22.9.84 | 3 | 4,05 |
| 49 | 21.12.94 | 3 | 11 |
| Seren aus der Schweiz | | | |
| | Geburtsdatum | CAP- Klasse | Spezifisches IgE |
| 1 | Nicht angegeben | 4 | 26,3 |
| 2 | Nicht angegeben | 1 | 0,51 |
| 3 | Nicht angegeben | 5 | 57,5 |
| 4 | Nicht angegeben | 3 | 6,45 |
| 5 | Nicht angegeben | 5 | 77,7 |
| 6 | Nicht angegeben | 3 | 4,95 |
| 7 | Nicht angegeben | 1 | 0,36 |
| 8 | Nicht angegeben | 0 | <0,35 |
| 9 | Nicht angegeben | 3 | 15,6 |
| 10 | Nicht angegeben | 2 | 2,19 |
| 11 | Nicht angegeben | 2 | 1,38 |
| 12 | Nicht angegeben | 0 | <0,35 |
| 13 | Nicht angegeben | 2 | 1,26 |
| 14 | Nicht angegeben | 1 | 0,54 |
| 15 | Nicht angegeben | 0 | <0,35 |
| 16 | Nicht angegeben | 5 | 82,6 |
| 17 | Nicht angegeben | 2 | 3,14 |
| 18 | Nicht angegeben | 3 | 4,45 |
| 19 | Nicht angegeben | 5 | 96 |
| 20 | Nicht angegeben | 0 | <0,35 |
| 21 | Nicht angegeben | 3 | 6,17 |
| 22 | Nicht angegeben | 2 | 2,89 |
| 23 | Nicht angegeben | 4 | 17,8 |
| Seren aus Italien | | | |
| | Geburtsjahr | CAP- Klasse | Spezifisches IgE |
| 1 | Nicht angegeben | 3 | 7,43 |
| 2 | Nicht angegeben | 2 | 1,25 |
| 3 | 1987 | 5 | 98,2 |
| 4 | 1967 | 3 | 9,96 |
| 5 | 1988 | 3 | 4,09 |
| 6 | 1998 | 6 | >100 |
| 7 | 1994 | 3 | 3,55 |
| 8 | 1982 | 3 | 4,05 |

Material und Methoden

| | | | |
|---|------|---|------|
| 9 | 1971 | 2 | 1,92 |
|---|------|---|------|

Durch eine Kooperation mit Frau Dr. U. Jappe (Allergologie-Ambulanz der Universität Heidelberg) konnten verschiedene zusätzliche Patientenseren erhalten werden, die allerdings nicht DBPCFC kontrolliert sind. Diese hatten positive Skin-Prick-Tests, spezifisches IgE und positive Anamnesen.

Tab. 5: Liste der Erdnussallergikerseren aus Heidelberg

| Nr | Geburtsdatum | Allergien gegen Leguminosen | Allergien gegen Nussartige | CAP- Klassen | | | Spez. IgE | | Gesamt IgE |
|----|-----------------|-----------------------------|---|--------------|------|-------|-----------|------|------------|
| | | | | EEx | Soja | Nüsse | EEx | Soja | |
| 1 | 28.03.1987 | Erdnuss, Soja | - | 2 | 2 | - | 2,64 | - | 156 |
| 2 | 27.10.1962 | Erdnuss | - | 2 | - | - | 2,46 | - | 189 |
| 3 | 04.02.1975 | Erdnuss | Walnuss | 4 | | 3 | 29,6 | - | > 2000 |
| 4 | 01.08.1973 | Erdnuss, Soja, Erbse, Bohne | Haselnuss, Mandel, Kokosnuss | 5 | 3 | 1-3 | 88,6 | - | 189 |
| 5 | 06.04.1998 | Erdnuss | - | 3 | - | - | 3,75 | - | - |
| 6 | 20.11.1984 | Erdnuss | Hasel-, Para-, Kokos-, Walnuss, Mandel, Sesamschrot | 3 | - | 1-3 | 9,66 | - | 1443 |
| 7 | Nicht angegeben | Erdnuss | - | 2 | - | - | 1,03 | - | 343 |
| 8 | 10.09.1968 | Erdnuss, Erbse | - | 6 | - | - | >100 | - | > 2000 |
| 9 | 08.07.1977 | Soja | - | - | 2 | - | - | 1,13 | - |
| 10 | Nicht angegeben | Soja | - | - | 2 | - | - | 1,13 | - |
| 11 | 06.11.1993 | Soja, | Nüsse | - | 3 | 3-5 | - | 15 | 1871 |
| 12 | 11.04.1976 | Soja | Sesam, Walnuss | - | 3 | 1-5 | - | 9,94 | 1136 |
| 13 | 27.10.1965 | Erdnuss, Soja | - | 2 | 2 | - | 2,49 | - | 1148 |
| 14 | 04.07.1957 | Erdnuss, Soja | - | - | - | - | - | - | - |
| 15 | 05.02.1982 | Erdnuss, Soja | - | 1 | 3 | - | 0,38 | - | 75,6 |
| 16 | 23.08.1987 | Erdnuss, Soja | - | 3 | 0 | - | 4,82 | - | 222 |

2.1.3 Protein-Marker

Als Protein-Marker für die SDS-PAGE wurde der Low Molecular Weight (LM) Marker (Biorad) verwendet:

| | |
|--------------------|----------|
| Lysozym | 14,4 kDa |
| Trypsin Inhibitor | 21,5 kDa |
| Carboanhydrase | 31,0 kDa |
| Ovalbumin | 45,0 kDa |
| Rinderserumalbumin | 66,2 kDa |
| Phosphorylase b | 97,4 kDa |

Für die Blue-native-PAGE im Novex-System und alle zweidimensionalen Elektrophoresen wurde der MultiMark™ Multi-Colored Standard (MM) von Invitrogen verwendet, der je nach verwendetem Puffersystem scheinbare Molekulargewichte anzeigt:

| | MES-Puffer | MOPS-Puffer | Tris-Glycin-Gele |
|------------------------|---------------|---------------|------------------|
| Insulin | 3 kDa | n/a * | 4 kDa |
| Aprotinin | 6 kDa | n/a * | 6 kDa |
| Lysozym | 11 kDa | 12 kDa | 17 kDa |
| Myoglobin-rot | 17 kDa | 19 kDa | 22 kDa |
| Myoglobin-blau | 19 kDa | 21 kDa | 30 kDa |
| Carboanhydrase | 31 kDa | 33 kDa | 42 kDa |
| Glutamin-Dehydrogenase | 52 kDa | 52 kDa | 60 kDa |
| Phosphorylase B | 98 kDa | 97 kDa | 148 kDa |
| Myosin | 185 kDa | 188 kDa | 250 kDa |

* n/a keine Angabe der entsprechenden Proteinbande.

Als pI-Marker bei der 2D-PAGE wurde der IEF-Marker (Katalog Nr. 39211) von Serva verwendet, der je nach pH-Bereich der verwendeten IEF-Streifen folgende Banden zeigt:

| | pI bei pH 3-10 |
|-------------------|-----------------|
| Amyloglukosidase | 3,5 |
| Glukose-Oxidase | 4,2 |
| Trypsin Inhibitor | 4,5 |
| β-Laktoglobulin | 5,2 ; 5,3 |
| Carboanhydrase | 6,0 |
| Myoglobin | 6,9 ; 7,4 |
| Lektin | 7,8 ; 8,0 ; 8,3 |
| Ribonuklease A | 9,5 |
| Cytochrom c | 10,7 |

2.1.4 Materialien zur Extrakterstellung

Für die Erdnussextraktherstellung sowie die Kauversuche aus roh-gerösteten Erdnüssen wurden im Rahmen dieser Arbeit Jumbo Riesen der Firma Seeberger in

Material und Methoden

verschiedenen Chargen verwendet. Diese werden nach der Ernte kurz erhitzt, um sie haltbarer zu machen.

Um den Vergleich mit gerösteten Erdnüssen zu erhalten, wurden dänische geröstete Erdnüsse Salta Jordnötter der Firma OLW, Filipstad verwendet. Diese enthielten laut Zutatenliste neben Erdnüssen noch Pflanzenöl und Salz.

Für die Herstellung der Extrakte und die Kauversuche von modifizierten Erdnuss-haltigen Produkten wurden verschiedene Produkte verwendet.

Corny-Riegel Schoko:

Zutaten laut Beschreibung:

Extrudat (Weizen-, Reis-, Mais-), Glukosesirup, Milkschokolade 20 %, geröstete Getreideflocken 11 % (Hafer-, Weizenflocken), geröstete und gehackte Erdnüsse, brauner Zucker, Kokosöl, Cornflakes, kondensierte, gezuckerte Vollmilch, gehackte und geröstete Mandeln, Honig, Emulgator E 471, Salz, Aroma

1 Riegel á 25 g

Erdnussbutter (Barney's Best) auf Roggen-Knäckebrötchen der Firma BRØDAS:

Zutaten laut Beschreibung:

Erdnussbutter: Erdnüsse (90 %), Zucker, pflanzliches Öl gehärtet, Speisesalz

Knäckebrötchen: Roggenvollkornmehl, Speisesalz

Snickers-Riegel:

Zutaten laut Beschreibung:

Zucker, Erdnüsse (45 %), Glukosesirup, Magermilchpulver, Kakaobutter, Pflanzenfett, Kakaomasse, Milchzucker, Butterreinfett, entsalztes Molkepulver, gehärtetes Pflanzenfett, Salz, Emulgator (Sojalecithin), Hühnerei-Trockeneiweiß, hydrolisiertes Milcheiweiß, Aroma

1 Riegel á 60 g

Peanut-Cracker:

Zutaten laut Beschreibung:

Erdnüsse, Getreidestärke, Weizenmehl, Tapioka- und Reisstärke, Sesam, Zucker, Weizensirup, Sojasauce, Salz, Mandelöl, getrockneter Seetang, Chili/Currypulver, Farbstoffe E142, E160B

Inhalt 100 g

Um die anderen Zutaten der verarbeiteten Produkte darzustellen, wurden gekaufte Weizenkörner (Raiffeisen) und handelsübliche Reiskörner (Aldi) ebenso verwendet wie Pollenextrakte (Allergopharma):

| | | |
|----------------------|----------------------|-------------------------------|
| Haferpollenextrakt | Charge 33248 N06/144 | Proteingehalt c = 625 µg/ml |
| Gerstenpollenextrakt | Charge 33451 N07/49 | Proteingehalt c = 3,875 mg/ml |
| Roggenpollenextrakt | Charge 158 Tri10/103 | Proteingehalt c = 750 µg/ml |

Selbst hergestellte Extrakte:

| | |
|--------------------------|-----------------|
| Maisextrakt (Korn) | c = 4,375 mg/ml |
| Haselnussextrakt (Nuss) | c = 8,688 mg/ml |
| Mandlextrakt (Mandel) | c = 9,5 mg/ml |
| Cashewkernextrakt (Nuss) | c = 8,13 mg/ml |
| Paranussextrakt (Nuss) | c = 13,25 mg/ml |
| Müsliextrakt | c = 4,13 mg/ml |

Material und Methoden

| | |
|----------------------------|-----------------|
| Erdnussbutterextrakt | c = 6,75 mg/ml |
| Erdnussplätzchenextrakt | c = 4,0 mg/ml |
| Special Cornflakes-Extrakt | c = 2,563 mg/ml |
| Erdnussriegelextrakt | c = 11,94 mg/ml |
| Erdnussflipsextrakt | c = 2,563 mg/ml |

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung von Erdnussextrakten

Verwendete Pufferlösungen:

Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer 0,1 M NH_4HCO_3 , pH 8,0

Durchführung:

Ganze Erdnüsse wurden ausgepaalt. Das Erdnussmehl wurde durch das Zermahlen tief gefrorener Erdnuskerne in einer Mulinette-Kaffeemühle gewonnen. 30 g dieses Mehles wurden über Nacht bei 4 °C in 250 ml Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer extrahiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes folgte die Zentrifugation der trüben Lösung für 15 min bis 1 h (je nach Fettgehalt der Erdnüsse) bei 4 °C und 10000 x g. Nach vier Filtrationsschritten über Zelluloseacetatfilter an einer Wasserstrahlpumpe mit absteigender Porengröße von 8, 0,8, 0,45 und 0,2 µm wurde der Extrakt gegen zwei Liter Aqua bidest. über Nacht bei 4 °C dialysiert. Am nächsten Morgen wurde das Wasser gewechselt und der Extrakt weitere zwei Stunden dialysiert. Anschließend erfolgte die Portionierung und ein rasches Einfrieren bei -80 °C für mindestens fünf Stunden, woraufhin der Extrakt lyophilisiert werden konnte.

Die Proteinkonzentration wurde nach der Bradford-Methode (siehe 2.2.2) mit Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin (BSA)) als Standard bestimmt (PIERCE Reagenz, Perbio Science). Die Ausbeute variierte je nach der Erdnusscharge von 8-10 mg/ml, das entspricht 6,7-8,3 % der Erdnusseinwaage.

2.2.1.1 Extrakte aus keimfähigen und gerösteten Erdnüssen

Um einen Vergleich mit nativen, d. h. keimfähigen Erdnüssen zu erhalten, wurde eine entsprechende Menge von keimfähigen Erdnusskernen für die analoge Herstellung von Erdnussextrakt (EEx-k) verwendet. Die Ausbeute betrug 14,375 mg/ml, das entspricht 11,93 % der Einwaage.

Zusätzlich wurde ein Extrakt aus keimfähigen Erdnüssen analog hergestellt, wobei dem Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer noch 10 % Laktose zugesetzt wurden, um eine mögliche Komplexbildung der Proteine zu unterbinden. Die Proteinbestimmung ergab eine Ausbeute von 15,469 mg/ml, entsprechend 12,84 % Proteinausbeute bezogen auf die Einwaage.

Außerdem sollte im Rahmen des EU-Projektes FAREDAT ein Vergleich mit dänischen gerösteten Erdnüssen einen Überblick über mögliche Veränderungen der Allergen-zusammensetzung bei dem Röstprozess geben. Dazu wurde ebenfalls analog zu dem oben beschriebenen Extraktionsprinzip gerösteter Extrakt hergestellt mit einer Ausbeute von 10,94 mg/ml, entsprechend 9,1 % der Einwaage.

2.2.1.2 Extrakte aus gekochten und fritierten Erdnüssen

Um den Einfluss der Zubereitungsart auf die Allergenzusammensetzung zu untersuchen, wurden folgende Extrakte hergestellt:

- Erdnussextrakt aus gekochten Erdnüssen

20 g der keimfähigen Erdnüsse wurden 20 min in 400 ml Leitungswasser gekocht und dann kurz kalt abgeschreckt. Die Zerkleinerung von 10 g dieser bräunlich erscheinenden Nüsse erfolgte wieder in der Mulinette. Das feine Mehl wurde mit 83 ml Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer versetzt und über Nacht extrahiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte analog (2.2.1). Die Proteinkonzentration betrug 1,613 mg/ml, das entspricht 1,34 % der Einwaage. Allerdings erwies sich das Lyophilisat nur noch in PBS-Puffer gut löslich, nicht mehr in Aqua bidest..

- Erdnussextrakt aus fritierten Erdnüssen

20 g der keimfähigen Erdnüsse wurden für 5 min in 50 ml Mazola® Maiskeimöl fritiert. Die Zerkleinerung von 10 g der rötlichen Nüsse zu sehr feinem Mehl erfolgte in der Mulinette. Die Extraktion erfolgte analog (2.2.1) in 83 ml Puffer über Nacht. Nach der Filtration wurde der Extrakt nicht dialysiert, da der hohe Ölgehalt dieses verhindert hätte. Daher wurde der Extrakt nur lyophilisiert. Die anschließende Proteinbestimmung des in Aqua bidest. löslichen Extraktes ergab eine Proteinkonzentration von 1,025 mg/ml, die einer Ausbeute von 0,85 % entspricht.

2.2.1.3 Extrakte aus verarbeiteten Erdnuss-Produkten

Für die Herstellung des Corny-Riegel-Extraktes wurde die Schokoladenunterseite von dem Flockengemisch entfernt und getrennt von diesem zermahlen. Die weitere Aufarbeitung erfolgte analog (2.2.1) in 210 ml Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer. Die Proteinbestimmung des Lyophilisates ergab eine Proteinkonzentration von 4,25 mg/ml, also eine Ausbeute von 3,57 % bezogen auf die Einwaage.

Für die Herstellung des Snickers-Riegel-Extraktes wurde der Schokoladenriegel in kleine Stücke zerbrochen und anschließend in der Mulinette portionsweise zermahlen. Die weitere Aufarbeitung erfolgte analog (2.2.1) in 225 ml Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer. Die Proteinbestimmung des Lyophilisates ergab eine Proteinkonzentration von 5,688 mg/ml (Ausbeute von 2,84 %).

Für die Herstellung des Peanut-Cracker-Extraktes wurden die einzelnen Cracker zunächst grob zerkleinert und dann in der Mulinette portionsweise zermahlen. Die weitere Aufarbeitung erfolgte analog (2.2.1) in 492 ml Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer. Die Proteinbestimmung des Lyophilisates ergab eine Proteinkonzentration von 2,188 mg/ml (Ausbeute von 1,82 %).

2.2.1.4 Herstellung von Extrakten aus Nahrungsrohmaterial zum Vergleich mit verarbeiteten Produkten

Für einen Vergleich mit den Weizenflocken, die in dem Corny-Riegel enthalten sind, wurde aus gekauften Weizenkörnern nach der beschriebenen Anleitung für die Herstellung von Erdnussextrakt Weizenkornextrakt hergestellt. Aus 30 g Weizen konnten 2,25 mg/ml Protein gewonnen werden, das entspricht 1,88 %.

Außerdem sind in dem Riegel Reisflocken enthalten, so dass aus handelsüblichen Reiskörnern ebenfalls nach Anleitung ein Reiskornextrakt hergestellt wurde. Die Proteinbestimmung ergab 8 mg/ml und somit eine Ausbeute von 6,67 %.

2.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Für die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) wurde das Coomassie-Pierce-Reagenz (Perbio Science) verwendet. Jeweils 980 μ l des Coomassie-Reagenz wurden in vorbereitete Eppendorfgefäße pipettiert. Eine Eichreihe mit Rinderserumalbumin (BSA) mit Konzentrationen von 1000 μ g/ml, 500 μ g/ml, 250 μ g/ml, 125 μ g/ml und 62,5 μ g/ml wurde angesetzt. 20 μ l dieser Konzentrationen wurden in einer Dreifachbestimmung zu der Coomassie-Lösung gegeben (Endvolumen 1 ml). Bei den Proteinproben war zu beachten, dass die zu erwartende Extinktion im linearen Bereich der Kurve liegt. So erwies sich eine Vorverdünnung von z. B. 1:100 bei der Extrakt Herstellung oft als sinnvoll. Die Extinktion wurde bei 595 nm im Photometer (Ultrospec III, Pharmacia; Eppendorf) bestimmt. Als Leerwert diente Aqua bidest. anstelle der Proteinlösungen.

2.2.3 Chromatographische Auftrennung des Erdnuss-extraktes mit der HPLC

2.2.3.1 Gelfiltrations-Chromatographie

Prinzip:

Das Prinzip der Gelfiltrations-Trennmethode ist die unterschiedliche Interaktion der Proteine mit der porösen Matrix der Säule je nach Molekülgröße. Ist ein Molekül bei der verwendeten Superdex 200-Säule kleiner als 200 kDa, so kann es bis in die kleinsten Poren der Säulenmaterialies gelangen und wird entsprechend eine längere Retentionszeit haben. Aufgrund der Ausschlussgröße von über 200 kDa kann kein größeres Molekül in die Poren gelangen und befindet sich daher im Ausschlussvolumen.

Verwendete Pufferlösungen und Eichproteine:

Proteintestmischung 1 enthielt die Eichproteine mit folgenden Molekulargewichten:

| | |
|--------------|------------|
| Ferritin | [440 kDa] |
| Aldolase | [158 kDa] |
| Ovalbumin | [46 kDa] |
| Ribonuklease | [13,7 kDa] |

Proteintestmischung 2 enthielt die Eichproteine mit folgenden Molekulargewichten:

| | |
|------------------|-----------|
| Catalase | [232 kDa] |
| Albumin | [67 kDa] |
| Chymotrypsinogen | [25 kDa] |

Kaliumhydrogenphosphat-Puffer: 50 mM K_2HPO_4
0.5 M NaCl
pH 7.5

Durchführung:

Für die qualitative Analytik wurden 1 mg Protein pro Lauf über eine vorgefertigte Superdex 200-Säule mit einer Länge von 34 cm und einem Durchmesser von 1,5 cm an einem Äkta-Purifier-System (Amersham Biosciences) gegeben. Die Auftrennung mit

Material und Methoden

Kaliumhydrogenphosphat-Puffer als Laufmittel erfolgte nach vorhergehender Eichung der Säule. Der Lauf wurde in 0,5 ml großen Fraktionen gesammelt und nach dem Einengen in der Speedvac in 100 µl Aqua bidest. aufgenommen. Unter SDS-PAGE-Kontrolle wurden gleichartige Fraktionen des Ausschlussvolumens zusammengestellt. Diese Fraktion 1 (B9-B15) mit einem Proteingehalt von 0,5-5 mg/ml wurde gepoolt, dialysiert und lyophilisiert.

Für die präparative Analytik wurde das Äkta-Prime System (Amersham biosciences) genutzt.

Verwendete Pufferlösungen:

| | |
|---------------------------------|---|
| Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer | 0,2 M (NH ₄)HCO ₃ 1 Tablette Complete |
|---------------------------------|---|

28,5 mg Protein wurden in 3 ml Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer pro Lauf auf eine im Labor gegossene Superdex-200-Säule mit einer Gelbettlänge von 20 cm und einem Durchmesser von 5 cm aufgegeben. Als Schutz vor enzymatischen Degradationen während der längeren Laufzeit wurde der Proteaseinhibitor Complete verwendet. Die 5 ml großen Fraktionen des Ausschlussvolumens wurden unter SDS-PAGE-Kontrolle in größeren Fraktionen gepoolt (1 a-c entsprechen B7-B10, B11-B13, B14-B15), dialysiert und lyophilisiert.

2.2.3.1.1 Entsalzung der Proteinlösungen

Das Entsalzen von Proteinlösungen wurde mittels Gelfiltrations-Chromatographie mit PD-10-Säulen (Amersham Biosciences) durchgeführt.

Die Säule wurde mit 25 ml Aqua bidest. äquilibriert. Anschließend wurde die in 2,5 ml Gesamtvolumen befindliche Probe auf die Säule gegeben und mit 3,5 ml Aqua bidest. eluiert. Nach erfolgter Entsalzung wurde die Proteinkonzentration erneut bestimmt.

Eine weitere Gelfiltrations-Methode der Umpufferung kam bei den Fraktionen der chromatographischen Auftrennungen mit den HiTrap-Säulen zum Einsatz.

Verwendete Pufferlösungen:

| | |
|---------------------------------|---|
| Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer | 0,1 M NH ₄ HCO ₃ pH 8,0 |
|---------------------------------|---|

Für die Umpufferung wurden 3 mit Sephadex G-25 gefüllte 5 ml-HiTrap-Säulen hintereinandergesetzt und an das Äkta-Prime System angeschlossen. Die Proben wurden mit Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer bei einer Flussrate von 5 ml/min umpuffert. Die Elution der Probe wurde im Durchflussphotometer verfolgt. Bei der anschließenden Lyophilisation wurde das Ammoniumhydrogencarbonat entfernt, so dass die Probe entsalzt war.

2.2.4 Elektrophoretische Trennmethoden

2.2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli (1970) wurden 12 % Polyacrylamidgele verwendet, die aus einem Sammel- und einem Trenngel bestanden.

Material und Methoden

Prinzip der SDS-PAGE nach Laemmli:

Das Prinzip dieser Proteintrennung beruht auf der Aufkonzentrierung der Proteine im Sammelgel und der Trennung nach Molekulargewicht im anschließenden Trenngel. Durch Zugabe von SDS wird die ursprüngliche Ladung der Proteine proportional zum Molekulargewicht negativ beladen. Diese anionischen Micellen wandern dann im elektrischen Feld entsprechend dem reziproken Wert des dekadischen Logarithmus proportional ihres Molekulargewichtes, so dass kleine Moleküle sehr viel schneller wandern als große Proteine. Durch einen bei jedem Lauf mitzuführenden Molekulargewichtsmarker lässt sich dann die Größe der Proteine bestimmen. Die Porengröße der Gele ist dabei abhängig von dem Verhältnis von Acrylamid (Ac) zu Bisacrylamid (Bis) und wird angegeben als Gesamtkonzentration T (Total) und Vernetzungsgrad C (Crosslinker).

$$\% T = \frac{Ac + Bis}{Vol} \times 100$$

$$\% C = \frac{Bis}{Ac + Bis} \times 100$$

Die Polymerisation der Acrylamid-Bisacrylamidlösung zu einer beständigen Gelmatrix wird durch die Katalysatoren TEMED und Ammoniumpersulfat erreicht.

Verwendete Lösungen:

Elektrodenpuffer:

50 mM Tris pH 8,3
384 mM Glycin
0,1 % SDS (w/v)

Sammelgelpuffer (4x):

0,5 M Tris/HCl pH 6,8

Trenngelpuffer (4x):

1,5 M Tris/HCl pH 8,8

Probenpuffer (reduzierend, 2x):

200 mM Tris/HCl pH 8,0
20 mM EDTA
25 % Glycerin (87 %) (v/v)
2 % SDS (w/v)
1 % DTE (w/v)
0,02 % Bromphenolblau (v/v)

Probenpuffer (nicht reduzierend, 2x):

(wie reduzierender Probenpuffer, aber ohne DTE)

Ammoniumpersulfatlösung (APS):

10 % APS (w/v) in Aqua bidest

Pyronin G:

1 % Pyronin G in Sammelgelpuffer (4x)

Angaben für die Herstellung zweier SDS-Gele:

| Reagenz | 12 % Trenngel | 4 % Sammelgel |
|--|---------------|---------------|
| Aqua bidest | 5,5 ml | 2,9 ml |
| Acrylamidkonzentration (T = 30 %, C = 2,5 %) | 6,5 ml | 0,85 ml |
| Trenngelpuffer (4x) | 4,0 ml | - |
| Sammelgelpuffer (4x) | - | 1,3 ml |
| Pyronin G | - | 16 µl |
| SDS (10 %) | 163 µl | 51 µl |
| TEMED | 16 µl | 5 µl |
| APS (10 %) | 100 µl | 30 µl |

Durchführung:

Die Gelkassetten wurden ungefähr zu 2/3 mit der frisch hergestellten Trenngellösung beschickt und mit n-Butanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Butanol entfernt, das Gel mit Aqua bidest. gespült und überschüssiges Wasser vorsichtig mit Filterpapier entfernt. Anschließend wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen, in das sofort ein entsprechender Gelkamm mit unterschiedlichen Taschen-Größen eingesetzt wurde. Nach Polymerisation im Wärmeschrank wurde der Kamm entfernt, die Taschen gespült und die Elektrophoreseapparatur aufgebaut. Parallel dazu wurden die Proben vorbereitet. Die Proteine wurden für 5 min bei 95 °C denaturiert, anschließend wurden die unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert. Nach dem Befüllen mit Elektrodenpuffer wurden die klaren Überstände der Proben in die Geltaschen und der genauso vorbereitete Molekulargewichtsmarker (Low Range, Biorad) luftblasenfrei appliziert und der Lauf gestartet. Der Lauf fand bis zum Einlaufen der Proben in das Sammelgel bei einer Spannung von 50 Volt statt und innerhalb des Trenngeles bei 100 –150 Volt. Nach dem Ende der Elektrophorese wurde das Gel gefärbt oder für einen Elektrobplot eingesetzt.

2.2.4.2 Blue-Native Gelelektrophorese (BN-PAGE) nach Schägger und von Jagow (1988)

Prinzip:

Die Proteine bleiben bei der Blue-Native Gelelektrophorese im Unterschied zu der SDS-PAGE in ihrer dreidimensionalen Struktur weitgehend erhalten. Sie werden durch die Beladung mit dem sauren Coomassie-Farbstoff (Serva G-250) negativ geladen und wandern dadurch im elektrischen Feld entsprechend ihres Molekulargewichtes. Der Farbstoff bindet adsorptiv an die hydrophoben Oberflächenstrukturen der Proteine und zerstört weder ihre Struktur noch ihre biologische Funktion. Durch die Beladung werden die Proteine nur leicht beeinflusst.

Analytische blue native Gelelektrophorese (BN-PAGE):

Um einen Überblick über den gesamten Molekulargewichtsbereich der nativen Proteine zu erhalten, wurde ein spezielles Acrylamid verwendet (ProSieve®, Biozym).

Material und Methoden

Diese Gele sollten einem Gradientengel entsprechend eine optimale Auftrennung in einem Molekulargewichtsbereich von 5 bis 300 kDa ermöglichen.

Verwendete Lösungen:

ProSieve® 50 Gellösung:

(Angaben des Herstellers,* können enthalten sein)

- 50-70 % Aqua bidest.
- 20-40 % Acrylamid
- 5-15 % N-Methylolacrylamid
- < 2* % Bis-Acrylamid Dimethylether
- < 2* % Diaceton Acrylamid
- < 2* % Di (Ethylenglycol) Diacrylat
- < 2* % Tetra (Ethylenglycol) Diacrylat
- < 2* % Methylen-Bis-Acrylamid
- < 0,3 % Formaldehyd

Probenpuffer (4x): (variiert nach NuPAGE)

- 32,5 % Glycerin (87 %) (v/v)
- 563 mM Tris Base
- 423 mM Tris HCl
- 1,61 mM EDTA
- 0,075 % Serva G250 (1 %) (w/v)
- 0,0005 % Phenolrot (2000x)
- pH 8,5

Nativer Elektrodnpuffer (variiert nach Laemmli,10x):

- 50 mM Tris
- 384 mM Glycin
- pH 8,3

Ansatz für zwei 8 %ige BN-PAGE-Gele:

| Reagenz | 8 % Trenngel | 5 % Sammelgel |
|--|--------------|---------------|
| Aqua bidest | 5,8 ml | 1,52 ml |
| ProSieve-Acrylamid-konzentration (~8 % T) | 1,6 ml | 200 µl |
| Trenngelpuffer (4x) | 2,5 ml | - |
| Sammelgelpuffer (4x) | - | 260 µl |
| Pyronin G | - | 8 µl |
| TEMED | 4 µl | 2 µl |
| APS (10 %) | 100 µl | 20 µl |

Durchführung:

Die Gele wurden nach dem bereits beschriebenen Aufbau der SDS-PAGE (2.2.5.1) gegossen, wobei das Acrylamid von ProSieve® verwendet (T ~ 8 %) und kein SDS hinzugefügt wurde. Als Puffersystem diente Elektrodnpuffer nach Laemmli, aber ohne SDS. Nach Zugabe des nativen Probenpuffers (bei RT) wurden die Lösungen

Material und Methoden

zentrifugiert und die klaren Überstände in die Taschen pipettiert. Es werden nur ca. 8 µg / cm Geltasche aufgetragen. Der Elektrophoreselauf wurde bei 100 V bis zum Einlaufen in das Sammelgel und anschließend bei 150 – 200 V durchgeführt, um eine gleichmäßige Wanderung der Proteine ihrem Molekulargewicht und ihrer Ladung entsprechend zu ermöglichen. Als Marker dienten die Molekulargewichtsmarker (ProSieve) und MultiMark (Invitrogen).

Präparative blue native Gelelektrophorese (BNP):

Für präparative Analysen wurden 4-20 % Tris-Glycin-Zoomgele, 8 % oder 10 % Tris-Glycin-Gele [Invitrogen und Anamed] mit nativen Laemmli-Puffer verwendet.

Nativer Elektrodenpuffer (variiert nach Laemmli, 10x):

50 mM Tris
384 mM Glycin
pH 8,3

Probenpuffer (4x): (variiert nach NuPAGE)

32,5 % Glycerin (87 %) (v/v)
563 mM Tris Base
423 mM Tris HCl
1,61 mM EDTA
0,075 % Serva G250 (1%) (w/v)
0,0005 % Phenolrot (2000x)
pH 8,5

Durchführung:

Diese Gele wurden mit bis zu 30 mg / cm Geltasche beladen. Als Molekulargewichtsmarker wurde hier der vorgefärbte MultiMark (Invitrogen) verwendet. Der Lauf fand bei 50 V bis zum Einlaufen des Markers und dann bei 100 – 150 V bis zum Ende der Elektrophorese statt. Anschließend wurden die Proteine mit Hilfe von Thermoblotting (2.2.6.1) auf NC-Membranen oder mittels Elektroblooming (2.2.6.3) auf PVDF-Membranen (beide zunächst Schleicher & Schüll, später Millipore) transferiert und die Gele gefärbt.

Für präparative Analysen mit folgender Tricin-SDS-PAGE wurden 4,5-16 %ige Gradientengele in der Protean II Gelelektrophorese-Kammer (BioRad) verwendet.

Verwendete Pufferlösungen:

Kathodenpuffer (5x):

250 mM Tricin
75 mM Bis-Tris
0,1 % Coomassie G 250 (w/v)
pH 7,0 (bei 4 °C mit HCl)

Anodenpuffer (6x):

300 mM Bis-Tris
pH 7,0 (bei 4 °C mit HCl)

ACA 750 (6x): 1,5 M ACA (Aminocaprinsäure)

Material und Methoden

100 mM Bis-Tris
1 mM EDTA
pH 7,0 (bei 4 °C mit HCl)

Gelpuffer (6x): 1,5 M ACA 750
150 mM Bis-Tris
pH 7,0 (bei 4 °C mit HCl)

5 % Serva Blau G: 750 mM ACA
5 % Coomassie G 250 (w/v)

Probenpuffer: ACA 750 750 µl
n-Dodecylmaltosid (10 %) (w/v) 150 µl
5 % Serva Blau G 150 µl

Ansatz für ein großes Gel:

| Reagenz | 4,5 % Trenngel | 16 % Trenngel | 4 % Sammelgel |
|-----------------------------|----------------|---------------|---------------|
| Aqua bidest | 15,6 ml | 6 ml | 11,3 ml |
| Acrylamid (49,5 T / 3 C) | 1,9 ml | 6 ml | 1,2 ml |
| Gelpuffer (6x) | 3,5 ml | 3 ml | 2,5 ml |
| 100 % Glycerin | - | 3,5 ml | - |
| APS (10 %) | 95 µl | 61 µl | 65 µl |
| TEMED | 9,5 µl | 6,1 µl | 6,5 µl |

Durchführung:

Alle Lösungen und Geräte wurden über Nacht bei 4 °C vorgekühlt. Nach dem Aufbau des Protean-Systems wurde zunächst von unten mit einer Injektionsnadel Aqua bidest. zwischen die Glasplatten gepumpt. Anschließend wurden die Lösungen für das Gradientengel hergestellt und in den Gradientenmischer pipettiert. Nach dem Mischen und Kühlen (10 min bei -20 °C) wurden APS und TEMED zugefügt. Zunächst wurde die 4,5 %ige Lösung langsam unter das als Overlay-Lösung dienende Aqua bidest. in die Gelkammer gepumpt. Enthielten beide Kammern des Gradientenmischers das gleiche Volumen, wurde auch die hintere Kammer (16 %ige Lösung) geöffnet und der Gradient wurde gebildet. Zum Polymerisieren blieb das Gel ca. 45 min bei 37 °C stehen. Anschließend wurde die Overlay-Lösung abgegossen, das Sammelgel (4 %) eingefüllt und mit einem Kamm versehen. Die vollständige Polymerisation dauerte mindestens 4 Stunden. Am nächsten Tag wurde das Gradientengel mit Agarose abgedichtet und in die Laufkammer überführt. Zunächst wurde dem verdünnten Kathodenpuffer 0,03 % Dodecylmaltosid zugefügt, dann wurde die Kathodenkammer befüllt. Anschließend wurde der verdünnte Anodenpuffer in die umgebende Kammer eingefüllt und die Apparatur für 30 min bei 4 °C stehengelassen.

Die Proben (max. 1 mg Protein) wurden zunächst für 5 min bei 14000 rpm (4 °C) zentrifugiert. Das Pellet oder Lyophilisat wurde in 75 µl ACA 750 resuspendiert, mit 15 µl Dodecylmaltosid versetzt und für mindestens 30 min bei 14000 rpm (4 °C) zentrifugiert, bis der Überstand klar blieb. Dieser Überstand wurde mit 5 % Serva Blau versetzt (Endkonzentration 0,6-1,2 %) und auf den Grund der Geltaschen pipettiert.

Material und Methoden

Der Lauf fand bis zum Einlaufen der Proben bei 6-7 mA (100 V) statt, nach 45 min bei 15 mA (max. 500 V).

2.2.4.3 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Prinzip der isoelektrischen Fokussierung (IEF):

Für die isoelektrische Fokussierung werden Immobiline (pH 3-10 oder 4-7) in eine Gelmatrix einpolymerisiert, so dass ein immobilisierter pH-Gradient innerhalb des Gelstreifens entsteht. Nach der Rehydratation der Gelstreifen wandern die positiv oder negativ geladenen Proteine eines Gemisches durch das Anlegen einer Spannung im elektrischen Feld zu ihrem jeweiligen isoelektrischen Punkt (pI), an dem sich ihre Ladung neutralisiert. Die Proteine werden durch die Ordnung an ihrem pI getrennt.

Zusammensetzung der Lösungen:

Rehydrationspuffer: (1 ml Aliquots werden eingefroren)

- 8 M Harnstoff
- 2 % CHAPS (w/v)
- 0,5 % Ampholyte (v/v) (pH 3-10 oder 4-7)
- 0,002 % Bromphenolblau
- + 20 mM DTT (direkt vor Gebrauch, entfällt bei nicht reduzierender IEF)

Kathodenpuffer pH 3-10 (10x): (vor Gebrauch 200x verdünnen)

- 20 mM Lysin
- 20 mM Arginin
- pH 10,1

Anodenpuffer (50x) : (vor Gebrauch 175x verdünnen)

- 7 mM Phosphorsäure (85 %) (v/v)
- pH 2,4

Durchführung:

Die Proteinlösungen mussten weitgehend entsalzt sein (<20 mM Salz). Die zu fokussierenden Proteine wurden in geeigneter Konzentration (5 µg Protein für analytische Zwecke, 200 µg für die präparative Verwendung) in Aqua bidest. oder direkt in Rehydrationspuffer mit DTT aufgenommen. Das Probenvolumen pro Streifen betrug 155 µl. Dieses wurde luftblasenfrei in die Fokussierungskammer pipettiert. Der IEF-Streifen wurde mit der Gelseite nach unten in die vorbereitete Kammer überführt. Nach Rehydratisierung über Nacht erfolgte am nächsten Morgen die Fokussierung in der ZoomRunner-Kassette (Invitrogen). Dazu wurde die Schutzschicht über den Elektroden abgezogen und je ein Elektrodenstreifen mit 750 µl Aqua bidest. oder Anoden- bzw. Kathodenpuffer getränkt. Nach dem Absaugen von überschüssiger Flüssigkeit wurde die äußere Kammer mit Wasser als Kühlmittel gefüllt und dann die Fokussierung gestartet.

Optimierte Fokussierbedingungen an der Multiphor:

| | |
|----------|--------|
| 20 Min | 200 V |
| 15 Min | 450 V |
| 15 Min | 750 V |
| 1 Stunde | 2000 V |

Material und Methoden

Die Stromstärke war während der gesamten Fokussierzeit auf 2 mA und 2 Watt begrenzt.

Zusätzlich wurde eine nicht reduzierende IEF ohne Zugabe von Reduktionsmitteln durchgeführt. Somit wurden die Disulfidbrücken der Proteine nicht zerstört. Die Proteine werden durch die Beladung mit Coomassie negativ beladen und wandern zu ihrem isoelektrischen Punkt. Dieser ist nicht identisch mit dem isoelektrischen Punkt der Moleküle, der durch die sauren und basischen Seitenketten der Proteine nach vollständiger Entfaltung durch Reduktion vorhanden ist. Die Inkubations- und Fokussierungszeiten waren analog.

2.2.4.4 Doppelt 1-dimensionale Gelelektrophoresen (D-1D)

Prinzip der D-1D-Auftrennungen:

Bei der D-1D-Elektrophorese wurden Proteine nacheinander mittels zweier verschiedener Verfahren in der gleichen Trennungsrichtung aufgetrennt.

So wurden einzelne Banden der BN-PAGE ausgeschnitten, nach LDS-Behandlung in der anschließenden LDS-PAGE erneut getrennt. Je nach Fragestellung fand die Äquilibration dabei unter nicht reduzierenden oder reduzierenden Bedingungen durch Zugabe von DTT statt. Das Lithiumdodecylsulfat (LDS) wurde als Detergenz eingesetzt, um die hydrophoben Wechselwirkungen der Proteinfragmente aufzuheben. Die Besonderheit des LDS ist die im Vergleich mit dem normalerweise verwendeten Natriumdodecylsulfat (SDS) bessere Löslichkeit in dem Gel auch bei niedrigen Temperaturen. Hierdurch wird ein deutlich reduzierter Hintergrund erreicht.

Zusammensetzung der Lösungen:

LDS-Probenpuffer (4x): (NuPAGE)

- 32,5 % Glycerin (87 %) (v/v)
- 563 mM Tris Base
- 423 mM Tris HCl
- 294 mM Lithiumdodecylsulfat (LDS)
- 1,61 mM EDTA
- 0,075 % Serva G250 (1%) (w/v)
- 0,0005 % Phenolrot (2000x)
- pH 8,5

MOPS-Laufpuffer (Konzentrat 1:20 verdünnen): (Angaben des Herstellers)

- 1 M MOPS (3-(N-morpholino) propansulfonsäure
- 1 M Tris Base
- 69,3 mM SDS
- 20,5 mM EDTA
- pH 7,7

Durchführung:

Aus dem Gel der BN-PAGE wurden angefärbte Proteinbanden mit gleichem Molekulargewicht ausgeschnitten. Diese wurden in LDS-Probenpuffer unter Schütteln für eine Stunde unter nicht reduzierenden oder reduzierenden Bedingungen (mit 0,5 Mol Dithiothreitol) in Eppendorfgläsern inkubiert und anschließend mit einem Teil des Puffers in die Tasche des zweiten Geles überführt.

Material und Methoden

Die Elektrophorese erfolgte in einem 10 %igen Bis-Tris-Gel (Invitrogen) mit dem Laufpuffer MOPS bei 50-100 V. Anschließend folgten Thermoblotting und die Coomassie-Färbung.

Prinzip der nicht reduzierenden und reduzierenden LDS-PAGE:

Bei dieser D-1D-PAGE wurden die Proteine zunächst nach LDS-Behandlung unter nicht reduzierenden Bedingungen und ohne Hitzedenaturation aufgetragen und getrennt. Die entstehenden Banden wurden dann ausgeschnitten und auf einem zweiten LDS-Gel nach Äquilibrierung mit DTT in der zweiten Dimension erneut nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Durchführung:

Die Trennung der Proteine wurde in der ersten Dimension mit 10 oder 12 %igen Bis-Tris-Gelen (Invitrogen) unter nicht reduzierenden Bedingungen mit MOPS-Puffer durchgeführt. Der Lauf fand bei 50 – 150 V statt und wurde mit dem Molekulargewichtsmarker MultiMark verfolgt. Das Gel wurde nach dem Thermoblotting zur Kontrolle der IgE-Reaktivität und Antikörperbindungen Coomassie gefärbt (2.2.6.1.1). Anschließend wurden die gefärbten Proteinbanden horizontal ausgeschnitten und in LDS-Probenpuffer mit Zusatz von 0,5 Mol DTT für 1 h unter Schütteln inkubiert. Danach wurden die Gelstreifen in die Taschen des zweiten Geles überführt, wobei abermals MOPS-Puffer als Laufpuffer diente, der aber noch 500 µl Antioxidant (entsprechend 0,5 M DTT, Invitrogen) enthielt. Die Trennparameter blieben gleich und nach Abschluss der Elektrophorese folgte Thermoblotten und Coomassie-Färbung des Geles.

2.2.4.5 Zweidimensionale Gelelektrophoresen (2D)

Das Prinzip der 2D-PAGE beruht darauf, dass Proteingemische in zwei aufeinander folgenden elektrophoretischen Trennmethode separiert werden, wobei die Trennrichtungen senkrecht zueinander stehen.

Hier wurden die Trennungen zunächst in der Abfolge **IEF / LDS-PAGE** durchgeführt, wobei die Proteine zunächst in der ersten Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt getrennt werden. In der zweiten Dimension, der LDS-PAGE, werden sie nach LDS-Behandlung entsprechend ihrem Molekulargewicht getrennt. Bei der Auftrennung unter nicht reduzierenden Bedingungen blieben die Disulfidbrücken der Proteine erhalten. Dann wanderten die Proteine durch die Beladung mit Coomassie entsprechend ihrem Molekulargewicht. Für die Auftrennung unter reduzierenden Bedingungen wurden die Proteine mit DTT reduziert. Eine Rückfaltung der Disulfidbrücken wurde durch anschließende Alkylierung mit Jodacetamid verhindert.

Zusammensetzung der Lösungen:

Äquilibrierungspuffer I (Reduktion): (entspricht LDS-Probenpuffer (4x))

32,5 % Glycerin (87 %) (v/v)
563 mM Tris Base
423 mM Tris HCl
294 mM LDS
1,61 mM EDTA

Material und Methoden

0,075 % Serva G250 (1%) (w/v)
0,0005 % Phenolrot (2000x)

Ansatz Äquibrierungspuffer I (1:4 verdünnt, pH 8,5)
+ 0,5 ml DTT (0,5 M)

Äquibrierungspuffer II (Alkylierung):

(entspricht LDS-Probenpuffer (4x), aber ohne Zugabe von DTT)

Ansatz Äquibrierungspuffer II (1:4 verdünnt, pH 8,5)
+ 116 mg Jodacetamid (125 mM)

Nativer Probenpuffer (4x) als Äquibrierungspuffer bei nativer PAGE:

32,5 % Glycerin (87 %) (v/v)
563 mM Tris Base
423 mM Tris HCl
1,61 mM EDTA
0,075 % Serva G250 (1%) (w/v)
0,0005 % Phenolrot (2000x)

MES-Laufpuffer (Konzentrat 1:20 verdünnen): (Angaben des Herstellers)

1 M MES (2-(N-morpholino) ethansulfonsäure)
1 M Tris Base
69,3 mM SDS
20,5 mM EDTA
pH 7,3

MOPS-Laufpuffer (Konzentrat 1:20 verdünnen): (Angaben des Herstellers)

1 M MOPS (3-(N-morpholino) propansulfonsäure)
1 M Tris Base
69,3 mM SDS
20,5 mM EDTA
pH 7,7

Elektrodenpuffer bei nativer PAGE (variiert nach Laemmli, 10x):

50 mM Tris
384 mM Glycin
pH 8,3

Durchführung:

Unter reduzierenden Bedingungen wurden die Gelstreifen mit den fokussierten Proteinen zunächst in Äquibrierungspuffer I für 15 min inkubiert. Dieser wurde dekantiert und durch Äquibrierungspuffer II für 15 min ersetzt. Die Streifen konnten dann mit ihrem Pluspol zum Marker (MultiMark) luftblasenfrei in die Tasche des 4-20 %igen Tris-Glycin-Geles (NuPAGE) gelegt werden, wobei die überstehenden gelfreien Plastikenden abgeschnitten werden mussten. Dann wurde der Streifen mit erwärmter 0,5 %iger Agarose überschichtet. Der Lauf mit MES-Laufpuffer fand bei 50 Volt bis zum Einlaufen des Markers und dann bei 100 – 150 V statt. Nach dem Ende der Elektrophorese wurde das Gel geblottet (Thermo- und/ oder Elektrolot) und gefärbt (Coomassie- oder Silber-Färbung für Gele).

Im Anschluss an die **nicht reduzierende oder reduzierende IEF** konnte auch eine **native PAGE** durchgeführt werden. Dazu wurden die Streifen nach der IEF nur 30 min in nativem Probenpuffer inkubiert und anschließend in das 4-20 %ige Tris-Glycin-Gel

Material und Methoden

überführt. Die Laufparameter waren identisch zu der reduzierenden 2D-PAGE, allerdings wurde nativer Laemmli-Puffer ohne SDS als Laufpuffer eingesetzt.

Eine weitere zweidimensionale elektrophoretische Auftrennung in der Abfolge **BN-PAGE/ reduzierende LDS-PAGE** oder **nicht reduzierende LDS-PAGE/ reduzierende LDS-PAGE** wurde analog der D-1D-PAGE (2.2.4.4) durchgeführt. Dazu wurden Proteinbanden ausgeschnitten, die den ganzen Molekulargewichtsbereich abdeckten und zunächst mit DTT reduziert. Dann wurden die Streifen in das 10 oder 12%ige Bis-Tris-Gel der zweiten Dimension überführt, ebenfalls mit Agarose überschichtet und die Elektrophorese bei 50-150 V mit MOPS-Puffer durchgeführt.

Schließlich wurde noch eine Kombination aus drei aufeinanderfolgenden Trennungen entwickelt. Hierzu wurde zunächst die **nicht reduzierende IEF** mit **reduzierender LDS-PAGE** kombiniert. Aus dem mit Coomassie gefärbten Gel der zweiten Dimension konnten einzelne Spots ausgeschnitten und erneut für 1 h reduziert werden. Anschließend wurden die Proben mit dem Probenpuffer in die Taschen der **zweiten reduzierenden LDS-PAGE** überführt. Dabei handelte es sich um ein 10 oder 12 %iges Bis-Tris-Gel (Invitrogen). Die Elektrophorese wurde mit MOPS-Puffer bei 50-150 V durchgeführt. Nach dem Ende des Laufes wurden die Gele geblottet (Thermo- oder Elektroblood) oder Coomassie-gefärbt.

Eine Besonderheit der zweidimensionalen elektrophoretischen Trennungen stellte die Abfolge **BN-PAGE** und **reduzierende Tricin-SDS-PAGE** dar.

Für präparative Analysen mit folgender Tricin-SDS-PAGE wurden 4,5-16 %ige Gradientengele in der Protean II Gelelektrophorese-Kammer (BioRad) verwendet.

Verwendete Pufferlösungen:

Kathodenpuffer: 0,1 M Tris
0,1 M Tricin
0,1 % SDS (v/v, 10 % Lsg.)
pH 8,25

Anodenpuffer: 0,2 M Tris
pH 8,9 (mit HCl)

Overlay-Lösung: 1 M Tris
0,1 % SDS (v/v, 10 % Lsg.)
pH 8,45 (mit HCl)

Tricin-Puffer: 3 M Tris
0,3 % SDS (v/v, 10 % Lsg.)
pH 8,45 (mit HCl)

Reduktionslösung:

1 % SDS (w/v)
1 % β -Mercaptoethanol (v/v)

Ansatz für zwei große Gele:

| Reagenz | 16,5 % Trenngel | 10 % Spacergel | 10 % Sammelgel |
|-----------------------------|-----------------|----------------|----------------|
| Aqua bidest | 18 ml | 13,9 ml | 10,3 ml |
| Acrylamid (49,5 T / 3 C) | 30 ml | 6,1 ml | 6,1 ml |
| Tricin-Puffer | 30 ml | 10 ml | 10 ml |
| 87 % Glycerin | 12 ml | - | - |
| 100 % Glycerin | - | - | 3 ml |
| 10 % SDS | - | - | 300 µl |
| APS (10 %) | 300 µl | 100 µl | 250 µl |
| TEMED | 30 µl | 10 µl | 25 µl |

Durchführung:

Zunächst wurden Gelstreifen, die den gesamten Molekulargewichtsbereich umfassten aus der BN-PAGE ausgeschnitten und für 30 min in der Reduktionslösung inkubiert. Nach Spülen mit Aqua bidest. wurden die Streifen in Höhe des Sammelgeles positioniert und die Protean II-Gelplatten (BioRad) zusammengebaut. Nun wurden die Trenn- und Spacergelphase nacheinander um den Streifen herum gegossen, ohne diesen zu benetzen, mit der Overlay-Lösung abgedeckt und für 1 h polymerisiert. Nach dem Absaugen der Overlay-Lösung mit Filterpapier wurde das Sammelgel so gegossen, dass der Streifen eingeschlossen wurde. Nach der 1 stündigen Polymerisation wurden die Gele in die Gelkammer eingebaut und diese mit Kathoden- und Anodenpuffer gefüllt. Die anschließende Elektrophorese lief bei 30 V bis die Probe in das Gel eingewandert war und dann für ca. 16 h bei 30 mA und max. 500 V.

2.2.5 Proteinfärbungen

2.2.5.1 Coomassie-Färbung

2.2.5.1.1 Gelfärbung

Die Coomassie-Färbung wurde nach Righetti und Drysdale (1974) durchgeführt.

Verwendete Lösungen:

Coomassie-Färbelösung (verändert nach Becker):

- 0,5 % Kupfersulfat [CuSO₄] (w/v)
- 0,05 % Coomassie Brilliant-Blau R-250 (w/v)
- 0,05 % Crocein Scarlet (w/v)
- 25 % Isopropanol (v/v)
- 10 % Eisessig (v/v)

Lösung A:

- 2,5 g Kupfersulfat [CuSO₄]
- oder 3,9 g Kupfersulfat-Pentahydrat [CuSO₄ x 5 H₂O]
- in 325 ml H₂O

Material und Methoden

Lösung B:

0,25 g Coomassie Brilliant-Blau R-250
0,25 g Croceine Scarlet
125 ml 2-Propanol
50 ml Eisessig

Beide Lösungen wurden getrennt hergestellt, die Farbstoffe jeweils durch Rühren vollständig gelöst und anschließend zusammen gegeben.

Entfärbelösung:

18 % 2-Propanol (v/v)
9 % Eisessig (v/v)

Glycerinlösung:

2 % Glycerin 87 % (w/v)
7 % Eisessig (v/v)

Durchführung:

Zunächst wurden die Gele für 30 min bei Raumtemperatur gefärbt. Dann wurde mit mehrfach zu wechselnder Entfärbelösung gespült. Anschließend wurden die Gele in Glycerinlösung gelagert, wobei die Novex-Gele mindestens für 48 Stunden inkubiert werden mussten, damit das Glycerin in die Poren diffundieren und diese Gele reißfest machen konnte. Bei den SDS-Gelen war hingegen die Inkubation für 1 Stunde in Glycerinlösung ausreichend. Zur Dokumentation wurden die Gele eingescannt und dann in Einmachfolie unter Luftabschluss feucht konserviert.

2.2.5.1.2 Kolloidale Coomassiefärbung

Prinzip:

Bei der kolloidalen Coomassiefärbung nach der in der Arbeitsgruppe von Professor Braun (Universität Hannover) verwendeten Methode (Laborprotokoll der Arbeitsgruppe von Prof. Wehland, GBF Braunschweig, Abt. Zellbiologie) wird das Gel zunächst fixiert. Anschließend wird es über Nacht gefärbt und mit Aqua bidest. entfärbt.

Fixierlösung:

40 % Methanol (v/v)
10 % Essigsäure (v/v)

Färbestammlösungen:

Lösung A:

1 % ortho-Phosphorsäure 85 % (w/v)
10 % Ammoniumsulfat (w/v)

Lösung B:

5 % Coomassie Brilliant-Blau R-250

Beide Lösungen wurden getrennt voneinander hergestellt, die Farbstoffe durch Rühren gelöst und dann zusammen gegeben.

Material und Methoden

Färbelösung:

- 98 % Lösung A (v/v)
- 2 % Lösung B (v/v)

Nach dem Mischen wurde die Färbelösung über Nacht gerührt, um eine optimale Verteilung zu erhalten. Vor Verwendung wurden noch 20 % Methanol zugesetzt.

Durchführung:

Die Fixierung des Geles wurde für eine Stunde durchgeführt. Die Färbung erfolgte über Nacht in Färbelösung, durch mehrfaches Wechseln von Aqua bidest. wurde entfärbt. Um die Hintergrundfärbung zu minimieren, wurde dem Wasser in den ersten Schritten auch 20 % Methanol zugesetzt.

2.2.5.1.3 Nitrozellulose-Membranfärbung

Ein Teststreifen der auf die NC-Membran geblotteten Proteine wurde zunächst mit India Ink (Hancock und Tsang,1983) angefärbt.

Färbelösung:

- 0,1 % India Ink (in TBS-Tween pH 7,4; Pelikan Füllfederhaltertütsche) (v/v)

Durchführung:

Zunächst wurde die blockierte Membran in der Färbelösung für 2 Stunden inkubiert und anschließend wurden überschüssige Farbpartikel durch Waschen mit TBS-T entfernt.

2.2.5.1.4 Proteinfärbung auf PVDF-Membranen für die Sequenzierung

Die Proteinfärbung auf PVDF-Membranen für die Sequenzierung wurde nach der Methode von Matsudaira (1987) durchgeführt.

Färbelösung:

- 0,1 % Coomassie Brilliant-Blau R-250 (w/v)
- 50 % Methanol (v/v)

Entfärbelösung:

- 50 % Methanol (v/v)

Durchführung:

Für die Färbung der Proteine musste die Membran nach der Inkubation bei 37 °C zunächst mit Methanol aktiviert werden. Anschließend wurden die Proteine für 10 Minuten mit der Coomassie-Färbelösung gefärbt und dann für 7 Minuten entfärbt. Schließlich wurde die Membran getrocknet.

2.2.5.2 Silberfärbung

Prinzip:

Die Silberfärbung erfolgte nach der Methode von Heukeshoven und Dernik (1986).

Material und Methoden

Die Fixierung der Gele in Fixierlösung und die Zugabe von Aldehyden bei den einzelnen Inkubationsschritten dient der Stabilisation und Reduktion der Proteine. Die Proteine werden mit der Silberlösung gefärbt, wobei noch Proteinkonzentrationen von 3 µg nachgewiesen werden können.

Fixierlösung:

- 30 % Ethanol (v/v)
- 10 % Eisessig (v/v)

Inkubationslösung:

- 30 % Ethanol (v/v)
- 0,5 M Natriumacetat (w/v)
- 0,5 % Glutardialdehyd (v/v)
- 0,2 % Natriumthiosulfat (w/v)

Silbernitratlösung:

- 0,1% Silbernitrat (w/v)
- 0,02 % Formaldehyd (v/v)

Entwicklerlösung:

- 2,5 % Natriumcarbonat (w/v)
- 0,01 % Formaldehyd (v/v)

Glutardialdehyd, Formaldehyd und Natriumthiosulfat wurden erst unmittelbar vor Gebrauch zugefügt.

Stopplösung:

- 50 mM EDTA

Glycerinpuffer:

- 2 % Glycerin 87 % (w/v)
- 7 % Eisessig (v/v)

Durchführung:

Die Gele wurden zunächst für zwei Stunden bei RT in der Fixierlösung inkubiert, anschließend über Nacht in der Inkubationslösung. Nach drei je 10 minütigen Waschschrinen mit Aqua bidest. erfolgte eine einstündige Inkubation in der Silberlösung. Kurzem Spülen mit Aqua bidest. zum Entfernen nicht gebundener Silberionen folgte dann die Entwicklung bis zur gewünschten Farbintensität. Die Entwicklung wurde durch 5 min Inkubation mit Stopplösung abgebrochen. Zur Konservierung wurden die Gele gewaschen in Glycerinpuffer inkubiert.

2.2.6 Transfertechniken

Für immunologische Nachweise wurden die separierten Proteine in den Gelelektrophoresen wurden diese geblottet. Neben den für Kapillarblot und Semi-Dry-Blot verwendeten Nitrocellulose-Membranen (NC) wurden für das Tankblotten zur Sequenzierung auch Polyvinylidendifluorid-Membranen (PVDF) verwendet.

2.2.6.1 Thermoblotting auf NC-Membranen (Kapillarblot)

Prinzip:

Die mit Hilfe der Gelelektrophorese getrennten Proteine wurden auf NC-Membranen mit Hilfe von Thermoblotting (Petersen, 1992) übertragen. Bei dieser Methode werden eine Heizplatte bei 50 °C und Druck verwendet, um die Proteine mittels Kapillarkwirkung aus dem Gel auf die Blotmembran zu übertragen.

Anodenpuffer II: 25 mM Tris/HCl (pH 10,4)
 20 % Methanol (v/v)

Durchführung:

Zunächst wurde das Trenngel auf Parafilm M® (Roth) auf einem Heizblock (50 °C) aufgelegt. Nach dem luftblasenfreien Auflegen der in Anodenpuffer II äquilibrierten Membran (Porengröße von 0,45 µm, Schleicher & Schüll) wurden zunächst zwei vorgefeuchtete dünne Filterpapiere, dann zwei trockene dicke Whatman Filterpapiere (GB002 und GB003, Schleicher & Schuell) und anschließend ein kleiner Stapel von Papierhandtüchern sowie eine Glasplatte mit einem 3 kg Gewicht auf der Membran platziert. Der erste Blotvorgang dauerte 3 Minuten und verlängerte sich für den jeweils folgenden Blotansatz um je drei Minuten. Max. sechs Replicablots mit einer vernachlässigbaren Proteinkonzentrationsänderung auf den einzelnen Blotmembranen wurden in TBS-Tween pH 7,4 blockiert (2.2.8.1). Das Gel wurde anschließend noch mit Coomassie gefärbt.

2.2.6.2 Semi-Dry-Blotting

Prinzip:

Die Übertragung der in der Gelelektrophorese getrennten Proteine auf die NC-Membran erfolgte im Semi-Dry-Blotting-Verfahren in einem diskontinuierlichen Puffersystem nach Kyhse-Andersen (1984).

Das Semi-Dry-Blotting auf aktivierte und äquilibrierte PVDF-Membranen wurde in einem kontinuierlichen Puffersystem nach Matsudaira (1987) durchgeführt.

Anodenpuffer I: 300 mM Tris/HCl (pH 10,4)
 20 % Methanol (v/v)

Anodenpuffer II: 25 mM Tris/HCl (pH 10,4)
 20 % Methanol (v/v)

Kathodenpuffer: 25 mM Tris/HCl (pH 9,4)
 40 mM 6-Aminohexansäure
 10 % Methanol (v/v)

CAPS-Puffer: 10 mM 3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure (pH 11,0)
 10 % Methanol (v/v)

Material und Methoden

Durchführung im diskontinuierlichen Puffersystem:

Nach der Äquilibration der Membran in Anodenpuffer II wurde das Blotten zwischen den Elektrodenplatten des Blotters (Biometra) wie folgt durchgeführt:

Zunächst wurden zwei Lagen in Anodenpuffer 1 getränkte dicke Filterpapiere (GB003, Schleicher & Schuell) auf die Anodenseite gelegt, dann eine Lage in Anodenpuffer II getränktes Filterpapier. Nach dem Auspressen von Luftblasen mit einem Handroller wurde die NC mit dem darauf liegenden Gel, sowie drei Lagen in Kathodenpuffer getränktes Filterpapier blasenfrei aufgelegt. Das Blotten wurde für eine halbe Stunde bei 0,8 mA/cm² Membranfläche durchgeführt. Eine Blockierung der NC-Membran erfolgte in TBS-Tween pH 7,4 (2.2.8.1)

Durchführung im kontinuierlichen Puffersystem:

Die PVDF-Membran wurde zunächst kurz in Methanol aktiviert und dann in CAPS-Puffer äquilibriert, in dem auch alle 6 Filterpapiere eingelegt wurden. Das Elektroblotten selbst erfolgte bei 0,8 mA/cm² Membranfläche. Nach dem Ende des Blottens wurden die Membranen für eine Stunde in einem Trockenschrank bei 37 °C getrocknet. Eine Blockierung der freien Bindungsstellen auf der für die Antikörper-Austestung vorgesehenen Membran erfolgte mit 5 %igen Milchpulver in TBS-T pH 7,4 für eine halbe Stunde. Der für eine N-terminale Sequenzierung vorgesehene Teil der Membran wurde nicht blockiert, sondern direkt für die Coomassie-Färbung (2.2.5.1.4) verwendet.

2.2.6.3 Blotting auf PVDF-Membranen (Tankblot)

Die Proteine wurden auf PVDF-Membranen (Schleicher & Schuell und später Millipore) mit dem Tankblotverfahren des Herstellers (Invitrogen) transferiert.

Verwendete Lösungen:

Transferpufferstammlösung (20x):

500 mM Bicine
500 mM Bis-Tris
20,5 mM EDTA
1 mM Chlorbutanol
pH 7,2

Transferpuffer: 4 % Stammlösung (v/v)
20 % Methanol (v/v)

Durchführung:

Die Membran wurde zunächst in Methanol aktiviert und in Transferpuffer äquilibriert. Anschließend wurde sie luftblasenfrei auf dem auf einem angefeuchteten Whatman Filterpapier (GB003, Schleicher & Schuell) liegenden Trenngel aufgelegt. Darauf wurde noch ein weiteres Whatman Papier aufgelegt. Abschließend wurde dieses „Sandwich“ zwischen fünf Blotting-Pads in die innere Blotkammer überführt und festgespannt. Bei zwei Gelen wurden die Pads aufgeteilt, so dass je zwei Pads zur Anode bzw. Kathode wiesen und ein Pad zwischen den beiden „Sandwiches“ lag. Nach dem vorsichtigen Füllen dieser Kammer mit Transferpuffer wurde die äußere Kammer

Material und Methoden

mit Aqua bidest. zur Kühlung während des Blottens gefüllt. Der Proteintransfer im Tankblot wurde dann bei 25 V für 1,5 Stunden durchgeführt. Anschließend wurde die Membran bei 37 °C im Trockenschrank für 1 Stunde getrocknet werden, um die Haftung der Proteine an die Membran zu erhöhen. Das Gel wurde Silber gefärbt. NC-Membranen wurden nur in Transferpuffer äquilibriert, bevor sie im Tankblotverfahren verwendet werden konnten.

2.2.7 Immunologische Nachweise

2.2.7.1 Immunnachweise auf NC-Membranen

Prinzip:

Die spezifische Bindung an die Erdnussallergene erfolgte durch einen 1. Antikörper (Patientenserum oder monoklonaler Antikörper). Dieser wurde mit einem alkalische Phosphatase markierten 2. Antikörper detektiert. Für die immunenzymatische Analyse dieser Bindung wurde die Substratreaktion der alkalischen Phosphatase (AP) mit 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat (BCIP) und Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) verwendet. In diesem System hydrolysieren AP-markierte Antikörper das BCIP unter Abspaltung einer Phosphatgruppe, wodurch das NBT reduziert wird. Dabei entsteht ein Farbkomplex, der ein violett-schwarzes Präzipitāt an der Substrat-Chromogen-Reaktionsstelle bildet.

Verwendete Antikörperverdünnungen (in TBS-T) nach Titrierung unter Einbeziehung der negativ Kontrolle:

Patientenseren (2.1.2) wurden normalerweise 1:20 verdünnt, in Ausnahmen bis zu 1:200 (bei CAP-Werten über 5).

Kaninchen-Antikörper:

| | |
|-----------------------|----------------|
| (MAP 3) anti-Ara h 2 | 1:100000 |
| (Carmen) anti-Ara h 2 | 1:100000 |
| anti-Ara h 6 | 1:100000 |
| anti-Ara h 7 | 1:100000 |
| (Sam 22) anti-Ara h 8 | 1:100 – 1:1000 |

Monoklonale Antikörper aus der Maus:

| | |
|----------------------|----------------|
| (Pn-t) anti-Ara h 1 | 1:10 |
| (Pn-c) anti-Ara h 1 | 1:10 |
| (Pn-r) anti-Ara h 3 | 1:10 |
| (Pn-b) anti-Ara h 3 | 1:10 |
| (Pn-x) anti-Ara h 3 | 1:10 |
| PEI-7B2 anti-Ara h 3 | 1:100 – 1:2000 |

Lektine mit gekoppelter alkalischer Phosphatase wurden eingesetzt, um mögliche N- und O-Glykosilierung bei den verschiedenen Allergenen nachzuweisen.

| | |
|---------------------------------|--------|
| Concanavalin A (Con A) | 1:1000 |
| Sambucus nigra agglutinin (SNA) | 1:400 |
| Peanut agglutinin (PNA) | 1:2000 |

Material und Methoden

Für die Sekundärantikörper wurden folgende Verdünnungen in TBS-T verwendet:

| | |
|--------------------------------|---------|
| Ziege anti-Maus IgG/IgM H+L-AP | 1:5000 |
| Ziege anti-Kaninchen IgG-AP | 1:10000 |
| Maus anti-Human IgE-AP | 1:2000 |
| Ziege anti-Human IgA-AP | 1:2000 |
| Ziege anti-Human IgG-AP | 1:2000 |
| Streptavidin-AP | 1:2000 |

TBS-Tween (TBS-T) pH 7,4:

100 mM Tris/HCl pH 7,4
100 mM NaCl
2,5 mM MgCl₂
0,05 % Tween 20 (v/v)

TBS-Tween pH 9,5:

100 mM Tris/HCl pH 9,5
100 mM NaCl
5 mM MgCl₂

NBT/BCIP-Färbung:

NBT-Lösung:

0,033 % (w/v) NBT in TBS-Puffer (pH 9,5) lösen, bei 4 °C kühl und dunkel lagern, vor der Verwendung 30 ml auf 37 °C erwärmen

BCIP-Lösung:

0,5 % (w/v) BCIP in Aqua bidest. lösen, 1 ml Portionen bei -20 °C lagern, vor der Verwendung eine Portion auf 37 °C erwärmen

Durchführung:

Zunächst wurden die freien Bindungsstellen der Transfermembran für 30 Minuten in TBS-Tween pH 7,4 (TBS-T) blockiert, um eine unspezifische Bindung der Patientenserum oder Antikörper zu verhindern. Anschließend wurden die Membran getrocknet. Die Inkubation mit dem in TBS-T verdünnten Primärantikörper erfolgte über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Blots oder Streifen dreimal zehn Minuten mit TBS-T gewaschen und anschließend mit dem jeweiligen Sekundärantikörper für 2 Stunden inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit TBS-T erfolgte ein weiterer Waschschrift mit TBS-Puffer pH 9,5, um das Tween auszuspülen und die Membran für die Chromogen-Substratreaktion mit NBT/BCIP zu äquilibrieren. Dabei wurde NBT im Verhältnis 30 zu 1 zu BCIP für die Substratreaktion eingesetzt. Die Farbreaktion wurde durch Waschen mit Aqua bidest. gestoppt.

2.2.7.2 Nachweise auf PVDF-Membranen

Verwendete Lösungen:

5 % Magermilchpulver in TBS-Tween pH 7,4
0,1 % Rinderserumalbumin in TBS-Tween pH 7,4

Durchführung:

Die Membranen wurden zunächst in TBS-T mit 5 % Milchpulver blockiert. Anschließend wurde mit den Primärantikörpern in TBS-T und 0,1 % Rinderserumalbumin (BSA) über Nacht inkubiert. Die Inkubation des Sekundärantikörpers in TBS-T + 0,1 % BSA erfolgte für zwei Stunden. Die Waschschriffe nach der Erst- und Zweitinkubation wurden mit TBS-T pH 7,4 und die Äquibrierung vor der Visualisierung mit TBS-Puffer pH 9,5 durchgeführt. Die NBT/ BCIP-Farbreaktion war analog (2.2.7.1).

2.2.7.3 Verstärkung der Immunnachweise durch Chemilumineszenz (Kricka, 1991)

Prinzip:

Die Chemilumineszenz basiert auf der Substratumsetzung von Luminol durch die Meerrettich Peroxidase in Gegenwart von Hydrogenperoxidase zu einem angeregten intermediären Dianon. Diese Substanz setzt Licht frei, um in seinen Grundzustand zurück zu gelangen, welches auf einem Röntgenfilm nachgewiesen werden kann. Die Lichtemission setzt direkt nach der Substratzugabe ein und lässt sich für ca. 1 bis 2 Stunden detektieren.

Verwendete Pufferlösungen:

Blockierungslösung: T-TBS-Puffer pH 7,4 + 5 % Milchpulver

Antikörperbindungen jeweils verdünnt mit T-TBS-Puffer + 2,5 % Milchpulver

| | |
|---|---------|
| Patientenserum | 1: 20 |
| 2. Antikörper biotinyliertes anti-human IgE | 1:2000 |
| Neutravidin-Horseradishperoxidase | 1:50000 |

Detektionslösung: LumiGLO Reserve™

Durchführung:

Nach dem Blotten der Proteine wurden die freien Bindungsstellen auf den NC-Membranen zunächst mit 5 % Milchpulver in TBS-Tween pH 7,4 für 2 Stunden blockiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T pH 7,4 für je 10 min wurden die Membranen in Streifen geschnitten und mit Humanserum in 2,5 %igem Milchpulver in TBS-T über Nacht inkubiert. Die spezifische Bindung der IgE-Antikörper an die Proteine auf der Membran konnte nach erneutem dreimaligen Waschen (je 10 min mit TBS-T) durch Zugabe und Inkubation mit einem biotinylierten anti-human IgE-Antikörper für 1 Stunde detektiert werden. Überschüssige IgE-Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit TBS-T entfernt, bevor die Inkubation mit NeutrAvidin als Horseradish Peroxidase (HRP)-Konjugat für eine halbe Stunde erfolgte. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit TBS-T wurden die Streifen für 1-5 min in der Detektionslösung LumiGLO Reserve™ inkubiert. Vollständiges Entfernen der Flüssigkeit verhinderte das Überstrahlen der sehr intensiven Lichtreaktion auf den Röntgenfilmen. Die Streifen wurden zwischen zwei Overheadfolien gelegt, um die Strahlung auf dem aufgelegten Röntgenfilm zu detektieren. Es wurden Expositionszeitintervalle von 30 sec, 3 min und 10 min durchgeführt, die einzelnen Filme wurden maschinell entwickelt.

2.2.8 N-terminale Sequenzierung

Prinzip:

Die N-terminalen Sequenzierung erfolgte nach dem Edman Abbau (1970). Die jeweils N-terminale Aminosäure wird mit Phenylisothiocyanat umgesetzt und anschließend mit 100 %iger Trifluoressigsäure abgespalten. Das PTC-Aminosäurederivat wird mit N-Butylchlorid extrahiert und mit TFA (25 %) in ein Phenylthiohydantoin-AS-Derivat überführt. Anschließend erfolgt eine Trennung über eine Reverse-Phase-Säule (C₁₈) und eine Detektion bei 270 nm. Mit Hilfe eines mitgeführten PTH-Aminosäurestandards lässt sich jedem Aminosäure-Derivat eine Retentionszeit zuordnen. Durch zyklusartige Wiederholung dieser Abbauschritte lässt sich so die Sequenz einer Aminosäurekette bestimmen.

Durchführung:

Die auf PVDF-Membranen geblotteten Proteine wurden aus der Membran ausgeschnitten, in Eppendorfgefäße überführt und nach Edmann Abbau im Proteinsequenziergerät (Procise, Applied Biosystems, USA) analysiert.

2.2.9 Massenspektrometrie mit Massenfingerprint mittels MALDI-TOF

Prinzip:

Für die Matrix-unterstützte Laser Desorptions-Ionisations-Massenspektroskopie (matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) müssen die Proteine direkt aus dem Gel extrahiert werden. Dabei erleichtert der enzymatische Abbau durch Trypsin in einzelne Peptide die Analyse großer Proteine und die Extraktion aus dem Gel. Die gereinigten Peptide wurden mit einer gesättigten Matrix-Lösung aus 3,5-Dimethoxy-4-hydroxy-Zimtsäure, Trifluoressigsäure und Acetonitril kokristallisiert. Aliquots dieser Proben wurden im Vakuum verdampft, ionisiert und durch das Anlegen einer Spannung in einem dann spannungsfreien Feld auf einen Detektor hin beschleunigt. Die Flugzeit über die definierte Flugstrecke bis zu dem Detektor ist abhängig von der Masse und der Ladung der entstandenen Ionen. Durch Eichung des Gerätes mit Molekülen bekannter Massen lassen sich die Massen der Probenmoleküle über ihre Flugzeit bestimmen. Über die Auswertung der einzelnen gefundenen Massen tryptischer Fragmente ist eine Ableitung der Ursprungsmoleküle möglich.

Verwendete Lösungen:

| | |
|---------------------|--|
| | 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung (NH ₄)HCO ₃ |
| | 50 mM (NH ₄)HCO ₃ |
| Trypsin-Stammlösung | (c = 1 µg/µl) |
| Arbeitslösung | 0,5 µl Trypsin-Stammlösung + 19,5 µl 50 mM (NH ₄)HCO ₃ |
| Ameisensäure (5 %) | 2,5 ml 100 % in 50 ml Aqua bidest. |

Material und Methoden

Aufreinigung mit C₁₈-Säulen:

Vorbereitung der Säule:

50 % Acetonitril 25 ml 100 % Acetonitril + 25 ml Aqua bidest.

Äquilibration der Säule mit:

0,1 % Trifluoressigsäure 0,2 ml 100 % TFA in 200 ml Aqua bidest.

Waschen der Säule mit:

0,1 % TFA+ 5 % Methanol 2,5 ml MeOH in 50 ml Äquilibrationsslsg.

Elution der Proteine mit:

50 % Acetonitril in 0,1 % TFA 25 ml 100 % Acetonitril + 25 ml
Äquilibrationsslsg.

Durchführung:

Zunächst mussten die einzelnen Proteinspots (BN-PAGE oder 2D-PAGE) mit einer Rasierklinge exakt ausgeschnitten und in Eppendorfgefäße überführt werden. Dann erfolgte eine Inkubation der Gelstücke für 10 min in 500 µl Aqua bidest.. Bei der folgenden Umpufferung in Acetonitril und 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat im Verhältnis 1:1 wurden die Proteine 15 min inkubiert. Nach der Dehydratation in der Speedvac mit 250 µl 100 %igem Acetonitril für ca. 30 min wurden die Gelstücke mit 20 µl Trypsinlösung versetzt und über Nacht bei 37 °C unter leichtem Schütteln verdaut. Die weitere Extraktion am nächsten Tag wurde ebenfalls unter leichtem Schütteln bei 37 °C für jeweils 15 min durchgeführt. Zunächst wurden 20 µl 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung zugegeben. Nach der Abnahme des Überstandes und der Überführung in ein neues Eppendorfgefäß erfolgte die Zugabe von 20 µl 5 %iger Ameisensäure und die erneute Inkubation der Gelstücke. Schließlich wurden 20 µl Acetonitril hinzugefügt, nach der letzten Inkubation wurden alle Überstände gepoolt und auf ca. 10 µl Restvolumen in der Speedvac eingetrocknet.

Die Aufreinigung tryptischer Peptide erfolgte dann mit Hilfe der C₁₈-Säulen in 10 µl Pipettenspitzen von Millipore nach den Vorgaben des Herstellers. Die Säulen wurden mit einer 50 %igen Acetonitril-Lösung vorbereitet. Anschließend konnte die Säule mit 0,1 %iger Trifluoressigsäure (TFA) äquilibriert werden. Nach dem Auftragen der Probe wurde die Säule mit 0,1 %iger TFA und 5 % Methanol dreimal gewaschen. Die Elution der Proteine erfolgte mit einem Laufmittel aus 50 % Acetonitril mit 0,1 %iger TFA für jeweils 10 Einzelschritte. Die Proteine wurden anschließend bei -20 °C gelagert. Die MALDI-TOF Analyse wurde freundlicherweise von PD Dr. B. Lindner (Biophysik, FZB) durchgeführt.

Die Auswertung der gefundenen Massen-Peaks erfolgte online mit den Programmen Mascot (www.mascot.htm) und ExPASy (www.expasy.org).

2.2.10 Epitopmapping von Membran-gebundenen synthetischen Peptiden

Prinzip:

Für das Epitopmapping wurden in der Arbeitsgruppe von PD Dr. A. Frey Peptide nach der Fmoc-Methode auf Filtern synthetisiert (Geysen *et al.*, 1984). Die Vorhersage antigener Bindungsstellen wurde mit der Jameson-Wolf-Vorhersage (1988) mit einem Computerprogramm der BGFA in Bochum durchgeführt.

Die Sequenzen von Ara h 3/4 und iso-Ara h 3 wurden vollständig synthetisiert. Von den publizierten Sequenzen von Gly 1, Ara h 3 und Ara h 4 wurden entsprechend Teilsequenzen hergestellt.

Bei diesem Herstellungsverfahren wurden 16er Peptide im zweier Versatz synthetisiert. Somit sind in jedem Peptid je 14 Aminosäuren mit dem vorigen Peptid identische und je zwei neue vorhanden. Ein Filter, der in dieser Weise produziert wurde, enthält schließlich 17 Reihen mit je 25 Zeilen, also insgesamt 425 Peptide. Um bei der Epitopkartierung einen Filterleerwert mitlaufen lassen zu können und um die einzelnen Bereiche voneinander zu trennen, mussten Schnittstellen ohne Peptide und computer-generierte Kontrollpeptide mit eingebaut werden.

Verwendete Lösungen:

Tris-gepufferte Kochsalzlösung (Tris-buffered Saline = TBS-Puffer):

- 0,14 M NaCl
- 2,68 mM KCl
- 50 mM Tris-Base
- pH 7,0, autoklavieren, Lagerung bei 4 °C

Citrat-gepufferte Kochsalzlösung (Citrated-buffered Saline = CBS):

- 0,14 M NaCl
- 2,68 mM KCl
- 10 mM Citronensäure-Monohydrat
- pH auf 7,0, autoklavieren, Lagerung bei 4 °C

T-TBS-Puffer:

- 0,05 % TBS-Puffer + (v/v) Tween 20

BCIP (5-brom-4-chlor-3-indolylphosphat p-toluidin Salz):

- 0,14 mM BCIP in 1 ml DMF lösen, Lagerung bei -20 °C

MTT ((Dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid):

- 0,12 mM MTT in 1 ml (70 % (v/v) DMF/ 30 % Aqua bidest.) lösen, Lagerung bei -20 °C

Membranblockierungslösung (Membran-Blocking-Solution = MBS):

- 20 ml Blocking-Puffer-Konzentrat (v/v)
- 80 ml T-TBS-Puffer (v/v)
- 14,6 mM Saccharose
- pH 7,0, Lagerung bei 4 °C

AP-Färbelösung (CDS):

- 10 ml CBS-Puffer
- 4,93 mM MgCl₂
- 0,0006 mM BCIP
- 0,0007 mM MTT

Stripping-Puffer:

8 M Urea

1 % SDS (w/v)

in TBS-Puffer ansetzen, bei RT lagern

vor Gebrauch + 0,5 % (v/v) β -Mercaptoethanol

pH mit CH_3COOH auf 7,0 einstellen

Durchführung des Epitopmappings nach Frank (2002):

Vor der ersten Verwendung wurden die Filter zunächst für 10 min in 100 % Ethanol und anschließend dreimal 10 min in 25 ml TBS-Puffer gewaschen werden. Synthesebedingte Verunreinigungen wurden nach folgender Prozedur entfernt. Zunächst wurde zweimal 5 min in 20 ml Dimethylformamid (DMF), dann zweimal 7 min in 20 ml Stripping-Puffer im Ultraschallbad inkubiert und schließlich 30 min und dann dreimal 5 min in 20 ml TBS-Puffer gewaschen. Abschließend wurden die Membranen über Nacht in MBS inkubiert, um freie Bindungsstellen zu blockieren.

Am nächsten Tag wurden die Membranen erneut für 10 min in 30 ml T-TBS-Puffer gewaschen und über Nacht mit dem ersten Antikörper (Patientenserum (1:20) oder monoklonaler Antikörper (1:10-1:2000) in MBS verdünnt) inkubiert. Der Primärantikörper wurde am 3. Tag durch dreimaliges Waschen für je 10 min in 20 ml T-TBS-Puffer entfernt. In dem sekundären Antikörper (anti-human IgE oder anti-Maus IgG (2.2.7.1) verdünnt in MBS) wurde für 2 h inkubiert. Nach Waschen der Filter für zweimal 10 min in 20 ml T-TBS-Puffer und zweimal 10 min in 20 ml CBS-Puffer wurden die Membranen in 10 ml CDS-Färbelösung überführt. Die Entwicklung der Chromogen-Substratreaktion erfolgte abhängig von der Reaktionsstärke für 10 min bis über Nacht. Nach Abstoppen der Färbereaktion durch Waschen der Filter für 10 min in 20 ml TBS-Puffer wurden die Filter feucht gehalten und eingescannt.

Um die Filter wiederverwenden zu können, mussten sie nun erneut gestrippt werden. Dabei wurde zunächst für zweimal 10 min in 20 ml Aqua bidest. gewaschen, dann für 10 min in 20 ml DMF inkubiert bis die Spots verblassten, woraufhin diese Prozedur wiederholt wurde, bis keine Spots mehr zu erkennen waren. Anschließend wurden die Filter noch dreimal 10 min in 20 ml Aqua bidest. gewaschen, dann für dreimal 10 min in 20 ml Stripping-Puffer im Ultraschallbad bei 40 °C behandelt und abschließend für dreimal 10 min in Ethanol gewaschen. Jetzt konnten sie direkt wieder verwendet oder getrocknet, eingeschweißt und bei -20 °C eingefroren werden.

2.2.11 Versuche zur simulierten Passage durch den Gastrointestinaltrakt

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein *in vitro* System entwickelt, das dem menschlichen Gastrointestinaltrakt entspricht und es somit erlaubt, die Allergene der Erdnuss bei ihrer Passage durch den menschlichen Körper zu verfolgen.

Dazu wurden Versuchsansätze mit verschiedenen Probanden und unterschiedlichen Erdnüssen und Erdnussprodukten durchgeführt.

2.2.11.1 Kauversuche von gerösteter Erdnuss

Zunächst haben verschiedene Probanden jeweils nach demselben Prinzip frisch ausgepaltete Erdnüsse (Jumbo Riesen, Seeberger) gekaut. Dazu gaben alle Versuchs-

Material und Methoden

personen nach dem Reinigen des Mundes durch Spülung mit Wasser eine Speichelprobe (ca. 3 ml) ab. Anschließend haben die Probanden 10 g Erdnüsse ca. 30 mal gekaut und den eingespeichelten Brei in ein zweites Röhrchen überführt. Diese Prozedur wurde wiederholt bis 60 ml Volumen gekaute Erdnussmasse-Speichelsuspension entsprechend 10 g Roheinwaage enthielten. Nun wurden ca. 10 ml Aqua bidest. bzw. ca. 5 ml nativer Probenpuffer zu der Suspension gegeben, die Mischung geschüttelt, gevortext und abzentrifugiert (1 Minute bei 1000 x g und 4 °C). Direkt aus den Überständen wurden je 1 ml Probe entnommen (EEx-gek) und die Proteinkonzentrationen nach Bradford (2.2.2) bestimmt. Nachdem die Überstände in neue Röhrchen dekantiert worden waren, ließen sich die Volumina der Proben 1 bis 4 bestimmen.

Versuchsaufbau:

- 1 Überstand Erdnussextrakt gekaut in Aqua bidest.
- 2 Überstand Erdnussextrakt gekaut in Probenpuffer
- 3 Matrix Erdnussextrakt gekaut in Aqua bidest.
- 4 Matrix Erdnussextrakt gekaut in Probenpuffer

Für die Simulation der Passage durch den Gastrointestinaltrakt wurde den Proben ein künstliches Magensaftäquivalent zugefügt. Dazu wurde das Medikament Enzynorm® forte (Knoll, Deutschland) verwendet, das bei Patienten eingesetzt wird, deren Magensaft- und Enzymproduktion nicht korrekt funktioniert. Dieses enthält Magenschleimhautextrakt des Schweines mit den notwendigen Proteinase für den Verdauungsprozess sowie Salzsäure. Der Versuch selbst wurde mit physiologischer Kochsalzlösung bei pH 2,0 und 37 °C durchgeführt, um den menschlichen Verdauungstrakt zu simulieren.

Anschließend wurde die simulierte Passage durch den Gastrointestinaltrakt mit Kreon® 25000 (Solvey, Deutschland) einem Pankreassaftäquivalent weitergeführt. Hierbei handelt es sich um ein Medikament für Patienten, bei denen die Enzymproduktion der Bauchspeicheldrüse gestört ist. Es enthält Pankreatin aus dem Schweinepankreas mit den relevanten Enzymen Lipasen, Amylasen und Proteasen, die für den weiteren Abbau der Nahrungspartikel entscheidend sind.

Verwendete Lösungen:

Physiologische Kochsalzlösung 0,9 % NaCl pH 2,0

Physiologische Kochsalzlösung 0,9 % NaCl pH 7,0

Stammlösung Enzynorm® forte 1 Tablette in 175 ml 0,9 % NaCl pH 2,0
Arbeitslösung 1:500 verdünnt mit 0,9 % NaCl pH 2,0

Stammlösung Kreon® 25000 1 Tablette in 150 ml 0,9 % NaCl pH 7,0
Arbeitslösung 1:2 verdünnt mit 0,9 % NaCl pH 7,0

Natronlauge 0,1 M NaOH
1 M NaOH

Durchführung nach Kortekangas-Savolainen *et al.* (1993):

Eine Tablette Enzynorm® forte wurde fein gemörsert und in 175 ml 0,9 % NaCl (pH 2,0) für ca. 1 h gerührt und gelöst. Anschließend wurde die Suspension über einen Faltenfilter filtriert, um die Farbstoffe abzutrennen, die bei der folgenden Proteinbestimmung stören könnten. Die Arbeitslösung wurde durch Verdünnen der Stammlösung (1:500) mit 0,9 % NaCl (pH 2,0) hergestellt, die dann im Verhältnis 9:1 eingesetzt wurde. Die Inkubation erfolgte unter leichtem Schütteln bei 37 °C im Brutraum, die Probennahme nach 1, 2, 3 und 24 h. Dazu wurden jeweils 1 ml der Probe in vorbereitete Eppendorfgefäße mit 0,5 ml 0,1 M NaOH überführt und die Reaktion durch sofortiges Mischen gestoppt. Nach 24 Stunden Inkubation erfolgte das Abstoppen der Reaktion in den restlichen Proben mit 1 M NaOH (pH-Wert von 7-7,3). Anschließend wurde die Proteinbestimmung nach Bradford für alle Proben parallel durchgeführt.

Analog des ersten Verdauungsschrittes wurde zunächst eine Stammlösung für den Verdau mit Pankreassaft hergestellt. Dazu wurde eine Kapsel Kreon® 25000 fein gemörsert, in 150 ml 0,9 % NaCl (pH 7,0) für ca. 1 h gerührt, gelöst und anschließend über einen Faltenfilter filtriert.

Als Arbeitslösung diente eine 1:2 verdünnte Lösung in 0,9 % NaCl (pH 7,0), die im Verhältnis 1:1 eingesetzt werden konnte. Auch hier erfolgte die Inkubation unter leichtem Schütteln bei 37 °C im Brutraum. Bei der Probennahme nach 1, 2, 3 und 24 h wurden jeweils 1 ml Probe in vorbereitete Eppendorfgefäße mit 0,5 ml 0,1 M NaOH überführt und sofort gemischt. Nach dem Ende des Versuches erfolgte eine Proteinbestimmung nach Bradford und der pH-Wert wurde kontrolliert.

2.2.11.2 Kauversuche mit keimfähigen Erdnüssen und Erdnussprodukten

Analog wurden Kauversuche mit gekochten und fritierten Erdnüssen und mit vier verarbeiteten Erdnussprodukten (Corny-Riegel, Erdnussbutter, Snickers-Riegel und Peanut Crackern) durchgeführt.

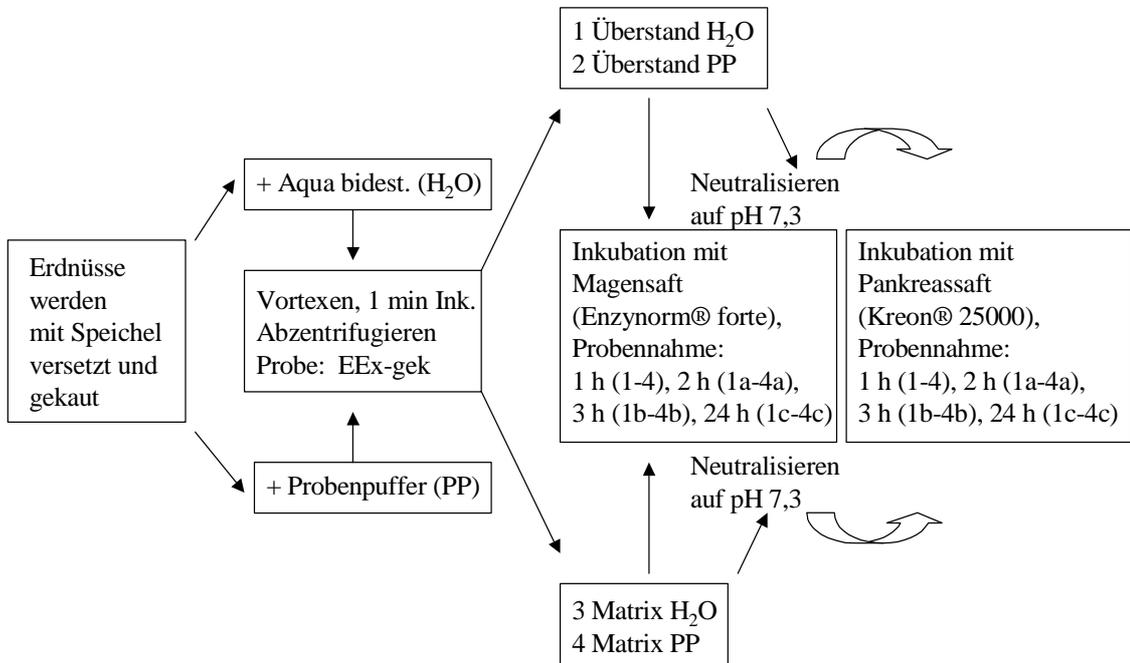
Im Unterschied zu allen vorhergehenden Kauversuchen wurde die Durchführung bei den Peanut-Crackern um eine Besonderheit ergänzt, um zu überprüfen, ob eine 24 stündige Inkubation mit Enzynorm zu einer Degradation der Erdnussproteine führte. Dieses hätte dann den folgenden Verdau mit Kreon gestört.

So fand neben dem beschriebenen Ablauf noch ein zusätzlicher Verdau mit Kreon statt, wobei nach einer Stunde der Enzynormverdau kurzzeitig unterbrochen wurde. Nach der Probennahme wurden alle vier Proben halbiert, so dass die eine Hälfte direkt weiter inkubiert und einem normalen Versuchsablauf unterzogen wurde. Die andere Hälfte wurde mit 1 M NaOH auf einen pH-Wert von 7,0-7,3 gebracht und dann direkt mit Kreon in der beschriebenen Weise versetzt.

Die Probennahme der löslichen Proteine wurde immer direkt aus der flüssigen Phase durchgeführt, die durch Zugabe von Aqua bidest. bzw. Probenpuffer oder durch enzymatische Freisetzung nach Inkubation mit Enzynorm bzw. Kreon gebildet wurde. Alle Proteinbestimmungen erfolgten parallel für alle Proben jeweils nach dem Ende eines Versuches.

Material und Methoden

Schema 2: Der Ablauf der simulierten Passage durch den menschlichen Gastrointestinaltrakt



3. Ergebnisse

3.1 Isolierung der Erdnussallergene Ara h 1, Ara h 3/4 und ihrer Isoformen aus dem Erdnussextrakt

Die Hauptaufgabe dieser Arbeit bestand darin, die Majorallergene Ara h 1, Ara h 3/4 und ihre Isoformen aus dem Erdnussextrakt zu isolieren, sie anzureichern und über ihr Laufverhalten in Gelelektrophoresen zu charakterisieren.

3.1.1 Isolierung von Ara h 1 und Ara h 3/4 aus Erdnussextrakt mittels Gelfiltration

Für die Isolierung der Erdnussallergene wurde der Gesamtextrakt zunächst mit Hilfe der Gelfiltration über eine Superdex 200-Säule (Abb. 2) unter weitgehend physiologischen Bedingungen aufgetrennt (Fraktionen 1 bis 3). Alle Proteine, die kleiner als 200 kDa waren, interagierten mit der Sephadex-Matrix der Säule und wurden entsprechend ihres Laufverhaltens mit unterschiedlichen Retentionszeiten in den Fraktionen 2 und 3 eluiert. Proteine, die größer als 200 kDa waren, konnten ungehindert mit dem Laufpuffer als Durchlauf im Ausschlussvolumen der Säule in den Fraktionen 1 a-c isoliert werden. Zwei verschiedene Eichläufe mit Proteingemischen definierter Molekulargewichte, die in der Abb. 2 durch hell- und dunkelgraue Pfeile eingezeichnet wurden, ermöglichten über ihre Retentionszeiten eine Zuordnung von Molekulargewichten der Erdnussallergene. So konnten Moleküle über 200 kDa (in den Fraktionen B7-B15) gezielt von Molekülen unter 200 kDa (C1-C13) getrennt werden. In den anderen Fraktionen konnten keine Proteine nachgewiesen werden, diese Peaks zwischen A15-B3 bzw. ab D2 enthielten vermutlich Farbstoffe und DNA. In der folgenden Abb. 2 ist das Chromatogramm einer repräsentativen Trennung von Erdnussextrakt über die Superdex-200-Säule dargestellt, die verschiedenen Eichproteingemische sind farblich markiert.

Ergebnisse

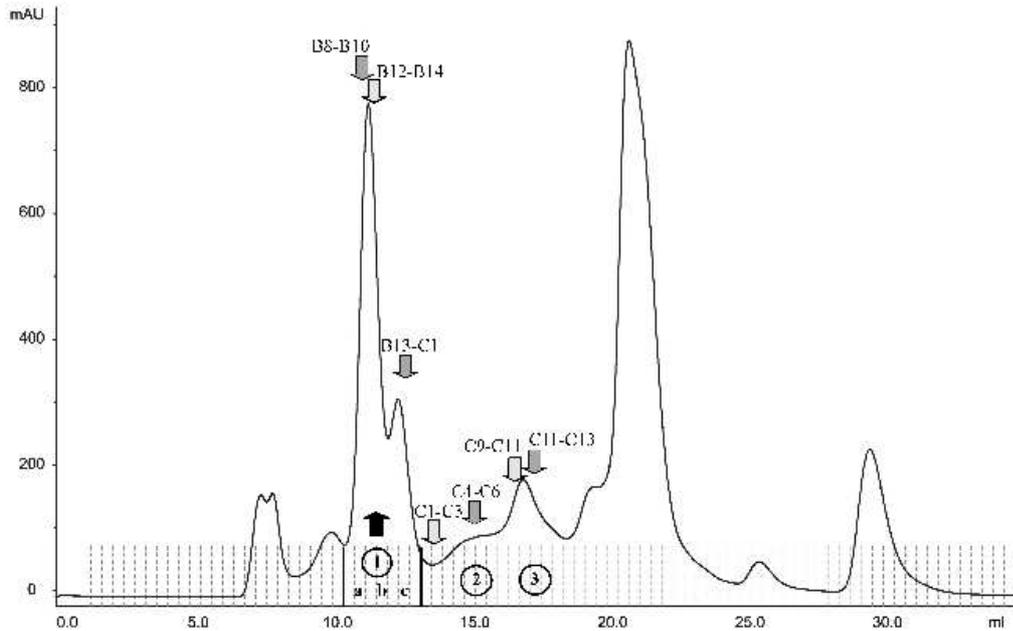


Abb. 2 Chromatogramm einer repräsentativen Trennung von Erdnussextrakt über Superdex-200

Zur Zuordnung der Molekularmassen wurden Eichproteinmischungen unter gleichen Bedingungen in 2 Läufen aufgetrennt (Ferritin (440 kDa, Fraktionen B8-B10), Aldolase (158 kDa, B13-C1), Ovalbumin (46 kDa, C4-C6), Ribonuclease (13,7 kDa, C11-C13)), (Catalase (232 kDa, B12-B14), Albumin (67 kDa, C1-C3) und Chymotrypsinogen (C9-C11)); Fraktionen des Ausschlussvolumens (1a-c) und Fraktionen unter 200 kDa (2 und 3). Wellenlänge 280 nm. Weitere Peaks wurden durch Farbstoffe und DNA verursacht, enthielten aber kein Protein.

Durch Integration der gefundenen Peakflächen konnte gezeigt werden, dass sich 90 % aller Erdnussproteine im Ausschlussvolumen über 200 kDa befanden (1 a-c, Abb. 2) und nur 10 % der Proteine in der Fraktion 2 und der Fraktion 3.

Zur Untersuchung, welche Erdnussproteine in den einzelnen Fraktionen der Gelfiltration vorlagen, wurde eine SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt.

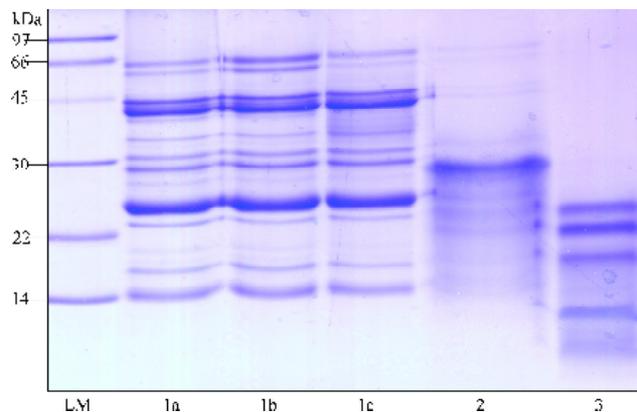


Abb. 3 SDS-PAGE zur Untersuchung der nach Superdex-200-Trennung von Erdnussextrakt erhaltenen Fraktionen

Ausschlussvolumen Fraktionen (1a-c), Fraktion 2 und Fraktion 3, LM Marker, 12 % red. SDS-PAGE, 10 µl/ Bahn, Coomassie-Färbung

In der Abb. 3 sind die unterschiedlichen Fraktionen einer chromatographischen Trennung mittels Superdex-200 gezeigt. Die Fraktionen 1 a-c wurden im Ausschluss-

Ergebnisse

volumen gefunden, wobei Fraktion 1 b die höchste Proteinkonzentration aufwies und die größte Peakfläche umfasste. Die Fraktion 2 lag zwischen Ausschlussvolumen und Fraktion 3 und wurde der Vollständigkeit halber analysiert, die Fraktion 3 wurde für die Charakterisierung der unter 20 kDa-Allergene verwendet.

3.1.2 Charakterisierung der Allergene durch verschiedene Gelelektrophoretetechniken und Proteinfärbungen

Das Molekulargewicht der im Ausschlussvolumen gefundenen Proteine deutete auf hochmolekulare Komplexe hin, wie sie von Vicilinen wie Ara h 1 und Glycininen wie Ara h 3/4 und Isoformen gebildet werden könnten (Tab. 1, Seite 7). Auf Grund ihrer geringen Größe sollten sich die niedermolekularen Erdnussallergene in den Fraktionen 2 und 3 befinden.

Es wurden verschiedene Gelelektrophoresen (SDS-PAGE, BN-PAGE, D-1D-PAGE und 2D-PAGE) durchgeführt, um unter unterschiedlich stringenten Bedingungen die vorhandenen Komplexe zu analysieren. Die gefundenen Proteine sollten im Immunoblot auf IgE-Reaktivität mit Patientenseren und auf die Bindung mit monoklonalen Antikörpern und Kaninchenseren getestet und identifiziert werden.

3.1.2.1 SDS-PAGE und LDS-PAGE

Zunächst wurde überprüft, ob sich die in der Gelfiltration mit Standard-Erdnussextrakt gefundenen Proportionen von 90 % hochmolekularen zu 10 % niedermolekularen Proteinen auch in Extrakten aus keimfähigen (EEx-k, EEx-k + 10 % Laktose) oder verarbeiteten Erdnüssen wiederfinden lassen. Dazu wurde zunächst eine SDS-PAGE mit neun verschiedenen Erdnussextrakten durchgeführt. Eine Gegenüberstellung dieser Extrakte mit jeweils 15 µg Protein / cm Probentasche zeigte die unterschiedliche Konzentration der einzelnen extrahierten Erdnussproteine (Abb. 4).

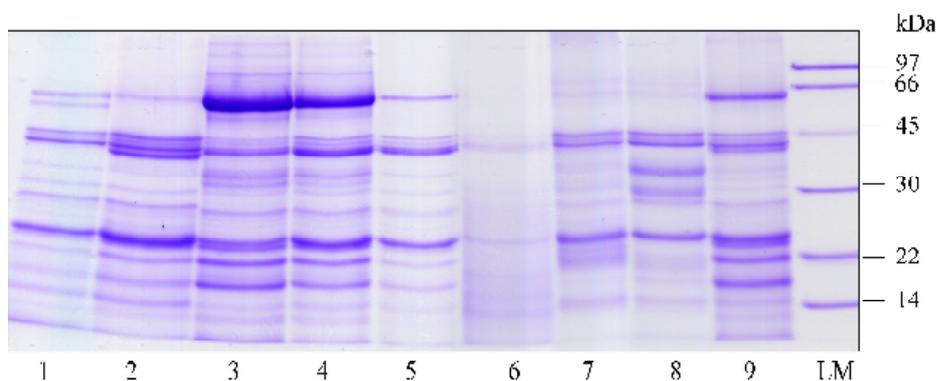


Abb. 4 Vergleich verschiedener Erdnussextrakte im SDS-Gel

12 % red. SDS-PAGE, Probenkonz. 15 µg/cm, Coomassie-Färbung

Bahn 1: Standard-Erdnussextrakt (EEx), 2: Dänischer EEx, 3: EEx aus keimfähigen Erdnüssen (EEx-k), 4: EEx-k + 10 % Laktose, 5: EEx gekocht, 6: EEx frittiert, 7: EEx Corny-Riegel, 8: EEx Snickers-Riegel, 9: EEx Peanut-Cracker

Einige Hauptbanden ließen sich in allen Extrakten wiederfinden, unabhängig davon, ob sie aus roh gerösteten, gerösteten und gesalzenen, aus verarbeiteten Produkten oder aus Varianten mit keimfähigen Erdnüssen hergestellt worden waren.

So konnten in nahezu allen Extrakten bis zu 20 verschiedene Proteinbanden gefunden werden, die aber deutliche Intensitätsunterschiede in den einzelnen verarbeiteten Extrakten aufwiesen. In allen Extrakten ließ sich eine Doppelbande, die oft auch in

Ergebnisse

Form von 4 Banden auftrat, bei 40-45 kDa nachweisen. Ebenfalls in allen Extrakten waren eine z. T. zwei Banden bei 25 kDa zu sehen und außer im Extrakt aus frittierten Nüssen auch immer eine intensive Bande bei 65 kDa. Auch hier lagen teilweise Doppelbanden vor (Bahnen 1, 3 und 4). Eine Doppelbande bei 20 kDa konnte in allen Extrakten außer dem frittierten Extrakt gefunden werden. In den Produktextrakten des Corny- und Snickers-Riegels waren sie nur schwach vorhanden. Je eine Bande bei ca. 12 und 14 kDa konnte in allen Extrakten nachgewiesen werden. Drei bis vier Banden zwischen 28-40 kDa waren in allen Extrakten vorhanden.

Um die eindeutige Zuordnung der einzelnen Banden zu ermöglichen, wurde die IgE-Reaktivität im Immunoblot mit einem Patientenpoolserum (aus den Seren JG3, CAT und OB) untersucht. Dabei wurden die Immunnachweise mit der Chemilumineszenz verstärkt, einer neuen sensitiven Methode, um Allergene auch in niedermolekularen Konzentrationen detektieren zu können.

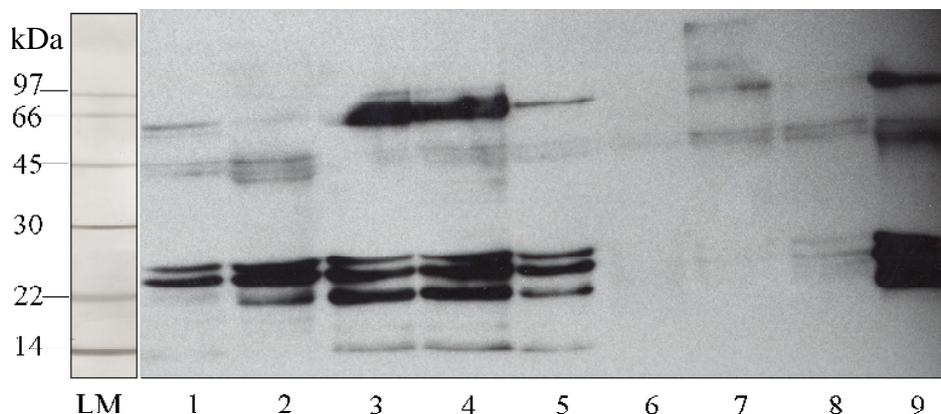


Abb. 5 Nachweis der IgE-reaktiven Erdnussallergene in verschiedenen Extrakten mit einem Patientenpoolserum (JG3, CAT und OB) mittels Chemilumineszenzdetektion

12 % red. SDS-PAGE Probenkonz. je 15 µg/cm, LM Marker

Bahn 1: Erdnusseextrakt (EEx), 2: Dänischer EEx, 3: Extrakt aus keimfähigen Erdnüssen (EEx-k), 4: EEx-k + 10 % Laktose, 5: EEx gekocht, 6: EEx frittiert, 7: EEx Corny-Riegel, 8: EEx Snickers-Riegel, 9: EEx Peanut-Cracker

Wie die Abb. 5 zeigt, sind die vier Banden bei 40 bis 45 kDa, die Banden zwischen 12 und 25 kDa und die Bande bei 65 kDa in fast allen Extrakten IgE-reaktiv. Im Extrakt aus frittierten Nüssen ist die IgE-Reaktivität nur schwach zu erkennen, was mit der schwachen Coomassie-Färbung korreliert. Auch drei Banden zwischen 25 und 30 kDa zeigten schwache IgE-Reaktivität, was in den Bahnen 2 bis 5 und 9 erkennbar ist. Besonders intensiv ist die Bande bei 65 kDa in den Bahnen 3, 4 und 9 detektiert, während zwei Banden bei 20 und eine Bande bei 25 kDa in den Bahnen 1-5 und 9 sehr stark erkannt wurden. Zusätzlich wurden Banden oberhalb von 100 kDa in den Bahnen 2 und 7 detektiert. Um eine Zuordnung der Allergene zu erhalten wurden monoklonale Mausantikörper gegen Ara h 1 (Pn-t) und Ara h 3/4 (PEI-7B2) sowie ein Kaninchenserum gegen Ara h 2 eingesetzt.

Ergebnisse

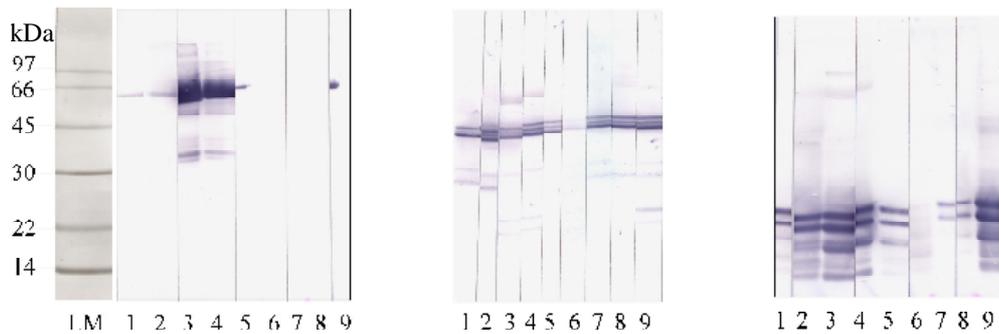


Abb. 6 Immunoblot zur Identifizierung der Erdnussallergene in verschiedenen Extrakten mit spezifischen monoklonalen Antikörpern und polyklonalen Seren

12 % SDS-PAGE, Detektion links: mAK Pn-t (α -Ara h 1), Mitte: mAK PEI-7B2 (α -Ara h 3/4) und rechts: pAK α -Ara h 2. Probenkonz. je 15 μ g/cm, LM Marker

Bahn 1: Erdnussextrakt (Standard-EEx), 2: Dänischer EEx, 3: Extrakt aus keimfähigen Erdnüssen (EEx-k), 4: EEx-k + 10 % Laktose, 5: EEx gekocht, 6: EEx frittiert, 7: EEx Corny-Riegel, 8: EEx Snickers-Riegel, 9: EEx Peanut-Cracker

Im Immunoblot (Abb. 6) fiel auf, dass der monoklonale Antikörper Pn-t, der das Ara h 1 (monomer und dimer) detektiert, die Banden der Extrakte 1-5 und 9 bei 65 kDa und höher erkannte, aber in den Extrakten aus keimfähigen Erdnüssen (3 und 4) auch Banden von 35 bis 65 kDa. Vor allem eine Bande bei ca. 35 kDa kam dabei in den anderen Extrakten nicht vor. Der monoklonale AK PEI-7B2, der gegen das Ara h 3/4 und Isoformen gerichtet ist, detektierte die vier Banden bei 40-45 kDa, sowie die Doppelbanden zwischen 22 und 30 kDa, sowie teilweise die Doppelbande bei 22 kDa. In den Extrakten aus keimfähigen Erdnüssen wurden auch die zu Ara h 1 gehörenden 65 kDa-Banden erkannt. Das polyklonale Kaninchenserum α -Ara h 2 wies nach, dass die Doppelbande bei 22 kDa Ara h 2 zeigte. Weiterhin wurden auch die Banden bei 12 und 14 kDa detektiert. Die nachgewiesenen Proteinkonzentrationen spielten auch bei der Antikörperbindung eine wichtige Rolle.

Insgesamt ließen sich in den neun Erdnussextrakten bis zu 20 Proteinbanden nachweisen, die fast alle IgE-Reaktivität zeigten und über ihre Molekulargewichte und das Bindungsverhalten mit mono- und polyklonalen Antikörpern identifiziert werden konnten. Die Banden bei 65 kDa gehörten zu Ara h 1, die vier Banden bei 45 kDa zu den Allergenen Ara h 3/4 und ihren Isoformen, ebenso wie die Banden zwischen 22 und 30 kDa. Die Doppelbande bei 20 kDa zeigte Ara h 2. Es wurde deutlich, dass die Proteinproportionen von 90 % hochmolekularen zu 10 % niedermolekularen Proteinen, die bei der Gelfiltration gefunden wurden, auch in den Extrakten vorlagen.

In der Fraktion 1 des Ausschlussvolumens (Abb. 3) ließen sich insgesamt 16 Banden zwischen 14 und 65 kDa darstellen, von denen die Proteinbanden bei 25, 31, 45 und 65 kDa jeweils Doppelbanden zeigten. Eine der Banden bei ca. 25 kDa enthielt in der Coomassie-Färbung das meiste Protein, diese Bande war bedeutend stärker ausgeprägt, als die anderen 15. Um diese gefundenen Banden genauer zu untersuchen, wurde ein Immunoblot der Fraktion 1 mit verschiedenen Antikörpern, Patientenseren und Lektinen durchgeführt (Abb. 7).

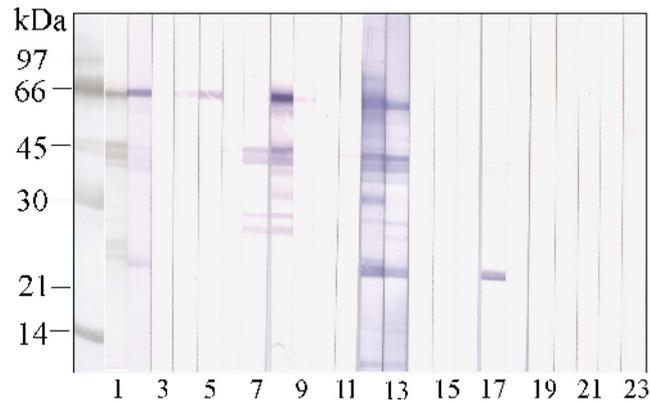


Abb. 7 Immunoblot zum Nachweis der in Superdexfraktion 1 (Ausschlussvolumen) enthaltenen Allergene

12 % red. SDS-PAGE:

LM, 1: India Ink, *2:* PS AB α -IgA, *3:* PS AB α -IgG,

4: mAK Pn-t, *5:* mAK Pn-c (beide α -Ara h 1), *6:* mAK Pn-x,

7: mAK PEI-7B2 (beide α -Ara h 3/4), *8:* PS JG3,

9: PS CAT, *10:* PS PG, *11:* PS KP28, *12:* Lektin Con A,

13: Lektin PNA, *14:* pAK MAP3 (α -Ara h 2), *15:* pAK α -Ara h 6,

16: pAK α -Ara h 7, *17:* Sam22, *18-22:* Negativkontrollen der ZweitAK

(α -M IgG, α -R IgG, α -h IgE, α -h IgA, α -h IgG, Streptavidin)

Das Patientenserum JG3 (Bahn 8) zeigte IgE-Reaktivität vor allem zu den drei Doppelbanden und zu einzelnen Banden zwischen 31 und 65 kDa, allerdings nur sehr schwach mit den Banden unterhalb von 21 kDa. Im Unterschied zu den Patientenseren wurden die monoklonalen Antikörper PEI-7B2 und Pn-x eingesetzt, um gezielt die Allergene Ara h 3/4 und ihre Isoformen zu detektieren. Somit waren die Banden bei 14, 22 und 45 kDa, die von PEI-7B2 erkannt wurden und die Banden bei 45 kDa zusätzlich auch von Pn-x, als Ara h 3/4 nachgewiesen. Die Banden bei 65 kDa wurden sowohl von Pn-t als auch von Pn-c detektiert und somit als Ara h 1 identifiziert. Zur Kontrolle eingesetzte polyklonale Antikörper gegen die anderen Allergene der Erdnuss, α -Ara h 2 (MAP3), α -Ara h 6 und α -Ara h 7 zeigten keine Reaktion. Sam 22 als α -Ara h 8 detektierte die beiden intensiven Banden bei 25 kDa, allerdings konnte die nachfolgende N-terminale Sequenzierung dieses nicht bestätigen. Auch hier wurde Ara h 3/4 gefunden.

Interessanterweise sind die Banden bei 25, 45 und 65 kDa auch IgA-reaktiv, was durch das Serum AB detektiert wurde. Diese Reaktivität korrelierte mit den Ergebnissen der Lektin-Färbungen. Neben dem Lektin Concanavalin A (Con A), das vor allem alpha-D-Glucose sowie alpha-D-Mannose in N-Glykanen erkennt, konnte auch das gegen beta-D-Galactose gerichtete Peanut Agglutinin (PNA) reaktive Strukturen detektieren. Dieses zeigte bei einer reduzierten Hintergrundfärbung ebenfalls die auch IgA-reaktiven Banden besonders deutlich, während andere Banden nur sehr schwach gefärbt wurden. Das Con A zeigte darüber hinaus noch eine sehr starke Bande im Bereich von ~31 kDa, die ebenfalls IgE-reaktiv war. Inhibitionsexperimente mit α -Methylmannopyranosid (Abb. 8, Bahn 1 und 2), dem Inhibitor von Con A, zeigten eine deutliche Schwächung einer Bande bei ~34 kDa, die mit der Bande bei ~31 kDa in Abb. 7 übereinstimmte. Eine leichte Schwächung konnte in der Bande bei 66 kDa (Ara h 1) gefunden werden. Die anderen Banden wurden nicht inhibiert, so dass hier eine unspezifische Bindung des Con A vorliegt. Bei einem Vergleich mit Extrakt aus keimfähigen Erdnüssen (Abb. 8, 3a+3b) fällt auf, dass die Banden bei 60 und 66 kDa (Ara h 1) und drei Banden bei 31-35 kDa sehr deutlich inhibiert werden. Diese Banden werden auch von dem Patientenserum PG (Abb. 8, 3c) erkannt, das Glykostrukturen

Ergebnisse

detektiert. Somit liegen im Ausschlussvolumen, isoliert aus Standarderdnussextrakt, und in dem Extrakt aus keimfähigen Erdnüssen vergleichbare Glykostrukturen vor.

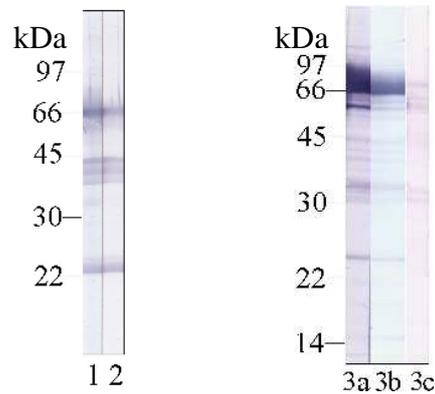


Abb. 8 Inhibitionsimmunoblot zum Nachweis und Vergleich spezifischer Bindungen an Glykostrukturen der im Ausschlussvolumen und in dem Extrakt aus keimfähigen Erdnüssen (EEx-k) enthaltenen Allergene
 12 % red. SDS-PAGE, Probenkonz. 15 µg/ cm
 Links (Ausschlussvolumen): LM, 1: Con A, 2: Con A + α-Methylmannopyranosid (10 %)
 Rechts (EEx-k): LM, 3a: Con A, 3b: Con A + α-Methylmannopyranosid (10 %), 3c: Patientenserum PG

Mit der N-terminalen Sequenzierung der IgE-reaktiven Proteine sollte die Identifikation der einzelnen Untereinheiten der Erdnussallergene Ara h 3/4, Ara h 3, Ara h 4, Gly 1 und iso-Ara h 3, sowie des Trypsin-Inhibitors ermöglicht werden. Zusätzlich sollte überprüft werden, ob die Zuordnung der Erdnussallergene Ara h 1, Ara h 2 und Ara h 6 aufgrund ihrer Molekulargewichte, isoelektrischen Punkte und ihres immunologischen Bindungsverhaltens bestätigt werden konnte. Dazu wurden zunächst alle Banden der Erdnussextrakte aus gerösteten und keimfähigen Erdnüssen nach Auftrennung mittels LDS- bzw. SDS-PAGE untersucht, die mit dem Patientenserum JG3 als IgE-reaktiv erkannt worden waren. In den Abb. 9 und 10 wurden die Banden, die N-terminal ansequenziert wurden, durch entsprechende Pfeile gekennzeichnet und in der folgenden Tabelle 6 mit den Sequenzen angegeben.

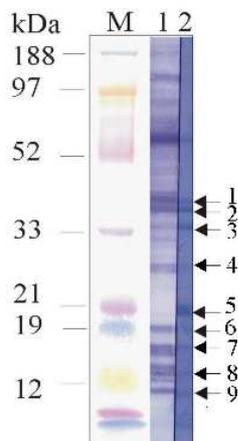


Abb. 9 LDS-PAGE des Erdnussextraktes zur Darstellung der Erdnussallergene
 10 % Bis-Tris-Gel, 1: Coomassie-Färbung
 2: Immunoblot mit Patientenserum JG3
 Pfeile kennzeichnen Banden für N-terminale Sequenzierung

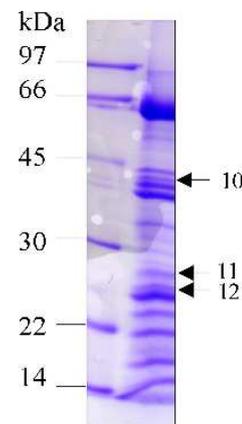


Abb. 10 SDS-PAGE des Erdnussextraktes (EEx-k + 10 % Laktose) zur Untersuchung des Einflusses von Lektinen auf die Erdnussallergene
 12 % SDS-Gel, Coomassie-Färbung
 Pfeile kennzeichnen Banden für N-terminale Sequenzierung

Ergebnisse

Tab. 6: Übersicht der Ergebnisse aus den N-terminalen Sequenzierungen zur Bestimmung der Proteinbanden aus Standarderdnussextrakt und Erdnussextrakt aus keimfähigen Erdnüssen +10 %Laktose (Abb. 9 und Abb. 10)

| Nr. | Molekulargewicht | Bestimmte Sequenz | Proteinname | Startpunkt in der Ara h 3/4-Sequenz |
|-----|------------------|-------------------|---|-------------------------------------|
| 1 | ~ 42 kDa | ISFRQQPXENA | Gly 1, Ara h 4, Ara h 3/4, Trypsin Inhibitor | 1 |
| 2 | ~36 kDa | ISFRQQPXENA | Gly 1, Ara h 4, Ara h 3/4, Trypsin Inhibitor | 1 |
| 3 | 33 kDa | VTFRQQGGEENEXQF | iso-Ara h 3 | 1 |
| 4 | 28 kDa | EEDQSQQXXD | Ara h 4 | 113 |
| 5 | 21 kDa | GIEETIXTASVK | Gly 1 | 332 |
| 6 | 20 kDa | EDQSQQXQD | Ara h 4 | 113 |
| 7 | 17 kDa | QQQGELQG | Ara h 2 | |
| 8 | 14 kDa | QQERGRQGD | Ara h 6 | |
| 9 | 12 kDa | ISFRQQPEENAXQF | Gly 1, Ara h 4, Ara h 3/4, Trypsin Inhibitor | 1 |
| 10 | ~ 45 kDa | ISFRQQP | Gly 1, Ara h 4, Ara h 3/4, Trypsin Inhibitor | 1 |
| 11 | 28 kDa | GIEETI | Gly 1, Ara h 3, Ara h 4, Ara h 3/4, iso-Ara h 3 | 332 |
| 12 | 28 kDa | GIEETI | Gly 1, Ara h 3, Ara h 4, Ara h 3/4, iso-Ara h 3 | 332 |

In den Abb. 9 und 10 fiel auf, dass sich die beiden Erdnussextrakte lediglich in der Intensität der einzelnen Proteinbanden unterscheiden. Durch die N-terminale Sequenzierung konnte bestätigt werden, dass die gefundenen Proteine auch in die gleichen Untereinheiten zerfielen. So sollten die Banden 1, 2 und 10 gleichen Unterheiten der Allergene Ara h 3/4 und Isoformen entsprechen. Die N-terminale Sequenzierung ergab, dass es sich um den N-terminalen Bereich dieser Allergene handelte. Für die Banden 5, 11 und 12 konnten die C-terminalen Bereiche der Allergene Ara h 3/4 und Isoformen gefunden werden. Die Bande 9 zeigte den N-terminalen Bereich der Allergene.

Die Zuordnung der Banden 7 und 8 zu den Allergenen Ara h 2 bzw. Ara h 6 erwies sich als richtig, so dass diese Sequenzierung nicht mit dem Extrakt aus keimfähigen Nüssen wiederholt werden musste.

Die Bande bei 65 kDa konnte nicht sequenziert werden, was mit den Literaturdaten übereinstimmt, dass die lange Form von Ara h 1 am N-Terminus blockiert ist. Daher war dieses negative Ergebnis dann zusammen mit dem Molekulargewicht und der immunologischen Bestimmung über Pn-t und Pn-c ein wichtiger Hinweis für die Identifizierung von Ara h 1.

Zwei Banden bei 20 und 28 kDa konnten einem Fragment von Ara h 4 zugeordnet werden, das bei der Aminosäure 113 startet.

Ergebnisse

Es wurden alle Isoformen mit der Startaminosäure bezogen auf die längste Allergensequenz des Ara h 3/4 angegeben, wenn eine eindeutige Zuordnung innerhalb der sechs Isoformen aufgrund der hohen Sequenzidentität nicht möglich war. Dabei wurde gezeigt, dass die Allergene in N-terminale und C-terminale Untereinheiten zerfallen, die durch die Proteaseschnittstelle NGIET der Glycine bestimmt wird. Der Trypsin Inhibitor entspricht der sauren Untereinheit. Deutlich zu erkennen war, dass nur die Hälfte der zwölf Sequenzen in einem Bereich lag, der sich eindeutig einer Isoform bzw. einem Allergen (Ara h 2 und Ara h 6 liegen jeweils einzeln vor) zuordnen ließ. Alle anderen Sequenzen konnten somit in mehr als einer Isoform vorliegen. Da für das Ara h 3 nur eine Partialsequenz veröffentlicht worden ist, in der die ersten drei Aminosäuren fehlen, konnten die sequenzierten N-Termini dieser Isoform nicht zugeordnet werden.

Ein Bereich der stärksten Sequenzunterschiede zwischen iso-Ara h 3 und den anderen Isoformen ist der N-Terminus des reifen Proteines. Somit ließen sich die Isoformen in diesem Bereich auch am besten zuordnen. Der Beginn der C-terminalen Untereinheit ist durch hohe Homologie gekennzeichnet, so unterscheiden sich die Sequenzen der Teilstücke erst ab der 7. Aminosäure. Daher konnte hier nur bei der Bande 5, in der acht Aminosäuren sequenziert wurden, eine eindeutige Zuordnung erfolgen. In den zwei anderen Banden (11 und 12) könnten diese Bereiche in allen Isoformen vorliegen.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden dann nur noch Proben sequenziert, die zu Ara h 3/4 und ihren Isoformen gehörten. Dabei sollte der Zerfall der Allergene in ihre Untereinheiten genau untersucht werden und die Frage geklärt werden, ob der Zerfall in N- und C-terminale Bereiche bei verschiedenen Trennungsmethoden reproduzierbar ist.

3.1.2.2 Blue native PAGE (BN-PAGE)

Um die Moleküle und Komplexe aus den Fraktionen des Ausschlussvolumens in ihrem natürlichen Zustand genauer untersuchen zu können, wurde die Methode der Blue native PAGE angewandt. Im Gegensatz zur SDS-PAGE wurden die Proteine dabei nicht denaturiert, sie konnten also weitgehend in ihrer komplexen Struktur dargestellt werden, in der sie im Ausschlussvolumen vorliegen. Die folgende Abb. 11 zeigt die in der Proteinauftrennung mittels Superdex-200-Säule im Ausschlussvolumen erhaltenen Proteine im Immunoblot.

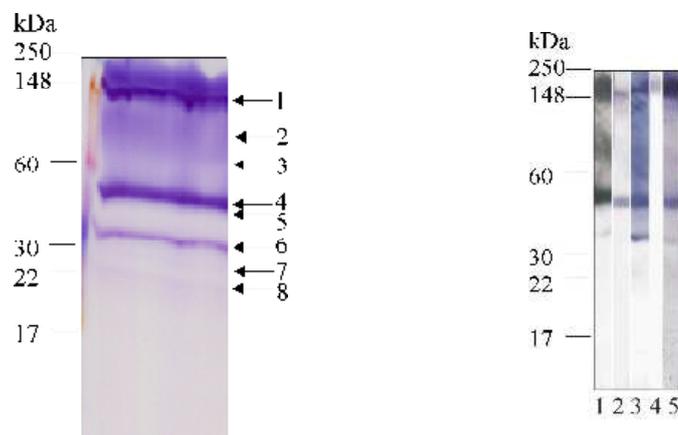


Abb. 11 Auftrennung des Ausschlussvolumens mittels Blue Native-PAGE
4-20 % Tris-Glycin-Gel: links Coomassie-Färbung, rechts Immunoblot
Bahn 1: India Ink (Proteinfärbung), 2: mAK PEI-7B2 (α -Ara h 3/4),
3: Patientenserum JG3, 4: mAK Pn-t (α -Ara h 1), 5: Lektin Con A.
Proteinbanden (Pfeile) 1-8 wurden für D-1D-Trennung ausgeschnitten

Ergebnisse

In der Abb. 11 ist die Auftrennung der Superdexfraktion 1 in acht Banden gezeigt. Die Bande mit dem höchsten Molekulargewicht liegt bei 150 kDa, zwei Banden bei ca. 100 kDa. Weitere Banden mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen konnten bei 25 und 30 sowie eine Doppelbande bei 50 kDa detektiert werden. Diese acht Banden wurden nicht nur bei der qualitativen Auftrennung in der Gelfiltration gefunden, sondern lagen auch in den Fraktionen 1 a-c in unterschiedlicher Intensität vor. Somit mussten also auch Proteinkomponenten unterhalb von 200 kDa als Einzelproteine vorliegen, die zunächst zusammen mit den Proteinen in Komplexen über 200 kDa im Durchlauf zu finden waren. Durch die negative Beladung mit dem Coomassie-Farbstoff, die eine leichte Beeinflussung der Komplexe zur Folge hat, wurden diese aus den Komplexen freigesetzt und konnten in fünf Banden unterhalb von 60 kDa nachgewiesen werden. Der Immunoblot in der Abb. 11 zeigte die IgE-Reaktivitäten der Banden 1-6 (Bahn 3). Die schwachen Banden unterhalb von 50 kDa wurden auch von keinem der monoklonalen Antikörper detektiert. Die Bande 1 wurde sowohl von Pn-t als Ara h 1 als auch von PEI-7B2 als Ara h 3/4 erkannt. Außerdem wurde die Doppelbande von 50 kDa als Ara h 3/4 identifiziert. Das Lektin Con A wies Glykosilierungen der Proteinbande 1 in Höhe von Ara h 1, sowie der Doppelbande 4/5 und 6 nach. Zusätzlich zu der Fraktion des Ausschlussvolumens von natur gerösteten Erdnüssen sollten Erdnussextrakte von verschiedenen Aufarbeitungsformen und Produkten mittels BN-PAGE aufgetrennt werden, um in einer Gegenüberstellung dieser Extrakte die unterschiedlichen oder gleichen relativen Konzentrationen der einzelnen extrahierten Erdnussproteine (Abb. 4) nachweisen zu können. Außerdem sollte überprüft werden, ob sich die Ergebnisse der Gelfiltrationsauftrennung in dem Ausgangsextrakt und in anderen Erdnussextrakten wiederfinden lassen.

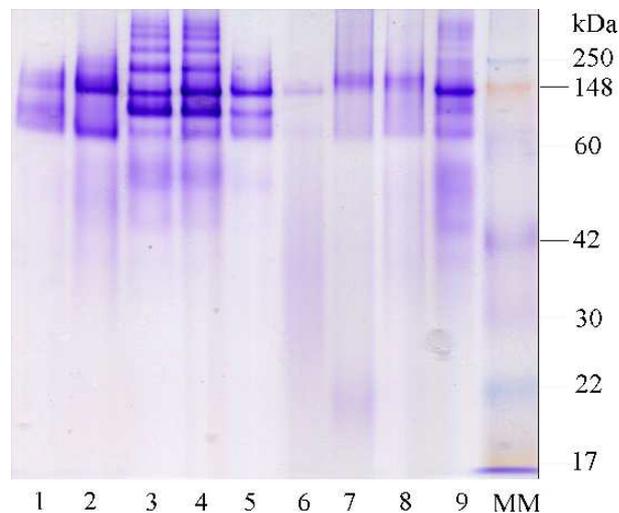


Abb. 12 Vergleich verschiedener Erdnussextrakte mittels BN-PAGE zum Nachweis der Allergene

10 % Tris-Glycin-Gel, Probenkonz. je 30 µg / Bahn, Coomassie-Färbung
Bahn 1: Standard-Erdnussextrakt (EEx), 2: Dänischer EEx, 3: Extrakt aus keimfähigen Erdnüssen (EEx-k), 4: EEx-k + 10 % Laktose, 5: EEx gekocht, 6: EEx fritiert, 7: EEx Corny-Riegel, 8: EEx Snickers-Riegel, 9: EEx Peanut-Cracker

In der Abb. 12 wird deutlich, dass es wie schon in Auftrennung dieser Erdnussextrakte mittels SDS-PAGE erkennbar wurde, neben einem ähnlichen Bandenmuster in allen Extrakten doch Unterschiede in der Proteinkonzentration einzelner Proteine gab. So konnte in allen Extrakten Banden bei ca. 100 und 150 kDa, meistens auch bei ca. 50 und 120 kDa gefunden werden. Zusätzlich ließen sich im Unterschied zu dem

Ergebnisse

Standarderdnussextrakt, der für die Auftrennung mittels Superdex-200 verwendet worden war, in den Extrakten aus keimfähigen Erdnüssen (Bahnen 3 und 4), sowie den Peanut Crackern (Bahn 9) noch hochmolekulare Proteinbanden über 250 kDa nachweisen. In diesen Extrakten, sowie im dänischen Extrakt wurden auch fünf weitere Banden zwischen 30 und 60 kDa gefunden, diese waren nur teilweise in den anderen Extrakten nachweisbar. In dem Snickers-Extrakt konnte zusätzlich eine Bande <20 kDa gefunden werden.

Somit konnten die im Ausschlussvolumen nachgewiesenen Proteinbanden auch in den anderen Extrakten ganz oder weitgehend wiedergefunden und zugeordnet werden.

3.1.2.3 Doppelt 1 dimensionale PAGE (D-1D)

Um die einzelnen Banden der BN-PAGE zu untersuchen und die Frage zu klären, warum die monoklonalen Antikörper gegen Ara h 1 und Ara h 3/4 beide die Bande 1 erkennen (Abb. 11), wurde eine D-1D-PAGE durchgeführt. Diese Methode ermöglichte es, die einzelnen Proteinbanden der BN-PAGE auszuschneiden, diese mittels Reduktion in Untereinheiten zu zerlegen und in der anschließenden zweiten Dimension dann nach Molekulargewicht aufzutrennen. Dazu wurden die acht Proteinbanden aus Abb. 11 weiter mittels LDS-PAGE getrennt.

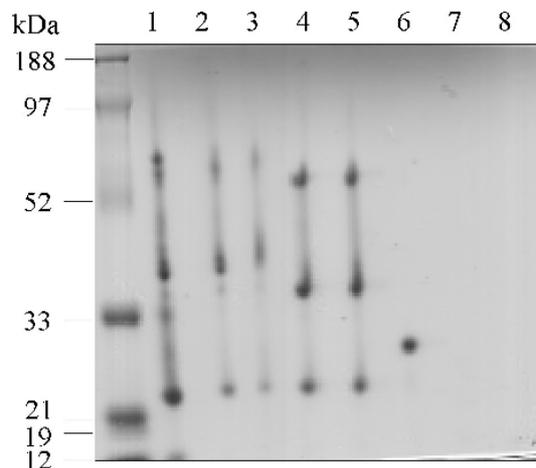


Abb. 13 Auftrennung des Ausschlussvolumens nach BN-PAGE mittels D-1D-PAGE zur Untersuchung des detaillierten Aufbaus der Proteinkomplexe
10 % Bis-Tris-Gel, MM, oben angegebene Nummern entsprechen den Banden 1-8 des BN-PAGE-Geles aus Abb. 11

In der Abb. 13 wird deutlich, dass die Banden 2-5 der BN-PAGE (Abb. 11) jeweils Untereinheiten der Bande 1 waren. Die Proteine dieser Bande zerfielen in sieben Untereinheiten. Die Banden 2 und 3 zeigten einen identischen Zerfall in vier Spots (22, 34, 36 und 66 kDa), die einem Teil der Bande 1 entsprachen. Ebenso zerfielen die Banden 4 und 5 in drei gleiche dazu passende Untereinheiten (22, 34 und 54 kDa), die ebenfalls in Bande 1 gefunden wurden. Entsprechend dem 25 kDa-Spot (Probe 6) wurde ein Spot auf Bande 1 nachgewiesen. Die beiden Banden 7 und 8 ließen sich im zweiten Auftrennungsschritt aufgrund einer zu geringen Proteinkonzentration nicht darstellen, so dass diese in dem folgenden Experiment unberücksichtigt blieben.

Aus einer anderen Auftrennung mittels der Superdex-200-Säule wurden fünf prominente Banden in der BN-PAGE erhalten, die in der D-1D-PAGE getrennt werden sollten. Dazu wurden die Proteinbanden 1 bis 5 ausgeschnitten, reduziert und in der zweiten Dimension nach Molekulargewicht aufgetrennt. Von jedem Gel wurde mittels Kapillarblot für den Immunnachweis ein Abdruck angefertigt und anschließend wurden

Ergebnisse

die Proteine mittels Tankblot auf eine PVDF-Membran überführt, Coomassie gefärbt und N-terminal sequenziert. Die Abb. 14 zeigt die Trennung im BN-PAGE-Gel und die weitere Analyse der erhaltenen fünf Banden nach D-1D-PAGE, Immundetektion und anschließender N-terminaler Sequenzierung.

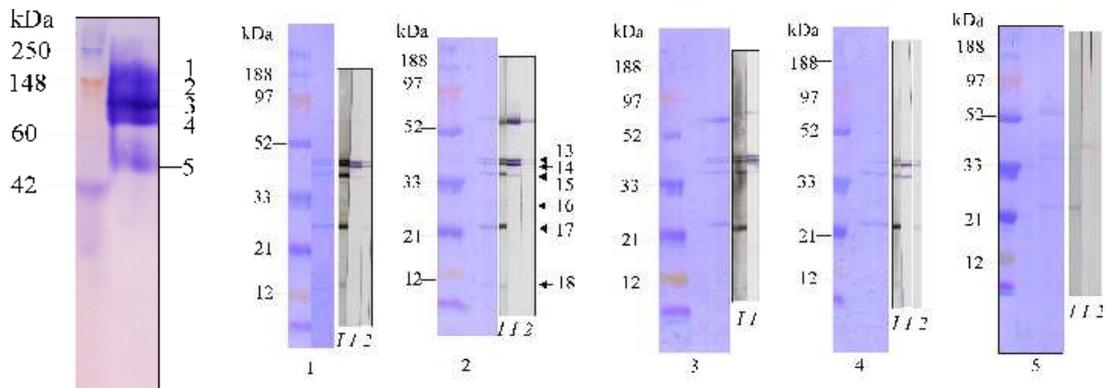


Abb. 14 **Auftrennung des Ausschlussvolumens nach BN-PAGE mittels D-1D-PAGE**
linkes Bild: BN-PAGE mit 4-20 % Tris-Glycin-Gel, Coomassie-Färbung, aus diesem Gel wurden die Banden 1-5 ausgeschnitten und in der D-1D-PAGE erneut aufgetrennt
rechtes Bild: D-1D-PAGE auf PVDF-Membranen geblottet, 10 % Bis-Tris-Gele, Coomassie-Färbung von PVDF-Membranen, *Bahn 1*: India Ink-Proteinfärbung, *1*: Patientenserum JG3, *2*: Patientenserum OB

In der Abb. 14 wurde gezeigt, dass in den Banden 2 bis 5 jeweils Untereinheiten der Gesamtbände 1 zu finden waren. So wurde deutlich, dass in den BN-PAGE-Banden 1 bis 3 neben der 66 kDa-Bande von Ara h 1 vor allem drei Banden bei 34-45 kDa auftraten, die IgE-Reaktivität zeigten. Im Unterschied zu JG3 wurde von dem Patientenserum OB zusätzlich eine Bande bei 22 kDa erkannt, die in allen fünf Banden mit unterschiedlicher Intensität vorhanden war. Auch die 12 kDa-Bande aus Abb. 13 wurde in den BN-PAGE-Banden 1 bis 4 gefunden und von JG3 als IgE-reaktiv identifiziert. Die Proteinkonzentration der BN-PAGE-Bande 5 war gering, aber auch hier ließen sich Banden von 25, 34-50 kDa finden und Ara h 3/4 und Isoformen zuordnen. Im Anschluss sollten diese Banden nun sequenziert werden, um die einzelnen Untereinheiten dieser Banden genau definieren zu können. Außerdem sollte im direkten Vergleich mit der D-1D-Auftrennung von Erdnussextrakt aus keimfähigen Nüssen (Abb. 15) überprüft werden, ob sich dieser Zerfall der Isoformen von Ara h 3/4 unabhängig von dem Ausgangsextrakt generell wiederfinden lässt. Die Ergebnisse der N-terminalen Sequenzierung sind in Tab. 9 zusammengefasst. Das Gel musste überladen werden, um eine ausreichend hohe Proteinmenge für die Sequenzierung zu erhalten. Es wurden nur die inneren Proteinbanden bei dieser D-1D-PAGE ausgeschnitten. Die aufkonzentrierten Proteinmengen werden durch die ausstrahlenden Banden markiert.

Ergebnisse

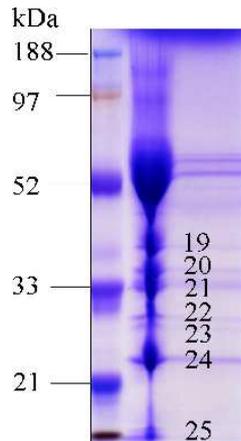


Abb. 15 Auftrennung des Erdnussextraktes (EEx-k) mittels D-1D-PAGE in der Abfolge BN-PAGE/ LDS-PAGE
10 % Bis-Tris-Gel, Coomassie-Färbung

Tab. 7: Übersicht der Ergebnisse der N-terminalen Sequenzierungen zur Bestimmung der Proteinbanden aus Abb. 14 (Banden 13-18) und Abb. 15 (Banden 19-25)

| Nr. | Molekulargewicht | Bestimmte Sequenz | Proteinname | Startpunkt in der Ara h 3/4-Sequenz |
|-----|------------------|-------------------|--|-------------------------------------|
| 13 | ~ 45 kDa | ISFRQQ | Gly 1, Ara h 4, Ara h 3/4, Trypsin Inhibitor | 1 |
| 14 | ~ 44 kDa | ISFRQQ | Gly 1, Ara h 4, Ara h 3/4, Trypsin Inhibitor | 1 |
| 15 | ~ 40 kDa | VTFRQG | iso-Ara h 3 | 1 |
| 16 | ~28 kDa | GIEETIXTAS | Gly 1, Ara h 3, Ara h 3/4 | 332 |
| 17 | ~ 22 kDa | GIEETI | Gly 1, Ara h 3, Ara h 4, Ara h 3/4, iso-Ara h 3 | 332 |
| 18 | ~12 kDa | IXFRQQ | Gly 1, Ara h 4, Ara h 3/4, Trypsin Inhibitor | 1 |
| 19 | ~36 kDa | ISFRQ | Gly 1, Ara h 4, Ara h 3/4, Trypsin Inhibitor | 1 |
| 20 | ~ 35 kDa | VTFXQQG | iso-Ara h 3 | 1 |
| 21 | ~34 kDa | VTFRQ / GIEET | iso-Ara h 3/ Gly 1, Ara h 3, Ara h 4, Ara h 3/4, iso-Ara h 3 | 1/ 332 |
| 22 | ~28 kDa | GIEETI | Gly 1, Ara h 3, Ara h 4, Ara h 3/4, iso-Ara h 3 | 332 |
| 23 | ~22 kDa | GIEET | Gly 1, Ara h 3, Ara h 4, Ara h 3/4, iso-Ara h 3 | 332 |
| 24 | ~21 kDa | GIEET | Gly 1, Ara h 3, Ara h 4, Ara h 3/4, iso-Ara h 3 | 332 |
| 25 | 12 kDa | IXFRQXP | Gly 1, Ara h 4, Ara h 3/4, Trypsin Inhibitor | 1 |

Vergleicht man die D-1D-Auftrennung der Allergene aus der Superdextrafraktion 1 (Abb. 14) mit dem Erdnussextrakt aus keimfähigen Erdnüssen (EEx-k, Abb. 15), so erkennt man in beiden Fällen einen gleichartigen Zerfall der Allergene. So sollten die Banden

Ergebnisse

13 und 19, 14 und 20, 15 und 21, 16 und 22, 17 und 23 sowie 18 und 25 jeweils identische Untereinheiten darstellen, was mit der Protein-Sequenzierung bestätigt werden konnte. Im Unterschied zu Bande 15 stellte die Bande 21 zwar ein Gemisch aus von Ara h 3/4-Untereinheiten aus N- und C-terminalen Bereichen dar, was aber durch die höhere Proteinkonzentration und dadurch nicht ganz so scharf abgegrenzten Banden des Extraktes aus keimfähigen Erdnüssen zu erklären ist.

3.1.2.4 Zweidimensionale PAGE (2D)

Die Ergebnisse der D-1D-PAGE sollten nun mit zweidimensionalen Elektrophoresen aus BN-PAGE und LDS-PAGE bzw. nicht reduzierender und reduzierender LDS-PAGE bestätigt werden. Dazu wurde zunächst die Auftrennung der Superdexfraktion 1 (Abb. 11) in der BN-PAGE verwendet. Es wurden nicht die acht einzelnen Banden, sondern ein Streifen, der den gesamten Molekulargewichtsbereich umfasste, ausgeschnitten, reduziert und im 90°-Winkel in der zweiten Dimension nach Molekulargewicht aufgetrennt (Abb. 16).

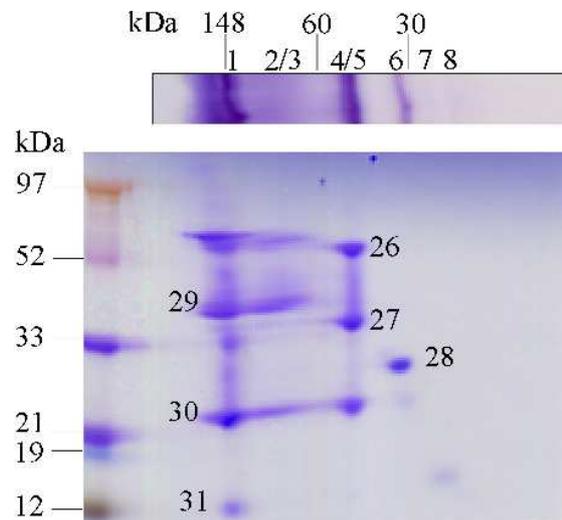


Abb. 16 Auftrennung der Superdexfraktion 1 in der Abfolge BN-PAGE / LDS-PAGE zur Untersuchung der Untereinheiten der Allergene
10 % Bis-Tris-Gel nach Reduktion der BN-PAGE, Coomassie-Färbung aus Abb. 11 als erster Dimension (oben angelegt), Nummerierung der Proben für N-terminale Sequenzierung

In der Abb. 16 wird deutlich, dass die Bande 1 wieder in sieben Untereinheiten von 12, 22, 25, 33, 45, 54 und 66 kDa zerfiel. Auch die beiden Doppelbanden 2/3 und 4/5 zerfielen in die Untereinheiten (wie für Abb. 11 beschrieben). Im Gegensatz zu der D-1D-PAGE reichte die Proteinkonzentration der Banden 6-8 in dieser Auftrennung aus, um Spots zwischen 12 und 25 kDa erkennen zu können.

Bei dieser zweidimensionalen Auftrennung deutete sich eine Diagonale an, bei der die Proteine nach Trennung in der 2. Dimension auf der Diagonale lagen und sich durch teilweisen Zerfall in kleinere Untereinheiten zerlegen ließen. Um dieses zu bestätigen und dabei zu klären, ob dieser Zerfall durch eine unvollständige Reduktion der Disulfidbrücken erfolgte, wurde eine weitere zweidimensionale Elektrophorese in der Abfolge nicht reduzierende PAGE - reduzierende PAGE durchgeführt (Abb. 17). Im Unterschied zu der BN-PAGE / LDS-PAGE war hier in beiden Dimensionen LDS als Detergenz vorhanden, so dass die Proteine bereits in der ersten Dimension denaturiert wurden und in der zweiten Dimension eine Auftrennung in Untereinheiten erfolgte.

Ergebnisse

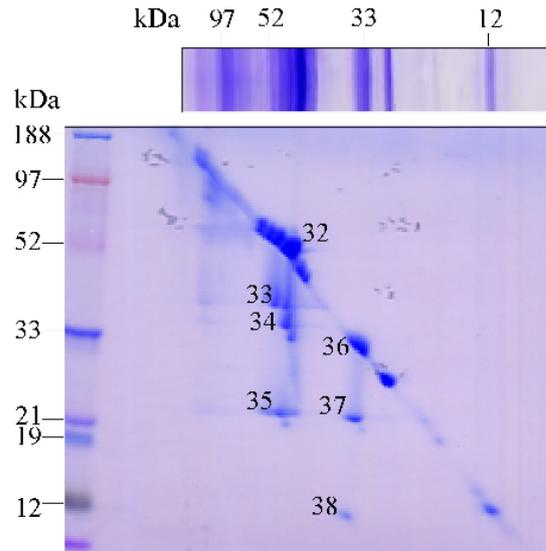


Abb. 17 Auftrennung der Superdexfraktion 1 in der Abfolge nicht-reduzierende / reduzierende LDS-PAGE
 10 % Bis-Tris-Gel nach Reduktion der nicht-reduzierenden PAGE als erster Dimension (oben angelegt), Coomassie-Färbung
 Nummerierung der Proben für N-terminale Sequenzierung

Die Abb. 17 zeigt einen deutlichen Zerfall der nach Auftrennung in der 1. Dimension erhaltenen Allergene bei 45 bis 55 kDa. So zerfällt der Spot 32 in drei kleinere Untereinheiten von 33 bis 40 kDa (Spots 33 und 34) und 22 kDa (Spot 35). Einen weiteren Zerfall zeigte der Spot 36 mit einem Molekulargewicht von 33 kDa in zwei kleinere Untereinheiten mit Molekulargewichten von 10 kDa und 22 kDa (Spots 37 und 38). Die Spots 35 und 37 wiesen jeweils das gleiche MW von 22 kDa auf. Proteine, die kleiner als 30 kDa waren, wurden nicht weiter zerlegt.

In diesem Zusammenhang fiel die Tatsache auf, dass sich eine Diagonale durch das Gel legen ließ, wobei auch ein Spot (Nr. 32) etwas oberhalb zu liegen kam, also nach Reduktion ein scheinbar größeres MW zeigt.

Diese Ergebnisse wurden mit der N-terminalen Sequenzierung der einzelnen Untereinheiten der Allergene Ara h 3/4 und Isoformen bestätigt und in der folgenden Tab. 8 zusammengefasst.

Tab. 8: Übersicht der Ergebnisse der N-terminalen Sequenzierungen nach Trennung der Erdnussallergene in der Abfolge BN-PAGE / LDS-PAGE (Abb. 16, Spots 26-31) und nicht-reduzierende / reduzierende LDS-PAGE (Abb. 17, Spots 32-38)

| Nr. | Molekulargewicht | Bestimmte Sequenz | Proteinname | Startpunkt in der Ara h 3/4-Sequenz |
|-----|------------------|---------------------|---|-------------------------------------|
| 26 | 60 | VTFRQGGEE / GIEETIC | iso-Ara h 3 / Gly 1, Ara h 3, Ara h 4, Ara h 3/4, iso-Ara h 3 | 1 / 332 |
| 27 | 34 | VTFRQ | iso-Ara h 3 | 1 |
| 28 | 26 | EEDQSQQQQ | Ara h 4 | 113 |
| 29 | ~34 kDa | VTFRQGGEE / GIEETIC | iso-Ara h 3 / Gly 1, Ara h 3, Ara h 4, Ara h 3/4, iso-Ara h 3 | 1 / 332 |
| 30 | ~21 kDa | GIEETIXTA | Gly 1, Ara h 3, Ara h 4, Ara h 3/4, iso-Ara h 3 | 332 |

Ergebnisse

| | | | | |
|----|----------|---------------------|---|--------|
| 31 | ~11 kDa | ISFRQQPE | Gly 1, Ara h 4, Ara h 3/4, Trypsin Inhibitor | 1 |
| 32 | ~ 60 kDa | VTFRQGGEEEN | iso-Ara h 3 | 1 |
| 33 | 40 kDa | ISFR / VTFR | Gly 1, Ara h 4, Ara h 3/4, Trypsin Inhibitor / iso-Ara h 3 | 1 |
| 34 | 34 kDa | VTFRQGGEE / GIEETIC | iso-Ara h 3 / Gly 1, Ara h 3, Ara h 4, Ara h 3/4, iso-Ara h 3 | 1/ 332 |
| 35 | ~21 kDa | GIEETIXTAS | Gly 1, Ara h 3, Ara h 4, Ara h 3/4, iso-Ara h 3 | 332 |
| 36 | 34 kDa | VTFRQGGEE / GIEETIC | iso-Ara h 3 / Gly 1, Ara h 3, Ara h 4, Ara h 3/4, iso-Ara h 3 | 1/ 332 |
| 37 | ~21 kDa | GIEETICTAS | Gly 1, Ara h 3, Ara h 3/4 | 332 |
| 38 | ~11 kDa | ISFRQQPEEN | Gly 1, Ara h 4, Ara h 3/4, Trypsin Inhibitor | 1 |

Die N-terminale Sequenzierung der einzelnen Spots in Abb. 17 konnte den beschriebenen Zerfall der Proteinbanden 1, 4 und 5 sowie 6 aus der BN-PAGE (Abb. 16) bestätigen. Die Allergene Ara h 3/4 und ihre Isoformen zeigten, bedingt durch die Spaltung an der Proteaseschnittstelle, einen Zerfall in der zweiten Dimension in ihre N-terminalen und C-terminalen Bereiche. So ließen sich die Spots 26, 27 und 31 dem N-terminalen Bereich von iso-Ara h 3 bzw. den anderen Isoformen zuordnen, während Spot 30 dem C-terminalen Bereich aller Isoformen und Spot 29 einem Gemisch aus N- und C-terminalem Bereich von iso-Ara h 3 entsprach. Auch hier konnte der Spot 28, der aus der Bande 6 hervorgegangen war, als mittlerer Bereich von Ara h 4 bestimmt werden, mit einem Beginn bei Aminosäure 113 bezogen auf die Allergensequenz von Ara h 3/4.

Bereits die Gegenüberstellung beider Trennmethode (BN-PAGE / reduzierende LDS-PAGE, nicht reduzierende / reduzierende LDS-PAGE) hatte große Übereinstimmungen in der Auftrennung der Proteine gezeigt. In beiden Auftrennungen konnten Diagonalen durch die Gele gelegt werden. Auf dieser Geraden lagen Proteine, die sich teilweise noch in Untereinheiten zerlegen ließen. Dieser Zerfall konnte mit der N-terminalen Sequenzierung bestätigt werden. Die scheinbar differierenden Molekulargewichte der einzelnen Untereinheiten bedingt durch die unterschiedliche Auftrennung erlaubten trotzdem eine klare Zuordnung der Proteine und ihrer Untereinheiten.

In den vier Fällen (Tab. 8), in denen ein Gemisch aus N- und C-terminalen Untereinheiten zu finden war, variierte das Molekulargewicht zwischen 34 und 60 kDa. Insgesamt sieben Sequenzen ließen sich als N-Terminus der reifen Proteine mehreren Isoformen (Ara h 4, Ara h 3/4, Trypsin Inhibitor und Gly 1, nicht jedoch Ara h 3) zuordnen. Die Molekulargewichte dieser Komponenten variierten dabei ganz erheblich. Zwei der Sequenzen konnten bei ~45 kDa, zwei zwischen 36-40 kDa und drei bei ca. 12 kDa gefunden werden.

Diese zweidimensionalen Gelelektrophoresen zeigten, dass sich die Proteine Ara h 3/4 und ihre Isoformen (Molekulargewichte von 58 bis 60 kDa) durch die Reduktion in kleinere Untereinheiten zerlegen ließen, nicht aber das Ara h 1 (MW 65 kDa). Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurde eine weitere zweidimensionale Auftrennung durchgeführt, wobei auch hier ein Vergleich zwischen den nativen und den reduzierten Proteine erfolgen sollte. Dabei wurde die Trennung der Proteine nach ihrem iso-

Ergebnisse

elektrischen Punkt mit der Auftrennung nach ihrem Molekulargewicht kombiniert. Außerdem sollte überprüft werden, ob bei der Auftrennung des Gesamterdnuss-extraktes noch weitere Allergenkomponenten erhalten werden, die in dem Ausschluss-volumen durch die Abtrennung kleinerer Fraktionen nicht mehr nachweisbar sind.

Für eine optimale Auftrennung des Erdnussextraktes wurde zunächst eine isoelek-trische Fokussierung in einem pH-Bereich von 3-10 durchgeführt, um einen Gesamt-überblick über die Erdnussproteine zu erhalten. Die anschließende zweite Dimension wurde in einem 4-20 %igen Tris-Glycin-Gel durchgeführt. Zunächst wurde Erdnuss-extrakt in der 2D-PAGE (Abb. 18) aufgetrennt und die einzelnen Spots anschließend mit Immunoblots und N-terminaler Sequenzierung (Tab. 9) weiter analysiert.

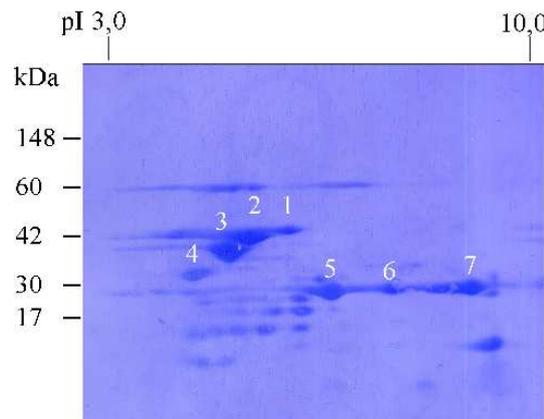


Abb. 18 2D-PAGE von Gesamterdnussextrakt
IEF im pH-Gradienten von pH 3-10, LDS auf 4-20 % Tris-Glycin-Gel
Coomassie-Färbung für PVDF-Membranen

In der 2D-PAGE (Abb. 18) konnten zunächst fünf Bereiche deutlich voneinander abgegrenzt werden. Im sauren Bereich von 30-45 kDa bei einem pI von 4-5 ließen sich vier einzelne Spots (1-4) finden, die jeweils ineinander überzugehen schienen. Zudem waren vier basische Spots bei ca. 28 kDa im pI-Bereich von 5-10 zu sehen, die aber nicht vollständig voneinander trennbar waren. Bei ca. 20 kDa konnte eine Spotan-sammlung im pI-Bereich von 4-5 gefunden werden, die deutlich weniger Protein enthielt. Außerdem war bei 60 kDa eine Bande mit einem pI von 5-6 zu erkennen, deren Komponenten sich nicht weiter trennen ließen.

Um die Trennschärfe zu erhöhen, wurde der pH-Bereich von 4-7 gespreizt, um diese Spots trennen zu können, ohne dabei die Trennung der anderen Spots zu verhindern.

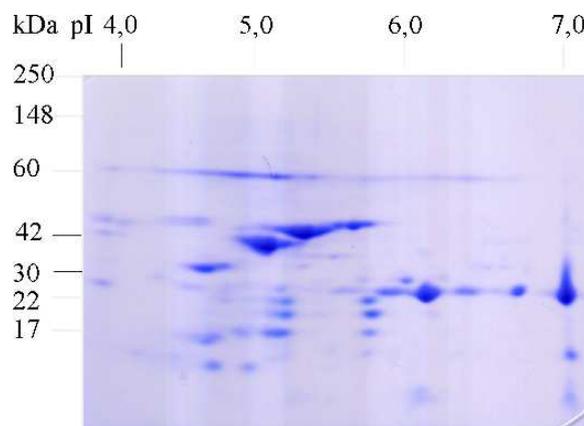


Abb. 19 2D-PAGE von Gesamterdnussextrakt
IEF im pH-Gradienten von pH 4-7, LDS auf 4-20 % Tris-Glycin-Gel
Coomassie-Färbung

Ergebnisse

Nach der Auftrennung von Erdnussextrakt unter diesen Bedingungen (Abb. 19) fiel auf, dass eine erheblich bessere Trennung der sauren Spots in dem Bereich zwischen 30-45 kDa bei einem pI von 5-6 erzielt wurde und sich sogar ein einzelner Spot (Nr. 4 in Abb. 18) bei 4,5 pI / 30 kDa etwas weiter von dem Komplex getrennt hatte. Insgesamt ließen sich alle Bereiche eindeutig wieder zuordnen, wobei in den Bereichen < 20 kDa, 60 kDa bzw. einem pI > 6 keine bessere Trennung zu finden war.

Nun sollten die Superdexfraktion des Ausschlussvolumens ebenfalls zweidimensional aufgetrennt werden, um diese mit der Auftrennung des Erdnussextraktes vergleichen zu können. Dabei wurde eine isoelektrische Fokussierung bei pH 4-7 durchgeführt und mit 4-20 %igen Tris-Glycin-Gelen in der 2D-PAGE kombiniert. Zur Kontrolle, ob sich die vier Spots noch deutlicher voneinander trennen lassen, wurden auch pH-Gradienten von 3-6 und 4,5-5,5 verwendet, die aber keine verbesserte Auftrennung erbrachten. Die Abb. 20 zeigt die repräsentative Auftrennung der für alle weiteren Experimente verwendeten Superdexfraktion 1.

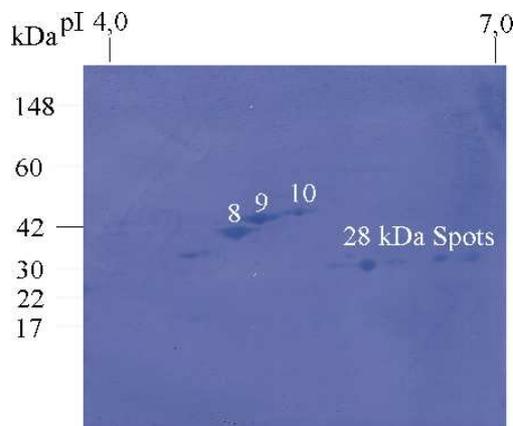


Abb. 20 2D-PAGE der Superdex-200-Fraktion 1
IEF im pH-Gradienten von pH 4-7, LDS auf 4-20 % Tris-Glycin-Gel
Coomassie-Färbung für PVDF-Membranen

Bei der 2D-PAGE der Superdexfraktion 1 (Abb. 20) ließen sich noch drei Bereiche deutlich voneinander trennen. So waren nun erneut die sauren Spots (hier mit Spot 8-10 gekennzeichnet) in dem Bereich zwischen 30-45 kDa bei einem pI-Bereich von 5-6 zu finden, während der einzelne, gekennzeichnete Spot bei 30 kDa / 4,5 pI sich noch etwas weiter von dem Komplex getrennt hatte. Die strichförmige Aneinanderreihung der basischen Spots bei 28 kDa blieb ebenfalls erhalten, hier konnte auch keine bessere Auftrennung erreicht werden. Die streifenförmige Bande bei 60 kDa blieb erhalten, trennte sich aber stärker in einen pI-Bereich von 4-5 und 6,5 auf. Die Spotansammlung war durch die Abtrennung der Fraktion unter 200 kDa nicht mehr vorhanden. Hier war also auch mittels der 2D-PAGE der Nachweis erbracht, dass eine vollständige Trennung des Erdnussextraktes mit der Superdex-200-Säule erfolgte.

Die Zuordnung der einzelnen Spots sollte mit Hilfe der N-terminalen Sequenzierung erfolgen. Dazu wurde ebenfalls der direkte Vergleich aus dem Erdnussextrakt und der daraus isolierten Superdexfraktion 1 gewählt, um den gleichartigen Zerfall der Allergene Ara h 3/4 und ihrer Isoformen darzustellen. Die Ergebnisse sind in der Tab. 9 zusammengefasst.

Ergebnisse

Tab. 9: Übersicht der Ergebnisse der N-terminalen Sequenzierungen der Proteinspots aus 2D-PAGE von Gesamterdnussextrakt (Abb. 18, Spots 1-7) und des Ausschlussvolumens der Gelfiltration (Abb. 20, Spots 8-10, 28 kDa-Spots)

| Nr. | Molekulargewicht | Bestimmte Sequenz | Proteinname | Startpunkt in der Ara h 3/4-Sequenz |
|--------------|------------------|---------------------------|---|-------------------------------------|
| 1 | 42 kDa | ISFRQQPEE | Gly 1, Ara h 4, Ara h 3/4, Trypsin Inhibitor | 1 |
| 2 | 42 kDa | ISFRQQPEE | Gly 1, Ara h 4, Ara h 3/4, Trypsin Inhibitor | 1 |
| 3 | ~30 kDa | VTFRQGGEE NECQ FQRLNAQ | iso-Ara h 3 | 1 |
| 4 | ~28 kDa | EEDQSQQQQ | Ara h 4 | 113 |
| 5 | 28 kDa | GIEETI | Gly 1, Ara h 3, Ara h 4, Ara h 3/4, iso-Ara h 3 | 332 |
| 6 | | GIEETI | Gly 1, Ara h 3, Ara h 4, Ara h 3/4, iso-Ara h 3 | 332 |
| 7 | | GIEETI | Gly 1, Ara h 3, Ara h 4, Ara h 3/4, iso-Ara h 3 | 332 |
| 8 | ~30kDa | VTFRQGG | iso-Ara h 3 | 1 |
| 9 | ~36 kDa | ISFRQQP | Gly 1, Ara h 4, Ara h 3/4, Trypsin Inhibitor | 1 |
| 10 | ~36 kDa | ISFRQQP | Gly 1, Ara h 4, Ara h 3/4, Trypsin Inhibitor | 1 |
| 28 kDa Spots | 28 kDa | GIEETI | Gly 1, Ara h 3, Ara h 4, Ara h 3/4, iso-Ara h 3 | 332 |
| | 28 kDa | GIEETI | Gly 1, Ara h 3, Ara h 4, Ara h 3/4, iso-Ara h 3 | 332 |
| | 28 kDa | GIEETI | Gly 1, Ara h 3, Ara h 4, Ara h 3/4, iso-Ara h 3 | 332 |

Die 2D-PAGE führte zu einer Trennung der sauren (N-terminalen) und basischen (C-terminalen) Untereinheiten der Isoformen (Abb. 18 und 20). Die sauren Spots bei 35-45 kDa waren IgE-reaktiv und durch den monoklonalen Antikörper PEI-7B2 als Ara h 3/4 und Isoformen identifiziert. Die N-terminale Sequenzierung der Spots 1 und 2 bzw. 9 und 10 bestätigte diese Befunde, so war hier eine Zuordnung zu den N-terminalen Bereichen der Isoformen Ara h 3/4, Ara h 4, Trypsin Inhibitor und Gly 1, nicht aber zu Ara h 3 möglich. Der Spot 3 bzw. 8 wurde als N-terminaler Bereich von iso-Ara h 3 identifiziert. Die basischen (C-terminalen) Untereinheiten aller Isoformen wurden in der Aneinanderreihung der 28 kDa-Spots gefunden. Sie wurden nicht von dem mAK PEI-7B2 erkannt. Die Patientenserum (CAT, OB und weitere) erkannten diese Bereiche als IgE-reaktiv (3.1.3), das Patientenserum JG3 jedoch nur schwach. Der durch die Wahl des engeren pH-Bereiches von 4-7 vereinzelt Spot bei ~ 28 kDa konnte Ara h 4 zugeordnet werden, wobei der Sequenzstart bei Aminosäure 113 bezogen auf Ara h 3/4 war.

Auch in der zweidimensionalen PAGE aus isoelektrischer Fokussierung und LDS-PAGE konnte gezeigt werden, dass die Allergene Ara h 3/4 und Isoformen in zwei große Untereinheiten zerfallen, während das Ara h 1 als einzelnes Protein vorlag. Jetzt

Ergebnisse

sollten die Proteine zunächst unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und dann durch Reduktion der Disulfidbrücken in ihre Untereinheiten zerlegt werden. Dazu wurden aus einer nicht reduzierenden IEF und einer folgenden LDS-PAGE (Abb. 21) unter reduzierenden Bedingungen einzelne Spots ausgeschnitten, reduziert und erneut in einer LDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 22).

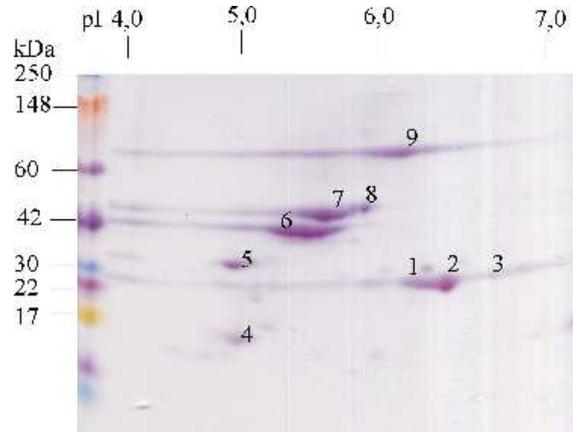


Abb. 21 2D-PAGE der Superdex-200-Fraktion 1
Nicht reduzierende IEF im pH-Gradienten von pH 4-7,
LDS auf 4-20 % Tris-Glycin-Gel
Spots wurden in red. LDS-PAGE aufgetrennt und gekennzeichnet
Coomassie-Färbung

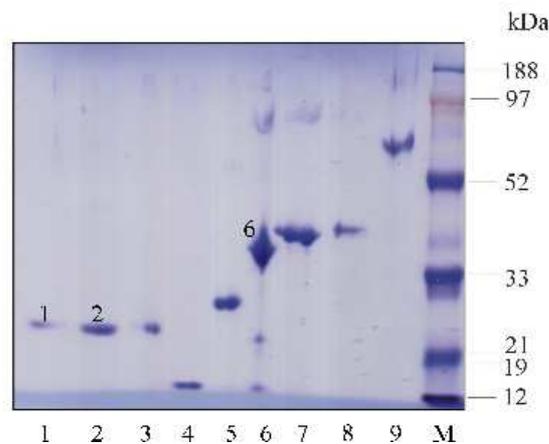


Abb. 22 LDS-PAGE der Superdex-200-Fraktion 1 zur Überprüfung der vollständigen Reduktion der Erdnussallergene
IEF im pH-Gradienten von pH 4-7, LDS auf 4-20 % Tris-Glycin-Gel,
LDS auf 10 % Bis-Tris-Gel Kennzeichnung der Spots
aus der 2D (Abb. 21), Coomassie-Färbung

Die Abb. 22 zeigt deutlich, dass in den Spots 1-5, sowie 8 kein Zerfall in kleinere Untereinheiten mehr erfolgte. Spot 6 (36 kDa), der mittels N-terminaler Sequenzierung als iso-Ara h 3 charakterisiert worden war, zerfiel partiell in zwei kleinere Untereinheiten von 12 und 24 kDa. In den Bahnen 6, 7 (Ara h 3/4) und 9 (Ara h 1) konnten darüber hinaus noch Banden bei Molekulargewichten von ca. 90 bzw. 150 kDa gefunden werden. Die Ergebnisse der N-terminalen Sequenzierung aus der Abb. 22 sind in der Tab. 10 zusammengestellt.

Ergebnisse

Tab. 10: Übersicht der Ergebnisse der N-terminalen Sequenzierungen der Proteine aus Abb. 22

| Nr. | Molekulargewicht | Bestimmte Sequenz | Proteinname | Startpunkt in der Ara h 3/4-Sequenz |
|-----|------------------|-------------------|---|-------------------------------------|
| 1 | 28 kDa | GIEETI | Gly 1, Ara h 3, Ara h 4, Ara h 3/4, iso-Ara h 3 | 332 |
| 2 | | GIEETI | Gly 1, Ara h 3, Ara h 4, Ara h 3/4, iso-Ara h 3 | 332 |
| 6 | ~36 kDa | VTFRQG | iso-Ara h 3 | 1 |

In der Abb. 22 wird deutlich, dass der Spot 6 mit einem Molekulargewicht von 36 kDa, der über verschiedene Immunoblotanalysen und Sequenzierungen schon eindeutig als iso-Ara h 3 (N-terminal, selten Gemisch N- und C-terminal) charakterisiert war, unter diesen Bedingungen noch weiter in zwei kleinere Spots von 12 und 24 kDa zerfiel. Leider konnten die kleinen Spots nicht sequenziert werden, da sich auch über die Kombination vieler Versuche nicht genug Protein gewinnen ließ. Aufgrund der Lage und der Immunoblotanalysen war klar, dass hier die Abspaltung der C-terminalen und N-terminalen Fragmente nicht vollständig war und erst durch erneute intensive Reduktion der Probe erfolgte.

3.1.3 Immunologische Charakterisierung der nachgewiesenen Allergene

Die gefundenen Allergene sollten abschließend über ihr Bindungsverhalten mit Patientenserum, monoklonalen Antikörpern und polyklonalen Kaninchenserum beschrieben werden. Dazu waren Thermoblots im Anschluss an die Gelelektrophoresen durchgeführt worden, um durch ihre Zuordnung zu einem Ausgangsgel identische Bedingungen zu schaffen. Dabei wurden die in ihrer Menge meist limitierten Patientenserum für die ersten Replicablots verwendet, anschließend die monoklonalen sowie die polyklonalen Antikörper und zuletzt die Lektine eingesetzt. Bei dem Einsatz von Lektinen trat oft eine starke und störende Hintergrundfärbung auf, da in der NC-Membran auch Zuckerstrukturen vorhanden sind. Wurden diese nun auf den letzten Blots eingesetzt, dann konnte diese Hintergrundfärbung reduziert werden.

Besonders gut konnten die Replicablots der zweidimensionalen Elektrophorese nach der isoelektrischen Fokussierung und reduzierenden LDS-PAGE für Immunoblotanalysen verwendet werden, da die Proteinkonzentration (bis zu 200 µg) sehr hoch war. Zum Nachweis, ob ein gleichmäßiges Blotergebnis aller Proteine erreicht werden konnte, wurde zunächst eine Proteinfärbung mit India Ink (Abb. 23) durchgeführt. Dabei traten besonders deutlich die sauren Spots bei 30-45 kDa, sowie die aneinandergereihten Spots bei 28 kDa hervor. Die anderen Bereiche waren etwas undeutlicher zu erkennen.

Ergebnisse

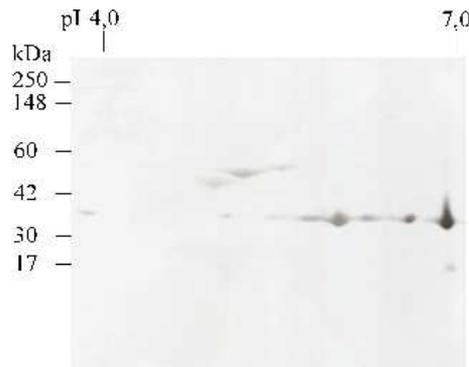


Abb. 23 2D-PAGE des Gesamterdnussextraktes
IEF im pH-Gradienten von pH 4-7,
LDS auf 4-20 % Tris-Glycin-Gel
Proteinfärbung mit India Ink

In den folgenden sechs Abb. (Abb. 24-29) werden nun Replicablots der Gele aus den Abb. 19 und 20 gezeigt. Diese zeigen die IgE-Reaktivität mit Patientenseren und die Bindung monoklonaler Mausantikörper für den Erdnussextrakt und die resultierende Superdexfraktion 1 des Ausschlussvolumens in einer direkten Gegenüberstellung.

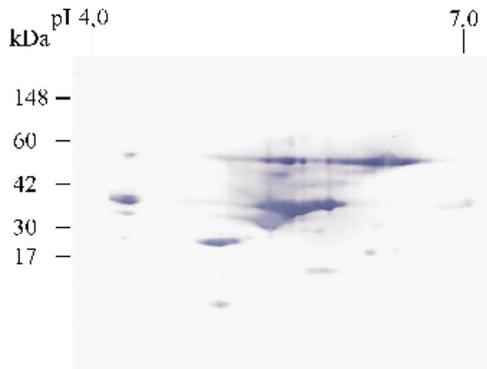


Abb. 24 2D-PAGE der Superdex-200-Fraktion 1
IEF im pH-Gradienten von pH 4-7,
LDS auf 4-20 % Tris-Glycin-Gel
Immunoblot detektiert mit Patientenserum JG3

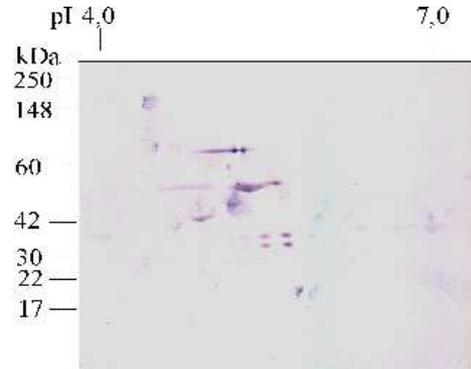


Abb. 25 2D-PAGE des Erdnussextraktes
IEF im pH-Gradienten von pH 4-7,
LDS auf 4-20 % Tris-Glycin-Gel
Immunoblot detektiert mit Patientenpoolserum JG3/ CAT/ OB

Bei dem Einsatz des Patientenserums JG3 (Abb. 24) wurde deutlich, dass es alle enthaltenen Proteine bis auf die strichförmige Aneinanderreihung der 28 kDa-Spots als IgE-reaktiv erkennt. Interessant war die Tatsache, dass der untere der drei Spots bei 30-42 kDa im Verhältnis schwächer erkannt wird, obwohl dieser auf Proteinebene besonders deutlich war. Im Vergleich zum Gesamtextrakt, bei dem lediglich $\frac{1}{4}$ der Proteinkonzentration der Superdexfraktion aufgetrennt wurde, wurde deutlich, dass das eingesetzte Poolserum zusätzlich weitere Proteine erkannte. Im Gegensatz zu JG3 erkannte das Poolserum auch die 28 kDa-Spots als IgE-reaktiv (Abb. 25). Die niedermolekularen Allergene Ara h 2 und Ara h 6 fehlten in der Superdexfraktion, aber auch diese Bereiche waren IgE-reaktiv.

Ergebnisse

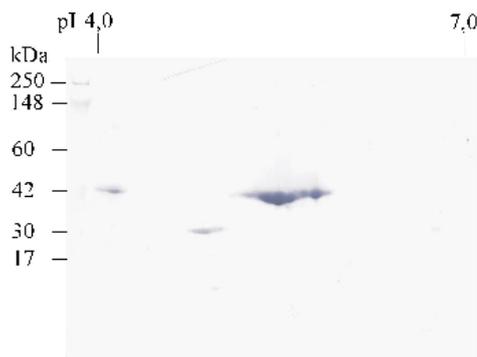


Abb. 26 2D-PAGE der Superdex-200-Fraktion 1
IEF im pH-Gradienten von pH 4-7,
LDS auf 4-20 % Tris-Glycin-Gel
Immunoblot mit mAK PEI-7B2 (α -Ara h 3/4)

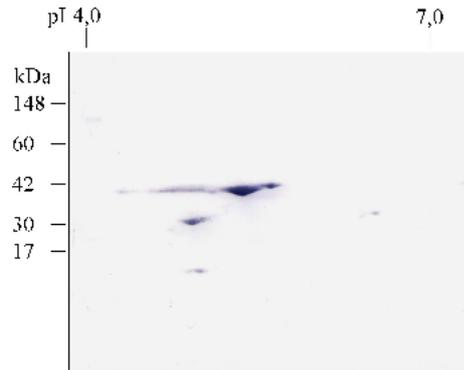


Abb. 27 2D-PAGE des Erdnussextraktes
IEF im pH-Gradienten von pH 4-7,
LDS auf 4-20 % Tris-Glycin-Gel
Immunoblot mit mAK PEI-7B2
(α -Ara h 3/4)

Das Bindungsverhalten des gegen Ara h 3/4 und Isoformen gerichteten monoklonalen Antikörpers PEI-7B2 wurde in den Abb. 26 und 27 gezeigt. Dieser erkannte die sauren Spots bei ~40 kDa, wobei der untere Spot nur undeutlich, der vereinzelte Spot 4 dafür sehr deutlich erkannt wurde. Die 28 kDa-Spots wurden nicht von dem Antikörper detektiert. Im Gesamtextrakt (Abb. 27) trat darüber hinaus nur ein weiterer Spot auf, der durch diesen Antikörper erkannt wurde und bei ca. 16 kDa und einem pI von ca. 5,0 lag. Dieser Spot trat auch bei der nicht vollständigen Reduktion nach nativer IEF in der Superdexfraktion auf, konnte aber nicht genauer charakterisiert werden. Um Ara h 1 nachzuweisen wurde der monoklonale Antikörper Pn-t verwendet. Die folgende Abb. 28 zeigt nur die Reaktion mit der Bande von Ara h 1 bei 60 kDa in der Superdexfraktion, da dieses Bild im Erdnussextrakt gleich aussah.

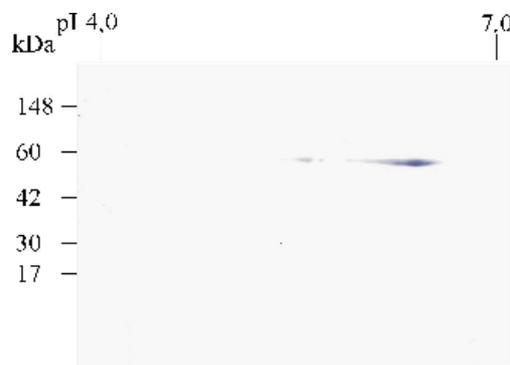


Abb. 28 2D-PAGE der Superdex-200-Fraktion 1
IEF im pH-Gradienten von pH 4-7, LDS auf 4-20 % Tris-Glycin-Gel
Immunoblot mit mAK Pn-t (α -Ara h 1)

Die Spotansammlung unter 20 kDa wurde mit dem polyklonalen Kaninchenserum MAP3 (α -Ara h 2) nach der Auftrennung von Erdnussextrakt immunologisch als Ara h 2 charakterisiert.

3.1.4 Verstärkung der Immunnachweise durch Chemilumineszenz

Mit der Charakterisierung der Erdnussmajorallergene (Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3/4 und Isoformen und Ara h 6) durch verschiedene Patientenkollektive mittels Chemilumineszenz sollten weitere Fragen zur Allergenität der Erdnüsse beantwortet werden. So wurde die Prävalenz der verschiedenen Allergene untersucht, um die Majorallergene

Ergebnisse

der Erdnuss zu finden. Außerdem sollte untersucht werden, ob die Stärke der allergischen Reaktion zu den gefundenen Erdnussallergenen korreliert ist. Die Stärke der Allergie wurde über die Bestimmung des spezifischen IgE gegen die Erdnuss als CAP-Wert ermittelt. Dieser wurde in Korrelation zu den gefundenen Erdnussallergenen gesetzt und in Prozent angegeben. Schließlich sollte überprüft werden, ob es regionale Unterschiede innerhalb des Patientenkollektives gibt und ob neue Allergene gefunden werden können.

Dazu wurde nach der Auftrennung des Erdnussextraktes mittels Superdex-200 sowohl das Ausschlussvolumen als auch die Fraktion 3 mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine wurden auf NC-Membranen geblottet. Für die Verstärkung der Allergendetektion mit Chemilumineszenz wurden dann parallel Streifen beider Immunoblots in einem Ansatz mit dem Patientenserum inkubiert, so dass identische Bedingungen für die beiden Versuchsansätze vorlagen. Damit wurde sichergestellt, dass alle auftretenden Unterschiede in der Immundetektion allergenspezifisch und keine versuchsbedingten Artefakte waren. Es wurden jeweils einige Kontrollen mit dem Patientenserum JG3, einem Allergiker- und einem Nichtallergikerserum mitgeführt, um die Sensitivität und die Spezifität der Methode zu überprüfen. Außerdem wurden die mono- und polyklonalen Antikörper Pn-c, Pn-t (beide α -Ara h 1), PEI-7B2 (α -Ara h 3), MAP3 (α -Ara h 2), α -Ara h 6 und Sam 22 (α -Ara h 8) sowie deren Zweit-Antikörper auf den Immunoblots eingesetzt, um die spezifischen reaktiven Proteinbanden darzustellen.

In den folgenden Abb. 29 und 30 werden nun die IgE-Reaktivitäten dänischer Patientenseren sowie die Bindungen monoklonaler und polyklonaler Antikörper mit den Superdexfraktionen 1 und 3 gezeigt.

Ergebnisse

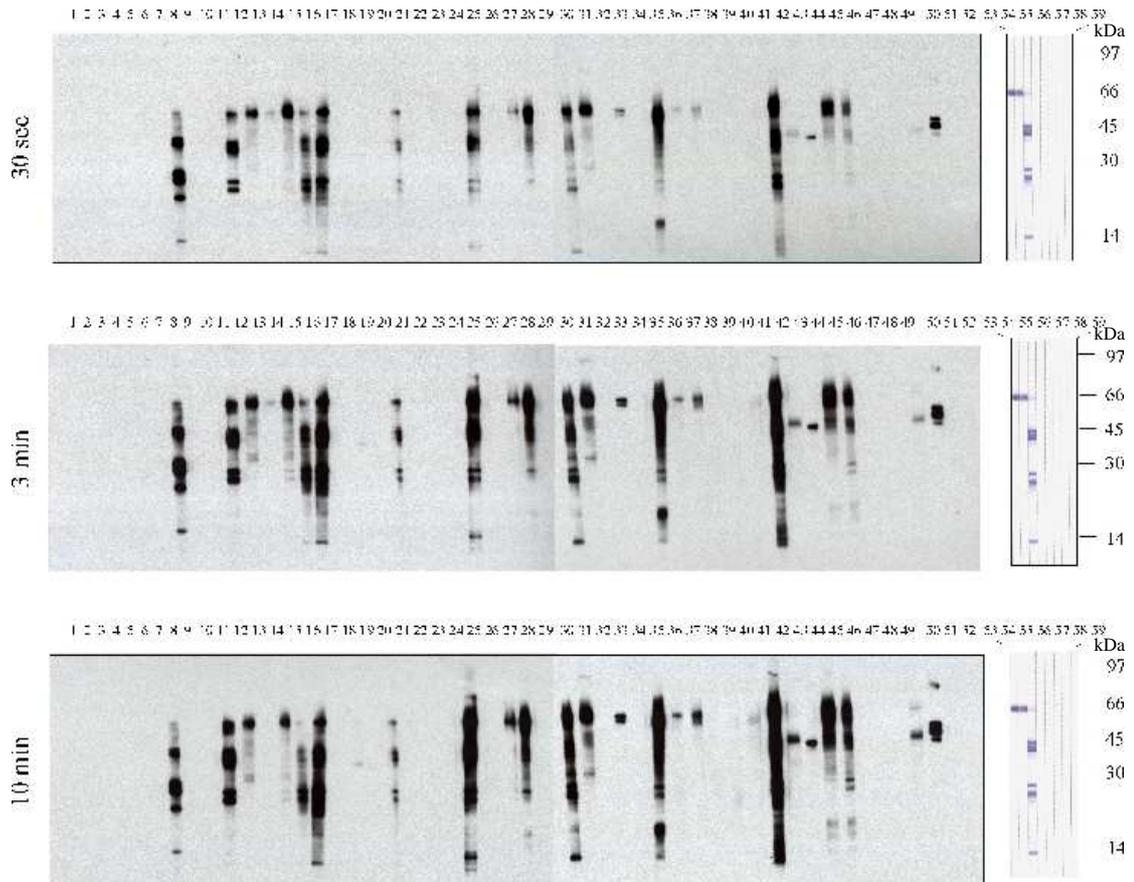


Abb. 29 Vergleich der Immunreaktionen von Patientenseren mit hochmolekularen Proteinen >200 kDa

mit Chemilumineszenz, Kontrollen der mAKs bzw. pAKs

Belichtungszeit der Röntgenfilme: 30 sec, 3 min und 10 min, 12 % SDS, 15 µg/cm, LM mit kDa

Streifen 1-50 Patientenseren aus Dänemark und Deutschland, 51 Nicht-Erdnussallergikerserum, 52 AK-Kontrolle, 53 mAK Pn-t, 54 mAK Pn-c (beide α-Ara h 1), 55 mAK PEI-7B2 (α-Ara h 3/4), 56 pAK MAP3 (α-Ara h 2), 57 pAK α-Ara h 6, 58 pAK Sam22 (α-Ara h 8), 59 AK-Kontrolle

In der Abb. 29 wird deutlich, dass die Allergene Ara h 1, Ara h 3/4 und ihre Isoformen Majorallergene sind. Immerhin 4,1 % der dänischen Patienten zeigten ausschließlich IgE-Reaktivität gegen diese hochmolekularen Proteine. Die Bande bei 65 kDa (Ara h 1), die von den monoklonalen Antikörpern Pn-t und Pn-c detektiert wurde, erkannten 40,8 % der dänischen Patienten. Die Banden von Ara h 3/4 mit Isoformen (14, 22, ~28 und ~45 kDa), die der monoklonale Antikörper PEI-7B2 teilweise anzeigte, wurden von 46,9 % aller Patienten als IgE-reaktiv erkannt. Dabei wurde deutlich, dass die Banden bei 22 und ~28 kDa sowie ~45 kDa von den meisten Patienten jeweils als Einheit detektiert wurden. Es sollte überprüft werden, ob IgE-Reaktivität nur auf einzelne Untereinheiten der Allergene Ara h 3/4 und Isoformen gefunden werden kann. Es war zu erkennen, dass nur eine Bande der jeweiligen Untereinheit von Ara h 3/4 mit Isoformen erkannt wurde. Dabei variierte die IgE-Reaktivität bei den einzelnen Patienten stark. Nur in einem Fall (Patient 39) konnte eine einzelne IgE-reaktive Bande in der C-terminalen Region der Allergene Ara h 3/4 und Isoformen identifiziert werden. Bei den anderen Patienten lagen einzelne IgE-reaktive Banden im N-terminalen Bereich von Ara h 3/4 und Isoformen.

Ergebnisse

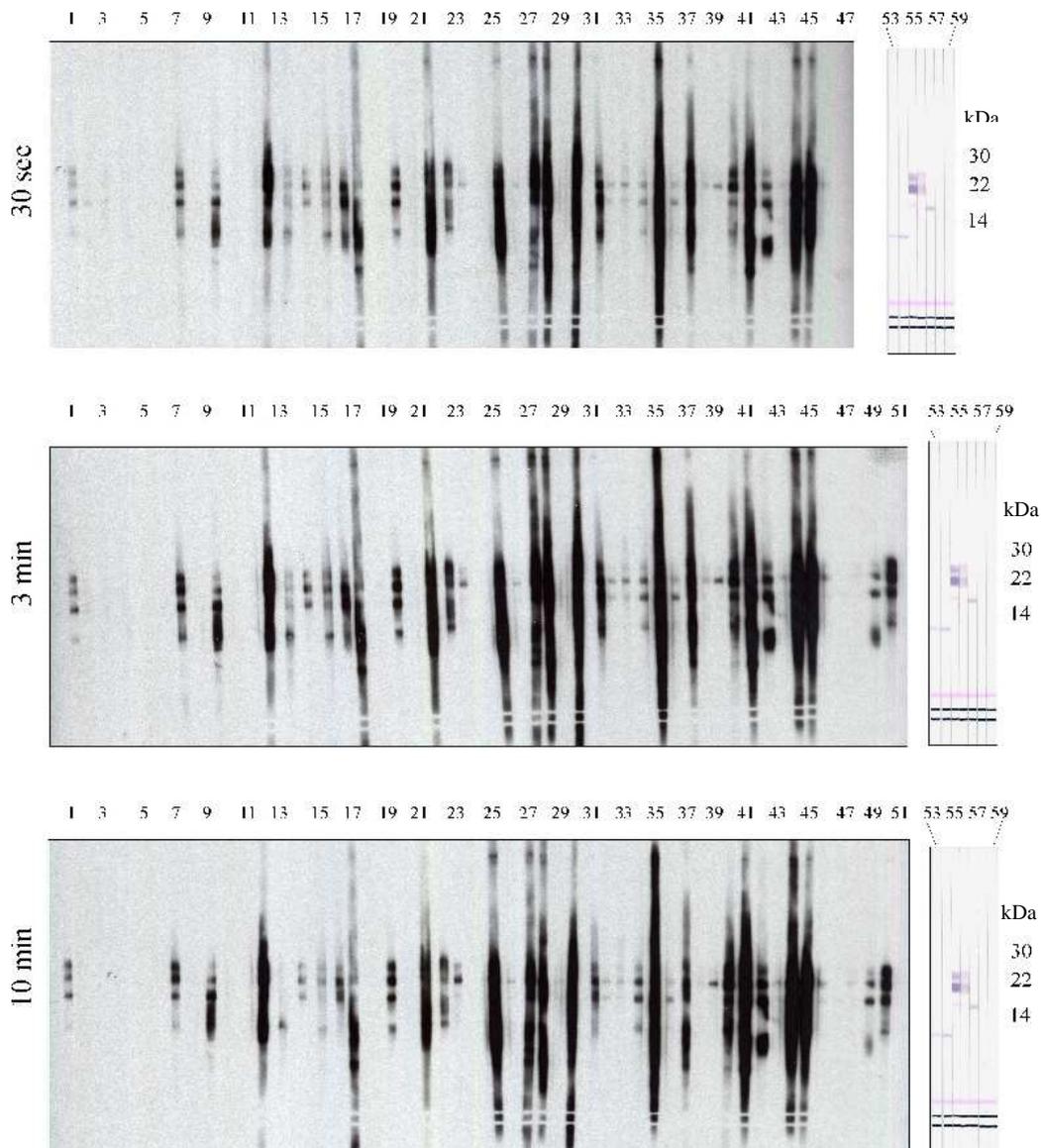


Abb. 30 Vergleich der Immunreaktionen von Patientenseren mit Erdnussproteinen <20 kDa

mit Chemilumineszenz, Kontrollen der mAKs bzw. pAKs

Belichtungszeit der Röntgenfilme: 30 sec, 3 min und 10 min, 12 % SDS, 30 µg/ cm, LM mit kDa

Streifen 1-50 Patientenseren aus Dänemark und Deutschland, 51 Nicht-Erdnussallergikerserum,

52 AK-Kontrolle, 53 mAK Pn-t, 54 mAK Pn-c (beide α-Ara h 1), 55 mAK PEI-7B2 (α-Ara h 3/4),

56 pAK MAP3 (α-Ara h 2), 57 pAK α-Ara h 6, 58 pAK Sam22 (α-Ara h 8), 59 AK-Kontrolle

Abb. 30 zeigt, dass auch die in dieser Fraktion 3 enthaltenen Allergene Majorallergene sind. 32,7 % der dänischen Patienten zeigten sogar nur auf diese Fraktion der Superdex 200-Säule von unter 20 kDa, in der Ara h 2, Ara h 6, sowie Ara h 5, Ara h 7, Ara h 8 und eine Untereinheit von Ara h 1 vorliegen sollten, IgE-Reaktivität. Die monoklonalen Antikörper gegen Ara h 1 (Pn-t und Pn-c) detektierten eine Bande bei ca. 12 kDa, die von den Patientenseren auch als IgE-reaktiv erkannt wurde. Die Doppelbande bei 20 kDa, die von dem polyklonalen Antikörper MAP 3 als Ara h 2 erkannt wurde, sowie die Bande bei 16 kDa, von dem polyklonalen Kaninchenserum α-Ara h 6 als Ara h 6 detektiert, wurden von den meisten Patienten als Einheit erkannt. Lediglich drei Patienten zeigten ausschließlich IgE-Reaktivität gegen Ara h 2. Vereinzelt konnten Banden unterhalb von 10 kDa als IgE-reaktiv erkannt werden, die von keinem der Antikörper nachgewiesen wurden und somit nicht zugeordnet werden konnten.

Ergebnisse

Zusammenfassend konnte bei der Auswertung der dänischen Patienten gezeigt werden, dass lediglich 14,3 % der insgesamt 49 Patientenserum mit einem sehr niedrigen CAP-Wert von 0 bis 3 keines der getesteten Allergene detektierten. Knapp die Hälfte der Patienten (49 %) zeigten auf alle Allergene deutliche IgE-Reaktivitäten. Um die Frage zu klären, ob die Stärke der allergischen Reaktion mit den auslösenden Allergenen korreliert werden kann, wurden die gefundenen IgE-Reaktionen gegen die Allergene Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3/4 und Isoformen, sowie Ara h 6 mit einem hohen CAP-Wert von 5-6 korreliert. Dabei zeigten 26,5 % bei Ara h 1 und 24,5 % bei Ara h 3/4 und Isoformen eine Korrelation mit einem sehr hohen spezifischen CAP-Wert von 5-6. Bei den niedermolekularen Proteinen Ara h 2 und Ara h 6 wiesen sogar 32,6 % der dänischen Patienten einen vergleichbar hohen CAP-Wert auf. Dabei war in 26,5 % der Fälle die Kombination aus den niedermolekularen und hochmolekularen Allergenen für den hohen CAP-Wert entscheidend.

In der folgenden Tab. 11 wird die Auswertung der dänischen Seren zusammengefasst.

Tab. 11: Vergleich der IgE-Reaktivitäten eines Patientenkollektivs aus Dänemark

mit spezifischen CAP-Werten für Erdnuss.

Spalte 1: Keine IgE-Reaktivität, *2:* Serum erkennt nur < 20 kDa, *3:* Serum erkennt nur Ara h 1 und Ara h 3/4, *4:* Serum erkennt Ara h 1, *5:* Serum erkennt Ara h 3/4, *6:* Serum erkennt alle Allergene

| Nr | CAP | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|----|-----|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 3 | | + | | | | |
| 2 | 3 | | + | | | | |
| 3 | 4 | | + | | | | |
| 4 | 3 | + | | | | | |
| 5 | 2 | + | | | | | |
| 6 | 3 | + | | | | | |
| 7 | 6 | | + | | | | |
| 8 | 2 | | | + | + | + | |
| 9 | 5 | | + | | | | |
| 10 | 2 | + | | | | | |
| 11 | 1 | | | + | + | + | |
| 12 | 5 | | | | + | + | + |
| 13 | 5 | | | | + | | + |
| 14 | 3 | | | | + | + | + |
| 15 | 5 | | | | + | + | + |
| 16 | 5 | | | | + | + | + |
| 17 | 6 | | + | | | | |
| 18 | 2 | + | | | | | |
| 19 | 3 | | | | | + | + |
| 20 | 2 | + | | | | | |
| 21 | 6 | | | | + | + | + |
| 22 | 4 | | + | | | | |
| 23 | 2 | | + | | | | |
| 24 | 0 | + | | | | | |
| 25 | 6 | | | | + | + | + |

| Nr | CAP | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|----|-----|---|---|---|---|---|---|
| 26 | 2 | | + | | | | |
| 27 | 6 | | | | + | + | + |
| 28 | 6 | | | | + | + | + |
| 29 | 2 | | + | | | | |
| 30 | 6 | | | | + | + | + |
| 31 | 4 | | | | + | + | + |
| 32 | 2 | | + | | | | |
| 33 | 3 | | | | + | + | + |
| 34 | 2 | | + | | | | |
| 35 | 6 | | | | + | + | + |
| 36 | 3 | | | | + | | + |
| 37 | 4 | | | | + | + | + |
| 38 | 3 | | + | | | | |
| 39 | 2 | | | | | + | + |
| 40 | 3 | | | | | + | + |
| 41 | 6 | | | | + | + | + |
| 42 | 4 | | | | | + | + |
| 43 | 3 | | | | | + | + |
| 44 | 6 | | | | + | + | + |
| 45 | 5 | | | | + | + | + |
| 46 | 2 | | + | | | | |
| 47 | 3 | | + | | | | |
| 48 | 3 | | + | | | | |
| 49 | 3 | | | | | | + |
| 50 | 6 | | | | + | + | + |

Zusätzlich zu den dänischen Seren wurden auch Patientenkollektive aus der Schweiz und Italien analog auf ihre IgE-Reaktivität bei hoch- und niedermolekularen Erdnussallergenen mittels Chemilumineszenz getestet. Die Auswertung ist in der folgenden Tab. 12 dargestellt. Die Ergebnisse dieser Seren waren nicht so eindeutig. 50 % der Patienten zeigten keine IgE-Reaktivität gegen die getesteten Allergene. Somit waren keine signifikanten Korrelationen möglich. Interessanterweise waren hier überhaupt keine Patienten zu finden, die nur IgE-Reaktivität bei den niedermolekularen Allergenen zeigten. Immerhin 20,6 % dieser Patienten erkannten ausschließlich Ara h 1 und Ara h 3/4, wobei 38,2 % der schweizerischen Patienten Ara h 1 und 41,2 % Ara h

Ergebnisse

3/4 und Isoformen detektierten. Dabei wurden die Banden bei 22, ~28 und ~45 kDa erneut als Einheit erkannt. Im Gegensatz zu den dänischen Patienten konnten hier keine IgE-reaktiven Banden gefunden werden, die nur einer Untereinheit von Ara h 3/4 und Isoformen zuzuordnen wäre. 17,6 % der Patienten zeigten IgE-Reaktivitäten auf alle Allergene, wobei hier keine zusätzlichen Banden vorhanden waren. Eine Korrelation zwischen den gefundenen Allergenen und hohen CAP-Werten von 5-6 wurde durchgeführt, es konnten aber keine Unterschiede zwischen den Allergenen Ara h 1, Ara h 3/4 und der <20 kDa-Fraktion gefunden werden (alle 11,8 %).

Tab. 12: Vergleich der IgE-Reaktivitäten eines Patientenkollektivs aus der Schweiz, Italien und Deutschland mit spezifischen CAP-Werten für Erdnuss.

Spalte 1: Keine IgE-Reaktivität, *2:* Serum erkennt nur < 20 kDa, *3:* Serum erkennt nur Ara h 1 und Ara h 3/4, *4:* Serum erkennt Ara h 1, *5:* Serum erkennt Ara h 3/4, *6:* Serum erkennt alle Allergene

| Nr | CAP | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|----|-----|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 4 | | | | + | + | + |
| 2 | 1 | | | + | + | + | |
| 3 | 5 | | | | + | + | + |
| 4 | 3 | | | | + | + | |
| 5 | 5 | | | | + | + | + |
| 6 | 3 | | | | + | + | |
| 7 | 1 | | | + | + | | |
| 8 | 0 | | | + | + | | |
| 9 | 3 | | | + | + | + | |
| 10 | 2 | | | | | | |
| 11 | 2 | + | | | | | |
| 12 | 0 | + | | | | | |
| 13 | 2 | + | | | | | |
| 14 | 1 | + | | | | | |
| 15 | 0 | + | | | | + | |
| 16 | 5 | | | | + | + | + |
| 17 | 2 | | | | + | + | + |
| 18 | 3 | | | | | | |

| Nr | CAP | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|----|-----|---|---|---|---|---|---|
| 19 | 5 | | | | + | + | + |
| 20 | 0 | + | | | | | |
| 21 | 3 | + | | | | | |
| 22 | 2 | | | + | | + | |
| 23 | | + | | | | | |
| 24 | | + | | | | | |
| 25 | 4 | | | + | | + | |
| 26 | 5 | + | | | | | |
| 27 | 3 | + | | | | | |
| 28 | 3 | + | | | | | |
| 29 | 6 | + | | | | | |
| 30 | 3 | + | | | | | |
| 31 | 3 | | | + | + | + | |
| 32 | 2 | + | | | | | |
| 33 | 3 | + | | | | | |
| 34 | 2 | + | | | | | |
| 35 | 5 | | | + | + | + | |
| 36 | 6 | | | | + | + | + |

In Zusammenhang mit den Seren aus der Schweiz und Italien sollte noch das Serum mit der Nummer 36 besonders hervorgehoben werden.

Dieser deutsche Allergiker hat multiple hohe CAP-Werte gegen viele verschiedene Allergene, die nur gegen die jeweiligen Zuckerstrukturen gerichtet sind. Bei vorhergehenden Immunoblotanalysen (Abb. 7, Abb. 8) konnten mit den Lektinen Con A und PNA schon erste Hinweise darauf gefunden werden, dass die sauren N-terminalen Bereiche von iso-Ara h 3 und Gly 1, sowie die basischen C-terminalen Bereiche bei 22 kDa vermutlich Glykostrukturen enthalten. Das Bandenmuster des Serums unterstützte diese Theorie.

Da alle vorhandenen Patientenkollektive mittels Chemilumineszenz untersucht werden sollten, um regionale Unterschiede analysieren zu können, wurden abschließend auch die Heidelberger Patientenserum analog untersucht.

Bei der Auswertung der Heidelberger Seren fiel sofort auf, dass alle Patientenserum IgE-Reaktivität zeigten. Diese war immer gegen die Allergene Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3/4 und Isoformen, sowie Ara h 6 gerichtet. Somit ließen sich keine Unterschiede finden, die einen Hinweis auf eine Korrelation zwischen der Schwere der allergischen Reaktion und den gefundenen Allergenen gegeben hätten. Neue IgE-reaktive Banden konnten ebenfalls nicht gefunden werden.

Mit der Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit von Immunnachweisen mit der Chemilumineszenz sollte geklärt werden, ob und inwieweit die Majorallergene Ara h 1, Ara h 2 Ara h 3/4 und Ara h 6 zusammen oder einzeln für die allergische Reaktion von Bedeutung sind. Dazu wurden die IgE-reaktiven Banden ausgewertet und ebenfalls

Ergebnisse

prozentual mit den Allergenen korreliert. Dabei zeigte sich, dass jeweils 1/3 der Patienten mit einem hohen CAP-Wert Ara h 3/4 und Ara h 1 erkannten, 1/3 Ara h 2 und Ara h 6 und für den Rest alle Allergene zusammen wichtig waren.

Schließlich wurde nach weiteren Allergenen wie Ara h 5, Ara h 7, Ara h 8, LTP und Oleosin gesucht, die ebenfalls zu der allergischen Reaktion beitragen könnten, aber bisher nicht detektierbar waren. Diese konnten nicht gefunden werden. Außerdem sollte auch für die Erdnussallergie geklärt werden, ob sich bei dem Vergleich verschiedener Patientenkollektive (Dänemark, Schweiz, Italien und Deutschland) regionale Unterschiede in der IgE-Reaktivität auf einzelne Allergene oder deren Untereinheiten zeigen lassen, wie dieses für andere Nahrungsmittelallergien beschrieben worden ist. Es wurde deutlich, dass bei den dänischen Seren einige Patienten IgE-Reaktivität verstärkt auf Ara h 1, iso-Ara h 3 oder auch Ara h 6 zeigten. Bei den Schweizern oder Italienern war diese Tendenz ebenfalls erkennbar, aber durch die hohe Zahl der nicht IgE-reaktiven Seren gegen die getesteten Allergene nicht eindeutig zu belegen.

3.1.5 Massenspektrometrische Bestimmung der Allergene mittels MALDI-TOF

Mit Hilfe der MALDI-TOF-Analyse sollten die über monoklonale Antikörper und N-terminale Sequenzierung bestimmten Allergene Ara h 1, sowie Ara h 3/4 mit ihren Isoformen auf molekularer Ebene untersucht werden. Aufgrund der Vielfalt der Isoformen (Gly 1, Ara h 3/4, Ara h 3, Ara h 4, iso-Ara h 3 und Trypsin Inhibitor) und dem Zerfall in saure N- und basische C-terminale Untereinheiten sollte zudem Klarheit über die Zugehörigkeit der einzelnen Untereinheiten zu einem Protein geschaffen werden. Dabei wurde die Kombination verschiedener zweidimensionaler Gelelektrophoresen (BN-PAGE/ SDS-PAGE, IEF/ SDS-PAGE) gewählt, um durch tryptischen In-Gel-Verdau der aufgetrennten Proteine den molekularen Aufbau einzelner Allergene und Allergenuntereinheiten zu bestimmen. Die online Auswertung der gefundenen Massenspektrogramme erfolgte mit den Programmen von MASCOT (www.matrixscience.com) und EXPASY (www.expasy.org).

In der folgenden Abb. 31 wird die zweidimensionale Auftrennung der Superdex-fraktion 1 mit der Nummerierung der massenspektrometrisch bestimmten Spots gezeigt, da hier alle im Ausschlussvolumen enthaltenen Proteine gut separiert dargestellt sind.

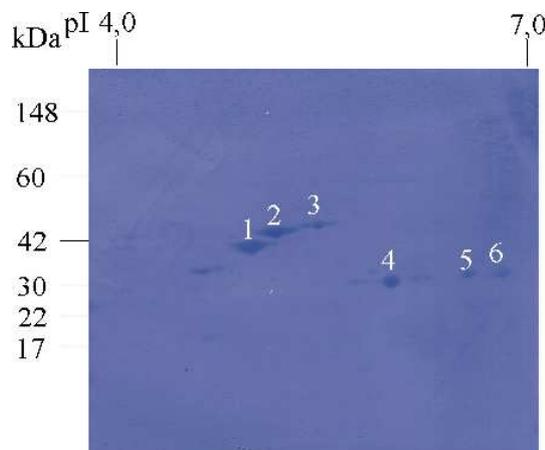


Abb. 31 2D-PAGE der Superdex-200-Fraktion 1
IEF im pH-Gradienten von pH 4-7, LDS auf 4-20 % Tris-Glycin-Gel
Coomassie-Färbung für PVDF-Membranen
Spots 1-6 wurden für die MALDI-Bestimmung eingesetzt

Ergebnisse

Nach tryptischem In-Gel-Verdau der Spots 1-6 (Abb. 31) und anschließender MALDI-TOF-Analyse konnte der bei der N-terminalen Sequenzierung erkannte Zerfall der Proteine in die jeweiligen N- und C-terminalen Untereinheiten nachvollzogen werden. Die sauren N-terminalen Untereinheiten konnten den drei Proteinen iso-Ara h 3 (Spot 1), Gly 1 (Spot 2) und Ara h 3/4 (Spot 3) zugeordnet werden. Die entsprechenden basischen C-terminalen Untereinheiten dieser Proteine konnten in den Spots 4-6 gefunden werden. So handelte es sich bei Spot 4 um die C-terminale Untereinheit von iso-Ara h 3, bei Spot 5 um Ara h 3/4 und bei Spot 6 um Gly 1. Mit der massenspektrometrischen Analyse konnte die N-terminale Sequenzierung und immunologische Charakterisierung der Allergenuntereinheiten von Ara h 3/4 und Isoformen bestätigt werden.

Die folgende Tabelle 13 zeigt die in Sequenzen umgeschriebenen Massenspektrogramme nach der Auswertung mit Mascot. Dabei wurden ineinander übergehende Sequenzen durchgehend gezeichnet, um die Überlappung der gefundenen Massen-Peaks und damit die Abdeckung der ganzen Sequenz zu verdeutlichen.

Tab. 13: Übersicht der massenspektrometrischen Analysen (Abb. 31), Kennzeichnung der gefundenen Peptide durch graue Flächen (überlappend dargestellt). Kennzeichnung der über N-terminale Sequenzierung bestimmten Bereiche (unterstrichen).

| Saurer N-terminaler Part der Proteine (Ara h 3/4 AS 1-331): | | |
|---|--|-----------------------|
| 1: | <u>VTFRQGGREENECQFQRLNAQRPDNR</u> IESEGGYIETWNPNNQEFQCAGVALSRTVLRRNALRRPFYSNAPLEIYVQQGSGYF | |
| 2: | <u>ISFRQQPEENACQFQRLNAQRPDNR</u> IESEGGYIETWNPNNQEFECAGVALSRLVLRNALRRPFYSNAPQEIFIQQGRGYF | |
| 3: | <u>ISFRQQPEENACQFQRLNAQRPDNR</u> IESEGGYIETWNP-NQEFECAGVALSRLVLRNALRRPFYSNAPQEIFIQQGRGYF | |
| 1: | GLIFPGCPSTYEEPAQEGRRYQSQKPSRRFQVGGDDPSQQQQDSHQKVRHFDEGDLIAVPTGVAFWYMNDEDTDVVVTLS | |
| 2: | <u>GLIFPGCPSTYEEPAQGGRRHQSQRAPRRFEGEDQSQQQQDSHQK</u> VRRFDEGDLIAVPTGVALWFMNDHDTDVVAVSLT- | |
| 3: | GLIFPGCPSTYEEPAQQGRRHQSQRPRRRFQGGDDPSQQQQ-DSHQKVRHFDEGDLIAVPTGVAFWYMNNDHDTDVVAVSLT- | |
| 1: | DTSSIHNQLDQFPRRFYLAGNQEQEFLRYQQQGSR-----PHY-----RQISPRVR-----GDEQENEGSN | |
| 2: | DTNNDNQLDQFPRRFNLAGNHEQEFLRYQQQ---SRRRSLPYSPYSPQSPRQEEREFSPRGQHSRRERAGQEEENEGGN | |
| 3: | DTNNDNQLDQFPRRFNLAGNHEQEFLRYQQQ---SRRRSLPYSP-SPQ--PKQEDREFSPRGQHGRRRERAGQEEENEGGN | |
| 1: | IFSGFAQEFLQAHAFQVD-RQTVENLNRGENEREQQGAIIVTVKGLRILSPDEEDESRSPPSRREEFDEDRSRPQQRGKY-- | |
| 2: | <u>IFSGFTPEFLAQAFQVDDRQIVQNLRGENSEEEGAIIVTVKGLRILSPDRKRGAD-----EEEEYDEDEYEYDEE-----D</u> | |
| 3: | <u>IFSGFTPEFLAQAFQVDDRQILQNLRGENSEDEQGAIIVTVR</u> GGLRILSPDRKRRQQYERPDEEEYDEDEYEYDEEERQQD | |
| 1: | ---DENRRGYKN | |
| 2: | RRRGRGSRGRGN | |
| 3: | RRRGRGSRGSGN | |
| Basischer C-terminaler Part der Proteine (Ara h 3/4 AS 332-517): | | |
| 4: | GIETICTASVKKNLGRSSNPDIYNPQAGSLRSVN--ELDLPILGWLGLSAQHGTIYRNAMFVPHYTLNAHTIVVALNGRA | |
| 5: | GIETICTASFKKNIGRNRSPIYNPQAGSLKTANELQLNLLILRWLGLSAEYGNLYRNALFVPHYNTNAHSIIYALRGRA | |
| 6: | GIETICTASVKKNIGRNRSPIYNPQAGSLKTAN--DLNLLILRWLGLSAEYGNLYRNALFVPHYNTNAHSIIYALRGRA | |
| 4: | HVQVVDSNGNRVYDEELQEGHVLVVPQNFVAAKAQSENFEYVAFKTDSPSIANLAGENSIIDNLPEEVVANSYRLPREQ | |
| 5: | HVQVVDSNGDRVFDEELQEGHVLVVPQNFVAVAGKSQSENFEYVAFKTDSPSIANLAGENSFIDNLPEEVVANSYGLPREQ | |
| 6: | HVQVVDSNGNRVYDEELQEGHVLVVPQNFVAVAGKSQSDNFEYVAFKTDSPNIANFAGENSIIDNLPEEVVANSYGLPREQ | |
| 4: | ARQLKNNNPFKFFVPPFDHQSMREVA | |
| 5: | ARQLKN-NPFKFFVPPSEQNSLRAVA | |
| 6: | ARQLKNNNPFKFFVPPSQQ-SLRAVA | |
| Spot 1 und Spot 4 | iso-Ara h 3 | ACCESSION Nr AAT39430 |
| Spot 2 und Spot 6 | Gly 1 | ACCESSION Nr AAG01363 |
| Spot 3 und Spot 5 | Ara h 3/4 | ACCESSION Nr AAM46958 |

Aufgrund dieser ersten Ergebnisse sollten weitere N-terminale Sequenzierungen und immunologische Charakterisierungen der gefundenen Allergene Ara h 1 und Ara h

Ergebnisse

3/4 mit den Isoformen bestätigt werden. Dazu wurden insgesamt 28 weitere tryptische in Gel-Verdauansätze hergestellt und im MALDI-TOF analysiert. Auch in diesem Fall erfolgte die weitere Auswertung online mit Mascot und Expsy. Dabei werden bei Mascot Ergebnisse dann als signifikant angegeben, wenn der errechnete Score über 61 liegt. Das Programm kann dabei nur das gesamte Protein, welches in der Datenbank eingegeben worden ist, als Grundlage für diese Berechnung nehmen. Dazu korreliert die Sequenz Coverage, bei der die Abdeckung der Sequenz mit den gefundenen Peptide angegeben wird, sowie deren Anzahl insgesamt.

Zunächst sollte eine 2D-PAGE kombiniert aus Blue-Native PAGE (Methode von Prof. Braun, Hannover) und reduzierender Tricin-PAGE durchgeführt werden und den Zerfall der Allergene in N- und C-terminale Bereiche zeigen. Dazu wurde das Ausschlussvolumens der Superdex-200-Säule zunächst nativ und dann nach Reduzierung in der Tricin-PAGE erneut nach Molekulargewicht aufgetrennt. Für diese zweite Dimension mit dem verwendeten Puffersystem lag kein geeigneter Molekulargewichtsmarker vor, so dass über eine vergleichende Zuordnung anderer zweidimensionaler Auftrennungen eine Auswahl der Proteinspots für den tryptischen In-Gel-Verdau getroffen wurde. In der Abb. 32 sind die analysierten Proteinspots eingezeichnet. Aufgrund der Lage zueinander sollten die Spots 1-3 Ara h 1 und die Spots 4-7 Ara h 3/4 und Isoformen sein. Die Auswertung der Massenspektrogramme ist in Tabelle 14 dargestellt. Dabei sind jeweils alle Möglichkeiten für die Zuordnung der Massenpeaks zu Ara h 1 bzw. Ara h 3/4 und Isoformen angegeben. Die Auswertung der einzelnen Peptide wird im Anhang (Tab. 20) exemplarisch an max. zwei Isoformen dargestellt.

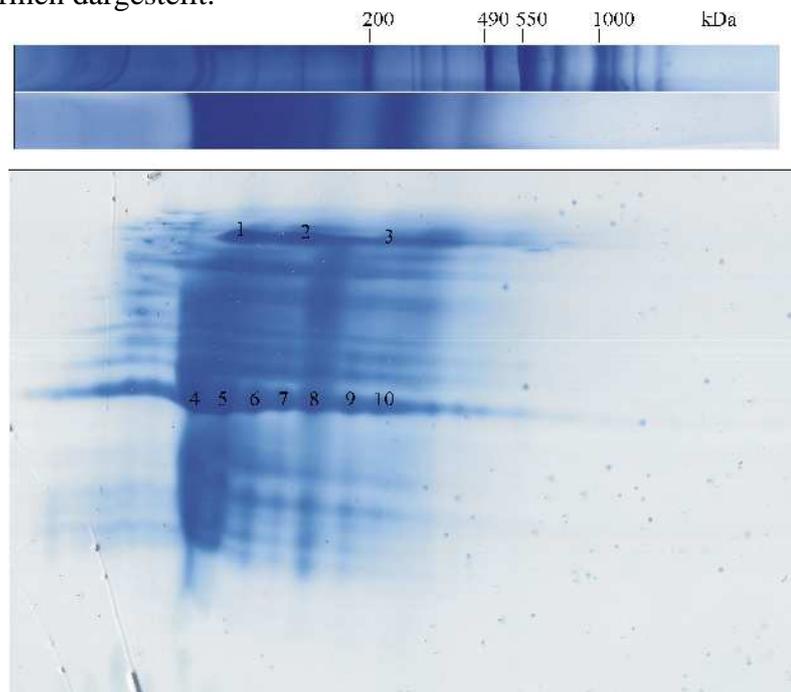


Abb. 32 2D-PAGE der hochmolekularen Fraktion >200 kDa
Kombination aus BN-PAGE und reduzierender Tricin-PAGE
Blue-Native PAGE auf 4,5-16 % Tris-Glycin-Gel
Tricin-PAGE auf 16,5 % Tricin-Gel

Tab. 14: Übersicht der massenspektrometrischen Analysen der Proteine, die aus dem Gel (Abb. 32) verwendet wurden. Angabe der gefundenen Sequenz Coverage in %, der Peptidanzahl und des Mascot Scores. Hinweis auf das Gesamtprotein (G) bzw. die nur bei Ara h 3/4 und Isoformen vorliegenden N- (N) und C- (C) terminalen Untereinheiten.

Ergebnisse

| Spot | Angabe Sequenz-Coverage in % / Peptidanzahl / Mascot-Score | | | | | | | Gesamtprotein (G) N-term. (N) / C-term. (C) Untereinheit |
|------|--|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|-------------------|--|
| | Ara h 1 | Ara h 3/4 | Gly 1 | iso-Ara h 3 | Ara h 3 | Ara h 4 | Trypsin Inhibitor | |
| 1 | 21% 11 72 | | | | | | | G |
| 2 | 17 % 9 83 | | | | | | | G |
| 3 | 35 % 23 93 | | | | | | | G |
| 4 | 34 % 17 116 | | | | | | | G |
| 5 | | 17 % 5 45 | | 19 % 5 45 | | | | G |
| 6 | | | 17 % 6 45 | 23 % 6 52 | | | | G |
| 7 | | 18 % 4 30 | 17 % 5 34 | | 8 % 3 31 | 8 % 3 30 | | C |
| 8 | | 13 % 4 25 | 16 % 6 34 | 14 % 5 46 | | 11 % 4 38 | | G |
| 9 | | 13 % 4 25 | 16 % 6 34 | 10% 3 32 | | 11 % 4 41 | | G |
| 10 | | | 14 % 5 68 | | 8 % 3 33 | 12 % 4 50 | | C |

Wie die Auswertung der Spots 1 bis 3 ergab, konnten diese eindeutig als Ara h 1 identifiziert werden. Dabei wurde neben der in der GenBank-Datenbank vorhandenen Sequenz für Ara h 1 von MASCOT auch eine um 41 Aminosäuren verkürzte Sequenz von Ara h 1 mit angegeben. Diese wurde unter dem Namen Conarachin in die Bank gestellt. Da keine Unterscheidung in den gefundenen Peptiden zu finden war, blieb diese neue Sequenz unberücksichtigt. Auch Spot 4 wurde als Ara h 1 identifiziert, was durch die Lage in direkter Nachbarschaft mit den Isoformen von Ara h 3/4 unerwartet war.

Die Spots 5 bis 10 wurden als Allergene und Allergenuntereinheiten von Ara h 3/4 und Isoformen (iso-Ara h 3, Gly 1 und Ara h 4) identifiziert. Die Spots 5, 6, 8 und 9 konnten dabei jeweils Sequenzabschnitten, die über das gesamte Protein verteilt waren, zugeordnet werden. Dabei wurden Massen-Peaks gefunden, die sich immer mehreren Sequenzen der einzelnen Isoformen zuordnen ließen. Somit könnten Gemische der Isoformen in den einzelnen Spots vorliegen. In den Proben 7 und 10 wurden mit den basischen C-terminalen Bereichen auch Allergenuntereinheiten der Isoformen gefunden, so dass die Ergebnisse aus Tab. 13 auch mit dieser anderen Probenaufbereitung bestätigt werden konnten. Im Anhang sind die gefundenen Peptide auf den Sequenzen der Isoformen exemplarisch eingezeichnet, wobei hier jeweils die zwei bei der Mascot-Auswertung erstgenannten gegenübergestellt wurden. Außerdem wurde bei der Auswertung nicht berücksichtigt, dass in der GenBank-Datenbank ca. 20 „neue“ Erdnussproteinen eingefügt wurde, die sich nur durch Aminosäureaustausche in einzelnen Aminosäuren unterschieden oder verkürzt waren.

Um den Zerfall der Allergene Ara h 3/4 und Isoformen in ihre sauren N- und basischen C-terminalen Untereinheiten gezielt verfolgen zu können, wurden weitere zweidimensionale Elektrophoresen mit anschließendem tryptischen In-Gel-Verdau durchgeführt. Dazu wurde die isoelektrische Fokussierung der Proteine jeweils nicht

Ergebnisse

reduzierend durchgeführt. In der anschließenden PAGE erfolgte die Auftrennung dann nativ oder reduzierend. Somit konnte im direkten Vergleich verfolgt werden, ob und wann die Auftrennung der Allergene in ihre N- und C-terminalen Untereinheiten erfolgte. Dieses ist in den Abb. 33a und 33b dargestellt. Die Auswertung der Massenspektrogramme ist in der Tabelle 15 zusammengefasst und im Anhang Tab. 21 graphisch dargestellt.

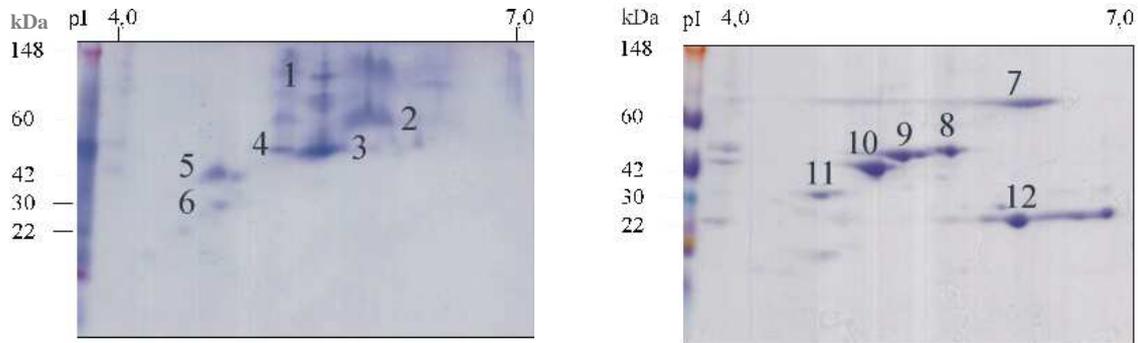


Abb. 33 2D-PAGE der Superdex-200-Fraktion 1 Nicht reduzierende IEF im pH-Gradienten von pH 4-7, native PAGE auf 4-20 % Tris-Glycin-Gel

Abb. 34 2D-PAGE der Superdex-200-Fraktion 1 Nicht reduzierende IEF im pH-Gradienten von pH 4-7, LDS-PAGE auf 4-20 % Tris-Glycin-Gel

Tab. 15: Übersicht der massenspektrometrischen Analysen der Proteine, die aus den Gelen verwendet wurden (Abb. 33 und 34). Angabe der gefundenen Sequenz Coverage in %, der Peptidanzahl und des Mascot Scores. Hinweis auf das Gesamtprotein (G) bzw. die nur bei Ara h 3/4 und Isoformen vorliegenden N- (N) und C- (C) terminalen Untereinheiten. Die Proben 5 und 11 konnten nicht bestimmt werden.

| Spot | MW in kDa | Angabe Sequenz-Coverage in % / Peptidanzahl / Mascot-Score | | | | | | | Gesamtprotein (G) N-term. (N) / C-term. (C) Untereinheit |
|------|-----------|--|-----------------|------------------|-----------------|---------|----------------|-------------------|---|
| | | Ara h 1 | Ara h 3/4 | Gly 1 | iso-Ara h 3 | Ara h 3 | Ara h 4 | Trypsin inhibitor | |
| 1 | 100 | | | | 22% 7 40 | | | | G |
| 2 | 60 | | 25% 11 80 | 30% 14 111 | | | 16% 7 38 | 21% 4 30 | G |
| 3 | 50 | | | | 18% 9 39 | | | | G |
| 4 | 50 | | | | 34% 11 88 | | | | G |
| 6 | 30 | | | 23% 6 52 | | | | | G |
| 7 | 65 | 32% 19 61 | | | | | | | G |
| 8 | 45 | | 26% 10 79 | | | | | 40% 9 64 | N |
| 9 | 45 | | | 40% 9 35 | | | | | N |
| 10 | 42 | | | | 7% 4 34 | | | | N |
| 12 | 22 | | | | 19% 4 46 | | | | C |

Ergebnisse

In den Proben 1, 3 und 4 konnten die Massen-Peaks allein der Sequenz von iso-Ara h 3 zugeordnet werden. Für Probe 2 war ein Gemisch aus den beiden Isoformen Gly 1 und Ara h 3/4 erkennbar, wobei die gefundenen Peptide über die vollständige Sequenz verteilt vorlagen. Für den Spot 6 zeigten die Massen-Peaks einen inneren Bereich von Gly 1, der weder dem N- noch dem C-terminalen Bereich zugeordnet werden konnte. Dieser startete wie die N-terminale Sequenzierung des Ara h 4 in der Mitte des Proteins ab AS 113. In den fünf Spots (Abb. 33) wurden Massen-Peaks von Peptiden gefunden, die Bereiche der gesamten Proteine abdeckte, da keine Reduktion der Disulfidbrücken erfolgte.

Die Probe 7 ergab das vollständige Ara h 1, da es keine posttranslational gespaltene Sequenz enthält, die über Disulfidbrücken zusammengehalten wird. Bei den Proben 8-12 sollte durch die Reduktion die Spaltung der Disulfidbrücken erfolgt sein, so dass N- und C-terminale Untereinheiten von Ara h 3/4 und Isoformen gefunden werden.

Für die Spots 8 bis 10 konnten die Ergebnisse aus Tab. 13 (IEF kombiniert mit LDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen) bestätigt werden. Bei dieser Auftrennung konnten die Spots den N-terminalen Bereichen von Ara h 3/4 (Spot 8), Gly 1 (Spot 9) und iso-Ara h 3 (Spot 10) ebenfalls zugeordnet werden. Für die Probe 8 konnten auch einige Massen-Peaks dem Trypsin Inhibitor zugeordnet werden, der der N-terminalen Untereinheit der beiden Isoformen homolog ist. Die Probe 12 konnte dem C-terminalen Bereich von iso-Ara h 3 zugeordnet werden und bestätigte damit ebenfalls die bisherigen Ergebnisse. Die Proben 5 und 11 konnten nicht bestimmt werden, da zu wenig Protein nachweisbar war.

Zum Abschluss der Untersuchungen sollten diese Ergebnisse mit Erdnussextrakt aus keimfähigen Nüssen verglichen werden, um zu kontrollieren, ob die gefundenen Allergenuntereinheiten durch den Röstprozess direkt nach der Ernte beeinflusst werden.

Zu diesem Zweck wurden einzelne Banden aus dem BN-PAGE-Gel des Erdnussextraktes (EEx-k) ausgeschnitten, gepoolt, reduziert und in der zweiten Dimension, der LDS-PAGE, erneut nach Molekulargewicht getrennt (siehe auch 3.1.2.3, Abb. 15). Aufgrund der bisherigen Erkenntnisse wurden dann gezielt Banden ausgeschnitten, die den einzelnen Isoformen von Ara h 3/4 zugeordnet werden konnten, was in der folgenden Abb. 35 gezeigt wird. Die Auswertung wird in Tab. 16 dargestellt. (Auch in diesem Fall ist die exemplarische Darstellung im Anhang (Tab. 22) gezeigt, wobei die gefundenen Massenpeaks überlappend in die Sequenzen der Isoformen von Ara h 3/4 eingezeichnet wurden.)

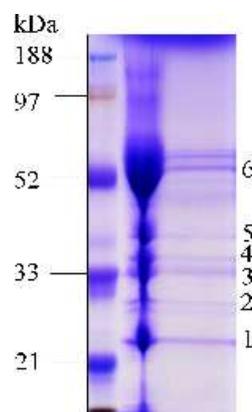


Abb. 35 Auftrennung des Extraktes aus keimfähigen Erdnüssen (EEx-k) mittels D-1D-PAGE (BN-PAGE / LDS-PAGE): 10 % Bis-Tris-Gel, Coomassie-Färbung

Ergebnisse

Tab. 16: Übersicht der massenspektrometrischen Analysen der Proteine, die aus dem Gel verwendet wurden (Abb. 35). Angabe der gefundenen Sequenz Coverage, der Peptidanzahl und des Mascot Scores. Hinweis auf das Gesamtprotein (G) bzw. die nur bei Ara h 3/4 und Isoformen vorliegenden N- (N) und C- (C) terminalen Untereinheiten. * Mascot-Score wurde nicht bestimmt

| Spot | MW in kDa | Angabe Sequenz-Coverage in % / Peptidanzahl / Mascot-Score | | | | | | Gesamtprotein (G) N-term. (N) / C-term. (C) Untereinheit |
|------|-----------|--|----------------------|------------------|---------|---------|-------------------|---|
| | | Ara h 3/4 | Gly 1 | iso-Ara h 3 | Ara h 3 | Ara h 4 | Trypsin inhibitor | |
| 1 | 25 | | | 24 % 12 61 | | | | Mittlerer Bereich |
| 2 | 28 | | 19 % 8 n best* | | | | | Mittlerer Bereich |
| 3 | 34 | | 11 % 5 20 | | | | | C |
| 4 | 36 | | | 17 % 9 65 | | | | N |
| 5 | 42 | | 14 % 8 49 | | | | | N |
| 6 | 52 | | | 29 % 17 89 | | | | G |

Bei der Auswertung der Massenspektrogramme wurde deutlich, dass die bisherigen Ergebnisse auch mit der Analyse des Erdnussextraktes aus keimfähigen Erdnüssen bestätigt werden konnten. So wurden in den Proben 1 und 2 Massen-Peaks von iso-Ara h 3 bzw. Gly 1 gefunden, die sich in dem mittleren Bereich der Proteine befanden, der bereits in der Tabelle 18 beschrieben wurde. Die Probe 3 zeigte die C-terminale Untereinheit von Gly 1, für die Banden 4 und 5 konnte eine Zuordnung zu den N-terminalen Untereinheiten von iso-Ara h 3 bzw. Gly 1 gefunden werden. Die Massen-Peaks der Probe 6 deckten weitgehend die gesamte Sequenz von iso-Ara h 3 ab. Es konnte somit keine Veränderung durch den Röstprozess gefunden werden.

3.2 Charakterisierung der Erdnussallergene Ara h 3/4 und ihrer Isoformen mittels Epitopmapping

Um die Erdnussallergene Ara h 3/4 und die Isoformen Gly 1, Ara h 3, Ara h 4, Trypsin Inhibitor und iso-Ara h 3 direkt miteinander vergleichen zu können, sollten die Bindungsstellen von Patientenseren und monoklonalen Antikörper auf den einzelnen Sequenzen bestimmt und verglichen werden. Dazu wurden zunächst die in der Datenbank GenBank veröffentlichten Sequenzen der Isoformen (Gly1 AAG01363, Ara h 3 AAC63045, Ara h 4 AF086821, Ara h 3/4 AAM46958, iso-Ara h 3 AAT39430, Trypsin Inhibitor AF487543) zusammengestellt und mit Literaturvorgaben (IgE-Epitope von Ara h 3, Rabjohn *et al.*, 1999) verbunden. Dabei wurde die konservierte Proteaseschnittstelle: NGLEET ebenso berücksichtigt, wie der Zerfall der Isoformen in saure N- und basische C-terminale Untereinheiten und mit den immunologischen Nachweisen erkannte neue IgE-reaktive Bereiche.

3.2.1 Alignment der veröffentlichten Sequenzen von Ara h 3/4 und ihren Isoformen und Konstruktion der Filter für das Epitopmapping

Die notwendigen Alignments wurden online mit dem frei verwendbaren Clustalw-Programm der Universität Heidelberg (www.bork.embl-heidelberg.de) durchgeführt und sind im Folgenden dargestellt. Dabei soll die Markierung durch Sterne die Homologie der Isoformen verdeutlichen. Abnehmende Homologie der Aminosäuren wird durch Doppelpunkte, Punkte und Lücken gekennzeichnet.

Ergebnisse

Prosequenzen

↙ N-Terminus der reifen Proteine (saure Untereinheit)

```

--MIRGRLLALSVCFCFLVLGASSISFRQQPEEENACQFQRLNAQRPDNRIESEGGYIETWNPNNQEFECAGVALSRLVLRNRALRRP
-----RQQPEEENACQFQRLNAQRPDNRIESEGGYIETWNPNNQEFECAGVALSRLVLRNRALRRP
--MAKLLLELSFCFCFLVLGASSISFRQQPEEENACQFQRLNAQRPDNRIESEGGYIETWNPNNQEFECAGVALSRLVLRNRALRRP
--MGKLLALSVCFCFLVLGASSISFRQQPEEENACQFQRLNAQRPDNRIESEGGYIETWNPNNQEFECAGVALSRLVLRNRALRRP
-----VTFRQGGEENECQFQRLNAQRPDNRIESEGGYIETWNPNNQEFECAGVALSRLVLRNRALRRP
NYLHMLLALSVCFCFLVLGASSISFRQQPEEENACQFQRLNAQRPDNRIESEGGYIETWNPNNQEFECAGVALSRLVLRNRALRRP
          **   **   *****;*****;*****  *****
FYSNAPQEIFIQQGRGYFGLIFPGCPSTYEEPAQQGRHQSQRAPRRFEG--EDQSQQQQDSHQKVRRFDEGDLIAVPTGVALW
FYSNAPQEIFIQQGRGYFGLIFPGCPRHYEEPHTQGRSQSQRPRRLQG--EDQSQQQR-DSHQKVHRFDEGDLIAVPTGVAFW
FYSNAPQEIFIQQGRGYFGLIFPGCPSTYEEPAQQGRRYQSQRPRRLQE--EDQSQQQQ-DSHQKVHRFNEGDLIAVPTGVAFW
FYSNAPQEIFIQQGRGYFGLIFPGCPSTYEEPAQQGRHQSQRPRRFQG--QDSQQQQ-DSHQKVHRFDEGDLIAVPTGVAFW
FYSNAPLEIYVQQSGYFGLIFPGCPSTYEEPAEGRRYQSQRKPSRRFQVGQDDPSQQQ-DSHQKVHRFDEGDLIAVPTGVAFW
FYSNAPQEIFIQQGRGYFGLIFPGCPSTYEEPAQQGRHQSQRPRRFQG--QDSQQQQ-DSHQKVHRFDEGDLIAVPTGVAFW
*****:*** *****  *** : *** **:.**:: : * ****: *****:**:*****:*****:*
MFNDHDTDVVAVSLTDTNNNDNQLDQFPRRFLAGNHEQEFLRYQQS---RRRSLPYSPSPSQPRQEEREFSPRQHSRRER
LYNDHDTDVVAVSLTDTNNNDNQLDQFPRRFLAGNHEQEFLRYQQSSRQSRRSLPYSPSPSQPRQEEREFSPRQHSRRER
LYNDHDTDVVAVSLTDTNNNDNQLDQFPRRFLAGNHEQEFLRYQQSSRQSRRSLPYSPSPHSPRREEREFSPRQHSRRER
MYNDHDTDVVAVSLTDTNNNDNQLDQFPRRFLAGNHEQEFLRYQQS---RRRSLPYSPSPSQTPKQEDRESPRQHGRER
MYNDEDTDVTVLSDTSSIHNQLDQFPRRFLAGNHEQEFLRYQQQG-----SRP--HYRQISPRV-----
MYNDHDTDVVAVSLTDTNNNDNQLDQFPRRFLAGNHEQEFLRYQQS---RRRS----- Ende Trypsin Inhibitor
:.*.*****:*:*.*. . *****  *** *****  .:.*  . **:  **
AGQEENEEGNIFSGFTPEFLAQFQVDRQIVQNLRGENESEEEGAIVTVKGGLRILSPDRKRG-----ADEEEYDEDEYEYD
AGQEENEEGNIFSGFTPEFLEQAFQVDRQIVQNLRGETESEEEGAIVTVRGGLRILSPDRKRR-----ADEEEYDEDEYEYD
AGQEEDEEGNIFSGFTPEFLEQAFQVDRQIVQNLRWGENESEEEGAIVTVRGGLRILSPDGTRG-----ADEEEYDEDEQYEYH
AGQEENEEGNIFSGFTPEFLAQFQVDRQILQNLRGENESDEQGAIVTVRGGLRILSPDRKRQYERPDEEYDEYEDY
-GDEQENEGSNIFSGFAQEFLQHAFQVD-RQTVENLRGENEREEQGAIVTVKGGLRILSPDEEDESSRSPSRREFEDEDRSRPQ
*:*:*:*.* *****: *** :***** ** ::* *.* :*:*****:*****
... *****
EE----DRRRGRGRSGRGRGN
EE----DRRRGRGRSGRGRGN
EQ----DGRRGRGRSGGGGN Proteaseschnittstelle
EEERQDRRRGRGRSGRGRGN
QR----GKYDENRRGYKN
.: : ... ** *

```

N-Terminus der basischen C-terminalen Untereinheiten

```

GIEETICTASVKKNIGRNRSPDIYNPQAGSLKTANDLN--LLILRWLGLSAEYGNLYRNALFVPHYNTNAHSIIYALRGRAHV
GIEETICTASAKKIGRNRSPDIYNPQAGSLKTANDLN--LLILRWLGLSAEYGNLYRNALFVAHYNTNAHSIIYRLRGRAHV
GIEETICTASVKNIGRNRSPHIDPQRWFTQNCHDLN--LLILRWLGLSAEYGNLYRNALFVPHYNTNAHSIIYALRGRAHV
GIEETICTASFKKIGRNRSPDIYNPQAGSLKTANLQLNLLILRWLGLSAEYGNLYRNALFVPHYNTNAHSIIYALRGRAHV
GIEETICASVKNLGRSSNPDIYNPQAGSLRSVNELD--LPILGWLGLSAQHGTIYRNAMFVPHYTLNAHTIVALLNGRAHV
*****:.* ***** .*.***** :.::: * * * * *:.*:*****:*****.*****:*.*****
QVVDSNGNRVYDEELQEGHVLVPQNFAVAGKSQSDNFEYVAFKTDSRPNIANFAGENSIDNLPEEVVANSYGLPREQARQL
QVVDSNGNRVYDEELQEGHVLVPQNFAVAGKSQSENFEYVAFKTDSRPSIANLAGENSVIDNLPEEVVANSYGLQREQARQL
QVVDSNGNRVYDEELQEGHVLVPQNFAVAGKSQSENFEYVAFKTDSRPSIANFAGENSFIDNLPEEVVANSYGLPREQARQL
QVVDSNGDRVDEELQEGHVLVPQNFAVAGKSQSENFEYVAFKTDSRPSIANLAGENSFIDNLPEEVVANSYGLPREQARQL
QVVDSNGNRVYDEELQEGHVLVPQNFAVAAKAQSENYELAFKTDSRPSIANLAGENSIIDNLPEEVVANSYRLPREQARQL
*****:*:*:*****:*****.*****:*****:*****.*****.*****.***** * *****
KNNNPFKFVPPS-QQSLRAVA Gly 1
KNNNPFKFVPPS-QQSPRAVA Ara h 3
KNNNPFKFVPPF-QQSPRAVA Ara h 4
KNNNPFKFVPPS-EQSLRAVA Ara h 3/4
KNNNPFKFVPPFDHQSMREVA iso-Ara h 3
Trypsin-Inhibitor
*****: * * * *

```

(*) Identische AS in allen Sequenzen, (:) hoch konservierter Bereich, (.) schwach konservierter Bereich.

Aus diesem Alignment wird deutlich, dass die Sequenzen der Isoformen in weiten Bereichen vollständig identisch sind. Nur durch die Eingabe der Partialsequenz von Ara h 3 konnten nicht noch weitere Sequenzidentitäten am Anfang der reifen Proteine gefunden werden, da hier nicht die vollständige Sequenz vorliegt. Zusammen mit bisherigen Ergebnissen dieser Arbeit und den Literaturvorgaben wurde dieses Alignment verwendet, um die Filter für das Epitopmapping mit den synthetischen Peptide zu konstruieren.

Ergebnisse

Die wichtigsten Sequenzbereiche sind in der folgenden Tabelle 17 dargestellt und dienen als Grundlage der Filterherstellung.

Tab. 17 Alignment der wichtigsten Sequenzbereiche der Isoformen von Ara h 3/4. IgE-Epitope von Rabjohn *et al.* (1999) grau, Proteaseschnittstelle durch Pfeil markiert in kursiv, mittlerer Bereich ab AS 113 kursiv, Fett gedruckte schwarze AS synthetisiert, grau gedruckte AS nicht synthetisiert

| N-Terminus der reifen Proteine | |
|---|--|
| ISFRQQPEENACQFQRLNAQRPNDRLESEGGYIETWNPNNQEFECAGVALSRLVLRNALRRPFYSNAPQEIFIQQGRGYFGLIFPGCPSTYEPP | |
| ---RQQPEENACQFQRLNAQRPNDRLESEGGYIETWNPNNQEFECAGVALSRLVLRNALRRPFYSNAPQEIFIQQGRGYFGLIFPGCPSTYEPP | |
| ISFRQQPEENACQFQRLNAQRPNDRLESEGGYIETWNPNNQEFECAGVALSRLVLRNALRRPFYSNAPQEIFIQQGRGYFGLIFPGCPSTYEPP | |
| ISFRQQPEENACQFQRLNAQRPNDRLESEGGYIETWNPNNQEFECAGVALSRLVLRNALRRPFYSNAPQEIFIQQGRGYFGLIFPGCPSTYEPP | |
| VTFRQGGEENECQFQRLNAQRPNDRLESEGGYIETWNPNNQEFECAGVALSRLVLRNALRRPFYSNAPLEIYVQQSGYFGLIFPGCPSTYEPP | |
| AQQGRRHQSQRPRR FEG -- EDQSQQQQDSHQ KVRRFDEGDLIAVPTGVALWMFNDHDTDVAVSLTDTNNNDNQLDQFPRRFLNAGNHEQEF | |
| HTQGRRSQSQRPRR LQG -- EDQSQQQR - DSHQ KVHRFDEGDLIAVPTGVAFWLYNDHDTDVAVSLTDTNNNDNQLDQFPRRFLNAGNTEQEF | |
| AQQGRRYQSQRPRR LQE -- EDQSQQQQ - DSHQ KVHRFDEGDLIAVPTGVAFWLYNDHDTDVAVSLTDTNNNDNQLDQFPRRFLNAGNHEQEF | |
| AQQGRRHQSQRPRR FQG -- QDQSQQQQ - DSHQ KVHRFDEGDLIAVPTGVAFWLYNDHDTDVAVSLTDTNNNDNQLDQFPRRFLNAGNHEQEF | |
| AQEGRRYQSQKPSRR FQVGDQDPSQQQQ - DSHQ KVHRFDEGDLIAVPTGVAFWLYNDHDTDVAVSLTDTNNNDNQLDQFPRRFLNAGNHEQEF | |
| RYQQQS --- RRRSLPSPSPSPSQSPRQEEREFSPRGQHSRRERAGQEEENEGGNIFSGFTPEFLAQAFQVDDRQIVQNLRGENESSEEGAIIVTVK | |
| RYQQSRQSRRRSLPSPSPSPSPSQSPRQEEREFSPRGQHSRRERAGQEEENEGGNIFSGFTPEFLAQAFQVDDRQIVQNLRGETESSEEGAIIVTVR | |
| RYQQSRQSRRRSLPSPSPSPSPSPSQSPRQEEREFSPRGQHSRRERAGQEEENEGGNIFSGFTPEFLAQAFQVDDRQIVQNLWGENESSEEGAIIVTVR | |
| RYQQQS --- RRRSLPSPSPSPQTPKQEDREFSPRGQHSRRERAGQEEENEGGNIFSGFTPEFLAQAFQVDDRQILQNLRGENESDEQGAIVTVR | |
| RYQQQGG ----- SRP --- HYRQISPRV ----- GDEQENEGSNIFSGFAQEFQAHAFQVD - RQTVENLRGENEREQGAIVTVK | |
| GGLRILSPDRKRG --- ADEEEYDEDEYDEE --- DRRRGRGSRGR NGIETICTASVKKNI GRNRSPIYNPQAGSLKTANDLN -- LLI | |
| GGLRILSPDRKRR --- ADEEEYDEDEYDEE --- DRRRGRGSRGR NGIETICTASAKNI GRNRSPIYNPQAGSLKTANDLN -- LLI | |
| GGLRILSPDGRG --- ADEEEYDEDEYDEE --- DRRRGRGSRGG NGIETICTACVKNI GRNRSPIYNDPQRWFTQCHDLN -- LLI | |
| GGLRILSPDRKRRQYERPDDEEEYDEDEYDEEERQDQDRRRGRGSRGG NGIETICTASFKNI GRNRSPIYNPQAGSLKTANELQLNLLI | |
| GGLRILSPDEEDESRRSPSRRREFDEDRSRPQQR --- GKYDENRRGK NGIETICTASVKKNI GRNRSPIYNPQAGSLRVSVELD -- LPI | |
| LRWLGLSAEYGNLYRNALFVPHYNTNAHSIIYALRGRAHVQVDSNGNRVYDEELQEGHVLVVPQNFVAVAGKSQSDNFEYVAFKTDSTRPNIANFA | |
| LRWLGPSAEYGNLYRNALFVAHYNTNAHSIIYALRGRAHVQVDSNGNRVYDEELQEGHVLVVPQNFVAVAGKSQSENFEYVAFKTDSTRPSIANLA | |
| LRWLGLSAEYGNLYRNALFVPHYNTNAHSIIYALRGRAHVQVDSNGNRVYDEELQEGHVLVVPQNFVAVAGKSQSENFEYVAFKTDSTRPSIANFA | |
| LRWLGLSAEYGNLYRNALFVPHYNTNAHSIIYALRGRAHVQVDSNGNRVYDEELQEGHVLVVPQNFVAVAGKSQSENFEYVAFKTDSTRPSIANLA | |
| LGWLGLSAQHGTYRNAMFVPHYTLNAHTIVVALNGRAHVQVDSNGNRVYDEELQEGHVLVVPQNFVAVAAKAQSENFEYVAFKTDSTRPSIANLA | |
| GENSIIDNLPPEVVANSYGLPREQARQLKNNNPFKFFVPPS-QQSLRAVA Gly 1 | |
| GENSVIDNLPPEVVANSYGLPREQARQLKNNNPFKFFVPPS-QQSPRAVA Ara h 3 | |
| GENSFIDNLPPEVVANSYGLPREQARQLKNNNPFKFFVPPF-QQSPRAVA Ara h 4 | |
| GENSFIDNLPPEVVANSYGLPREQARQLKNNNPFKFFVPPS-EQSLRAVA Ara h 3/4 | |
| GENSIDNLPPEVVANSYRLPREQARQLKNNNPFKFFVPPFDHQMREVA Iso-Ara h 3 | |

Dabei sind die IgE-Epitope des Ara h 3 auf allen Sequenzen markiert, da diese Bereiche durch ihre hohe Homologie auf ihre IgE-Reaktivität hin untersucht werden sollten. Ebenfalls markiert ist die Proteaseschnittstelle und der Bereich in der Mitte der Proteine ab AS 113, der über N-terminale Sequenzierungen und massenspektrometrische Analysen ermittelt und mit Patientenserum bereits als IgE-reaktiv erkannt wurde.

Für den Aufbau der Membranen waren vor allem die bereits von Rabjohn *et al.* (1999) für das Ara h 3 beschriebenen IgE-Epitope (in Tabelle 20 grau unterlegt) sehr wichtig, da es sich bei diesen Bereichen zwar um konservierte Sequenzabschnitte handelt, es aber durchaus bei den einzelnen Isoformen der Ara h 3/4-Allergene geringfügige Unterschiede durch den Austausch einzelner Aminosäuren gibt. An der kursiv dargestellten Protease-Schnittstelle (ebenfalls grau unterlegt), die bei allen Leguminosen konserviert vorliegt, folgt die posttranslationale Spaltung der Proteine in saure N- und basische C-terminale Bereiche, so dass diese nach der Spaltung nur noch durch die Disulfidbrücke innerhalb der Proteine zusammengehalten werden. Somit wurde dieser Bereich ebenfalls als sehr wichtig eingestuft, da über die Spaltung selbst und die daraus resultierenden Besonderheiten der Leguminosen noch wenig bekannt war.

Die Frage sollte geklärt werden, ob und in welchem Umfang die C-terminalen Untereinheiten der Allergene IgE-Epitope tragen. Außerdem sollte der durch N-terminale Sequenzierungen und Massenspektrogramme bestimmte Bereich in der Mitte der Proteine ab AS 113 (grau unterlegt mit kursiver Schrift) näher untersucht werden,

Ergebnisse

da dieser Bereich IgE-Reaktivität aufwies, was ebenfalls noch nicht beschrieben worden war. Für die Synthese wurde zunächst die Sequenz des Ara h 3/4 als Matrix verwendet und komplett mit 16er Peptiden im 2er Versatz synthetisiert. Außerdem wurde die Sequenz des iso-Ara h 3 mit der höchsten Variabilität innerhalb der Isoformen analog komplett synthetisiert. Die drei anderen Isoformen wurden dann entsprechend in Teilen hergestellt, wobei auf die IgE-Epitope, den mittleren Bereich, die Protease-Schnittstelle und die C-terminalen Bereiche geachtet wurde. Eine Anzahl von Kontrollpeptiden, die ein Computerprogramm von Dr. Frey nach dem Zufallsprinzip erstellte, wurden zur Bestimmung des Hintergrundes als Negativkontrolle hergestellt. Es wurden jeweils zwei Membranen parallel hergestellt, um gleichwertige Untersuchungen durchführen zu können. Die Peptidkonzentration der Filter lag bei 257 nmol / cm² Filterfläche.

Ergebnisse

| 7B2 II | A 1 | A 2 | A 3 | A 4 | A 5 | A 6 | A 7 | A 8 | A 9 | A 10 | A 11 | A 12 | A 13 | A 14 | A 15 | A 16 | A 17 | A 18 | A 19 | A 20 | A 21 | A 22 | A 23 | A 24 | A 25 |
|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| A 1 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 |
| A 2 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 |
| A 3 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | 60 | 61 | 62 | 63 | 64 | 65 | 66 | 67 | 68 | 69 | 70 | 71 | 72 | 73 | 74 | 75 |
| A 4 | 76 | 77 | 78 | 79 | 80 | 81 | 82 | 83 | 84 | 85 | 86 | 87 | 88 | 89 | 90 | 91 | 92 | 93 | 94 | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 100 |
| A 5 | 101 | 102 | 103 | 104 | 105 | 106 | 107 | 108 | 109 | 110 | 111 | 112 | 113 | 114 | 115 | 116 | 117 | 118 | 119 | 120 | 121 | 122 | 123 | 124 | 125 |
| A 6 | 126 | 127 | 128 | 129 | 130 | 131 | 132 | 133 | 134 | 135 | 136 | 137 | 138 | 139 | 140 | 141 | 142 | 143 | 144 | 145 | 146 | 147 | 148 | 149 | 150 |
| A 7 | 151 | 152 | 153 | 154 | 155 | 156 | 157 | 158 | 159 | 160 | 161 | 162 | 163 | 164 | 165 | 166 | 167 | 168 | 169 | 170 | 171 | 172 | 173 | 174 | 175 |
| A 8 | 176 | 177 | 178 | 179 | 180 | 181 | 182 | 183 | 184 | 185 | 186 | 187 | 188 | 189 | 190 | 191 | 192 | 193 | 194 | 195 | 196 | 197 | 198 | 199 | 200 |
| A 9 | 201 | 202 | 203 | 204 | 205 | 206 | 207 | 208 | 209 | 210 | 211 | 212 | 213 | 214 | 215 | 216 | 217 | 218 | 219 | 220 | 221 | 222 | 223 | 224 | 225 |
| A 10 | 226 | 227 | 228 | 229 | 230 | 231 | 232 | 233 | 234 | 235 | 236 | 237 | 238 | 239 | 240 | 241 | 242 | 243 | 244 | 245 | 246 | 247 | 248 | 249 | 250 |
| A 11 | 251 | 252 | 253 | 254 | 255 | 256 | 257 | 258 | 259 | 260 | 261 | 262 | 263 | 264 | 265 | 266 | 267 | 268 | 269 | 270 | 271 | 272 | 273 | 274 | 275 |
| A 12 | 276 | 277 | 278 | 279 | 280 | 281 | 282 | 283 | 284 | 285 | 286 | 287 | 288 | 289 | 290 | 291 | 292 | 293 | 294 | 295 | 296 | 297 | 298 | 299 | 300 |
| A 13 | 301 | 302 | 303 | 304 | 305 | 306 | 307 | 308 | 309 | 310 | 311 | 312 | 313 | 314 | 315 | 316 | 317 | 318 | 319 | 320 | 321 | 322 | 323 | 324 | 325 |
| A 14 | 326 | 327 | 328 | 329 | 330 | 331 | 332 | 333 | 334 | 335 | 336 | 337 | 338 | 339 | 340 | 341 | 342 | 343 | 344 | 345 | 346 | 347 | 348 | 349 | 350 |
| A 15 | 351 | 352 | 353 | 354 | 355 | 356 | 357 | 358 | 359 | 360 | 361 | 362 | 363 | 364 | 365 | 366 | 367 | 368 | 369 | 370 | 371 | 372 | 373 | 374 | 375 |
| A 16 | 376 | 377 | 378 | 379 | 380 | 381 | 382 | 383 | 384 | 385 | 386 | 387 | 388 | 389 | 390 | 391 | 392 | 393 | 394 | 395 | 396 | 397 | 398 | 399 | 400 |
| A 17 | 401 | 402 | 403 | 404 | 405 | 406 | 407 | 408 | 409 | 410 | 411 | 412 | 413 | 414 | 415 | 416 | 417 | 418 | 419 | 420 | 421 | 422 | 423 | 424 | 425 |

Abb. 36 Synthese überlappender Peptide von Ara h 3/4 (Peptide 1 bis 250, schwarz) und Ara h 4 (Peptide 305 bis 425, schwarz) mit 2er Versatz, sowie von Kontrollpeptiden (276-304 schwarz unterlegt) für das Epitopmapping
Beschriftung der Achsen, Schnittfläche (grau), Aufbau der Filter I und II

| | A 1 | A 2 | A 3 | A 4 | A 5 | A 6 | A 7 | A 8 | A 9 | A 10 | A 11 | A 12 | A 13 | A 14 | A 15 | A 16 | A 17 | A 18 | A 19 | A 20 | A 21 | A 22 | A 23 | A 24 | A 25 |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| A 1 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 |
| A 2 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 |
| A 3 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | 60 | 61 | 62 | 63 | 64 | 65 | 66 | 67 | 68 | 69 | 70 | 71 | 72 | 73 | 74 | 75 |
| A 4 | 76 | 77 | 78 | 79 | 80 | 81 | 82 | 83 | 84 | 85 | 86 | 87 | 88 | 89 | 90 | 91 | 92 | 93 | 94 | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 100 |
| A 5 | 101 | 102 | 103 | 104 | 105 | 106 | 107 | 108 | 109 | 110 | 111 | 112 | 113 | 114 | 115 | 116 | 117 | 118 | 119 | 120 | 121 | 122 | 123 | 124 | 125 |
| A 6 | 126 | 127 | 128 | 129 | 130 | 131 | 132 | 133 | 134 | 135 | 136 | 137 | 138 | 139 | 140 | 141 | 142 | 143 | 144 | 145 | 146 | 147 | 148 | 149 | 150 |
| A 7 | 151 | 152 | 153 | 154 | 155 | 156 | 157 | 158 | 159 | 160 | 161 | 162 | 163 | 164 | 165 | 166 | 167 | 168 | 169 | 170 | 171 | 172 | 173 | 174 | 175 |
| A 8 | 176 | 177 | 178 | 179 | 180 | 181 | 182 | 183 | 184 | 185 | 186 | 187 | 188 | 189 | 190 | 191 | 192 | 193 | 194 | 195 | 196 | 197 | 198 | 199 | 200 |
| A 9 | 201 | 202 | 203 | 204 | 205 | 206 | 207 | 208 | 209 | 210 | 211 | 212 | 213 | 214 | 215 | 216 | 217 | 218 | 219 | 220 | 221 | 222 | 223 | 224 | 225 |
| A 10 | 226 | 227 | 228 | 229 | 230 | 231 | 232 | 233 | 234 | 235 | 236 | 237 | 238 | 239 | 240 | 241 | 242 | 243 | 244 | 245 | 246 | 247 | 248 | 249 | 250 |
| A 11 | 251 | 252 | 253 | 254 | 255 | 256 | 257 | 258 | 259 | 260 | 261 | 262 | 263 | 264 | 265 | 266 | 267 | 268 | 269 | 270 | 271 | 272 | 273 | 274 | 275 |
| A 12 | 276 | 277 | 278 | 279 | 280 | 281 | 282 | 283 | 284 | 285 | 286 | 287 | 288 | 289 | 290 | 291 | 292 | 293 | 294 | 295 | 296 | 297 | 298 | 299 | 300 |
| A 13 | 301 | 302 | 303 | 304 | 305 | 306 | 307 | 308 | 309 | 310 | 311 | 312 | 313 | 314 | 315 | 316 | 317 | 318 | 319 | 320 | 321 | 322 | 323 | 324 | 325 |
| A 14 | 326 | 327 | 328 | 329 | 330 | 331 | 332 | 333 | 334 | 335 | 336 | 337 | 338 | 339 | 340 | 341 | 342 | 343 | 344 | 345 | 346 | 347 | 348 | 349 | 350 |
| A 15 | 351 | 352 | 353 | 354 | 355 | 356 | 357 | 358 | 359 | 360 | 361 | 362 | 363 | 364 | 365 | 366 | 367 | 368 | 369 | 370 | 371 | 372 | 373 | 374 | 375 |
| A 16 | 376 | 377 | 378 | 379 | 380 | 381 | 382 | 383 | 384 | 385 | 386 | 387 | 388 | 389 | 390 | 391 | 392 | 393 | 394 | 395 | 396 | 397 | 398 | 399 | 400 |
| A 17 | 401 | 402 | 403 | 404 | 405 | 406 | 407 | 408 | 409 | 410 | 411 | 412 | 413 | 414 | 415 | 416 | 417 | 418 | 419 | 420 | 421 | 422 | 423 | 424 | 425 |

Abb. 37 Synthese überlappender Peptide von iso-Ara h 3 (Peptide 1 bis 239, schwarz), Ara h 3 (Peptide 266 bis 316, kursiv schwarz) und Gly 1 (Peptide 329 bis 425, schwarz) mit 2er Versatz und von Kontrollpeptiden (317-328 schwarz unterlegt) für das Epitopmapping
Beschriftung der Achsen, Schnittfläche (grau), Aufbau der Filter III und IV

Ergebnisse

Die Auswertung der Filter nach der Inkubation mit den monoklonalen Antikörpern oder den Patientenseren erfolgte durch visuellen Abgleich der Spots. Für die Auswertung dieses Screening-Verfahrens nach Reaktionsintensität wurde eine zweistufige Farbkodierung gewählt.

Dabei galten die Peptide mit einer Markierung in mittelgrau als über dem Hintergrund liegend und wurden für die Auswertung ebenso herangezogen, wie die markanten Peptide, die mit dunkelgrauen Schattierungen markiert wurden. Diese markierten die als Hauptepitope angesehenen Sequenzbereiche. Zusätzliche Kontrollen der Färbereaktion wurden auf den Filtern durchgeführt. Dabei wurden die Filter jeweils im Wechsel mit monoklonalen Antikörpern und Zweitantikörper (α -Maus IgG) sowie Patientenserum und Zweitantikörper (α -Human IgE) untersucht, um Wechselwirkungen untereinander auszuschließen. Außerdem wurde das Serum (AB) als Negativkontrolle eingesetzt. Zusätzlich wurde eine Kontrolle mit dem monoklonalen Antikörper Pn-t (α -Ara h 1) durchgeführt, der in den immunologischen Voruntersuchungen keine Bindung an Ara h 3/4 und Isoformen zeigte. Diese Kontrollen zeigten lediglich Hintergrundfärbung, die bei der Auswertung abgezogen wurde.

3.2.2 Bestimmung der Epitope von monoklonalen Antikörpern

Zunächst sollten die Epitope des monoklonalen Antikörpers PEI-7B2, der die Erdnussallergene Ara h 3/4 und zwei Isoformen (Gly 1 und Ara h 4) detektiert, genau bestimmt werden. Auffällig war, dass die N-terminale Untereinheit von iso-Ara h 3 in der 2D-PAGE immer nur in den Randbereichen des Spots markiert wurde. Vor diesem Hintergrund waren die Fragen zu klären, welche Epitope generell von PEI-7B2 auf den einzelnen Sequenzen erkannt werden und ob es sich dabei um lineare Sequenzabschnitte handelt. Die folgende Abb. 38 zeigt die Detektion einzelner Peptide von Ara h 3/4 und Isoformen auf den Filtern II und IV mit PEI-7B2. Die graphische Auswertung Abb. 69 wird im Anhang gezeigt.

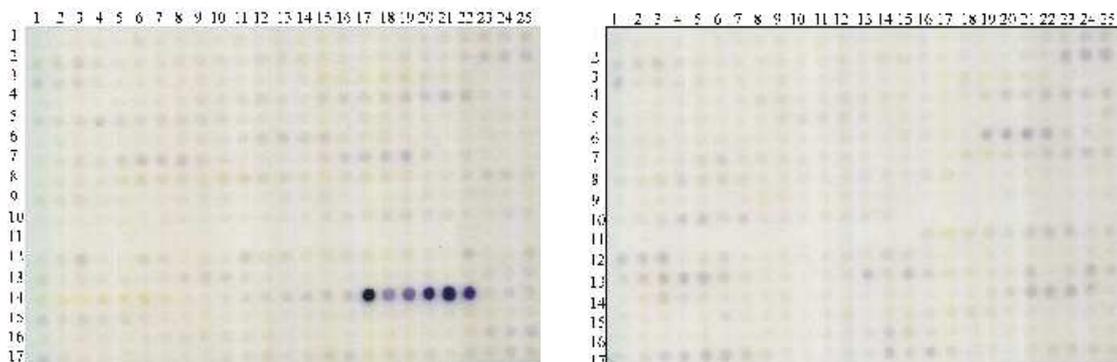


Abb. 38 Epitopmapping mit dem mAK PEI-7B2 (gegen Ara h 3/4), Färbung der Filter II und IV

Schon bei einem ersten Vergleich der Filter in Abb. 38 fiel auf, dass das Hauptepitop dieses monoklonalen Antikörpers auf der Sequenz von Ara h 4 (Filter II, Peptide 342-347, schwarz) lag. In dem folgenden Bild soll schematisch dargestellt werden, wie aus den gefundenen Peptiden das Epitop bestimmt wurde.

Ergebnisse

| | | |
|---------|------------|--|
| Ara h 4 | Peptid 342 | R Q S R R R S L P Y <u>S P Y S P H</u> |
| | Peptid 343 | S R R R S L P Y <u>S P Y S P H</u> S R |
| | Peptid 344 | R R S L P Y <u>S P Y S P H</u> S R P R |
| | Peptid 345 | S L P Y <u>S P Y S P H</u> S R P R R E |
| | Peptid 346 | P Y <u>S P Y S P H</u> S R P R R E E R |
| | Peptid 347 | <u>S P Y S P H</u> S R P R R E E R E F |

Der übereinstimmende Sequenzbereich (AS 195-220) aller dunkelgrau markierter Peptide (Filter II, Peptide 342-347) ergab die unterstrichene Sequenz **SPYSPH** als Hauptepitop von PEI-7B2. Diese Sequenz findet sich in Teilen bei den Isoformen Ara h 3/4 (AS 186-209) und iso-Ara h 3 (AS 193-210) und zeigte hier eine deutlich geringere Antikörperbindung. Die flankierenden homologen Aminosäuren sind in grau markiert.

| | | |
|-----------|-----------|--|
| Ara h 3/4 | Peptid 93 | F L R Y Q Q Q S R R R <u>S L P Y S</u> |
| | Peptid 94 | R Y Q Q Q S R R R <u>S L P Y S</u> P S |
| | Peptid 95 | Q Q Q S R R R <u>S L P Y S</u> P S P Q |
| | Peptid 96 | Q S R R R <u>S L P Y S</u> P S P Q P K |
| | Peptid 97 | R R R <u>S L P Y S</u> P S P Q P K Q E |

Die schwächere Färbung des Peptids 93 verdeutlicht, dass die folgende Aminosäure P für die Antikörperbindung wichtig ist.

| | | |
|-------------|-----------|--|
| Iso-Ara h 3 | Peptid 97 | Q Q Q G <u>S R P H Y R</u> Q I S P R V |
| | Peptid 98 | Q G <u>S R P H Y R</u> Q I S P R V R G |

Die Reaktivität des iso-Ara h 3 ist geringer als bei Ara h 3/4. Die Peptide der homologen Sequenzen von Ara h 3 und Gly 1 wurden nicht synthetisiert.

Weiterhin sollten die Bindungsstellen des monoklonalen Antikörpers Pn-x gegen Ara h 3/4 und Isoformen bestimmt werden. In der folgenden Abb. 39 wird die sehr deutliche Färbung dieses mAKs gezeigt, dessen graphische Auswertung in der Abb. 70 im Anhang dargestellt wird.

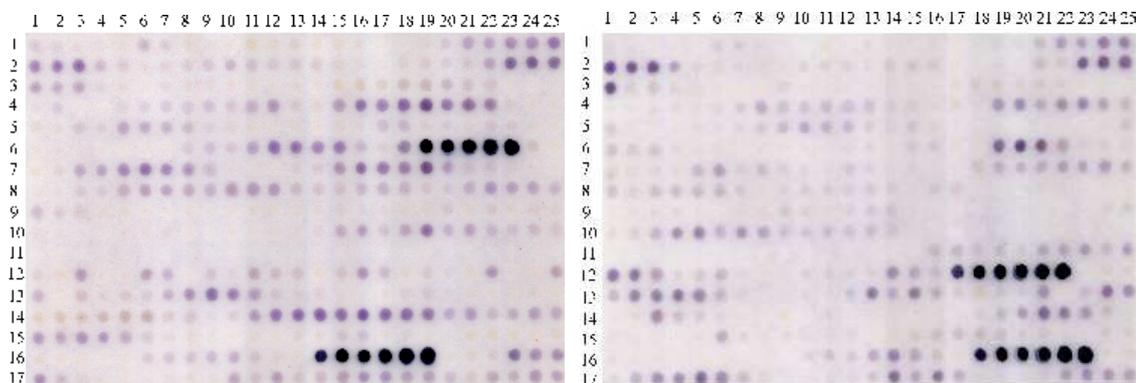


Abb. 39 Epitopmapping mit dem mAK Pn-x (gegen Ara h 3/4), Färbung der Filter II und IV

Ergebnisse

Bei einem ersten Vergleich der Filter in Abb. 39 fällt auf, dass das Hauptepitop dieses monoklonalen Antikörpers auf den Sequenzen von Ara h 3/4, Ara h 4 (Filter II, Peptide 143-148, schwarz und 389-394, schwarz), Ara h 3 und Gly 1 (Filter IV, Peptide 292-297, kursiv und 393-398, schwarz) lag. In dem folgenden Bild soll schematisch dargestellt werden, wie aus den gefundenen Peptiden das Epitop bestimmt wurde. Die flankierenden homologen Aminosäuren sind grau markiert.

| | | |
|-----------|------------|--|
| Ara h 3/4 | Peptid 143 | R K R R Q Q Y E R P <u>D E E E E Y</u> |
| | Peptid 144 | R R Q Q Y E R P <u>D E E E E Y</u> D E |
| | Peptid 145 | Q Q Y E R P <u>D E E E E Y</u> D E D E |
| | Peptid 146 | Y E R P <u>D E E E E Y</u> D E D E Y E |
| | Peptid 147 | R P <u>D E E E E Y</u> D E D E Y E Y D |
| | Peptid 148 | <u>D E E E E Y</u> D E D E Y E Y D E E |
| Ara h 4 | Peptid 389 | L S P D G T R G A D <u>E E E E Y D</u> |
| | Peptid 390 | P D G T R G A D <u>E E E E Y D</u> E D |
| | Peptid 391 | G T R G A D <u>E E E E Y D</u> E D Q Y |
| | Peptid 392 | R G A D <u>E E E E Y D</u> E D Q Y E Y |
| | Peptid 393 | A D <u>E E E E Y D</u> E D Q Y E Y H E |
| | Peptid 394 | <u>E E E E Y D</u> E D Q Y E Y H E Q D |
| Ara h 3 | Peptid 292 | L S P D R K R R A D <u>E E E E Y D</u> |
| | Peptid 293 | P D R K R R A D <u>E E E E Y D</u> E D |
| | Peptid 294 | R K R R A D <u>E E E E Y D</u> E D E Y |
| | Peptid 295 | R R A D <u>E E E E Y D</u> E D E Y E Y |
| | Peptid 296 | A D <u>E E E E Y D</u> E D E Y E Y D E |
| | Peptid 297 | <u>E E E E Y D</u> E D E Y E Y D E E D |
| Gly 1 | Peptid 393 | L S P D R K R G A D <u>E E E E Y D</u> |
| | Peptid 394 | P D R K R G A D <u>E E E E Y D</u> E D |
| | Peptid 395 | R K R G A D <u>E E E E Y D</u> E D E Y |
| | Peptid 396 | R G A D <u>E E E E Y D</u> E D E Y E Y |
| | Peptid 397 | A D <u>E E E E Y D</u> E D E Y E Y D E |
| | Peptid 398 | <u>E E E E Y D</u> E D E Y E Y D E E D |

Somit konnte die Sequenz **DEEEEYD** als Hauptepitop der Isoformen Ara h 3/4, Ara h 3, Ara h 4 und Gly 1 bestimmt werden. Diese Sequenz ließ sich nur bedingt auf das iso-Ara h 3 übertragen, das eine deutlich schwächere Reaktivität bei drei aufeinanderfolgenden Peptiden zeigte. Hier ergab sich ein Epitopbereich mit DENRR.

| | | |
|-------------|------------|--|
| iso-Ara h 3 | Peptid 144 | D R S R P Q Q R G K Y <u>D E N R R</u> |
| | Peptid 145 | S R P Q Q R G K Y <u>D E N R R</u> G Y |
| | Peptid 146 | P Q Q R G K Y <u>D E N R R</u> G Y K N |

Bei der Färbung mit Pn-x waren weitere Bereiche mit schwächerer Reaktivität gezeigt worden, die nicht weiter verfolgt wurden.

3.2.3 Bestimmung der IgE-Epitope von Patientenseren

Um eine Charakterisierung der Patientenseren mit allen Isoformen von Ara h 3/4 vornehmen zu können wurden zwei Patientenseren (JG3 und CAT) getestet. In der folgenden Abb. 40 wird die Färbung der Filter mit JG3 gezeigt, deren graphische Auswertung in Abb. 71 im Anhang dargestellt ist.

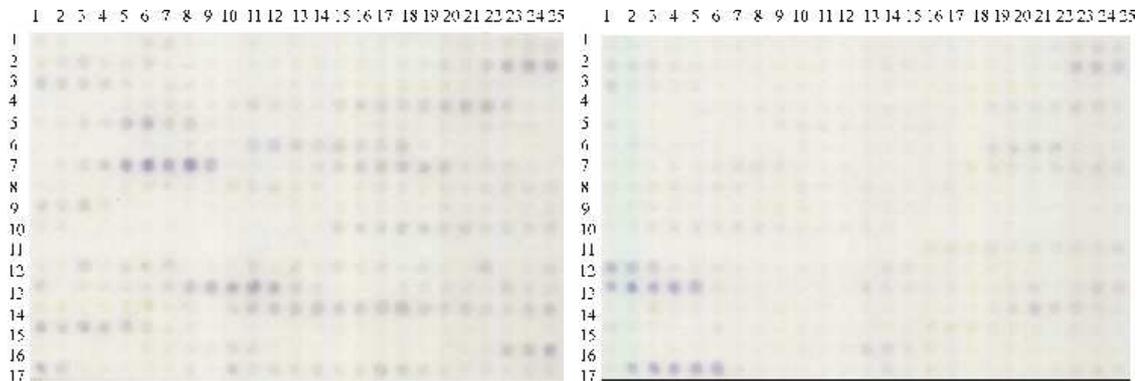


Abb. 40 Epitopmapping mit dem Patientenserum JG3, Färbung der Filter I und III

In der Abb. 40 ist die IgE-Bindung von dem Patientenserum JG3 dargestellt. Es ist deutlich erkennbar, dass die Bindung der Patientenseren eine schwache Färbung als die der monoklonalen Antikörper ergab. Die Auswertung wird in Tab. 18 zusammen mit dem Patientenserum CAT dargestellt.

Das Patientenserum CAT aus dem FAREDAT-Projekt wurde ebenfalls getestet. Dieses zeigte im Unterschied zu JG3 IgE-Reaktivität im Immunoblot auch bei den C-terminalen Untereinheiten von Ara h 3/4 und Isoformen. Daher sollten mit CAT vor allem die IgE-reaktiven Epitope der C-terminalen Untereinheiten bestimmt werden. Außerdem wurde überprüft, ob und welche linearen Epitope von diesem zusätzlichen Patientenserum erkannt werden. Die Filter sind in der Abb. 41 und die graphische Auswertung ist in der Abb. 72 im Anhang dargestellt.

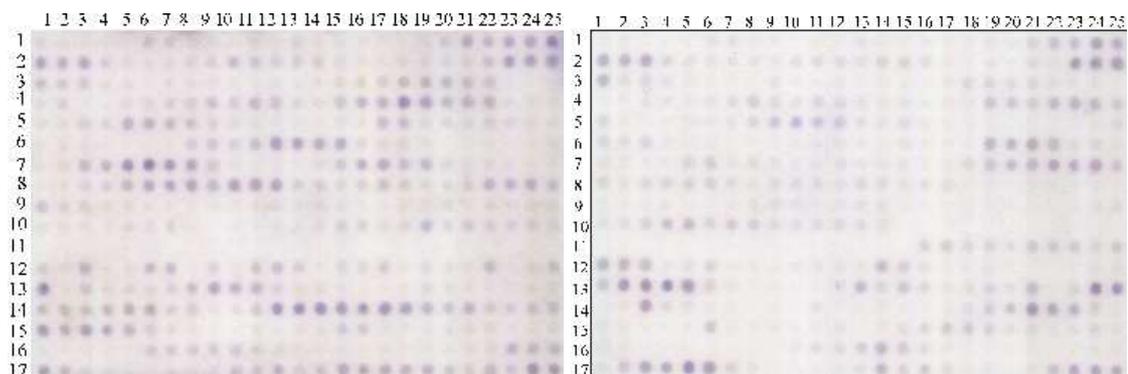


Abb. 41 Epitopmapping mit dem Patientenserum CAT, Färbung des Filter II und IV

In der Abb. 41 fiel auf, dass eine ganz andere Verteilung der Epitope bei diesem Patientenserum im Vergleich zu JG3 zu finden war. Die Auswertung wird in der Tabelle 18 für beide Patientenseren zusammengefasst.

Ergebnisse

Tab. 18: Übersicht der detektierten Peptide der Patientenseren JG3 und CAT mit den Aminosäuresequenzen der Isoformen, der Reaktivität (- keine Reaktivität, + schwache und ++ starke Reaktivität) und der Angabe der wichtigsten Aminosäuren für die Bindung der IgE-Antikörper

| Nr. | Allergen | Peptide JG3 / CAT | Aminosäuren JG3 / CAT | Antikörper-bindender Bereich (schwarz von beiden Patientenseren, grau nur von einem PS detektiert) | Reak- tivitäten der beiden PS JG3 / CAT | |
|-----|-------------|------------------------------|-----------------------------|---|--|----|
| | | | | | - | + |
| 1 | Ara h 3/4 | 21, 23-28 | 42-71 | EFECAGVALSRLVLRNRNALRRPFYSNAPQE | - | + |
| | Gly 1 | 343 | 41-70 | NNQEFECAGVALSRLV | - | - |
| | Iso-Ara h 3 | 22-28 | 43-70 | FQCAGVALSRTVLRNRNALRRPFYSNAPL | - | + |
| 2 | Ara h 3/4 | 45, 47-52 48-50 | 90-119 90-119 | STYE EP A Q <u>Q</u> RR H Q S Q R P <u>RR</u> F Q G Q D Q S Q | + | + |
| | Gly 1 | 346 346-348 | 96-109 96-113 | A Q <u>Q</u> RR H Q S Q R A P R <u>R</u> F E G E D | + | ++ |
| | Ara h 4 | 307-312 308-311 | 94-115 94-115 | E P A Q <u>Q</u> G R R Y Q S Q R P <u>RR</u> L Q E E D Q S | + | + |
| | Ara h 3 | 276-278 276 | 92-112 92-107 | H T <u>Q</u> G R R S Q S Q R P <u>RR</u> L Q G E D | ++ | + |
| | Iso-Ara h 3 | 48-51 48-51 | 95-116 95-116 | P A <u>Q</u> E G R R Y Q S Q K P <u>S</u> R R F Q V G Q D | + | ++ |
| 3 | Ara h 3/4 | 92-98 93-94 | 184-201 186-201 | Q E F L R <u>Y</u> Q Q S R R R S L P S <u>P</u> S P Q P K Q E D R | + | ++ |
| | Ara h 3/4 | 105-106 105-106 | 200-217 200-217 | D R E F S P <u>R</u> G Q H G R R E R A G Q | + | + |
| | Ara h 4 | 336-344, 346 337-343, 346 | 182-218 184-218 | H E <u>Q</u> E F L R <u>Y</u> Q Q S R <u>S</u> R R R S L P S P <u>S</u> P H S R P R E E R | + | ++ |
| | Ara h 4 | 349-354 351, 353-354 | 209-236 213-236 | P H S R <u>P</u> R R E E R E F R P R G Q H S <u>R</u> R E R A G Q | ++ | + |
| | Iso-Ara h 3 | 98 94-95, 97-99 | 195-210 195-210 | E F L R <u>Y</u> Q Q S R <u>S</u> R P H R Q I S P R V R G D E Q E N E | + | + |
| 4 | Ara h 3/4 | 136-140 | 275-298 | R I L S P D R K R R Q Q Y E R P | - | + |
| | Gly 1 | 388-389 | 276-293 | I V T V K G L R I L S P D R K R G | - | + |
| | Ara h 3 | 289 | 279-294 | R G G L R I L S P D R K R A D | - | + |
| | Iso-Ara h 3 | 130 | 255-270 | I V T V K G L R I L S P D E E | - | - |
| 5 | Ara h 3/4 | 154-159 155-158 | 311-336 313-334 | Y D E E R Q <u>D</u> R R R G R G S R G S G N G I E E T | + | + |
| | Gly 1 | 402-406 402-406 | 306-327 306-327 | E Y E Y D E E <u>D</u> R R R G R G S R G R G N G I E E | ++ | ++ |
| | Ara h 4 | 398-402 401 | 306-330 300-315 | Q Y E Y H E <u>Q</u> D R R R G R G S R G G N G I E E | + | + |
| | Ara h 3 | 301-305 302-305 | 303-326 305-326 | E Y E Y D E E <u>D</u> R R R G R G S R G R G N G I E E | ++ | ++ |
| | Iso-Ara h 3 | 144-147 144-147 | 285-306 285-306 | <u>D</u> R S R P <u>Q</u> R G K <u>Y</u> D E N R R G <u>Y</u> K N G I | + | + |
| 6 | Ara h 3/4 | 166-169 | 335-356 | E T I C T A S F K K N I G R N R S P D I Y N | - | + |
| | Gly 1 | 414 | 328-343 | T I C T A S V K K N I G R N R S | - | + |
| | Ara h 4 | 415-419 | 340-363 | <u>I</u> G G N R S P H I Y D P Q R W F T Q N C H D L N | - | + |

Ergebnisse

| | | | | | | |
|---|-------------|---------|---------|--|---|----|
| 6 | Ara h 3 | 313 | 327-346 | TICTASAKKN <u>I</u> GRNRS | - | + |
| | Iso-Ara h 3 | 156 | 311-326 | TICSASVKKNL <u>G</u> RSSN | - | - |
| 7 | Ara h 3/4 | 181-187 | 365-392 | KTANELQ <u>L</u> NLL <u>I</u> LRWLGLSAEYGNLYRNAL | - | + |
| | Gly 1 | 423-425 | 363-382 | KTANDL <u>N</u> LL <u>I</u> LRWLGLSAEY | - | + |
| | Ara h 4 | 424-425 | 359-375 | NCHDL <u>N</u> LL <u>I</u> LRWLGLSAE | - | ++ |
| | Iso-Ara h 3 | 169-174 | 335-360 | <u>L</u> DL <u>P</u> IL <u>G</u> WL <u>G</u> LSAQHG <u>T</u> IYRNA | - | + |

In der Tab. 18 wird gezeigt, dass beide Patientenserum insgesamt drei nahezu identische IgE-reaktive Bereiche erkannten und das Patientenserum CAT weitere vier IgE-reaktive Bereiche detektierte.

Im Vergleich zu den Bindungsstellen der monoklonalen Antikörper sind die IgE-Epitope größer, d. h. sie umfassen eine längere Aminosäuresequenz. Dieses war in dem IgE-reaktiven Bereich 3 besonders deutlich. So zeigten die Peptide 336-343, 346 und 349-354 für das Ara h 4 IgE-Reaktivitäten an, also in einem Bereich von 52 Aminosäuren.

Das Patientenserum JG3 zeigte drei IgE-reaktive Bereiche, die innerhalb der N-terminalen Untereinheiten der Isoformen lagen. Die mit dem Patientenserum CAT zusätzlich detektierten Bereiche lagen je zur Hälfte auf der N- und C-terminalen Untereinheit der Isoformen, so dass es insgesamt eine gleichmäßige Verteilung über die gesamte Sequenz von Ara h 3/4 und Isoformen zeigte.

In den Epitopen 1 (AS: 41-71), 2 (AS: 90-119), 3 (AS: 182-236), 5 (AS: 285-336) und 7 (AS: 335-392) wurden jeweils alle Isoformen erkannt, während sich in den Epitopen 4 (AS: 255-298) und 6 (AS: 311-363) das iso-Ara h 3 nicht detektieren ließ.

Mit einem weiteren Patientenserum TVJ konnten die sieben IgE-reaktiven Bereiche des Patientenserums CAT verteilt über die gesamte Sequenz von Ara h 3/4 und Isoformen bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Damit konnte für die C-terminalen Untereinheiten eindeutig gezeigt werden, dass diese IgE-reaktive Epitope enthalten.

3.3 Charakterisierung der Erdnussallergene nach *in vitro* Simulation des menschlichen Gastrointestinaltraktes

Für die Charakterisierung der Erdnussallergene sollte eine *in vitro* Simulation des menschlichen Gastrointestinaltraktes durchgeführt werden, um die Frage zu klären, in welcher Form die Erdnussallergene vom Darmepithel aufgenommen werden. Außerdem sollte überprüft werden, ob bei der Passage durch den Körper ein vergleichbarer Zerfall der Allergene in ihre N- und C-terminalen Untereinheiten beobachtet werden kann. Zusätzlich galt es die Frage zu klären, ob die für die laborchemische Extraktion beschriebenen Proportionen von 90 % hochmolekularen Komplexen zu 10 % niedermolekularen Erdnussproteinen auch bei der *in vitro* Simulation gefunden werden können und ob diese eine Rolle bei der Allergenaufnahme spielen könnten.

Vor Beginn der eigentlichen Passage durch den Gastrointestinaltrakt wurde den Versuchspersonen Speichel abgenommen, um mögliche Variabilitäten zwischen verschiedenen Versuchspersonen aufzudecken. Damit konnte eine gleichartige Ausgangsbasis für den folgenden Versuch geschaffen werden. Dazu wurde eine BN-PAGE durchgeführt, die die native Zusammensetzung der Speichelproben darstellte und damit einen Überblick über die Speichelproteine vor dem folgenden Experiment gab. Dieses wird in der folgenden Abb. 42 gezeigt.

Ergebnisse

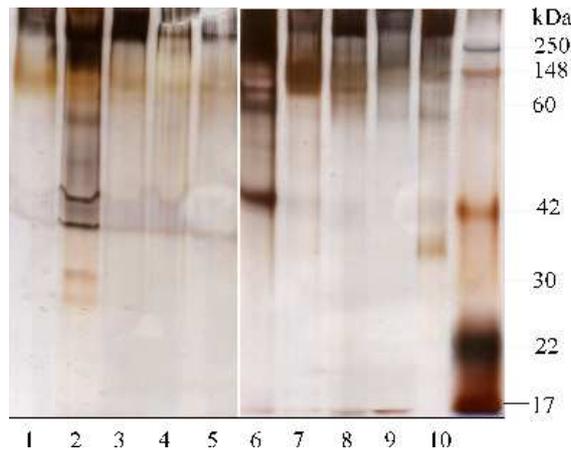


Abb. 42 Vergleich von Speichelproteinen im BN-PAGE-Gel zur Darstellung der Variabilität bei verschiedenen Probanden vor dem geplanten Experiment

10 % BN-PAGE, 10 µg Speichel, Silber-Färbung

1, 7: AB vor Kauvorgang; 2: AB nach Kauvorgang; 3, 8: AP; 4: WMB; 5: SF; 6: KL; 9: AK; 10: SM

Bei der ersten Versuchsdurchführung (Abb. 42, Bahn 1 und 2) wurde zusätzlich auch eine halbe Stunde nach dem Kauvorgang eine Speichelprobe untersucht, um einen Vergleich zu erhalten, ob durch die Erdnussextraktion eine Veränderung des normalen Milieus im Mundraum erreicht wird. Da lediglich eine Intensitätsverstärkung der bereits vorhandenen Proteinbanden, aber keine qualitative Veränderung im BN-PAGE-Gel in der Proteinzusammensetzung erkennbar war, wurde diese Kontrolle bei den weiteren Versuchen nicht mehr durchgeführt werden. Außerdem fiel oft eine geringfügige Variabilität der Bandenintensitäten auf, da in den Bahnen 1, 2 und 7 sowie 3 und 8 jeweils Speichelproben einer Versuchsperson aufgetrennt wurden, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor der Versuchsdurchführung abgenommen worden waren.

3.3.1 Untersuchung der Passage von gerösteten Erdnüssen

Zunächst wurde die Passage der Erdnussallergene durch den menschlichen Gastrointestinaltrakt mit natur gerösteten Erdnüssen parallel zu der im Labor üblichen Extraktionsmethode mit verschiedenen Probanden simuliert und verglichen. Dabei sollte die Frage geklärt werden, ob eine gleichmäßige Allergenextraktion allein durch den Kauprozess erfolgen kann oder ob es individuelle Unterschiede zwischen verschiedenen Versuchspersonen gibt, die für die Entstehung von Allergien relevant sein könnten. Dazu wurden eine BN-PAGE und eine reduzierende SDS-PAGE mit den direkt nach dem Kauen abgenommenen Erdnussprotein enthaltenden Speichel-Proben der einzelnen Probanden durchgeführt, um die einzelnen Erdnussallergene in ihrem noch weitgehend nativen Aufbau und nach Zerfall in ihre Untereinheiten vergleichend darstellen zu können.

Ergebnisse

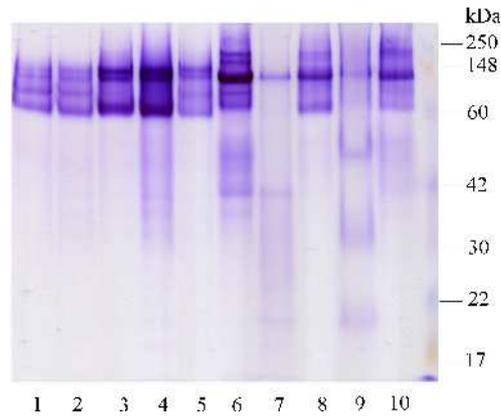


Abb. 43 Vergleich von Erdnussextrakten der verschiedenen gekauten Proben im BN-PAGE-Gel

10 % BN-PAGE mit Extrakten (EEx-gek), Probenkonz. je 15 µg/cm, Coomassie-Färbung, *Bahnen 1-5*: natur geröstete Erdnüsse von folgenden Versuchspersonen gekaut (AB, AP, WMB, SF, KL), 6: Erdnuss gekocht (AB), 7: Erdnuss frittiert (AB), 8: Erdnussbutter (AP), 9: Erdnuss Snickers-Riegel (AK), 10: Erdnuss Peanut-Cracker (SM)

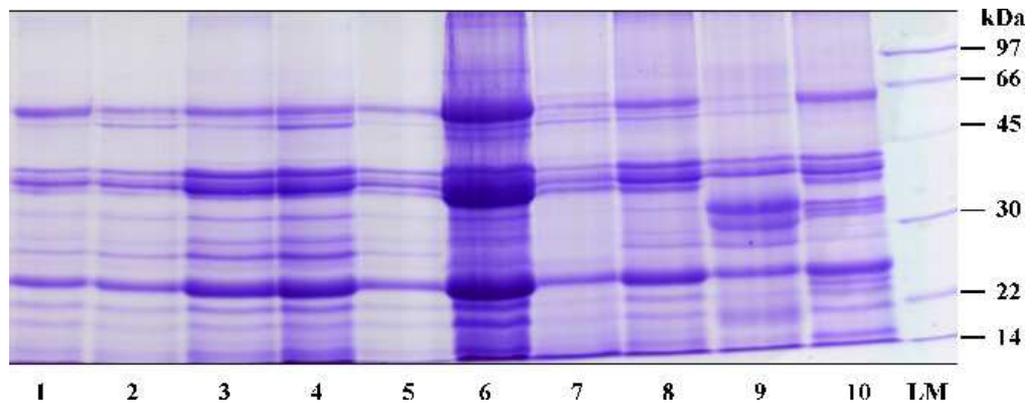


Abb. 44 Vergleich von Erdnussextrakten der verschiedenen gekauten Proben im SDS-Gel

12 % SDS-PAGE mit Extrakten (EEx-gek), Probenkonz. je 15 µg/cm, Coomassie-Färbung, *Bahnen 1-5*: natur geröstete Erdnüsse von folgenden Versuchspersonen gekaut (AB, AP, WMB, SF, KL), 6: Erdnuss gekocht (AB), 7: Erdnuss frittiert (AB), 8: Erdnussbutter (AP), 9: Erdnuss Snickers-Riegel (AK), 10: Erdnuss Peanut-Cracker (SM)

Die Abb. 43 und 44 zeigen zum Vergleich alle gekauten Erdnussprodukte nebeneinander in der BN-PAGE bzw. in der reduzierenden SDS-PAGE. Schon bei der ersten mechanischen Zerkleinerung der Erdnüsse durch das Kauen wurde deutlich, dass es neben einer weitgehend gleichen Extraktion individuelle Unterschiede in der Konzentration der einzelnen Erdnussproteine gab (Abb. 43). In den Bahnen 1 bis 5 wurden jeweils natur geröstete Erdnüsse gekaut, wobei alle beschriebenen Banden (s. auch 3.1.1) der Majorallergene Ara h 1 (SDS-PAGE bei 65 kDa), Ara h 2 (Doppelbande <20 kDa), Ara h 3/4 und Isoformen (12, 25, 30-45 kDa) und Ara h 6 (14 kDa) in unterschiedlicher Konzentration vorhanden waren. Dieses Ergebnis wurde mit den spezifischen Antikörpern (Pn-t (Ara h 1), MAP 3 (Ara h 2), PEI-7B2 (Ara h 3/4 und Isoformen) sowie α -Ara h 6) immunologisch detektiert und konnte auch bei den anderen Kauproben mit verarbeiteten Erdnüssen und Erdnussprodukten gefunden werden.

Ergebnisse

Um einen Vergleich bezüglich der IgE-Reaktivität zu erhalten, wurde ein Immunoblot der SDS-PAGE aus Abb. 44 mit einem Poolserum aus JG3, CAT und OB durchgeführt und über die Chemilumineszenz nachgewiesen, um neben den Erdnussallergenen Ara h 1, Ara h 2 und Ara h 6 auch die Untereinheiten der Allergene Ara h 3/4 und Isoformen bestimmen zu können.

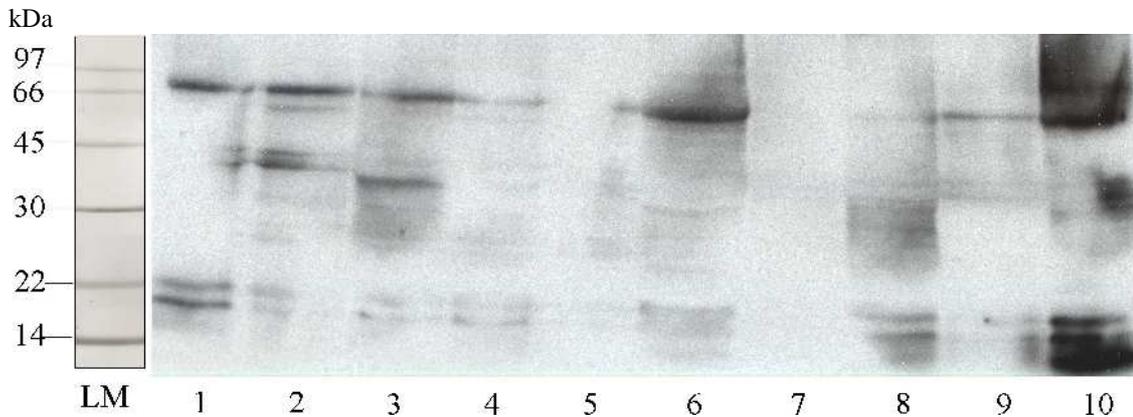


Abb. 45 Vergleich von Erdnussextrakten der verschiedenen gekauten Proben aus Abb. 44 im Immunoblot mittels eines Patientenpoolserums (JG3/ CAT/ OB) und Chemilumineszenzdetektion

12 % SDS-PAGE mit Extrakten (EEx-gek), Probenkonz. je 15 µg/cm

Bahnen 1-5: natur geröstete Erdnüsse von folgenden Versuchspersonen gekaut

(AB, AP, WMB, SF, KL), 6: Erdnuss gekocht (AB), 7: Erdnuss frittiert (AB),

8: Erdnussbutter (AP), 9: Erdnuss Snickers-Riegel (AK), 10: Erdnuss Peanut-Cracker (SM)

In der Abb. 45 wird gezeigt, dass alle Allergene und Allergenuntereinheiten, die in der Abb. 44 erkennbar waren, auch IgE-reaktiv sind. Darüber hinaus wurden zusätzliche Banden oberhalb von 97 kDa identifiziert, die nach der Reaktivität mit den mAKs PEI-7B2 und Pn-t vermutlich durch eine Dimerisierung der Glycine (Ara h 3/4 und Isoformen) oder des Vicilins (Ara h 1) entstanden sind. Bei dem verarbeiteten Produkt, den Peanut-Crackern, ist eine erhebliche Zunahme an IgE-Reaktivität zu verzeichnen, was durch die Überstrahlung in dieser Bahn 10 deutlich wird. Die Extraktion von Erdnussproteinen durch die mechanische Zerkleinerung beim Kauen und die enzymatische Bearbeitung der Proteine durch den Speichel führte zu einem gleichen Bandenmuster wie bei den laborchemisch hergestellten Erdnussextrakten. Ein direkter Einfluss von Speichel konnte somit nicht gefunden werden.

Als Folge dieser ersten Gegenüberstellung von verschiedenen Erdnussextrakten nach dem Kauvorgang sollte nun mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese überprüft werden, ob sich auch die weitere Auftrennung der Allergene und der Zerfall der Ara h 3/4-Isoformen analog den laborchemischen Extraktionsverfahren verhält.

Dazu wurden die Proteine des Extraktes (EEx-gek) zunächst über die isoelektrische Fokussierung nach ihren isoelektrischen Punkten separiert und in der anschließenden LDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Ergebnisse

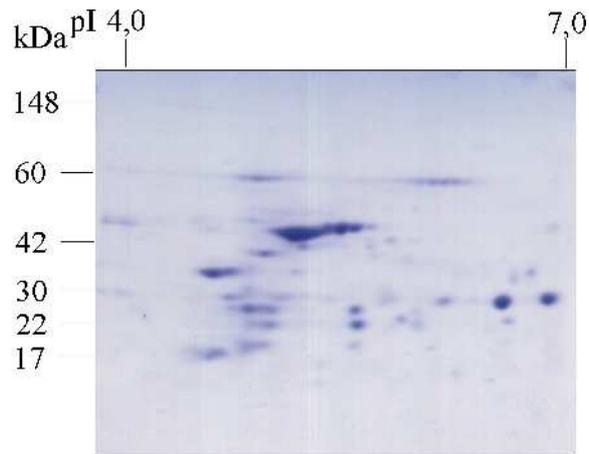


Abb. 46 2D-PAGE des Erdnussextraktes einer gekauten Probe (AB) zur Darstellung der Erdnussallergene aus natur gerösteten Nüssen
IEF im pH-Gradienten von pH 4-7,
LDS-PAGE auf 4-20 % Tris-Glycin-Gel, Coomassie-Färbung

Direkt nach dem Kauen ließen sich in der 2D-PAGE (Abb. 46) die gleichen Allergene und Allergenuntereinheiten finden, wie in dem laborchemisch hergestellten Erdnussextrakt (s. 3.1.2.4, Abb. 19). Auch hier konnten die strichförmigen Banden bei 60 kDa als Ara h 1, die sauren Proteine zwischen 30 und 42 kDa als N-terminale Untereinheiten von Ara h 3/4 und Isoformen und die dazugehörigen basischen Proteine bei 28 kDa als die C-terminalen Untereinheiten ebenso gefunden werden wie die Ansammlung von Spots unterhalb von 20 kDa aus Ara h 2 und Ara h 6. Auch die Proportionen aus 90 % hochmolekularen Komplexen zu 10 % niedermolekularen Proteinen scheinen weitestgehend gleichgeblieben zu sein bei gegebenem pH-Wert.

Im weiteren Versuchsverlauf der simulierten Passage durch den menschlichen Gastrointestinaltrakt wurde die biochemische Zerkleinerung der Erdnussproteine durch die Inkubation mit einem Magensaftäquivalent (Enzynorm) bei einem pH-Wert von 2 untersucht. Nach dem Neutralisieren folgte die Inkubation mit einem Pankreassaftäquivalent (Kreon) bei einem pH-Wert von 7. Proben wurden nach 1, 2, 3 und 24 Stunden genommen. Dabei sollten dann die Fragen geklärt werden, wie lange sich die in der BN-PAGE gefundenen hochmolekularen Proteinkomplexe während des Verdauungsprozesses nachweisen lassen und wann bzw. wodurch diese zersetzt werden. Außerdem sollte überprüft werden, ob die bereits beim Kauen aufgetretenen individuellen Unterschiede in der Allergenextraktion über den gesamten Versuch hinweg zu verfolgen sind oder sich durch die Inkubation mit Magensaft bzw. Pankreassaft aufheben.

Dazu wurde zunächst mit der BN-PAGE verfolgt, ob die hochmolekularen Proteinkomplexe während der simulierten Passage durch den Gastrointestinaltrakt erhalten bleiben oder ob und wann diese zersetzt werden. Der Versuchsaufbau wurde jeweils mit den vier Proben durchgeführt:

1. Überstand Erdnussextrakt gekaut aufgenommen in Aqua bidest. (H₂O)
2. Überstand Erdnussextrakt gekaut aufgenommen in Probenpuffer (PP)
3. Matrix Erdnussextrakt gekaut aufgenommen in Aqua bidest. (H₂O)
4. Matrix Erdnussextrakt gekaut aufgenommen in Probenpuffer (PP)

Ergebnisse

Die Aliquots wurden nach 1 Stunde (1-4), 2 Stunden (1a-4a), 3 Stunden (1b-4b) und 24 Stunden (1c-4c) entnommen. Die Abb. 47 und 48 zeigen die BN-PAGE nach der Inkubation mit Enzynorm und Kreon für die Versuchsperson AB.

(Die Probe 1 fehlte in diesem Fall, da die Proteinkonzentration unterhalb der Nachweisgrenze mit der Coomassie-Färbung lag.)

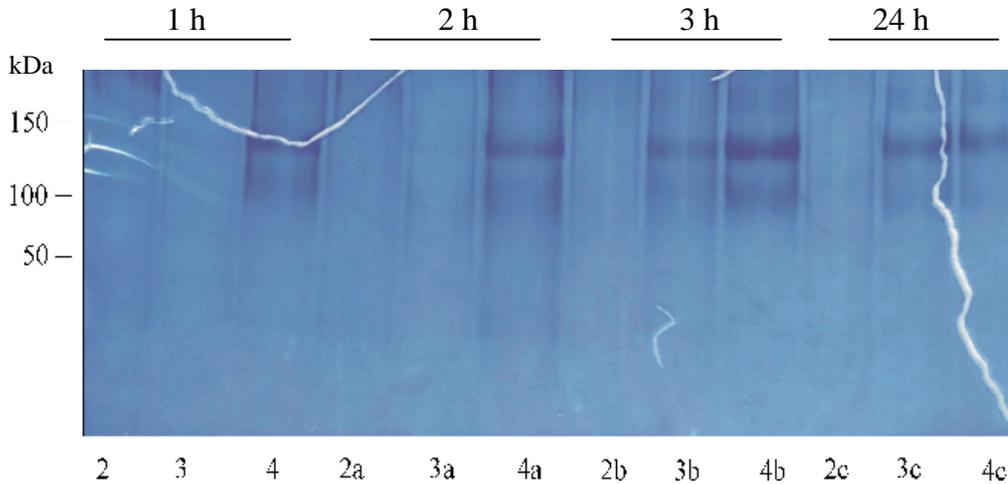


Abb. 47 Vergleichende BN-PAGE des Verdaus mit Enzynorm (AB) zur Darstellung der Erdnussallergene von natur gerösteten Erdnüssen
BN-PAGE auf 8 % ProSieve-Gel, Coomassie-Färbung
Probennahme nach 1 h (2-4), nach 2 h (2a-4a), nach 3 h (2b-4b) und nach 24 h (2c-4c) 1. Überstand EEx-gek in H₂O, 2. Überstand EEx-gek in PP, 3. Matrix EEx-gek in H₂O, 4. Matrix EEx-gek in PP

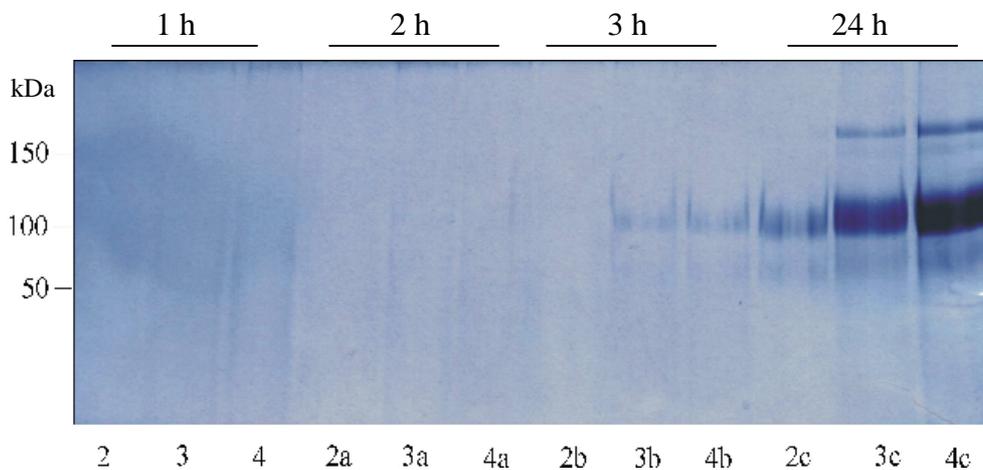


Abb. 48 Vergleichende BN-PAGE des Verdaus mit Kreon (AB) zur Darstellung der Erdnussallergene von natur gerösteten Erdnüssen
BN-PAGE auf 8 % ProSieve-Gel, Coomassie-Färbung
Probennahme nach 1 h (2-4), nach 2 h (2a-4a), nach 3 h (2b-4b) und nach 24 h (2c-4c) 1. Überstand EEx-gek in H₂O, 2. Überstand EEx-gek in PP, 3. Matrix EEx-gek in H₂O, 4. Matrix EEx-gek in PP

Besonders deutlich ist in den Abb. 47 und 48 zu erkennen, dass auch nach 24stündiger Inkubation mit dem Magensaftäquivalent immer noch hochmolekulare Proteine im messbaren Bereich vorlagen und sogar immer noch eine Freisetzung von Allergenen aus der Matrix des Kaugutes (Bahnen 3 und 4) stattfand. Dieses konnte ebenso für den Verdau mit Pankreassaftäquivalent gezeigt werden. Interessanterweise ließ sich mit der BN-PAGE und immunologischen Nachweisen eindrucksvoll bestätigen, dass die

Ergebnisse

Allergene Ara h 1 und Ara h 3/4 in hochmolekularen Komplexen von über 200 kDa vorliegen und während der Passage durch den menschlichen Gastrointestinaltrakt erhalten blieben. Trotz der fortwährenden Verdauung und des Aufschlusses der Erdnüsse in kleinere Bruchstücke der Allergene, waren auch nach 24 Stunden sowohl mit Enzynorm als auch mit Kreon noch hochmolekulare Proteinkomplexe nachweisbar. Neben der BN-PAGE wurde der gesamte Verdauungsprozess auch mit der zweidimensionalen Elektrophorese verfolgt, um den Zerfall der Erdnussallergene Ara h 3/4 und Isoformen zu untersuchen. Dazu wurden die Probe 3 nach 3stündiger Inkubation mit Magensaft bzw. nach 24stündiger Inkubation mit Pankreassaft gewählt, da hier wieder eine hohe Proteinkonzentration nachweisbar war. Diese Proben wurden dann zweidimensional mittels IEF und anschließender LDS-PAGE aufgetrennt.

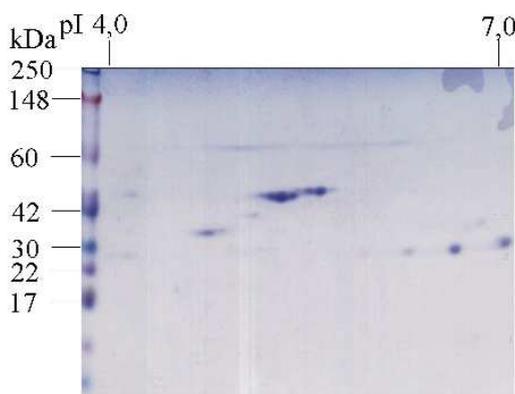


Abb. 49 2D-PAGE des Erdnussextraktes einer gekauten Probe (AB) nach 3 h Inkubation mit Enzynorm
IEF im pH-Gradienten von 4-7,
LDS-PAGE auf 4-20 % Tris-Glycin-Gel
Coomassie-Färbung

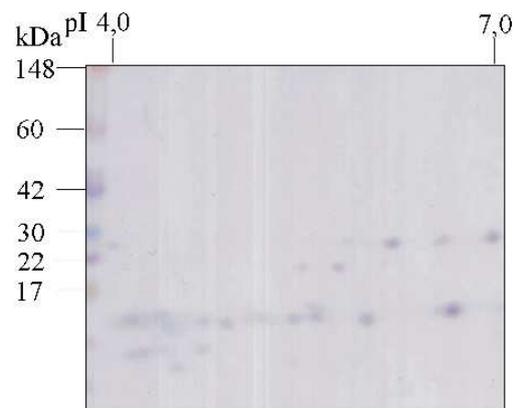


Abb. 50 2D-PAGE des Erdnussextraktes einer gekauten Probe (AB) nach 24 h Inkubation mit Kreon
IEF im pH-Gradienten von 4-7,
LDS-PAGE auf 4-20 % Tris-Glycin-Gel
Coomassie-Färbung

In den Abb. 49 und 50 der 2D-PAGE konnte gezeigt werden, dass auch nach der 3stündigen Inkubation mit Magensaft noch eindeutig eine Bande bei 60 kDa als Ara h 1, die sauren Proteine bei 42-45 kDa als N-terminale Untereinheiten von Ara h 3/4 und Isoformen und die dazugehörigen basischen Proteine bei 28 kDa als C-terminale Untereinheiten nachzuweisen waren. Unterhalb von 20 kDa waren keine Spots nachweisbar, so dass Ara h 2 und Ara h 6 (auch nach Einsatz von pAKs) nicht gefunden wurden. Nach der 24stündigen Inkubation mit Pankreassaft ließen sich nur noch die C-terminalen Untereinheiten von Ara h 3/4 und Isoformen eindeutig nachweisen. Unterhalb von 20 kDa waren nun neue Spots erkennbar. Es konnten weder die N-terminalen Bereiche von Ara h 3/4 und Isoformen noch Ara h 1 im Gel bzw. immunologisch nachgewiesen werden.

Um eine Kontrolle zu erhalten, ob es durch die Inkubation bei 37 °C oder den pH-Wert von 2,0 bereits zu Veränderungen in der Proteinzusammensetzung kommen kann, wurde laborchemisch hergestellter Erdnussextrakt mit Aqua bidest. bzw. Salzsäure (pH 2,0) versetzt und unter leichtem Schütteln bis zu 24 h parallel inkubiert. Dabei konnte weder eine Degradation der hochmolekularen Proteinkomplexe noch eine Freisetzung von Allergenen gefunden werden.

Zusätzlich wurde überprüft, ob durch Zugabe von Gallensäuren ein Einfluss auf die Proteinkomplexe oder die Freisetzung von Allergenen erkennbar wird. Auch in diesem Fall konnte kein Unterschied in der Proteinzusammensetzung oder ein anderer Ablauf des Verdauens gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

Ergebnisse

Zusätzlich zu den Gelelektrophoresen wurden die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben bestimmt, um mögliche Änderungen durch den Verdau zu erfassen. Die Probennahme der löslichen Proteinen erfolgte immer direkt aus den Überständen, die durch die Inkubation mit Aqua bidest. oder Enzynorm bzw. Kreon gebildet wurden. Nach dem Ende des jeweiligen Versuchs wurde die Proteinkonzentration für alle Proben gleichzeitig bestimmt.

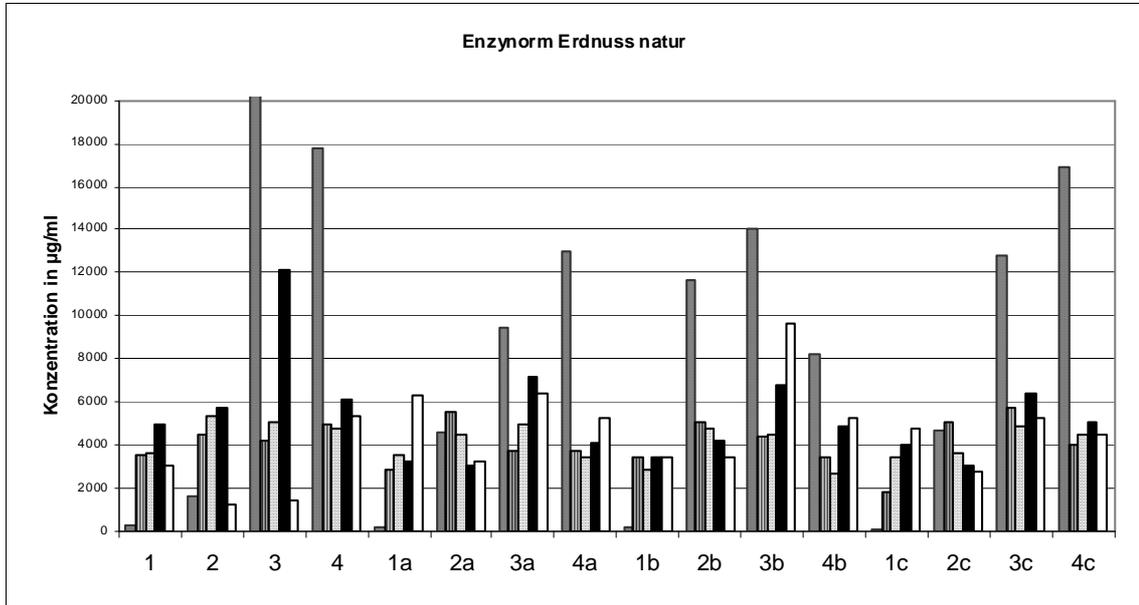


Abb. 51 Diagramm zum Vergleich der Proteinkonzentrationen von natur gerösteten Erdnüssen nach Verdau mit Magensaft (Enzynorm forte). Vergleich der EEx-Proben von fünf Versuchspersonen (Säulen unterschiedlich gemustert), Probennahme nach 1 h (Proben 1-4), 2 h (1a-4a), 3 h (1b-4b) und 24 h (1c-4c) 1. Überstand EEx-gek in H₂O, 2. Überstand EEx-gek in PP, 3. Matrix EEx-gek in H₂O, 4. Matrix EEx-gek in PP

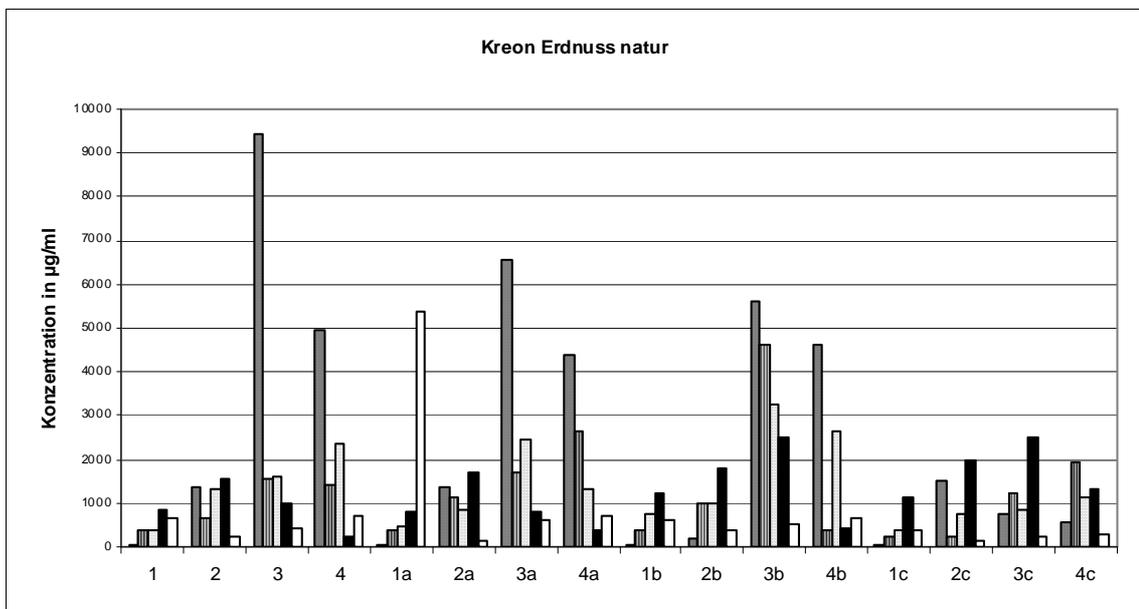


Abb. 52 Diagramm zum Vergleich der Proteinkonzentrationen von natur gerösteten Erdnüssen nach Verdau mit Pankreassaft (Kreon 25000). Vergleich der EEx-Proben von fünf Versuchspersonen (Säulen unterschiedlich gemustert), Probennahme nach 1 h (Proben 1-4), 2 h (1a-4a), 3 h (1b-4b) und 24 h (1c-4c) 1. Überstand EEx-gek in H₂O, 2. Überstand EEx-gek in PP, 3. Matrix EEx-gek in H₂O, 4. Matrix EEx-gek in PP

Ergebnisse

Die Proteinkonzentrationen der Extrakte aus natur gerösteten Erdnüssen, die von fünf Versuchspersonen gekaut worden waren, sind in den Diagrammen (Abb. 51 und 52) für den Verdau mit Enzynorm bzw. Kreon gezeigt. Insgesamt wurde eine gleichmäßige Proteinextraktion gefunden, aber auch individuelle Unterschiede in der Konzentration einzelner Proteine sichtbar. Es ließ sich eine vergleichbare Ausbeute an Proteinen wie bei der laborchemischen Extraktionsmethode gewinnen. So betragen die Verhältnisse von Ara h 1 und Ara h 3/4 mit Isoformen zu den anderen Allergenen Ara h 2, Ara h 5, Ara h 6, Ara h 7 und Ara h 8 wieder ca. 90 % zu 10 %. Somit konnte gezeigt werden, dass die Extraktion mittels Gelfiltration und die Extraktion von Erdnussproteinen durch die mechanische Zerkleinerung beim Kauen vergleichbar sind. Damit war auch eine wichtige Frage beantwortet, denn die Proportionen der Erdnussallergene zueinander sind unabhängig von der Extraktionsart immer ca. 90 % zu 10 %, bei gegebenem neutralem pH-Wert.

Durch die Ergebnisse der gastrointestinalen und laborchemischen Extraktionen waren alle bisherigen Immunoblotanalysen und N-terminalen Sequenzierungen der einzelnen Allergene und ihrer Untereinheiten vergleichbar. Auch die Lektinbindungen blieben bei den durch biologische Abbauprozesse gewonnenen Allergenen mit denen der biochemischen Extraktionen vergleichbar, so dass auch hier von Glykosilierungen bei Ara h 1, iso-Ara h 3 und Gly 1 ausgegangen werden konnte. Für die anderen Isoformen von Ara h 3/4 konnten erneut keine Hinweise auf mögliche Glykostrukturen gefunden werden.

3.3.2 Untersuchung der Passage von keimfähigen gekochten und frittierten Erdnüssen

Während dieser Arbeit war die Frage aufgeworfen worden, inwieweit der Röstprozess der Erdnüsse einen Einfluss auf die Allergenität und möglicherweise auch auf die Konzentration der einzelnen Allergene zueinander ausüben könnte (Chung *et al.*, 2003). Keimfähige Erdnüsse, die nach der Ernte direkt als Samen für weiteren Feldbau verwendet werden könnten, wurden auf ihre einzelnen Proteine hin untersucht. Um die Passage durch den menschlichen Gastrointestinaltrakt darstellen zu können, mussten diese keimfähigen Erdnüsse für den menschlichen Verzehr wenigstens bedingt geeignet sein. Sie wurden in Wasser gekocht oder aber in Erdnussöl frittiert, um sie, wie es im asiatischen Raum üblich ist, zu bearbeiten. Damit sollten Bedingungen geschaffen werden, um kulturelle Unterschiede in der Nahrungsaufnahme nachstellen und untersuchen zu können.

Anschließend wurden diese so behandelten Erdnüsse jeweils geteilt und die eine Hälfte wurde für die Kauversuche und die andere Hälfte für die beschriebene laborchemische Extraktion herangezogen. Um die simulierte Passage dieser Erdnüsse durch den Gastrointestinaltrakt direkt verfolgen zu können, wurde wieder die BN-PAGE eingesetzt. In den folgenden vier Abb. 53-57 sind jeweils die Inkubation mit Enzynorm und Kreon für die gekochten bzw. frittierten Erdnüsse gegenübergestellt, wobei nur die Probennahme nach 3 bzw. 24 h gezeigt wird.

Ergebnisse

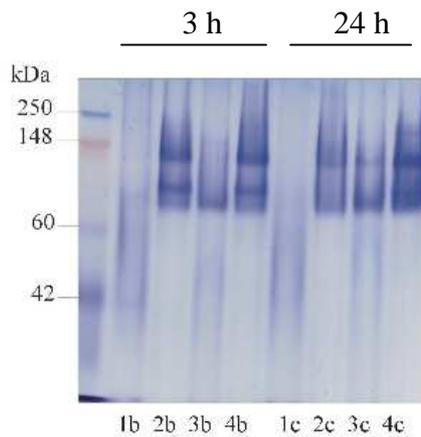


Abb. 53 BN-PAGE des Verdaus mit Enzynorm (AB) nach Kochen
BN-PAGE auf 10 % Tris-Glycin-Gel, Coomassie-Färbung, Probenahme 3 h (1b-4b) und 24 h (1c-4c)
1. Überstand EEx-gek in H₂O, 2. Überstand EEx-gek in PP, 3. Matrix EEx-gek in H₂O, 4. Matrix EEx-gek in PP

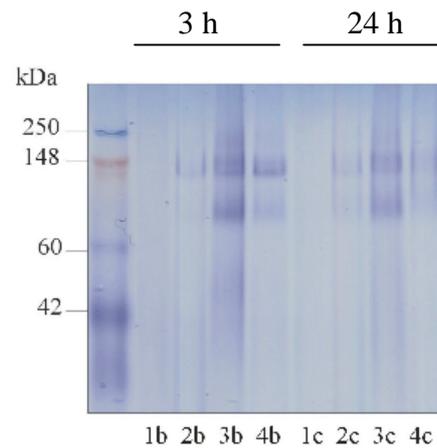


Abb. 54 BN-PAGE des Verdaus mit Enzynorm (AB) nach Fritieren
BN-PAGE auf 10 % Tris-Glycin-Gel, Coomassie-Färbung, Probenahme 3 h (1b-4b) und 24 h (1c-4c)
1. Überstand EEx-gek in H₂O, 2. Überstand EEx-gek in PP, 3. Matrix EEx-gek in H₂O, 4. Matrix EEx-gek in PP

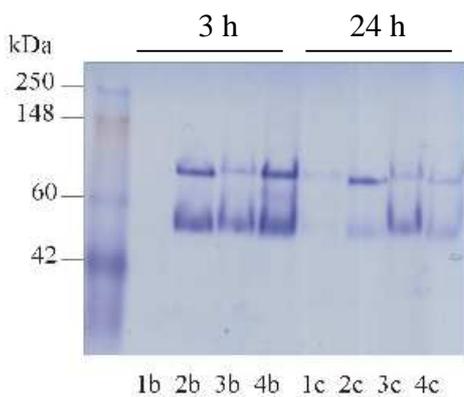


Abb. 55 BN-PAGE des Verdaus mit Kreon (AB) nach Kochen
BN-PAGE auf 10 % Tris-Glycin-Gel, Coomassie-Färbung, Probenahme 3 h (1b-4b) und 24 h (1c-4c),
1. Überstand EEx-gek in H₂O,
2. Überstand EEx-gek in PP,
3. Matrix EEx-gek in H₂O,
4. Matrix EEx-gek in PP

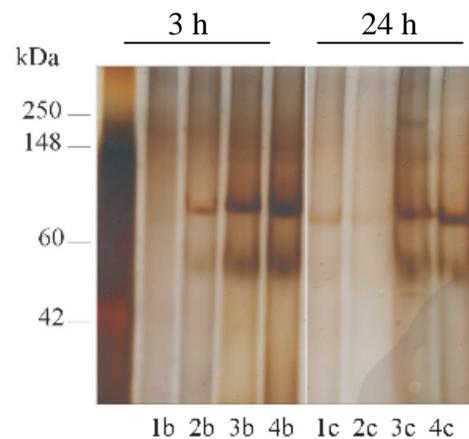


Abb. 56 BN-PAGE des Verdaus mit Kreon (AB) nach Fritieren
BN-PAGE auf 10 % Tris-Glycin-Gel, Silber-Färbung, Probenahme 3 h (1b-4b) und 24 h (1c-4c),
1. Überstand EEx-gek in H₂O,
2. Überstand EEx-gek in PP,
3. Matrix EEx-gek in H₂O,
4. Matrix EEx-gek in PP

In den Abb. 53 bis 56 wird deutlich, dass die Allergenzusammensetzung zwischen gekochten und fritierten Erdnüssen keine Unterschiede aufweist. Die Gesamtproteinmenge der fritierten Erdnüsse schien insgesamt im Vergleich zu gerösteten Erdnüssen (Abb. 47 und 48) reduziert, bei den gekochten Erdnüssen war dies jedoch unerheblich. Das Verhältnis von Ara h 1 und Ara h 3/4 mit Isoformen zu den anderen Allergenen blieb ebenfalls konstant. Somit konnte kein Einfluss des Röstprozesses auf die Allergenzusammensetzung nachgewiesen werden. Eindeutig war hingegen, dass auch in dieser Zubereitungsform die Allergene Ara h 1 und Ara h 3/4 mit Isoformen in

Ergebnisse

hochmolekularen Komplexen vorlagen, die bei ihrer Passage durch den menschlichen Gastrointestinaltrakt trotz enzymatischer Behandlung erhalten blieben.

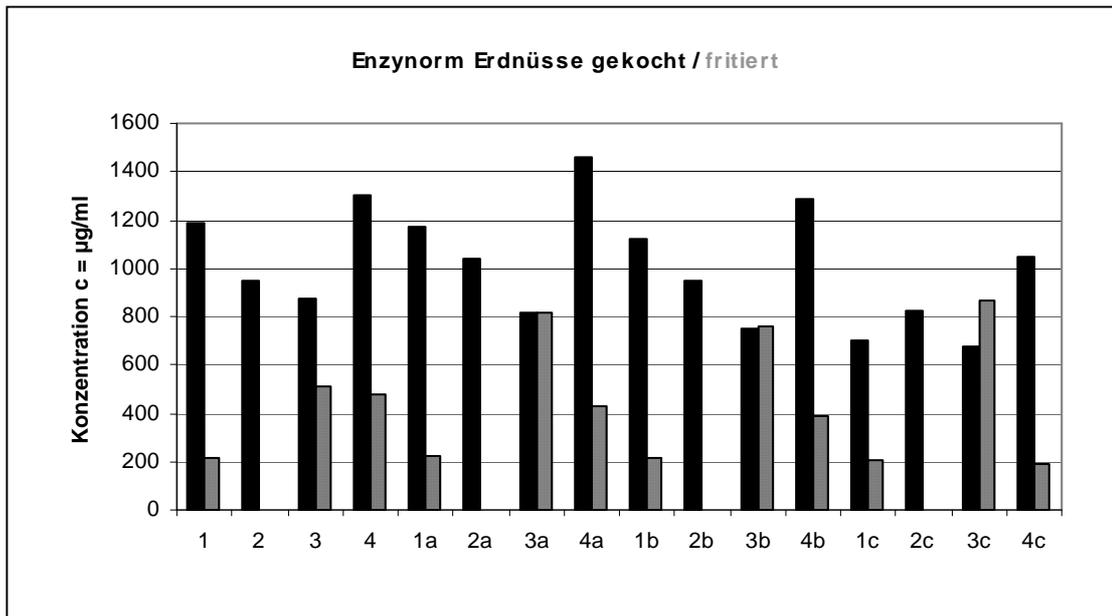


Abb. 57 Diagramm mit Vergleich der Proteinkonzentrationen von gekochten (Säulen in schwarz) und frittierten (grau) Erdnüssen nach Verdau mit Magensaft (Enzynorm forte). Probennahme nach 1 h (Proben 1-4), 2 h (1a-4a), 3 h (1b-4b) und 24 h (1c-4c) 1. Überstand EEx-gek in H₂O, 2. Überstand EEx-gek in PP, 3. Matrix EEx-gek in H₂O, 4. Matrix EEx-gek in PP
*Proteinkonzentration der Proben 2, 2a, 2b und 2c war nicht messbar

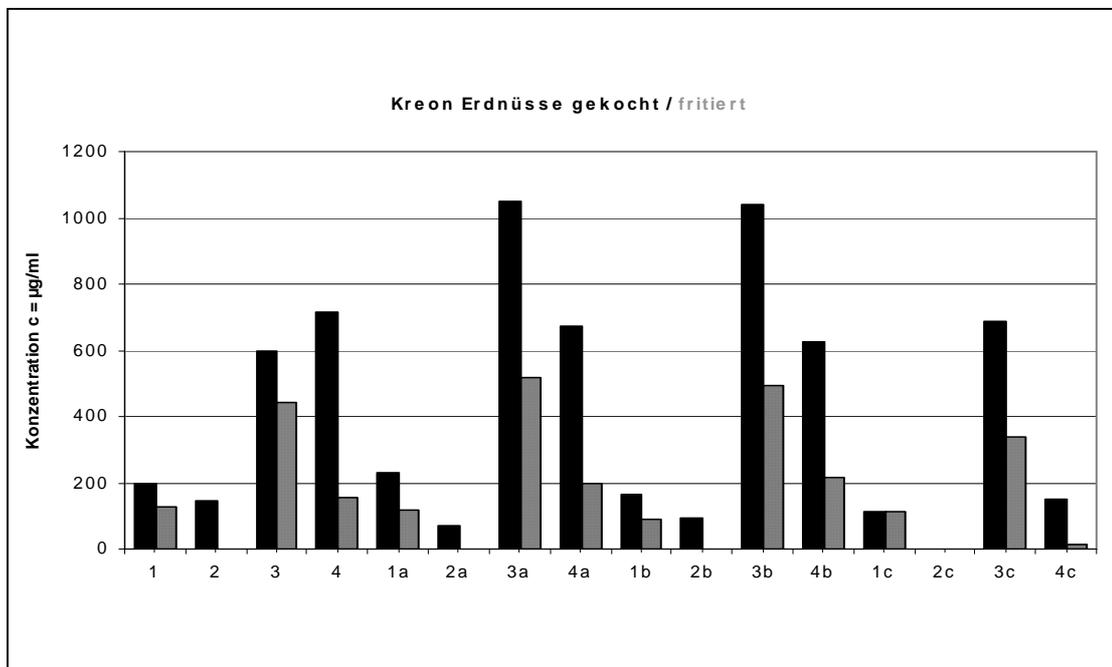


Abb. 58 Diagramm mit Vergleich der Proteinkonzentrationen von gekochten (Säulen in schwarz) und frittierten (grau) Erdnüssen nach Verdau mit Pankreassaft (Kreon 25000). Probennahme nach 1 h (Proben 1-4), 2 h (1a-4a), 3 h (1b-4b) und 24 h (1c-4c) 1. Überstand EEx-gek in H₂O, 2. Überstand EEx-gek in PP, 3. Matrix EEx-gek in H₂O, 4. Matrix EEx-gek in PP
*Proteinkonzentration der Proben 2, 2a, 2b, 2c und 4c war nicht messbar

Ergebnisse

In den Diagrammen (Abb. 57 und 58) sind die Proteinkonzentrationen der einzelnen Probenahmen dargestellt. Insgesamt war die Proteinkonzentration reduziert und lag bei den Überständen der frittierten Erdnüsse teilweise unterhalb der Nachweisgrenze. Allerdings waren auch hier noch Matrixeffekte nachweisbar und eine Freisetzung von Allergenen nach 24stündiger Inkubation mit Enzynorm und Kreon konnte vor allem für die gekochten Erdnüsse gezeigt werden.

3.3.3 Untersuchung der Passage von verschiedenen Erdnussprodukten

Erdnüsse werden nicht nur in Form gerösteter Ware oder in gekochter bzw. fritierter Variante verzehrt, sondern auch in fertig verarbeiteten Produkten. Da auch durch verarbeitete Lebensmittel Allergien gegen Erdnüsse entwickelt werden können, sollten nun im Rahmen dieser Arbeit auch verschiedene Erdnussprodukte untersucht werden. Die Frage nach einer Veränderung in der Allergenzusammensetzung durch unterschiedliche Herstellungsverfahren wurde in diesem Zusammenhang mit der Passage durch den Gastrointestinaltrakt wieder aufgenommen und geklärt.

Weiterhin wurde untersucht, ob sich durch die oft geringe Endkonzentration von Erdnüssen in den fertigen Produkten eine schnellere Verdauung und damit geringere Allergenität ergibt. Dazu wurden vier bekannte Erdnuss-Produkte ausgewählt.

3.3.3.1 Peanut-Cracker

Für die Untersuchungen der Passage von Erdnussprodukten durch den menschlichen Gastrointestinaltrakt sollte zunächst ein neuartiges Produkt verwendet werden, das neben Erdnüssen auch Sesam enthält. Es wurden keine Angaben über die Mengenverhältnisse der einzelnen Zutaten auf der Verpackung angegeben. Sesam könnte jedoch homologe Proteinstrukturen aufweisen, da es auch Viciline enthält (Beyer *et al.*, 2002). Dadurch würde sich möglicherweise die Allergenität erhöhen.

Bei den Peanut-Crackern wurde im Vergleich zu der bisherigen Versuchsdurchführung noch ein zusätzlicher Versuchsablauf eingefügt. Damit sollte ausgeschlossen werden, dass bei einer bis zu 24stündigen Inkubation mit Magensaft eine zu starke Degradation der Proteine erfolgt, die möglicherweise den folgenden Kreonversuch beeinflusst hätte. Deshalb wurde bereits nach 1 Stunde die Inkubation mit Enzynorm unterbrochen und die Inkubation mit Pankreassaft angeschlossen, während parallel auch der normale Versuchsablauf durchgeführt wurde. Damit konnte nun im direkten Vergleich untersucht werden, ob Unterschiede in der Proteinkonzentration oder der Proteinzusammensetzung auftraten. Zunächst wurde eine SDS-PAGE durchgeführt, um den Enzynormverdau zu bestimmen.

Ergebnisse

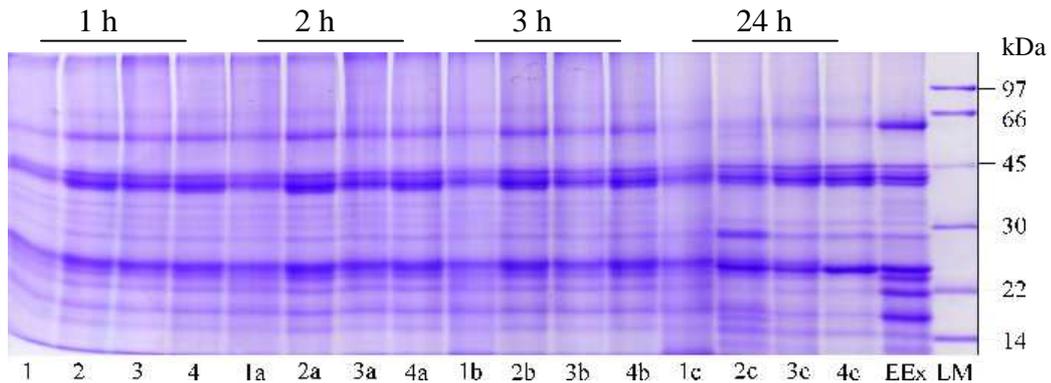


Abb. 59 Vergleichende SDS-PAGE des Verdau mit Enzynorm von Peanut Crackern zur Darstellung der Erdnussallergene

12 % SDS-PAGE, 15 µg/ cm, Coomassie-Färbung

Probennahme nach 1 h (1-4), nach 2 h (1a-4a), nach 3 h (1b-4b)

und nach 24 h (1c-4c), 1. Überstand EEx-gek in H₂O, 2. Überstand EEx-gek in PP, 3. Matrix EEx-gek in H₂O, 4. Matrix EEx-gek in PP, Peanut Cracker-Extrakt

Die vorhergehenden Versuche der natur gerösteten Erdnüssen hatten stets zu einem vollständigen Abbau der Allergene Ara h 2 und Ara h 6 geführt, während Ara h 1 und Ara h 3/4 mit Isoformen grundsätzlich auch nach dem nachgestellten Verdau mit Kreon nachweisbar blieben. Der Verdau der Peanut Cracker nach der Inkubation mit Enzynorm im Vergleich zu dem laborchemisch hergestellten Peanut Cracker-Extrakt (Abb. 59) zeigte diesen schnellen Abbau trotz der zunächst höheren Ausgangskonzentration dieser Allergene ebenfalls.

Die Inkubationen mit Kreon im Anschluss an die Inkubation mit Enzynorm wurde mit einer SDS-PAGE verglichen, wobei nur die Probennahme nach 24 h dargestellt wird.

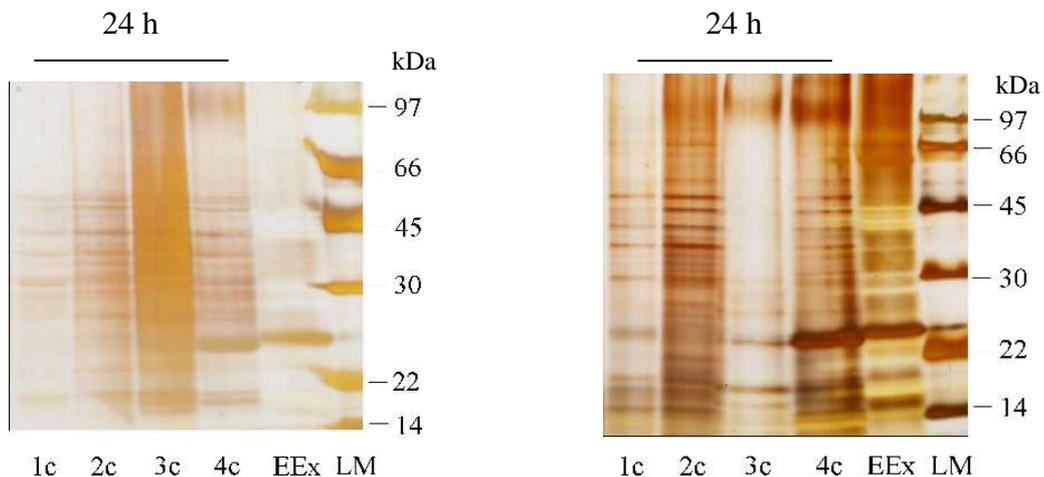


Abb. 60 Vergleichende SDS-PAGE des Verdau mit Kreon nach 1 h Ink. mit Enzynorm

12 % SDS-PAGE, 5-10 µg/ cm, Silber-Färbung, Probennahme nach 24 h (1c-4c) 1. Überstand EEx-gek in H₂O, 2. Überstand EEx-gek in PP, 3. Matrix EEx-gek in H₂O, 4. Matrix EEx-gek in PP, Peanut Cracker-Extrakt

Abb. 61 Vergleichende SDS-PAGE des Verdau mit Kreon nach 24 h Ink. mit Enzynorm

12 % SDS-PAGE, 5-10 µg/ cm, Silber-Färbung, Probennahme nach 24 h (1c-4c) 1. Überstand EEx-gek in H₂O, 2. Überstand EEx-gek in PP, 3. Matrix EEx-gek in H₂O, 4. Matrix EEx-gek in PP, Peanut Cracker-Extrakt

Ergebnisse

In den Abb. 60 und 61 wird gezeigt, dass sich nur eine Abnahme der Proteinkonzentration bei beiden Versuchsansätzen feststellen ließ. In beiden Fällen konnte erneut eine Freisetzung von Proteinen nach 24stündiger Inkubation mit Pankreassaft nachgewiesen werden. Auch die gefundenen Proteine und Allergenuntereinheiten ließen keinen Einfluss des längeren Verdauens mit Magensaft erkennen. Parallel konnten mit der BNP abermals die hochmolekularen Komplexe aus Ara h 1 und Ara h 3/4 und ihren Isoformen gefunden werden, die in beiden Versuchsansätzen deutlich zu erkennen waren. Auch die IgE-Reaktivität der Patientenseren oder die Antikörperbindung ließ keine Unterschiede erkennen (nicht dargestellt).

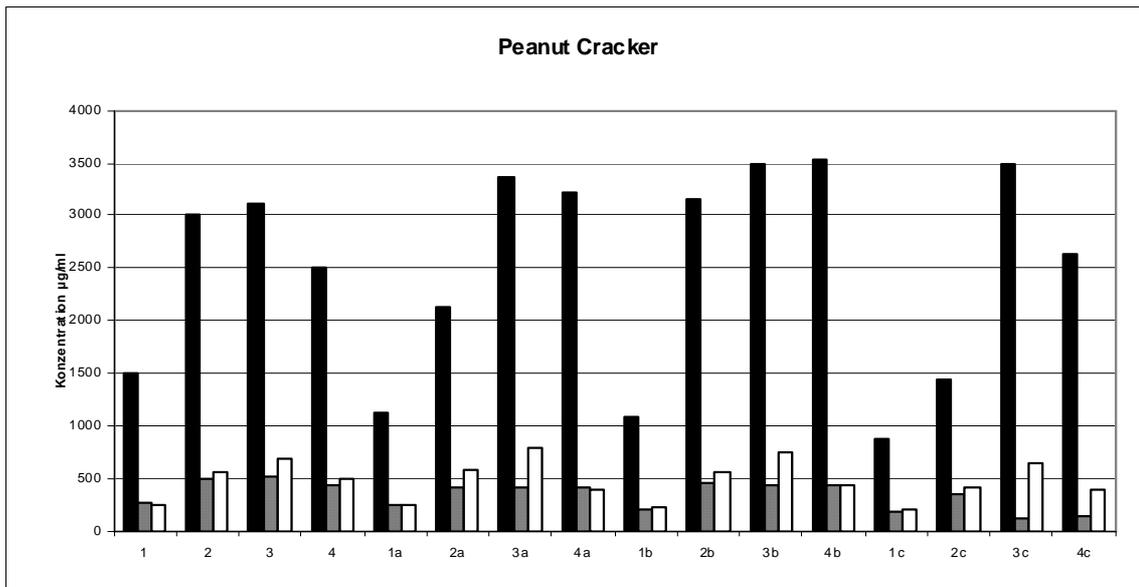


Abb. 62 Diagramm mit Vergleich der Proteinkonzentrationen des Peanut-Cracker-Verdaues nach Verdau mit Enzynorm (Säulen in schwarz), sowie nach Verdau mit Kreon nach 24 h (grau) bzw. nach 1 h Inkubation mit Enzynorm (weiß). Probennahme nach 1 (Proben 1-4), 2 h (1a-4a), 3 h (1b-4b) und 24 h (1c-4c) 1. Überstand EEx-gek in H₂O, 2. Überstand EEx-gek in PP, 3. Matrix EEx-gek in H₂O, 4. Matrix EEx-gek in PP

Bei der Untersuchung der Proteinkonzentrationen in dem Diagramm (Abb. 62) wurde deutlich, dass bis auf eine starke Abnahme in der Proteinkonzentration keine versuchsbedingten Unterschiede festgestellt werden konnten.

3.3.3.2 Corny-Riegel

Um das morgendliche Frühstück von Kindern und Jugendlichen zu simulieren, wurde ein handelsüblicher Corny-Riegel mit Schokolade verwendet. Dieser wurde halbiert, wobei die eine Hälfte für den Kauversuch und die andere Hälfte für die laborchemische Extraktion verwendet wurde. Bei der gekauten Hälfte blieb die Schokoladenunterseite erhalten, während sie für die Extraktion zunächst von der Müsliseite getrennt und einzeln zerkleinert wurde. In der Inhaltsangabe der Riegel war kein Hinweis enthalten, wie viel Prozent des fertigen Produktes aus Erdnüssen bestehen. Daher wurden auch Vergleichsextrakte von Weizen-, Hafer-, Gerste-, Reis-, und Nussextrakten analysiert, um die einzelnen Banden anschließend zuordnen zu können. Bei der Auswertung der BN-PAGE und SDS-PAGE zeigte sich dann allerdings, dass keine zusätzlichen Proteinbanden nachweisbar waren, die den weiteren Zutaten wie Getreide- und Milchproteinen zugeordnet werden könnten. Somit konnte auch bei diesem Kauversuch eine

Ergebnisse

eindeutige Zuordnung der Banden zu den Erdnussallergenen erfolgen. Zunächst wurde wieder eine BN-PAGE durchgeführt, um die Inkubation mit Magensaft- und Pankreassaftäquivalent direkt verfolgen zu können. Dieser Vergleich wird in den Abb. 63 und 64 dargestellt, wobei hier zunächst die Probennahme nach 1 und 2 h (Magensaft) bzw. nach 3 und 24 h (Pankreassaft) exemplarisch gezeigt wird.

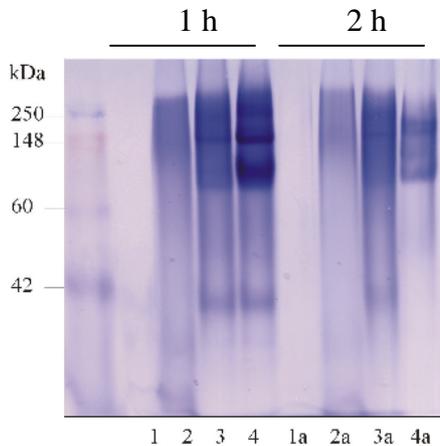


Abb. 63 BN-PAGE des Verdaus mit Enzynorm des Corny-Riegels
BN-PAGE auf 10 % Tris-Glycin-Gel, Coomassie-Färbung
Probennahme nach 1 h (1-4) und nach 2 h (1a-4a), Proband AB
1. Überstand EEx-gek in H₂O,
2. Überstand EEx-gek in PP,
3. Matrix EEx-gek in H₂O,
4. Matrix EEx-gek in PP

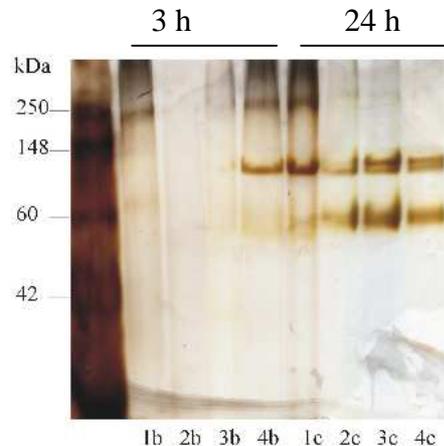


Abb. 64 BN-PAGE des Verdaus mit Kreon des Corny-Riegels
BN-PAGE auf 10 % Tris-Glycin-Gel, Silber-Färbung
Probennahme nach 3 h (1b-4b) und nach 24 h (1c-4c), Proband AB
1. Überstand EEx-gek in H₂O,
2. Überstand EEx-gek in PP,
3. Matrix EEx-gek in H₂O,
4. Matrix EEx-gek in PP

Aus den Abb. 63 und 64 wird deutlich, dass zunächst noch eine Proteinbande bei ca. 42 kDa vorhanden war, diese aber bereits nach 2 Stunden Inkubation mit Magensaft fast verschwunden war. Die hochmolekularen Komplexe aus Ara h 1 und Ara h 3/4 blieben auch in diesem verarbeiteten Produkt erhalten. Auch das Verhältnis zu den anderen Allergenen war trotz der Tatsache, dass dieses Produkt im Laufe des Herstellungsprozesses vielfältigen thermischen und chemischen Einflüssen ausgesetzt worden war, unverändert. Dieser unerwartete Befund wurde noch erweitert, denn auch der Zerfall der Allergene Ara h 3/4 und Isoformen in ihre N- und C-terminalen Untereinheiten konnte nachvollzogen werden. Außerdem war der Abbau der Allergene trotz der anderen Bestandteile des Riegels unverändert, so dass keine Matrixeffekte durch die weiteren Nahrungsmittelbestandteile auftraten. Allerdings blieben die hochmolekularen Erdnussallergene erhalten, so dass Matrixeffekte durch die Erdnussproteine messbar und eine Freisetzung von Allergenen nach 24stündiger Inkubation mit Magensaft gezeigt werden konnte.

3.3.3.3 Erdnussbutter

Als ein weiteres wichtiges Erdnussprodukt sollte die Erdnussbutter untersucht werden, die einen wichtigen Bestandteil der amerikanischen Ernährung darstellt. Aufgrund der Konsistenz dieses Produktes konnte es nicht alleine gekaut werden, so dass als Unterlage ein Roggenknäckebrot gewählt wurde, das nur Roggenprotein als zusätzlichen Anteil aufwies. Dadurch war eine eindeutige Zuordnung möglicher Protein-

Ergebnisse

banden gewährleistet. Schon bei der ersten Proteinbestimmung direkt nach dem Kauvorgang fiel auf, dass nur sehr wenig Protein nachzuweisen war. Weder das Verhältnis der Allergene zueinander noch die Konzentration der einzelnen Allergene war verändert. Die hochmolekularen Komplexe aus Ara h 1 und Ara h 3/4 ließen sich nachweisen. Außerdem konnte bestätigt werden, dass auch hier noch nach 24 Stunden Inkubation mit Enzynorm oder Kreon Proteine freigesetzt wurden, allerdings deutlich weniger als bei den anderen Produkten bzw. gerösteten Erdnüssen.

3.3.3.4 Snickers-Riegel

Im Unterschied zu den bisher untersuchten Erdnussprodukten war die Deklaration dieses Produktes eindeutig und sprach für einen reinen Erdnussproteinanteil von 45 %. Dieser Artikel wurde ausgewählt, um einen von Kindern und Jugendlichen bevorzugten Schokoladenriegel zu testen und um zu prüfen, inwieweit die Deklaration mit den tatsächlichen Inhaltsstoffen übereinstimmte.

Dazu wurde zunächst eine SDS-PAGE (Abb. 65) durchgeführt, die den Verlauf der Inkubation mit Magensaft darstellt. Immunoblots (Abb. 66) aus diesem Gel zeigten dann die Erdnussallergene Ara h 3/4 mit Isoformen (mAK PEI-7B2) und die IgE-Reaktivitäten dieser Allergene mit einem Patientenpoolserum (JG3, CAT, OB)

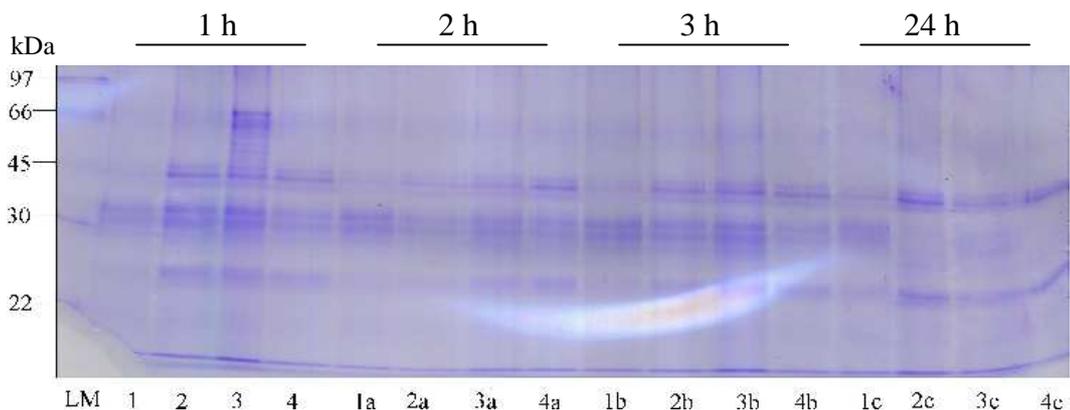


Abb. 65 Vergleichende SDS-PAGE des Verdaus mit Enzynorm eines Snickers-Riegels zur Darstellung der Erdnussallergene

12 % SDS-PAGE, 15 µg/ cm, Coomassie-Färbung, Proband AB
Probennahme nach 1 h (1-4), nach 2 h (1a-4a), nach 3 h (1b-4b)
und nach 24 h (1c-4c) 1. Überstand EEx-gek in H₂O, 2. Überstand EEx-gek
in PP, 3. Matrix EEx-gek in H₂O, 4. Matrix EEx-gek in PP

Ergebnisse

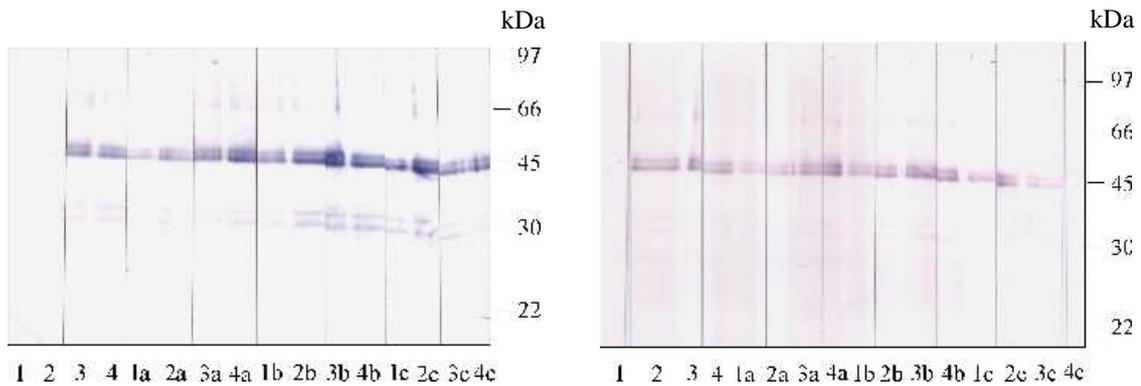


Abb. 66 Vergleichende Immunoblots des Verdaus mit Enzynorm eines Snickers-Riegels zur Darstellung der Antikörperbindung gegen Ara h 3/4 und Isoformen und der IgE-Reaktivität dieser Banden

12 % SDS-PAGE aus Abb. 65, 15 μ g/ cm, Proband AB

links: mAK PEI-7B2 rechts: Patientenpoolserum (JG3, CAT, OB) Probenahme nach 1 h (1-4), nach 2 h (1a-4a), nach 3 h (1b-4b) und nach 24 h (1c-4c)

1. Überstand EEx-gek in H₂O, 2. Überstand EEx-gek in PP, 3. Matrix EEx-gek in H₂O, 4. Matrix EEx-gek in PP

In den Abb. 65 und 66 wird deutlich, dass eine Freisetzung von Erdnussallergenen wie Ara h 3/4 und Isoformen auch nach 24stündiger Inkubation mit Enzynorm erfolgt und diese Freisetzung mittels des monoklonalen Antikörpers PEI-7B2 gezeigt werden kann. Außerdem wurde mit einem Poolserum von Erdnussallergikern gezeigt, dass diese Banden IgE-reaktiv sind.

Auch hier fiel auf, dass alle Banden in den Gelelektrophoresen scheinbar nur die Erdnussproteine zeigten und alle weiteren Bestandteile zu vernachlässigen waren, obwohl zum Beispiel auch Soja- und Milchproteine vorhanden sein sollten. Es waren auch hier die hochmolekulare Komplexe aus Ara h 1 und Ara h 3/4 nach Abschluss aller Inkubationsschritte noch eindeutig nachweisbar. Der laborchemisch hergestellte Extrakt aus einem zweiten Snickers-Riegel zeigte ebenfalls nur Erdnussproteine (s. 3.1.2.1, Abb. 4). Für den Vergleich mit den bisherigen Verdauxperimenten wird hier die Proteinkonzentration des Corny-Riegels, Snickers-Riegels und der Erdnussbutter jeweils für den Verdau mit Enzynorm und Kreon zusammengefasst.

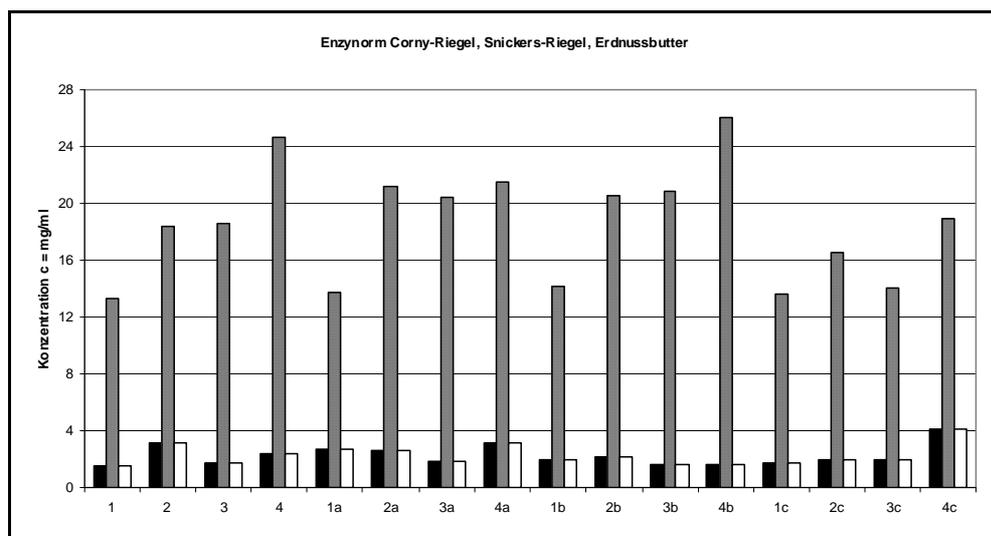


Abb. 67 Diagramm mit Vergleich der Proteinkonzentrationen des Corny-Riegel (Säulen in schwarz), des Snickers-Riegel- (grau) und des Erdnussbutter-Verdaues (weiß) nach Magensaftverdau (Enzynorm forte) Probenahme nach 1 h (Proben 1-4), 2 h (1a-4a), 3 h (1b-4b) und 24 h (1c-4c) 1. Überstand EEx-gek in H₂O., 2. Überstand EEx-gek in PP, 3. Matrix EEx-gek in H₂O, 4. Matrix EEx-gek in PP

Ergebnisse

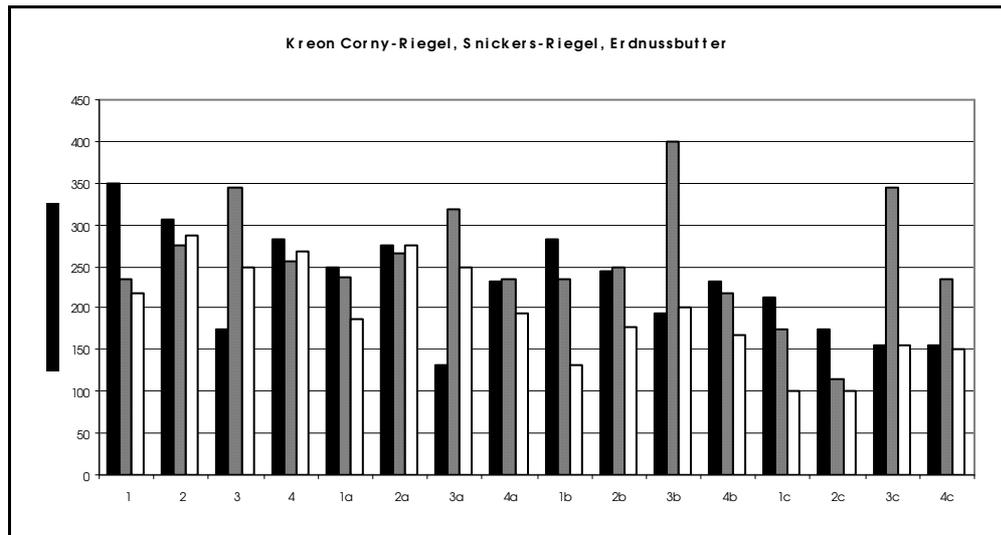


Abb. 68 Diagramm mit Vergleich der Proteinkonzentrationen des Corny-Riegel (Säulen in schwarz), des Snickers-Riegel- (grau) und des Erdnussbutter-Verdaues (weiß) nach Pankreassaftverdau (Kreon 25000) Probenahme nach 1 h (Proben 1-4), 2 h (1a-4a), 3 h (1b-4b) und 24 h (1c-4c) 1. Überstand EEx-gek in H₂O, 2. Überstand EEx-gek in PP, 3. Matrix EEx-gek in H₂O, 4. Matrix EEx-gek in PP

In den Diagrammen (Abb. 67 und 68) wird deutlich, dass bei dem Corny-Riegel und der Erdnussbutter eine verminderte Proteinkonzentration in Bezug zu den natur gerösteten Erdnüssen vorlag, aber keine Veränderung in der prozentualen Zusammensetzung im Versuchsablauf gefunden werden konnten. Überraschend war die sehr hohe Proteinkonzentration des Snickers-Riegels, die während der gesamten Inkubation mit Enzynorm über 10 mg/ml betrug, um dann ebenso wie in den anderen verarbeiteten Produkten bei dem Verdau mit Kreon rapide zu sinken, so dass keine Unterschiede innerhalb dieser drei Produkte mehr erkennbar waren.

Insgesamt konnte bei den simulierten Passagen durch dem menschlichen Gastrointestinaltrakt gezeigt werden, dass bereits direkt nach der mechanischen Zerkleinerung der Erdnussproteine durch das Kauen eine Freisetzung von Allergenen nachweisbar wurde. Diese Freisetzung konnte auch noch nach 24 h Inkubation mit Enzynorm und Kreon gefunden werden und war unabhängig davon, ob natur geröstete, gekochte oder fritierte Ernüsse oder aber Erdnussprodukte eingesetzt wurden. Das Verhältnis von hochmolekularen zu niedermolekularen Erdnussproteinen betrug jeweils 90 % zu 10 %, wobei die niedermolekularen Allergene bereits nach dem Verdau mit Magensaft nicht mehr detektierbar waren. Auch in den verarbeiteten Produkten konnten nur Erdnussproteine nachgewiesen werden, die anderen Zutaten zeigten keine Verdauungsresistenz.

4. Diskussion

4.1 Isolierung der Allergene Ara h 1, Ara 3/4 und ihrer Isoformen aus dem Erdnussextrakt

Das Ziel dieser Arbeit war die Isolierung und Charakterisierung der Erdnussallergene Ara h 1, Ara h 3/4 und Isoformen (Ara h 3, Ara h 4, iso-Ara h 3, Gly 1 und Trypsin Inhibitor) unter natürlichen, nicht denaturierenden Bedingungen. Dabei sollen sie in ihrer natürlichen Form untersucht werden, in der sie auch dem menschlichen Körper zugeführt und Allergien auslösen können. Im Gegensatz dazu stehen bisherige Untersuchungen (Sampson, 1996, 1998, 2002; Eigenmann *et al.*, 1996, Burks *et al.*, 1998, Koppelman *et al.*, 2003) über die Erdnuss und ihre Allergene, bei denen diese immer unter den denaturierenden Bedingungen der SDS-PAGE analysiert wurden.

Es wurden unterschiedliche Ansätze gewählt, um eine Isolierung dieser Allergene aus dem Erdnussextrakt zu ermöglichen. Die beschriebenen Isolierungsmethoden (Koppelman *et al.*, 2003), wie die Auftrennung von Erdnussextrakt mit einer Anionenaustauschchromatographie über Source Q- oder Mini Q-Säulen an der HPLC erwiesen sich als ungeeignet, um eine Isolierung von Ara h 1 und Ara h 3/4 mit Isoformen aus dem Extrakt zu erreichen. Bei der Durchführung unter den angegebenen Bedingungen wurden alle Proteine des gesamten Extraktes gemeinsam eluiert, eine Trennung in einzelne Fraktionen und Allergene fand nicht statt. Außerdem wurden die Proteine bei diesen Extraktionsmethoden durch enthaltenen Harnstoff und Imidazol denaturiert. Daher wurde nach geeigneteren Methoden für eine Auftrennung des Extraktes unter nicht denaturierenden Bedingungen gesucht. Dabei erwies sich die Gelfiltration als besonders geeignet.

Bisherige Untersuchungen zur quartären Struktur der Viciline, zu denen das Ara h 1 gehört, und der Glycinine (Ara h 3/4 und Isoformen) innerhalb der Leguminosen und der Erdnuss hatten gezeigt, dass diese in komplexen hexameren Formen vorliegen können (Wang *et al.*, 2003). Diese hochmolekularen Proteinkomplexe mit einem Molekulargewicht von über 200 kDa konnten daher erfolgreich im Ausschlussvolumen einer Superdex-200-Säule isoliert werden (Koppelman *et al.*, 2003), da die Proteine nicht mit der Matrix der Säule interagieren konnten. Ein weiterer Vorteil dieser Gelfiltrationsmethode liegt darin, dass die Proteine dabei nicht denaturiert wurden und in ihrer komplexen Struktur erhalten blieben, die genauer untersucht werden sollte. Diese Struktur beruht auf der Aneinanderlagerung verschiedener Moleküle durch hydrophobe Wechselwirkungen zu großen Komplexen.

Das Ara h 1 ist innerhalb der Viciline am besten untersucht, da es ein Majorallergen der Erdnuss ist (Shin *et al.*, 1998). Drei Ara h 1 Monomere von je 65 kDa lagern sich zu einem sehr stabilen Trimer zusammen, das resistent gegenüber proteolytischer Spaltung die Passage durch den Gastrointestinaltrakt des Menschen als komplexes Molekül überstehen kann (Breiteneder *et al.*, 2004). Die Viciline haben in der prozessierten Form jeweils nur einen Cysteinrest und enthalten somit keine Disulfidbrückenbindungen.

Die hexameren Legumine bilden ebenfalls Trimere aus, die posttranslational prozessiert werden. Legumine sollen als intakte Precursor-Proteine (50-60 kDa), als prozessierte saure (30-40 kDa) und basische (20 kDa) Untereinheiten vorliegen können, die über Disulfidbrücken verbunden sind (Wang *et al.*, 2003). Alle Legumine sind sich strukturell sehr ähnlich und sollen mit den Vicilinen gemeinsame Vorläufermoleküle haben.

Diskussion

Aufgrund dieser Vorinformationen wurde zunächst überprüft, ob sich diese komplexe Struktur sowohl nach der Isolation dieser großen Komplexe mittels Gelfiltration als auch in dem Standarderdnussextrakt aus natur gerösteten Erdnüssen, in Extrakten aus keimfähigen Erdnüssen, die teilweise gekocht oder fritiert wurden, und verarbeiteten Erdnussprodukten nachweisen ließ. Zum Vergleich wurden diese Extrakte mit der Blue Native PAGE untersucht. Dies ist eine schonende Methode zur weitgehend nativen Darstellung der Struktur großer Proteinkomplexe (Eubel *et al.*, 2003). Durch die Beladung mit dem sauren Coomassie-Farbstoff werden die Proteine negativ geladen, dabei nur leicht beeinflusst, so dass sie bei der Elektrophorese wandern können.

Bei der BN-PAGE der Extrakte fiel auf, dass in den keimfähigen Erdnüssen und einem verarbeiteten Produkt (Peanut Cracker) sehr viel höhere Molekulargewichte (>150 kDa) nachweisbar waren, als in den anderen Extrakten (Abb. 49). Mit der reduzierenden SDS-PAGE konnten ebenfalls Banden in einem Molekulargewicht über 100 kDa gefunden werden (Abb. 50), die über den immunologischen Nachweis als Ara h 1 bestimmt wurden. Damit war klar, dass hier die beschriebenen Trimere der Viciline nachgewiesen wurden. Außerdem konnte eine Zunahme der Ara h 1-Konzentration gezeigt werden. Darüber hinaus konnte in den Extrakten der keimfähigen Erdnüsse eine Intensitätsverstärkung bei einer Isoform von Ara h 3/4 (iso-Ara h 3) und einem niedermolekularen Allergen (Ara h 2) gefunden werden.

Zur Untersuchung der Komplexbildung aus zusammengelagerten Ara h 1-Monomeren und hexameren Glycininen (Ara h 3/4 und Isoformen) war eine Extrakterstellung unter Zugabe von 10 % Laktose durchgeführt worden. Laktose ist der für das Erdnuss-Lektin inhibierende Zucker. Somit sollte eine Komplexbildung unterbleiben, wenn die gefundenen Komplexe nur aufgrund der Vernetzung der Lektine entstehen würden (Hird *et al.*, 2000). Es konnte kein Unterschied in der Komplexbildung festgestellt werden (Abb. 12). Die großen Komplexe waren somit eindeutig ohne Wechselwirkungen über die Lektine entstanden.

In einem anderen Extrakt aus dänischen gerösteten und gesalzenen Erdnüssen konnte eine Zunahme von Ara h 3/4 mit den Isoformen gefunden werden, wobei hier deutlich weniger Ara h 1 vorzuliegen schien.

Dieses steht in direktem Widerspruch zu der Veröffentlichung von Beyer *et al.* (2001), in der beschrieben wurde, dass durch den Röstprozess eine Verschiebung in der Allergenzusammensetzung zu einer deutlich erhöhten Ara h 1-Konzentration zu verzeichnen sei. Unberücksichtigt blieb dabei auch, dass sehr wohl die Ara h 3/4-Konzentration (Banden in der SDS-PAGE bei 14, 21 und 30-40 kDa) variierte, da in der Publikation lediglich eine 14 kDa-Bande als Ara h 3 beschrieben wurde. Diese entspricht einem Teil der N-terminalen Untereinheit der Erdnussallergene Ara h 3/4 und Isoformen, kann aber nur einen sehr oberflächlichen Eindruck dieser wichtigen „Allergengruppe“ vermitteln. Diese müssen immer als intakte Proteine oder zusammen als saure und basische Untereinheiten (Wang *et al.*, 2003) betrachtet werden. Beyer *et al.* (2001) diskutierten, dass Menschen aus dem chinesischen Kulturkreis keine Erdnussallergien bekommen, da sie ihre Erdnüsse in gekochter und fritierter Form zu sich nehmen. Diese Verarbeitungsformen sollen das allergene Potential der Erdnüsse reduzieren, indem die Proteinkonzentrationen der Allergene Ara h 1, Ara h 2 und Ara h 3 (14 kDa-Bande) abnehmen.

Die Untersuchungen in dieser Arbeit bestätigten diese Hypothese nicht. Bei den gekochten Erdnüssen konnten im Vergleich zu den natur gerösteten und den dänischen gesalzenen und gerösteten Erdnüssen nur sehr geringe Intensitätsunterschiede gefunden werden, die weder eine Abnahme der IgE-Reaktivität der Patienten noch eine verminderte Antikörperbindung zur Folge hatte (Abb. 5). Lediglich bei den fritierten

Diskussion

Nüssen konnte eine deutliche Reduktion der Proteinkonzentration und eine damit verbundene Abnahme der IgE-Reaktivität und Antikörperbindung gefunden werden.

In Zusammenhang mit einer möglichen Veränderung der Erdnussallergene bei der Verarbeitung müssen noch weitere Veröffentlichungen (Maleki *et al.*, 2003, Koppelman *et al.*, 1999, Wal, 2003, Kopper *et al.*, 2005) gesehen werden. So beschreiben Maleki *et al.*, dass Röstprozesse die Proteinkonzentration von Ara h 2 zwar senken, in gleichem Umfang aber dessen Funktion als Trypsin Inhibitor gesteigert wird und somit möglicherweise auch eine Steigerung der Allergenität herbeiführt. Koppelman *et al.* sehen zwar eine Denaturierung von Ara h 1 bei Hitzeeinwirkungen von 80 - 90 °C, aber keinen signifikanten Unterschied in der IgE-Bindung. Wal schließlich wirft im Zusammenhang mit der thermischen Prozessierung von Nahrungsmitteln allgemein die Frage auf, ob sich damit die zunehmende Allergieprävalenz gegenüber immer neuen Nahrungsmitteln erklären lassen könnte. Und Kopper *et al.* stellen fest, dass mit der Zugabe von Amylase durch die Maillard-Reaktion eigentlich unlösliche Proteine in Lösung gebracht werden können.

In dieser Arbeit konnte eine Veränderung der Allergenproportionen zueinander bei den Extrakten aus verarbeiteten Erdnüssen beobachtet werden. So war bei dem Snickers- und Corny-Riegel eine Zunahme von Ara h 3/4 und eine Abnahme von Ara h 2 zu finden, während bei den Peanut Crackern ein signifikanter Anstieg von Ara h 1 und Ara h 2 beobachtet werden konnte. Somit könnte alleine die weitere Bearbeitung der Erdnüsse nach der Ernte für ein schwächeres oder stärkeres allergenes Potential verantwortlich sein.

Insbesondere für die Entstehung von Nahrungsmittelallergien und für die individuell unterschiedliche Schwere der allergischen Reaktion gegen Erdnüsse spielen viele Faktoren eine Rolle. So sollten drei Patientenkollektive genau untersucht werden, um die Erdnussallergie und die dafür verantwortlichen Allergene charakterisieren zu können. In der Literatur sind vor allem Ara h 1 (Becker, 1997, Buschmann *et al.*, 1996, Koppelman *et al.*, 2001) und Ara h 2 (Chatel *et al.*, 2003, Gruber *et al.*, 2004, Koppelman *et al.*, 1999, Maleki *et al.*, 2003) als Majorallergene beschrieben. Komplizierter und kontroverser wird mit dem Allergen Ara h 3/4 und Isoformen (Ara h 3, Ara h 4, iso-Ara h 3, Gly 1 und Trypsin Inhibitor) umgegangen. In den meisten Veröffentlichungen werden diese Isoformen gar nicht erwähnt, oder eine 14 kDa-Bande wird als Ara h 3 dargestellt (Beyer *et al.*, 2001, Koppelman *et al.*, 2003, Rabjohn *et al.*, 1999, 2002), ohne dem komplexen Aufbau der Glycine Rechnung zu tragen. Weitere Erdnussallergene wie Ara h 5 (Kleber-Janke *et al.*, 1999, 2001), Ara h 6 (Suhr *et al.*, 2004), Ara h 7, Ara h 8 (Mittag *et al.*, 2004), LTP und Oleosin (Pons *et al.*, 2002) werden nur selten erwähnt und sind nur über rekombinante Proteine definiert (Ara h 7) oder indirekt (LTP) und nicht als native Proteine gefunden worden.

Aber welche Erdnussallergene sind nun für die Bildung spezifischer IgE-Antikörper bei den Patienten entscheidend?

Um diese Frage vor allem in Hinblick auf das Ara h 3/4 und Isoformen zu klären, wurden Patientenkollektive aus Dänemark, der Schweiz, Italien und Deutschland mit der verstärkten Immundetektion mittels Chemilumineszenz getestet. Bei den dänischen Patienten zeigten immerhin 46,9 % IgE-Reaktivität gegen Ara h 3/4 und Isoformen, wobei alle Banden (14, 22, ~28 und ~45 kDa) erkannt und die Untereinheiten der Isoformen meistens gemeinsam detektiert wurden. Ara h 1 wurde von 40,8 % der Patienten erkannt. 32,7 % der Allergiker erkannten ausschließlich die niedermolekularen Allergene wie Ara h 2 und Ara h 6. Dabei darf allerdings nicht vernachlässigt werden, dass die geblottete Proteinkonzentration mit 30 µg/cm bei der niedermolekularen Superdexfraktion doppelt so hoch war, wie bei der hochmolekularen Fraktion des Ausschlussvolumens (15 µg/cm), um die Bindung der IgE-

Diskussion

Antikörper überhaupt zeigen zu können. Diese Beobachtungen konnten auch mit den beiden anderen Patientenkollektiven bestätigt werden. Dabei wurde deutlich, dass Ara h 3/4 zusammen mit seinen Isoformen als Majorallergene definiert werden müssen, da diese hier von knapp 50 % der Patienten als IgE-reaktiv erkannt und immerhin 89 Seren getestet wurden. Sowohl die sauren N-terminalen Untereinheiten von ~45 kDa als auch die basischen C-terminalen Untereinheiten von 22 und ~28 kDa sind in den meisten Fällen als Einheiten von den Patienten erkannt worden (Abb. 30). Selten zeigten aber auch nur einzelne Isoformen wie das iso-Ara h 3 und deren Untereinheiten eine Reaktivität.

Die in der Literatur (Beyer *et al.*, 2001, Koppelman *et al.*, 2003, Rabjohn *et al.*, 1999, 2002) als Ara h 3 beschriebene 14 kDa-Bande wurde nur vereinzelt zusätzlich, aber nie ausschließlich als IgE-reaktiv detektiert. Insgesamt ergab sich ein individuelles Bandenmuster bei den Patienten, wobei die seltenen Allergene (Ara h 5, Ara h 7, Ara h 8, LTP und Oleosin) nicht gefunden werden konnten. Eine Erklärung dafür könnte das geringe Molekulargewicht dieser Allergene (<15 kDa) sein. So zeigte auch Schocker (2003), dass niedermolekulare Proteine schlechter zu detektieren sind.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass 90 % der Proteinkomplexe größer als 200 kDa waren und bei der Gelfiltration mit der Superdex-200-Säule im Ausschlussvolumen vorlagen. Lediglich 10 % aller Erdnussproteine konnten nach der Interaktion mit der Säulenmatrix gefunden werden. Diese Proportionen konnten in allen Erdnuss-extrakten wiedergefunden werden. Während Ara h 1 und Ara h 3/4 mit Isoformen 90 % aller Proteine bilden, stellen die sieben anderen Allergene zusammen die restlichen 10 %. Dabei sind die Allergenproportionen innerhalb dieser niedermolekularen Fraktion nicht gleichmäßig verteilt, sondern das Ara h 2 und auch das Ara h 6 haben einen signifikant höheren Anteil an dieser als Allergene wie Ara h 5, Ara h 7, Ara h 8, LTP und Oleosin. Somit wird auch erklärbar, dass keine zusätzlichen Allergene gefunden werden konnten. Da diese möglicherweise weniger als 4 % aller Erdnussproteine umfassen, lagen sie unter den gegebenen Extraktionsmethoden unterhalb der Nachweisgrenze.

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, erkannten die Patienten die sauren und basischen Untereinheiten der Isoformen von Ara h 3/4. In der Literatur (Beyer *et al.*, 2001, Rabjohn *et al.*, 2002) wird oft nur das rekombinant herstellbare 14 kDa-Protein als Ara h 3 definiert, das einem Teil der sauren Untereinheit der Isoformen entspricht. Dieses Protein wird von den Patienten nur vereinzelt erkannt. Bei der Herstellung rekombinanter Proteine für das Anfertigen von Skin-Prick-Testlösungen zur Bestimmung vorhandener Allergien waren im Rahmen eines europäischen Projektes zur Verbesserung diagnostischer Möglichkeiten große Unterschiede in der Allergenzusammensetzung dieser Lösungen aufgefallen (van Ree, 2004). Ein Vergleich kommerzieller Skin-Prick-Testlösungen für die Detektion von Haselnussallergie ergab eine Bandbreite in der Proteinkonzentration von 0,2-14 mg / ml (Akkerdaas *et al.*, 2003). Auch bei berufsbedingten Sensibilisierungen gegen Mehlstaub und andere Allergenquellen konnten mit käuflichen Allergenextrakten oft nicht alle Allergien nachgewiesen werden, da diese nicht den natürlichen Molekülstrukturen entsprachen und große Unterschiede in der Proteinkonzentration aufwiesen (van Kampen *et al.*, 2005).

Wenn eine Testlösung aus gleichen Anteilen von Ara h 1, Ara h 2, einem kleinen Teil von Ara h 3 und Ara h 6 hergestellt wird, so werden viele Erdnussallergiker keine Reaktionen zeigen und als falsch negativ gelten. Dieses kann für die einzelnen Patienten aber zu Komplikationen führen, da bereits kleinste Mengen Erdnussprotein (100 µg) (Wensing *et al.*, 2002) allergische Reaktionen wie OAS auslösen können. Die einzige Therapie bei Erdnussallergie ist bisher die Vermeidung des Erdnussverzehr. Bei einer falsch negativen Einteilung als Nichtallergiker bleibt das Risiko eines

Erdnussverzehr. Somit sollten die Skin-Prick-Testlösungen auch die Untereinheiten von Ara h 3/4 und iso-Ara h 3 enthalten, um die Bandbreite der in dieser Arbeit als wichtig und häufig gefundenen IgE-Reaktivitäten abzudecken.

Ein weiteres Problem bei der rekombinanten Proteinexpression ist die fehlende Glykosylierung der Proteine. Immunologische Nachweise mit Con A und PNA hatten die beschriebene Glykosylierung des Ara h 1 (Kolarich *et al.*, 2000) bestätigt, aber auch gezeigt, dass die sauren und basischen Untereinheiten von iso-Ara h 3 und Gly 1 lektinbindende Strukturen tragen (Abb. 7 + 8).

Auch für die Patienten können Zuckerstrukturen von klinischer Relevanz sein. Bei Immunnachweisen konnte bei dem Patienten PG, der nur auf Zuckerstrukturen bei verschiedenen Nüssen und Leguminosen mit einem sehr hohen spezifischen IgE reagiert, aber keine klinischen Symptome bei einem Verzehr dieser Nahrungsmittel zeigt, ein Bandenmuster gefunden werden, dass ebenfalls eine Glykosylierung bei iso-Ara 3 und Gly 1 vermuten lässt.

Bei den anderen Isoformen (Ara h 3/4, Ara h 3 und Ara h 4) konnten hingegen keine Hinweise auf eine Glykosylierung gefunden werden, obwohl das Ara h 4 und das Ara h 3/4 im Unterschied zu dem Ara h 3 zwei N-Glykanbindungsstellen (Aminosäureabfolge NES oder NRS) aufweisen. Somit müssen auch Zuckerstrukturen für die Entstehung oder Verstärkung von allergischen Reaktionen berücksichtigt werden. Da diese die IgE-Reaktivität auch maskieren können, wäre es sinnvoll eine Skin-Prick-Testlösung ohne und eine mit Zuckerstrukturen jeweils parallel zu testen. Möglicherweise sind auch Arabinogalaktane über O-glykosidische Bindungen für die Auslösung von allergischen Reaktionen verantwortlich (van Ree *et al.*, 2005)

Im Laufe dieser Arbeit wurde mehrfach bestätigt (Abb. 14, 16-20), dass die Legumine durch die posttranslationale Spaltung an der Proteaseschnittstelle als prozessierte saure (30-40 kDa) und basische (20 kDa) Untereinheiten vorliegen können, die normalerweise über Disulfidbrücken verbunden sind (Wang *et al.*, 2003). Bei der N-terminalen Sequenzierung und auch der Analyse der Untereinheiten von Ara h 3/4 und Isoformen mittels MALDI-TOF konnte darüber hinaus aber noch eine weitere Untereinheit von Ara h 4 gefunden werden, die bei der Aminosäure 113 (bezogen auf die Allergensequenz des Ara h 3/4) startet. Dafür konnte keine Erklärung gefunden werden.

Bisher gibt es keine Untersuchungen über die an der Disulfidbrückenbindung beteiligten Cysteine der Erdnuss, die die Entstehung dieser Untereinheit erklären könnte. Lediglich für die Sojaglycine ist die Struktur der Disulfidbrücken bestimmt worden (Staswick, 1984). Dabei wurde festgestellt, dass zwischen der sauren und basischen Untereinheit nur eine Disulfidbrücke gebildet wird. Dabei ist das Cystein an Position 7 direkt hinter der Proteaseschnittstelle und unmittelbar vor einem beteiligten Methioninrest auf der basischen Untereinheit mit einem Cystein an Position 86 direkt hinter einem Methioninrest auf der sauren Untereinheit verbunden.

Das folgende Alignment (CLUSTAL W (1.82)) verschiedener Glycine (Walnuss (Ber e 2), Reis, Cashew (Ana o 2), Mandel, Erdnuss (Gly 1, Ara h 3/4, iso-Ara h 3), Springbohne und Soja) soll die hohe Sequenzhomologie verdeutlichen und unterstreichen, dass die Ausbildung der Disulfidbrücke bei den Glycininen homolog erfolgen sollte.

Diskussion

↓
Reifes Protein

```
1 q84nd2 Ber e 2      Prosequenz      Reifes Protein      -MAKL---FLLSLGLIFLLFHCCCLAIEYE-----QEE---LYECRIQRLTAQEPQYRLAEAE
2 q40685 Reiss       -MASINRPVVFVTVCLFLLCNGSLAQQLLGQSTSQWQSSRRGSSRECRFDRLQAFEP IRSVRSQ
3 q8gzp6 Ana o 2     -----L SVCFLLILFHGCLASRQE-----WQQQ---DECQIDRLDALEPDNRVYE
4 q43607 Mandel      -MAKA---FVFLSCLLLVFNGLAARQS-----QLS---PQNQCQLNQLQAREPDNRIQAE
5 q9fz11 Gly 1       MIRG-RLALSV-CFCFLVLGASSISFRQQ-----PEENACQFQRLNAQRPNRLESE
6 q81knl Ara h 3/4   -MGK-LLALSV-CFCFLVLGASSISFRQQ-----PEENACQFQRLNAQRPNR-ESE
7 q6iwg5 iso-Ara h 3 --K-LLALSL-CFCFLVLGASSVTFRQG-----GEENECCFQRLNAQRPNR-ESE
8 q41702 Springbohne -MAK-LLALSL-SFCFLFL-SSCFALREQ-----SQNECQLERINALEPDNRIESE
9 p93707 Soja        -MGKPFFTLSLSSLCLLLSSACFAITS-----SKFNQCQLNLLNALEPDHRVESE
      . . . . . : : : : : 88 ↓ : * : : : * * : . . :
1 AGVSEVWDYTDQQFRCAAGVAALRNTIRPQGLLVPVYTNAPKLYVYVQGRGILGVLMPGCPETFSQMSQF-----
2 VGTTEFFDVSNEQFCCTGVSVVRRVIEPRGLLLPHYTNASLVYIIQGRGITGPTFPGCPESYQQQFQQ-----
3 AGTVEAWDPNHEQFRCAAGVALVRHTIQPNGLLLPQYSNAPQLIYVVGEGMTGISYSPGCPETYQAPQQ-----
4 AGQIETWNNQGDQFCAGVAASRITIQRNLGLHLPYSNAPQLIYVVGGRVGLGAVFSGCPETFEESSQSSQGRQEQEQERQQ
5 GGYIETWNPNNQEFECAGVALSRLVLRNLRPFYSNAPQEIFIQGRGYFGLIFPGCPSTYEEPAQQGR-----
6 GGYIETWNPNNQEFECAGVALSRLVLRNLRPFYSNAPQEIFIQGRGYFGLIFPGCPSTYEEPAQQGR-----
7 GGYIETWNPNNQEFECAGVALSRTVLRNLRPFYSNAPLEIYVQGSYFGLIFPGCPSTYEEPAQEGR-----
8 GGLIETWNPNNRQFRCARVALSRATLQRNALRRPFYSNAPQEIFIYQGNFYGMVFPGCPETHEEPQQS-----
9 GGLIETWNSQHPLEQCAGVTVSKRTLNRNGSHLPSYSPYQMLIVVQGGKGAIGFAFPGCPETFEEKPQQ-----
      * * : : . : : * : : : . : . . * * : : : * * * * . * * : : : *
1 -----QGS-----REQEERG-----RFQDQHQKVVHLLKGDIIAIPAGVALWCYNDGD
2 -----SQ-----AQLTESQSQ-----KFKDEHQIHRFRQGDVIALPAGVAHWYCYNDGE
3 -----G-----RQQQSG-----FQDRHQIRRFRRGDIIAIPAGVAHWYCYNEGN
4 -QQEQGRQGGQQEQQERQGRQGRQGGQEQEQGGQGRPQQQQFRQLDRHQKTRRIREGDVVAIPAGVAYWSYNDGD
5 -----RHQ-----SORAPRRFGEQDQSQ-----QQQDSHQKVRFRFDEGDLIAVPTGVALWFMFNDHD
6 -----RHQ-----SORPPRRFQ-GDQSQ-----QQ-DSHQKVRFRFDEGDLIAVPTGVAFWMYNDHD
7 -----RYQ-----SQKPSRRFQVGGDDPSQ-----QQQDSHQKVRFRFDEGDLIAVPTGVAFWMYNDHD
8 -----RYQ-----EQEGRRYR-----DSHQKVRFRFREGDIIAVPTGIAFWMYNDQD
9 -----SRRGRSRQ-----Q-QLQDSHQKIRHFNEGDLVLIPLGVVYWTYNTGD
      * * * . : : * * : : : * * : . * * :
1 EDLVTVLVQHTASDLNQLDQNPFRHFFLAGN---IQRSQKQRGERYG-----LRGG-----Q
2 VPVVAIYVTDLNNGANQLDPRQRDFLLAGN---KRNPAQYRREVE-----ER-----
3 SPVVVTLLDVSNSQNLDRTPRKFFLAGN---PKDVFOQQQQHQ-----SR-----
4 QELVAVNLPHVSDHNLQDLQNPFRKFFLAGN---PENEFNQGSQSPRQ---QGEQGRPGQHQQP-----FGRPRQEQ
5 TDVAVSLTDTNNDNQLDQFPRFFLAGN---HEQEFLRYQQSRRRSLPYSYSPQSPRQEEREFSPRQGHSRRERAGQEE
6 TDVAVSLTDTNNDNQLDQFPRFFLAGN---HEQEFLRYQQSRRRSLPYSYSPQTPQKQEDREFSPRQGHSRRERAGQEQ
7 TDVVTTLSDTSSIHNLQDQFPRFFLAGN---QEQEFLRYQQQSGSR---PHYRQISPRVR-----GDEQ
8 TPVIAISLTDGSSNNQLDQMPRRFFLAGN---QEQEFLRYQQHQGGK-----PHYRQISPRVR-----QBQ
9 BPVVAISLLDTSNFNQLDQNPFRVFFLAGNPDIEHPETMQQQQQKSHG-----GRKQGG-----HQQQ
      : : : . * . * * * * * * * : : :
1 QILADNVFKGNMEALADVLGFG-MDTETARKVRGEDDQRGHIIVRVEQG-LKVI RPPRIRE-----ELEQ-----
2 ---SQNIFSGFSTELLSEALG---VSSQVAVRQLQCNDRQRGHIIVRVEHG-LSLLPQYASLQ-----EQEQGVV-----
3 ---GRNLFSGFDTELLAFAFQ---VDERLIKQLKSE-DNRGGIVKVKDDELVRIRPSRSQS-----ERGS-----
4 QGNGNNVFSGFNTQLLAQALN---VNEETARNLQGGQNDNRNQIQVRGN-LDFVQPPRRGRQ-----EREHEER-----
5 ENEGNIFSGFTPEFLAQAFQVDDRQIVQNLRGENSEEEGAIIVTKGG-LRILSPDRKRKRG-----ADEEEYDE-----
6 ENEGNIFSGFTPEFLAQAFQVDDRQILQNLRGENSEDEQGAIVTVRGG-LRILSPDRKRKRRQYERPDDEEYDE-----
7 ENEGNIFSGFAEQFLQAFQVD-RQTVENLRGENEEOGAIIVTKGG-LRILSPDEEDESRRSPSRREEFDE-----
8 DNDGNIFSGFKRDFLEDAFNVN-RHIVDRLQGRNEDEKGAIVTKGG-LSIAPPERQARHERGSRQEEDDEK---EERQP
9 EEEGGSVLSGFSKHLAQSFNTN-EDTAEKLR--SPDDEKQIVTVEGG-LSVISPKWQEQEDED-EDDEEYEQTPSYPPRRP
      . : : . * * . * . : : : . * * : : : * * : . * * :
1 -----QEG-----GGYNGLEETICSATFIQNIIDNPAEADFYNPRAGRLTTVN--SLK
2 -----QSRERYQEQ-----YQSSQYGS--GCSNGLDETFTCLRVQRNIDNPNRADTYNPRAGRVTNLN--TQN
3 -----ESEESE-----DEKRRWG---QRDNGIETICTMRLKENINDPARADIYTPVEVGRLLTTLN--SLN
4 -----QEQELQEQERQ-----QQEQ---LMANGLEETFCSLRLKENIGNPERADIFSPRAGRISTLN--SHN
5 -----DEYEYDEE-----DRRRGRGRGRG---GNGIETICTASVKKNIGRNRPDIYNPQAGSLKTAN--DLN
6 -----DEYEYDEEERQ-----DRRRGRGRGRG---NGIETICTASFKKNIGRNRPDIYNPQAGSLKTANELQLN
7 -----DRSRPQR-----GKYDENRRGY---KNGIETICTASVKKNIGRNRPDIYNPQAGSLKTAN--ELD
8 SHKSRDEDEDDEKKEK-----HSQKQGSRRQ---DNGLEETVCTAKLRANIGSSPDIYNPQAGRIKTVT--SLD
9 SHGHEDDEDEDEEDQPRPDHPQRPSRPEQQEPRGRGCQTRNGVEENICTMRLHENIARPSRADFYNPKAGRISTLN--SLT
      . : : * * : : : * * : . * * : . * * :
1 VPILTLFLQLSAMKGVLYENAMMPLWRLNANSVYAVRGEARVQIVDHRGETVFDNLRREGQMVVVPQNFVVVKQAGSRGFWEV
2 FPILSLVQMSAVKVNLYQNALLSPFWNINAHVYVITQGRARVQVNNNGKTVFNGELRRGQLLVVPQHYAVVKAQREGCAYI
3 LPILKWLQLSVEKGVLYKNALVPLPHWNLNSHSIIYCGKKGQGVQVVDNFNGRVFDGVEGQMLVVPQNFVAVKRAREERFEWI
4 LPILRFLRLSAERGFYRNGIYSPHWNVNAHSVYVIRGNARVQVNVNGDAILDQEVQQGLFIVPQNHGVIQQAGNQGFYF
5 LLILRLWGLSAEYGNLYRNALFVPHYNTNAHSIIYALRGRAHVQVVDNSGNRVYDEELQEGHVLVVPQNFVAVAGKSQDNFEYV
6 LLILRLWGLSAEYGNLYRNALFVPHYNTNAHSIIYALRGRAHVQVVDNSGNRVYDEELQEGHVLVVPQNFVAVAGKSQSENFEYV
7 LPILWGLLSAQHGTIYRNAMFVPHYTLNAHTIIVVALNGRAHVQVVDNSGNRVYDEELQEGHVLVVPQNFVAVAAKAQSENFEYV
8 LPVLRWLKLSAEGHSLKHNAMFVPHYNLNANSVIYALGRARLQVVCNCGNTVFDGGELEAGRALTPVQNFVAVAAKSLSERFTV
9 LPALRQFGLSAQYVVLRYRNGIYSPHWNLNANSVIYVTRGKGRVNVNCGNAVFDGELRRGQLLVVPQNFVVAEQGGEQGLEVY
      . * . : * . : : * : * : : : * . : : : * . * * * . * : . :
1 VFNTNDNALFSTAAGRTSPLRGI PVGLANAYRLSQEEARRIKLNR-DEAVLFQP---GSRSRGRASA---
2 AFKTNPSMVSHTAGKSSIFRRLPTDVLANAYRISREAAQLKHNRRGDEFGAFTPIQYKSYQDVYNAAES---
3 SFKTNDRAMTSPLAGRTSVLGGMPEEVLANAFQISREDARKIKFNN-QQTTLTSG---ESSHMRDDA---
4 AFKTEENAFINTLAGRTSFLRALPDEVLANAYQISREARQLKYNR-QETIALSS---SQORRAVV---
5 AFKTDSPNIAFAGENSIDNLPPEVVANSYGLPREQARQLKNNN-PFKFFVPPSQ---QSLRAVA---
6 AFKTDSPNIAFAGENSIDNLPPEVVANSYGLPREQARQLKNNN-PFKFFVPPSE---QSLRAVA---
7 AFKTDSPNIAFAGENSIDNLPPEVVANSYRLPREQARQLKNNN-PFKFFVPPFDH---QSMREVA---
8 AFKTDSPNIAFAGENSIDNLPPEVVANSYRLPREQARQLKNNN-PFKFFVPPFDH---QSMREVA---
9 VFKTHNAVSSYIK--D-VFRAIPSEVLNSYLNQGSQVRQLKYQG-NSGPLVNP-----
      * * . : : : * * : : : : : : : * * : . * * : . * * : . * * : . * * : . * * :
```

Diskussion

Clustalw Alignment verschiedener Glycinine (Walnuss (Ber e 2), Reis, Cashew (Ana o 2), Mandel, Erdnuss (Gly 1, Ara h 3/4, iso-Ara h 3), Springbohne und Soja) mit kursiv markierten Methioninresten, fettgedruckten Cysteinen und die Lage der Disulfidbrücke ist mit schwarzen Pfeilen angedeutet. AS 311 von Koppelman und AS 113 in dieser Arbeit sind grau unterlegt, den Start des reifen Proteins und die Proteaseschnittstelle zeigen graue Pfeile und fett gedruckte AS. (*) Identische AS in allen Sequenzen, (:) hoch konservierter Bereich, (.) schwach konservierter Bereich.

Dieses Alignment zeigt die hohe Homologie vor allem der für die Ausbildung der Disulfidbrücken wichtigen Bereiche, so dass die Ergebnisse von Soja auf die anderen Glycinine übertragbar sein sollten. Somit sollte zwischen den Cysteinen 88 (saure Untereinheit) und 332 (basische Untereinheit) eine Disulfidbrücke entstehen, wie dies auch bereits vermutet wurde (Koppelman *et al.*, 2003). Koppelman *et al.* beschrieben außerdem, dass ein mittlerer Bereich ab Aminosäure 311 starten und durch eine nicht vollständige posttranslationale Spaltung entstehen würde, wobei auch er bei der N-terminalen Sequenzierung die Aminosäureabfolge EEDQ gefunden hat. Diese Sequenz ist bei dem rekombinanten Ara h 3 jedoch nicht vorhanden, hier findet sich wie bei Gly 1 EEDR. Sie liegt nur auf der Sequenz von Ara h 4 und startet bereits bei Aminosäure 113 (in dem Alignment eingezeichnet wurde die homologe Sequenz bei Gly 1). Das Alignment der Isoformen von Ara h 3/4 wird in Tab. 20 gezeigt. Diese Aminosäureabfolge konnte über N-terminale Sequenzierungen sowohl in der ein-dimensionalen SDS-PAGE als auch in der zweidimensionalen PAGE (IEF / LDS-PAGE bzw. BN-PAGE / LDS-PAGE) gefunden werden. Dieses Protein könnte tatsächlich durch unvollständige Prozessierung entstanden sein, sein N-Terminus startet aber anders als von Koppelman *et al.* (2003) postuliert, was auch durch die unmittelbare Nachbarschaft mit den anderen sauren Untereinheiten der Isoformen im 2D-Gel deutlich wurde. Würde die Sequenz dieses Proteins tatsächlich unmittelbar vor der Proteaseschnittstelle starten, so sollte es nach theoretischer Ableitung einen basischen pI von 9,27 aufweisen (www.expasy.org/cgi-bin/protparam). Startet es hingegen bei Aminosäure 113, dann würde es einen theoretischen pI von 4,78 aufweisen. Dieses stimmt mit der Lage des Proteinspots im 2D-Gel neben den anderen sauren N-terminalen Untereinheiten der Isoformen überein (Abb. 18).

Bei einer zunächst zweidimensionalen Auftrennung (IEF / LDS-PAGE) von iso-Ara h 3 (Spot 6, siehe 3.1.2.4), einer erneuten Reduktion und Auftrennung in der LDS-PAGE erfolgte ein weiterer Zerfall in zwei kleinere Untereinheiten (~21 kDa) und (~12 kDa). Auch dies widerlegt die Hypothese von Koppelman *et al.* (2003). Die kleinere Untereinheit könnte einem Teil der sauren N-terminalen Untereinheit entsprechen. Sie kann aber nicht nur aus 15 Aminosäuren gebildet werden (theoretisches MG 1912 Da, pI 9,99). Hingegen wäre es möglich, dass sie dem N-terminalen Bereich von iso-Ara h 3 bis zur Aminosäure 112 (theoretisches MG 13 kDa, pI 8,57) entspricht. Dann wäre die größere Untereinheit der Bereich ab Aminosäure 113 bis zur Protease-Schnittstelle (theoretisches MG 22,5 kDa, pI 4,83) und zusammengesetzt würde sich wieder der saure N-terminale Bereich von iso-Ara h 3 ergeben (theoretisches MG 35,5 kDa, pI 5,14). Weitere N-terminale Sequenzierungen sind somit notwendig, um den Zerfall von iso-Ara h 3 abschließend erklären zu können.

Mit dem gezeigten Alignment wird aber noch eine weitere Besonderheit der Glycinine und Viciline deutlich. Innerhalb der Leguminosen und der Nüsse sind viele Kreuzreaktivitäten beschrieben worden (Moneret-Vautrin *et al.*, 1999, Teuber *et al.*, 1999, Leon *et al.*, 2003, Roux *et al.*, 2003, Wang *et al.*, 2003, Wensing *et al.*, 2003). Wenn nun nicht nur eine sehr hohe Sequenzhomologie mit großer Aminosäureidentität sondern auch eine vergleichbare 3D-Struktur vorhanden ist, dann wäre eine weitere Erklärung für die Kreuzreaktivitäten über konformationelle Epitope innerhalb der Leguminosen

und Nüsse gefunden. Patienten können IgE-Antikörper besitzen, die mit anderen Leguminosenspezies immunologische Kreuzreaktivitäten aufweisen (Eigenmann *et al.*, 1996). Auch im Rahmen dieser Arbeit konnten derartige Beobachtungen gemacht werden: bei vier Patientenseren aus Heidelberg (Sojaallergiker mit CAP-Klassen von 0 - 2) konnten im Immunoblot Erdnussbanden detektiert werden, obwohl kein spezifisches IgE gegen Erdnuss nachweisbar war. Umgekehrt zeigten alle Erdnussallergiker auch immunologische Reaktionen gegen Soja, teilweise auch gegen Lupine. Inwieweit diese immunologischen Kreuzreaktionen auch klinische Relevanz besitzen, muss sicher für jeden Patienten getrennt bestimmt werden. Die vielen homologen Strukturen innerhalb der Leguminosen und Nüsse sollten aber aufgrund der Schwere der allergischen Reaktionen gerade auf diese Nahrungsmittel bei entsprechenden Diätvorschlägen für diese Patienten berücksichtigt werden.

4.2 Charakterisierung von Ara h 3/4 und Isoformen durch Epitopmapping

Um die Erdnussallergene Ara h 3/4 und Isoformen Gly 1, Ara h 3, Ara h 4, Trypsin Inhibitor und iso-Ara h 3 direkt miteinander vergleichen zu können, sollten die Bindungsstellen mittels Epitopmapping von zwei Patientenseren (JG3, CAT) und zwei monoklonalen Antikörpern (PEI-7B2, Pn-x) auf den einzelnen Sequenzen bestimmt und verglichen werden. Dabei sollte überprüft werden, ob die mit der Jameson-Wolf-Vorhersage als antigene Bindungsstellen vorhergesagten Bereiche auch bei den Erdnussallergenen gefunden werden können.

Im Unterschied zu den meisten Veröffentlichungen, bei denen IgE-Epitope für ein Allergen (Cardaba *et al.*, 1998, Garcia-Casado *et al.*, 2003) oder Antikörperbindungsstellen eines Antikörpers (Gruber *et al.*, 2004) charakterisiert wurden, wurden in dieser Arbeit fünf Isoformen eines Erdnussproteins parallel untersucht. Die Konstruktion der synthetischen Peptide für das Epitopmapping erfolgte über eine Kombination bisheriger Ergebnisse (IgE- und Antikörperbindung im Immunoblot an die N- und C-terminalen Untereinheiten aller Isoformen mit unterschiedlichen Intensitäten, Auftreten einer weiteren Untereinheit ab AS 113) mit den veröffentlichten IgE-Epitopen für das Ara h 3 (Rabjohn *et al.*, 1999). Da der Platz auf den vier Membranen auf je 425 Peptide begrenzt war und die Inkubation mit Patientenserum bzw. monoklonalem Antikörper jeweils parallel erfolgen sollte, mussten je zwei identische Filter mit einer ausreichenden Anzahl von Kontrollpeptiden als Hintergrundkontrolle hergestellt werden. Somit wurden die beiden längsten Sequenzen (Ara h 3/4 und iso-Ara h 3) mit der höchsten Variabilität innerhalb der Isoformen (76 % Sequenzidentität) komplett synthetisiert und von den anderen Isoformen mit einer 92 bis 94 %igen Sequenzidentität (Ara h 3, Ara h 4 und Gly 1) jeweils die ausgewählten Bereiche mit Aminosäureaustauschen. Auf die Synthese des Trypsin Inhibitors wurde verzichtet, da dieser bisher nur über eine rekombinante Expression als mögliche Isoform identifiziert wurde und zu der N-terminalen Untereinheit von Ara h 4 eine Homologie von 96 % aufweist (Dodo *et al.*, 2004).

Bei der Auswertung der Reaktivitäten der monoklonalen Antikörper und Patientenseren wurde deutlich, dass der Aufbau der Filter einige bis dahin unerkannte Schwierigkeiten enthielt. So war bei der Synthese der Teilbereiche der anderen Isoformen nicht aufgefallen, dass sich die Aminosäureabfolge der Sequenzen durch Aminosäureeinschübe oder -deletionen erheblich verschieben würde. Bei dem Alignment der Sequenzen wurden die homologen Bereiche durch Bindestriche zusammengestellt, die bei der Synthese der Peptide dann entfielen, so dass auch die beiden längsten vollständig synthetisierten Sequenzen eine erheblich verschobene

Diskussion

Aminosäureabfolge zeigten. Dieses erschwerte die gezielte Bestimmung einzelner homologer Epitope innerhalb der fünf Isoformen vor allem bei den Patientenseren, die im Unterschied zu monoklonalen Antikörpern polyklonale IgE-Antikörper enthalten und dadurch mehrere Aminosäurebereiche als IgE-reaktiv erkennen können.

Es wurde deutlich, dass mit der Auswertung unterschiedlicher Reaktivitäten bei den einzelnen Isoformen von Ara h 3/4 gleichzeitig ein Alanin-Scan ähnliches System vorlag (Rabjohn *et al.*, 1999, Ayuso *et al.*, 2002). Dabei werden einzelne Aminosäuren eines reaktiven Bereiches durch schrittweisen Austausch mit Alanin ersetzt und die Reaktivitätsunterschiede ausgewertet, so dass für die Bindung essentielle Aminosäuren erkannt werden. In dieser Arbeit wurden erstmalig die natürlicherweise vorkommenden Sequenzunterschiede der einzelnen Isoformen untersucht, so dass beobachtet werden konnte, ob diese für die Patienten wichtig oder vernachlässigbar sind.

Zunächst wurde die Bindungsstelle des monoklonalen Antikörpers PEI-7B2 bestimmt. Das gefundene Hauptepitop SPYSPH lag auf der Sequenz von Ara h 4 und konnte teilweise auf die Isoformen Ara h 3/4 und iso-Ara h 3 übertragen werden, allerdings zeigte der Antikörper in beiden Fällen eine deutlich geringere Färbung. In diesem Bereich (Tab. 17) zeigen die Isoformen Gly 1 und Ara h 3 eine 100 %ige Sequenzidentität, das Ara h 3/4 eine Deletion des zweiten Tyrosins, das Ara h 4 einen Aminosäureaustausch (Histidin an Stelle von Glutamin) und das iso-Ara h 3 eine vollständig andere Aminosäureabfolge, die lediglich ein ähnliches Motiv enthielt. Dieses Epitop liegt genau zwischen zwei Bereichen, die durch einen hohen antigenen Index gekennzeichnet sind. Dabei liegen diese für das Ara h 4 zwischen 1,87-3,4 (11 AS) vor und 1,4-3,4 (23 AS) hinter dem Hauptepitop. Bei den anderen Isoformen sehen diese Zahlen etwas anders aus: Ara h 3/4 1,84-3,4 (7 AS) bzw. 1,33-3,4 (30 AS) und iso-Ara h 3 1,25-3,4 (9 AS) bzw. 1,45-3,4 (13 AS). Somit könnte eine veränderte Aminosäureabfolge und ein nur ähnliches Motiv bei iso-Ara h 3 flankiert von sehr kurzen antigenen Bindungsstellen zu einer schwächeren Bindung von PEI-7B2 führen. Diese schwächere Reaktivität wurde bereits bei den immunologischen Nachweisen gefunden und konnte mit dem Epitopmapping bestätigt werden.

Die Bestimmung des Hauptepitopes SPYSPH konnte aber noch eine andere Beobachtung erklären. Der monoklonale Antikörper PEI-7B2 war auf Ara h 2 hin selektioniert worden und zeigte trotzdem eine Spezifität gegen Ara h 3/4 und Isoformen. Mischungsexperimente konnten zeigen, dass die Affinität zu Ara h 3/4 deutlich größer war als zu Ara h 2, so dass der Antikörper für eine Bindung an Ara h 2 im gleichen Ansatz in Konkurrenz zu Ara h 3/4 nicht zur Verfügung stand (Boldt *et al.*, 2003). Außerdem zeigte der Antikörper in hohen Konzentrationen eine Bindung an Ara h 1. Diese Sequenzabfolge findet sich auch beim Ara h 2 in den Epitopen 6 und 7, teilweise repetitierend (Gruber *et al.*, 2004), sowie bei Ara h 1 und Ara h 7. Die Sequenzen der beiden Ara h 2-Isoformen mit den eingezeichneten Epitopen von PEI-7B2, sowie die Sequenz von Ara h 7 und Ara h 1 werden im folgenden dargestellt.

Ara h 2 - Isoform I

RQQWELQGDRRCQSQLERANLRPCEQHLMQKIQRDEDSYGRD**PYSPS**QD**PYSPS**QDPDRRD**PYSPS**
PYDRRGAGSSQHQERCCNELNEFENNQRMCCEALQQIMENQSDRLQGRQQEQQFKRELRLNLPQQCGLRA
PQRCDLEVESGGRDRY

Ara h 2 - Isoform II

RQQWELRGDRRCQSQLERANLRPCEQHLMQKIQRDEDSYERD**PYSPS**QD**PYSPYSPY**DRRGAGSSQH
QERCCNELNEFENNQRMCCEALQQIMENQSDRLQGRQQEQQFKRELRLNLPQQCGLRAPQRCDLDVESGGR
DRY

Diskussion

Ara h 7

TRWDPDRGSRGSRWDAPSRGDDQCQRQLQRANLRPCEEHMRRRVEQEQQEQDE**YPYS**RRGSRGRQPGE
SDENQEQRCCNELNRFQNNQRMCQALQQILQNSFWVPAGQEPVASDGEQAQELAPELRVQVTKPLRPL

Ara h 1

MRGRVSPMLLLLGIILVLASVSATHAKS**SPY**QKKTENPCAQRCLQSCQQEFPDDLKQKACESRCKLEYDP
RCVYDPRGHTGTTNQRSPGERTRGRQPGDYDDRRQPRREEGGRWGPAGPREREREEDWRQPREDWRRP
SHQQPRKIRPEGREGEQEWGTPGSEVREETSRNNPFYFPSRRFSTRYGNQNGRIRVLQRFQDQRSRQFQN
LQNHRIVQIEAKPNTLVLPKHADADNILVIQQGQATVTVANGNNRKSFNLDDEGHALRIPSGFISYILNR
HDNQNLRVAKISMPVNTPGQFEDFFPASSRDQSSYLQGFSRNTLEAAFNAEFNEIRRVLLEENAGGEQE
ERGQRRWSTRSSENEGVIKVSKEHVEELTKHAKSVSKKGSEEEGDI TNPINLREGEPLDSNNFGRLFE
VKPDKKNPQLQDLDMMLTCVEIKEGALMLPHFNSKAMVIVVVKGTGNLELVAVRKEQQQRGRREQEED
DEEEEGSNREVRRYTARLKEGDVFIMPAHPVAINASSELHLLGFGINAENNHRIFLAGDKDNVIDQIEK
QAKDLAAPPGSGEQVEKLIKQKESHFVSARPQSQSQSPSSPEKESPEKEDQEENQGGKGPLLSILKAFN

Interessanterweise stimmt das Hauptepitop von PEI-7B2 weitgehend mit dem für die Ara h 2-Isoformen bestimmten IgE-Epitop DPYSPS überein (Hales *et al.*, 2004). Dadurch erklärt sich auch, warum die eine Isoform, in der dieses Epitop dreifach vorhanden ist, deutlicher erkannt wird, als die andere Isoform.

Auch die beiden antigenen Bindungsstellen, die mit PEI-7B2 schwache Reaktivitäten zeigten, können mit der Selektion auf Ara h 2 erklärt werden. In diesen Bereichen waren auf allen Isoformen gleichmäßige repetitierende Aminosäuren wie Arginin, Glutamin, Glycin, Serin vorhanden, die auch das Hauptepitop flankierten und die kombiniert für einen erhöhten antigenen Index stehen. Bei Ara h 2 befinden sich diese Aminosäuren ebenfalls in unmittelbarer Nähe des SPYS-Motives und könnten so die Bindungsfähigkeit zu diesem Epitop erhöhen.

Die Auswertung des monoklonalen Antikörpers Pn-x ergab das Hauptepitop DEEEYD für die Isoformen Ara h 3/4, Ara h 3, Ara h 4 und Gly 1. Lediglich beim iso-Ara h 3 konnte dieses Sequenzmotiv nur teilweise gefunden werden, so war die homologe Sequenz hier DENRR. Darüber hinaus zeigte dieser auf Ara h 3/4 selektionierte Antikörper identische Bereiche wie PEI-7B2, bei denen ein größerer Bereich reaktiv war. Auch das von PEI-7B2 detektierte Hauptepitop wurde mit erfasst, was aus den immunologischen Voruntersuchungen nicht vorhergesagt werden konnte.

Somit konnte gezeigt werden, dass von den beiden monoklonalen Antikörpern die vorhergesagten antigenen Bindungsstellen oder direkt angrenzende Bereiche detektiert werden. Deutlich wurde die hohe Homologie innerhalb der vier Isoformen Ara h 3/4, Ara h 3, Ara h 4 und Gly 1, die sich durch sehr ähnliche Reaktivitäten auszeichneten. Ebenfalls war erkennbar, dass schon ein einziger Aminosäureaustausch bei den monoklonalen Antikörpern zu einer stark gesenkten Bindungsfähigkeit führen kann. Das iso-Ara h 3 lag mit der höchsten Variabilität innerhalb der Isoformen gleichwohl innerhalb der Bindungsbereiche der beiden Antikörper und zeigte ebenfalls, wenn auch schwächere Reaktivitäten mit den jeweiligen Hauptepitopen.

Da auch einige der Kontrollpeptide eine Färbung zeigten, wurde in diesen Fällen die Aminosäureabfolge genauer analysiert. Dabei zeigte sich, dass in den markierten Peptiden immer mindestens ein Histidin (H) und meistens ein Prolin (P) vorhanden waren, oft auch ein oder mehrere Tyrosine (Y). Diese Aminosäuren lagen auch in dem Hauptepitop von PEI-7B2 vor und wurden auch in allen anderen als reaktiv nachgewiesenen Einzelpeptiden gefunden.

Die IgE-Reaktivitäten von Patientenserum wurden bestimmt, um zu klären, ob die im Immunoblot nachgewiesenen Unterschiede in der Verteilung der IgE-Reaktivitäten den

Diskussion

N- und C-terminalen Untereinheiten von Ara h 3/4 und Isoformen auch bei den Sequenzen nachweisbar sind.

Das Patientenserum JG3 zeigte drei IgE-Epitope auf den N-terminalen Untereinheiten der Isoformen. Eine andere Verteilung wurde bei dem Patientenserum CAT gefunden. CAT zeigte eine gleichmäßige Verteilung der IgE-Epitope über die gesamte Sequenz von Ara h 3/4 und Isoformen, so waren von sieben Epitopen vier in den N-terminalen, eines überlappend und zwei in den C-terminalen Untereinheiten lokalisiert. Die Unterschiede der immunologischen Nachweise konnten somit auch bei dem Epitopmapping gefunden werden, wobei sich wie bei den monoklonalen Antikörpern zeigen ließ, dass das iso-Ara h 3 teilweise schwächere Reaktivitäten aufwies.

Die IgE-reaktiven Bereiche waren länger, als die reaktiven Bereiche der monoklonalen Antikörper. Da es sich bei den Patientenseren um polyklonale Antikörper handelt, werden viele kleinere Bereiche als IgE-reaktiv erkannt, die dann zu einem größeren überlappenden Bereich verschmelzen können. Um einzelne voneinander getrennte IgE-Epitope mit den dazugehörigen essentiellen Aminosäuren endgültig bestimmen zu können, müssten alle Aminosäuren im 1er Versatz für alle Isoformen gleichermaßen synthetisiert werden und dann mit einer großen Anzahl von Patientenseren gescreent werden.

Bei der Auswertung beider Patientenseren, sowie weiterer nicht gezeigter Versuche mit Patientenseren, wurde sehr schnell deutlich, dass die von Rabjohn *et al.* (1999) beschriebenen IgE-Epitope in der vorliegenden Arbeit mit europäischen Erdnussallergikern nicht oder nur in Teilen gefunden werden konnten. So stellten Rabjohn *et al.* fest, dass alle Patienten das Epitop 3 mit der Sequenz VTVRGGLRILSPDRK und jeweils ca. 1/3 die Epitope 1 (IETWNPNNQEFECAG), 2 (GNIFSGFTPEFLEQA) und 4 (DEDEYEYDEEDRG) erkannten. Die essentiellen Aminosäuren für die IgE-Bindung sind dabei durch einen Alanin-Scan bestimmt worden und hier unterstrichen dargestellt.

In dieser Arbeit wurden parallel alle Isoformen von Ara h 3/4 mit zwei Patientenseren auf ihre IgE-bindenden Bereiche hin untersucht. Ein Vergleich der bestimmten IgE-Epitope mit den von Rabjohn *et al.* beschriebenen wird in der folgenden Tabelle dargestellt. Dabei sind sowohl die essentiellen Aminosäuren, die über einen Alanin-Scan bestimmt wurden, unterstrichen als auch die in der vorliegenden Arbeit durch den Vergleich innerhalb der Isoformen bestimmten unterstrichen und zusätzlich durch Fettdruck hervorgehoben.

Diskussion

Tab. 19 Übersicht der gefundenen IgE-Epitope und Vergleich mit der Literatur (Rabjohn *et al.*, 1999).
Essentielle AS unterstrichen und in dieser Arbeit bestimmte AS zusätzlich durch Fettdruck hervorgehoben.

| Isoform | Epitop-Nr. und AS | Zusätzliche Epitope dieser Arbeit | Rabjohn <i>et al.</i> (1999) | | | |
|-----------------|--|--|---------------------------------------|---------------------|-----------------------------|---|
| | | | Epitop 1 | Epitop 2 | Epitop 3 | Epitop 4 |
| Ara h 3 | | | IETWNPNNQ EFECAG | GNIFSGFT PEFLEQA | VTVRGGL RILSPDRK | DEDEYE YDEEDRG |
| Ara h 3/4 | 1 (AS: 42-71) | | EFECAGVALSR LVLRNALRRP FYSNAPQE | | | |
| | 2 (AS: 290-119) | STYE EP <u>AOQGRRHQS</u> ORPP <u>RRFQGQDQSQQ</u> | | | | |
| | 3 (AS: 184-201) | Q E <u>FLRYQQSRRRSLPYSP</u> <u>SPQPKQEDR</u> | | | | |
| | 3 (AS: 200-217) | DREF <u>SPRGQHGR</u> RERAGQ | | | | |
| | 4 (AS: 275-298) | | | | <u>RILSPDRKRRQ</u> QYERP | |
| | 5 (AS: 311-336) | | | | | <u>YDEEERQDRR</u> <u>RGRGSRGSGNG</u> <u>IET</u> |
| | 6 (AS: 335-356) | ETICTASFKKN <u>IGRNRSPD</u> IYN | | | | |
| 7 (AS: 365-392) | KTANEL <u>QLNLLILRWLGLS</u> AEYGNLYRNAL | | | | | |

In dieser Übersicht zeigte sich, dass ein Teil von Epitop 1 identisch zu dem beschriebenen Epitop 1 war, dass aber in dieser Arbeit durch den Vergleich mit den anderen Isoformen erfolgten „Alanin“-Scans andere Aminosäuren für essentiell gefunden wurden (in fett gedruckt). Die Epitope 3 und 4 stimmten hingegen mit einem Teil der beschriebenen Epitope 3 und 4 überein und zeigten eindeutig die gleichen essentiellen Aminosäuren.

Da sie große Übereinstimmungen innerhalb der einzelnen Aminosäureabfolgen und auch zu der von JG3 erkannten Sequenz auf Ara h 2 (Gruber *et al.*, 2004) haben, scheinen die sich wiederholenden Aminosäuren (Arginin, Glutamin, Glutaminsäure, Glycin, Histidin und Prolin) für die Bindung wichtig zu sein. Für die AS (Arginin, Glutaminsäure und Prolin) war dies bereits beschrieben (Rabjohn *et al.*, 1999).

Bei den Untersuchungen mit dem Patientenserum JG3 zeigte sich eine enge Übereinstimmung mit dem Bindungsverhalten des monoklonalen Antikörper PEI-7B2. Dieses war bereits in den immunologischen Nachweisen aufgefallen und konnte jetzt auch auf der Basis des Epitopmappings bestätigt werden.

Ganz anders waren die Ergebnisse des Epitopmappings des Patientenserums CAT. Bereits über die immunologischen Nachweise war bekannt, dass dieses Serum auch IgE-Reaktivitäten mit den C-terminalen Untereinheiten der Isoformen von Ara h 3/4 zeigte. So konnten von den sieben IgE-reaktiven Bereichen drei bereits mit JG3 gefunden werden. Zwei weitere IgE-reaktive Bereiche wurden auf der C-terminalen Untereinheit gefunden. Vor allem bei Epitop 7 fällt dabei die große Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz zu Epitop 4 auf, für das die Aminosäuren Leucin und Isoleucin als für die IgE-Bindung essentiell bestimmt worden waren. Auch in dieser Arbeit wurde deutlich, dass die Leucine für die Bindungsfähigkeit notwendig sind.

Somit zeigte dieses Patientenserum eine Übereinstimmung in drei Epitopen mit den beschriebenen Epitopen (Rabjohn *et al.*, 1999) und erstmalig auch die IgE-Reaktivität auf den C-terminalen Untereinheiten der Isoformen von Ara h 3/4.

Bei einem Epitopmapping lassen sich nur lineare Epitope eindeutig bestimmen, während konformationelle Epitope nur über Vermutungen zugeordnet werden können, wenn die 3D-Struktur der Proteine bereits bekannt ist. Für die Patientenserien spielen neben linearen Epitopen die konformationellen Epitope, die durch die Faltung der Proteine entstehen, eine entscheidende Rolle. Viele Allergene der Gräser bilden konformationelle Epitope aus, die sensibilisierend wirken können, während die Nahrungsmittelallergene wie die Erdnüsse auch über sensibilisierende lineare Epitope verfügen. Um nun entscheiden zu können, welche IgE-reaktiven Bereiche für die Patienten auch klinische Relevanz haben, könnten synthetische Peptide, wie es auch von Gruber *et al.* (2004) vorgeschlagen wird, als Sonde zum Aufspüren von IgE-Epitopen genutzt werden. Somit könnte dann gezielt überprüft werden, welche Bereiche der Erdnussallergene Ara h 3/4 und Isoformen für die einzelnen Patienten entscheidend sind. In einer Arbeit von Madan *et al.* (2004) konnte sogar bereits gezeigt werden, dass synthetische Peptide zur Detektion allergischer Aspergillose genutzt werden können.

4.3 Charakterisierung der Erdnussallergene durch *in vitro* Simulation des menschlichen Gastrointestinaltraktes

Für die Charakterisierung der Erdnussallergene (Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3/4 und Isoformen, Ara h 5, Ara h 6, Ara h 7, Ara h 8, LTP und Oleosin) sollte eine *in vitro* Simulation des menschlichen Gastrointestinaltraktes entwickelt werden, um die Frage zu klären, wie die Erdnussallergene durch die Enzyme des Gastrointestinaltraktes prozessiert wurden, bevor sie resorbiert werden. Dabei sollte überprüft werden, ob bei der simulierten Passage durch den Körper ein Zerfall von Ara h 3/4 und Isoformen (Ara h 3, Ara h 4, Gly 1 und iso-Ara h 3) in ihre Untereinheiten beobachtet werden kann und ob eine weitere Degradation erfolgt.

Die Passage der Nahrungsmittel durch den menschlichen Gastrointestinaltrakt beginnt mit der oralen Nahrungsaufnahme. Neben der mechanischen Zerkleinerung der Nahrung durch das Kauen beginnt im Mund ein erster enzymatischer Aufschluss durch Speichelproteine wie α -Amylase und Lysozym. Daher sollte zunächst mit der BN-PAGE überprüft werden, ob Unterschiede in der Speichelzusammensetzung bei verschiedenen Versuchspersonen nachweisbar sind, die neben einer individuellen Kautechnik zu einer veränderten Allergenextraktion führen könnten. In der Abb. 42 wurde gezeigt, dass bei den sieben Probanden neun gleichartige Speichelproteinbanden (25 – 250 kDa) zu finden waren. Die Intensitäten dieser Banden wiesen große Unterschiede auf, wobei auch die Speichelzusammensetzung einer Versuchsperson variabel schien. Ein Mensch kann 1-2 l Speichel am Tag bilden, der je nach Nahrungszusammensetzung muköser oder wässriger wird und einen schwankenden pH-Wert von 5,5-7,8 aufweist (Rehner, 1999). Mit der nativen BN-PAGE konnten diese individuellen Unterschiede identifiziert und mit der Gegenüberstellung der Speichelproteine vor und nach der Nahrungsaufnahme gezeigt werden, wie wichtig schon dieser erste enzymatische Aufschluss bei der Nahrungsmittelallergie sein kann. Allergische Reaktionen können bereits unmittelbar nach der Nahrungsaufnahme im Mundraum entstehen und sich in Form von Schleimhautschwellungen des Rachens oder der Zunge äußern (Bachert *et al.*, 2001). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es bereits durch das Kauen zu einer schleichenden Freisetzung von Allergenen kommt.

Die Amylase führt aber nicht nur zu einem enzymatischen Aufschluss der Nahrung sondern auch zu einer besseren Löslichkeit der Proteine durch die Aufhebung der

Maillard-Reaktion in verarbeiteten Produkten (Kopper *et al.*, 2005). Die gute Löslichkeit der Proteine direkt nach der Nahrungsaufnahme und der mechanischen Zerkleinerung durch das Kauen wurde durch eine hohe Proteinkonzentration und eine den laborchemischen Extrakten vergleichbare Allergenextraktion im BN-PAGE- und SDS-PAGE-Gel gezeigt (Abb. 43 und 44). Vor allem mit der BN-PAGE, die die Proteine in ihrer weitgehend nativen Form darstellte, wurde deutlich, dass es neben einer allgemeinen gleichartigen Proteinextraktion individuelle Konzentrationsunterschiede in der Allergenzusammensetzung gab. Dieses konnte mit der SDS-PAGE noch genauer untersucht werden. So wurden von zwei der fünf Versuchspersonen, die natur geröstete Erdnüsse gekaut hatten, verstärkt Ara h 3/4 und Isoformen extrahiert. Insgesamt konnten bei allen Erdnussextrakten aus gekauten Erdnüssen die für die laborchemischen Extrakte beschriebenen Proportionen von 90 % hochmolekularen Komplexen zu 10 % niedermolekularen Erdnussproteinen auch bei der *in vitro* Simulation des menschlichen Gastrointestinaltraktes gefunden werden. Besonders deutlich wurde die gleichartige Extraktion der Erdnussallergene auch bei dem Vergleich IgE-reaktiver Proteine (Abb. 5 und 45). Die bessere Löslichkeit der Proteine in den Extrakten aus gekauten Erdnüssen führte bei einer identischen Proteinkonzentration (15 µg / cm) zu einer stärkeren Bindung der IgE-Antikörper und somit einer stärkeren Färbung der Proteinbanden.

Bei der simulierten Passage der Erdnüsse durch den Gastrointestinaltrakt sollte überprüft werden, ob kulturelle Unterschiede in der Zubereitung der Erdnüsse oder Röstprozesse zu einer Veränderung der Allergenzusammensetzung und damit zu einer Veränderung der Allergenität führen können (Koppelman *et al.*, 1999, Beyer *et al.*, 2001, Chung *et al.*, 2003, Maleki *et al.*, 2003, Wal, 2003, Kopper *et al.*, 2005). Insgesamt wird in diesen Veröffentlichungen eine Zunahme der Allergenität durch das Rösten der Erdnüsse beschrieben. Beyer *et al.* (2001) beschrieben darüber hinaus eine Abnahme der Allergenität durch Kochen oder Fritieren von Erdnüssen, so dass Menschen des chinesischen Kulturkreises durch diese veränderte Zubereitungsart keine Erdnussallergien ausbilden würden.

In dieser Arbeit konnten bei einem Vergleich verschiedener Erdnussextrakte aus natur gerösteten, keimfähigen gekochten oder fritierten Erdnüssen oder aber verarbeiteten Erdnussprodukten direkt nach dem Kauvorgang keine Unterschiede in der Allergenzusammensetzung (Abb. 44) gefunden werden. Lediglich in der Konzentration einzelner Allergene zueinander konnten Unterschiede gezeigt werden. Diese führten jedoch nicht zu einer Verschiebung der Allergenproportionen von 90 % hochmolekularen zu 10 % niedermolekularen Proteinen. Eine Veränderung in der Allergenität ließ sich ebenfalls nicht nachweisen. Die Konzentrationsunterschiede innerhalb der verschiedenen Extrakte korrelierten immer mit einer etwas veränderten Extraktion der Majorallergene (Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3/4 mit Isoformen) oder allen zusammen. Eine Abnahme der Allergenität durch eine Degradation dieser Majorallergene beim Kochen oder Fritieren konnte serologisch nicht beobachtet werden.

Der weitere Weg durch den menschlichen Gastrointestinaltrakt führte dann zu einer Inkubation des Speichel-Protein-Gemisches mit künstlichem Magensaft (Enzynorm) und anschließend künstlichem Pankreassaft (Kreon). Im Gegensatz zu Veröffentlichungen von Astwood *et al.*, 1996 und Kopper *et al.*, 2005, bei denen einzelne Enzyme wie Chymotrypsin, Trypsin und Pepsin chemisch hergestellten Erdnussextrakten zugesetzt und dann die Wirkung dieser Enzyme jeweils isoliert betrachtet worden waren, wurden die gekauten Proteinproben in dieser Arbeit mit Medikamenten inkubiert, die den natürlichen Verdauungstrakt des Menschen bei Dysfunktionen unterstützen sollen und somit dem natürlichen System entsprechen. Damit wurde analog zu Veröffentlichungen von Kortekangas-Savolainen *et al.* (1993) und Becker

(1997) unmittelbar am menschlichen Gastrointestinaltrakt simuliert, ob und wann die hochmolekularen Proteinkomplexe aus Ara h 1 und Ara h 3/4 mit Isoformen und die niedermolekularen Erdnussproteine bei ihrer Passage durch den Körper zersetzt werden. Im Gegensatz zu diesen Arbeiten wurde hier die Passage der Erdnussallergene dabei sowohl mit der BN-PAGE als auch mit der SDS-PAGE und über die immunologischen Nachweise mit Patientenseren und monoklonalen Antikörpern verfolgt.

Der Magensaft des Menschen (1 – 3 l / Tag) enthält neben Pepsin und abgeschluckter α -Amylase vor allem Mucus, also Magenschleim, und Salzsäure, die einen pH-Wert von 1,5-2,5 vor Nahrungsaufnahme bis 6,5 nach Nahrungsaufnahme einstellt. Zusätzlich zu dem sauren enzymatischen Aufschluss der Nahrung in Polypeptide findet hier eine weitere mechanische Zerkleinerung, aber auch eine Lagerung der Nahrung vor dem Weitertransport in den Dünndarm statt. Beim Übertritt in den Dünndarm werden dem Nahrungsbrei (Chymus) Pankreasenzyme wie Trypsin, Chymotrypsin und Lipasen zugefügt, die in einem basischen pH-Bereich von 7,5 – 8,5 ihre optimale Wirkung entfalten können. Außerdem werden hier Gallensäuren zugesetzt, die eine Solubilisierung von Lipiden und damit ihre Resorption ermöglichen (Eckert *et al.*, 1993). Dieses komplexe Zusammenspiel verschiedener Enzyme und mechanischer Zerkleinerung lässt sich nicht durch die Inkubation einzelner Proteine mit einzelnen Enzymen darstellen. Die Kombination aus Kauvorgang, Inkubation mit künstlichem Magensaft und künstlichem Pankreassaft bei leichtem Schütteln und 37 °C stellte die Passage durch den menschlichen Gastrointestinaltrakt in dieser Arbeit sehr gezielt nach.

Mit der BN-PAGE konnte erstmals gezeigt werden, dass die hochmolekularen Proteinkomplexe aus Ara h 1 und Ara h 3/4 und Isoformen bei der Passage durch den Gastrointestinaltrakt auch nach 24stündiger Inkubation mit Enzynorm oder Kreon noch nachweisbar waren (Abb. 47 und 48). Sehr deutlich wurde in den simulierten Passagen von natur gerösteten, gekochten oder fritierten Erdnüssen oder aber verarbeiteten Erdnussprodukten, dass auch nach 24stündiger Inkubation noch eine Freisetzung von Allergenen aus der Matrix des Erdnussbreies stattfand. Diese Matrix schützt die hochmolekularen Proteine vor einem vollständigen Verdau innerhalb kurzer Zeit und erklärt damit den großen Unterschied zu der bisher beschriebenen Verdauresistenz der Allergene von 60 min für Ara h 2 (Astwood *et al.*, 1996). Der Einfluss von Matrixeffekten konnte bereits von Becker (1997) gezeigt werden. Auch hier führte die Matrix zu einer Verdauresistenz von >80 min speziell für Ara h 1. Da die Passage von Nahrungsmitteln je nach Art und Zusammensetzung durch den Gastrointestinaltrakt unterschiedlich lange dauern kann (30 min bis ca. 24 Stunden), wurde in dieser Arbeit der gesamte Zeitraum überwacht und mit der BN-PAGE das Vorliegen von Einzelallergenen und Komplexen in den einzelnen Verdauerschritten auch weitgehend nativ verfolgt. Es konnten keine Unterschiede bei der *in vitro* Simulation bezüglich eines Abbaus der hochmolekularen Proteinkomplexe aus Ara h 1 und Ara h 3/4 mit Isoformen auf Grund der unterschiedlichen Zubereitungsart der Erdnüsse, natur geröstet (Abb. 47 und 48), gekocht oder fritiert (Abb. 53-56), verarbeitete Erdnussprodukte (Abb. 63-64), gefunden werden. Weder in den gekochten bzw. fritierten Erdnüssen noch in den verarbeiteten Erdnussprodukten konnte eine vorzeitige Degradation dieser Komplexe nachgewiesen werden. Lediglich die Proteinkonzentration (Abb. 57, 58, 62, 67 und 68) war teilweise deutlich reduziert. Somit müssen diese Matrixeffekte unabhängig von der Verarbeitungsform der Erdnüsse auftreten, da auch bei den verarbeiteten Produkten keine Einflüsse der anderen Proteine nachweisbar waren, sondern nur Erdnussprotein gefunden werden konnte. Die Hypothese von Teuber (2002), dass vermutlich viele Faktoren wie Protein-Interaktionen, Phytochemikalien und Protease-

Inhibitoren zusammenwirken, um ein Protein für den menschlichen Organismus antigen zu machen und dass die dadurch entstehenden Matrixeffekte dann ebenfalls eine Rolle spielen, wurde durch die große Nähe dieser *in vitro* Simulation zu dem menschlichen Gastrointestinaltrakt bestätigt. Dieses kann auch erklären, warum Astwood (1996) diesen Matrixeffekt nicht nachweisen konnte, da er im Gegensatz zu dieser Arbeit mit laborchemisch hergestellten Extrakten gearbeitet hat.

Im Unterschied zu den hochmolekularen Proteinkomplexen waren die niedermolekularen Proteine schon nach kurzer Enzymeinwirkungszeit nicht mehr nachweisbar. Dieses war besonders gut mit der zweidimensionalen Auftrennung der Erdnussproteine mittels IEF und LDS-PAGE während der simulierten Verdauung zu verfolgen (Abb. 46, 49 und 50). Direkt nach dem Kauvorgang waren die niedermolekularen Proteine in der Spotansammlung unter 20 kDa mit der Coomassie-Färbung und immunologisch mit den Kaninchenseren (MAP 3 (α -Ara h 2) bzw. α -Ara h 6) nachweisbar. Bereits nach 1stündiger Inkubation mit Enzynorm und während der Inkubation mit Kreon waren sie jedoch nicht mehr detektierbar. Dieses wurde auch bei der simulierten Passage der Peanut-Cracker in der SDS-PAGE (Abb. 59-61) gefunden, die einen sehr hohen Ara h 2-Anteil aufwiesen, der aber bereits nach 1stündiger Inkubation erheblich reduziert war. Die obere Bande von Ara h 2 ließ sich nach 3 Stunden Inkubation mit Enzynorm noch detektieren, verschwand dann aber auch weitgehend und war während der Inkubation mit Pankreassaft nicht mehr nachweisbar.

Sen *et al.* (2002) fanden unter gastrointestinalen Bedingungen Ara h 2-Fragmente nach einer Reduktion der Disulfidbrücken. Eine solche Reduktion findet im natürlichen System jedoch nicht statt. Da in dieser Arbeit das natürliche System dargestellt wurde, konnten diese Ara h 2-Fragmente nicht gefunden werden, da eine Reduktion der Disulfidbrücken nicht durchgeführt wurde.

Somit konnte weder für das Majorallergen Ara h 2 noch für das Ara h 6 eine Verdauungsresistenz nachgewiesen werden.

In den Extrakten aus gekauten Erdnüssen konnten analog den laborchemisch hergestellten Extrakten Glykostrukturen gefunden werden. Diese blieben in der zweidimensionalen Auftrennung auch nach 3stündiger Inkubation mit Enzynorm mit Concanavalin A und Peanut Agglutinin detektierbar. Dies könnte ein weiterer Grund für die Allergenität sein. So sieht van Ree *et al.* (2000) zwar eine IgE-Bindung an die Zuckerstrukturen (N-Glykane) der untersuchten Allergene (Lol p 11, Ole e 1 und Ara h 1), hält diese aber für klinisch nicht relevant. Im Gegensatz dazu hält van Ree *et al.* (2005) die Arabinogalaktane von Art v 1 für die IgE-Bindung und die Verstärkung der allergischen Reaktion verantwortlich. Da die Zuckerstrukturen den Verdauungsvorgang überstehen, könnten sie für einige Patienten durchaus sensibilisierend wirken. Für ein Allergen der Sojabohne (Gly m Bd 28K) konnte bereits gezeigt werden, dass die N-Glycane direkt an der IgE-Bindung beteiligt sind (Hiemori *et al.*, 2000). Und auch für ein Allergen der Platane (Pla l 1) konnte eine IgE-Bindung der N-Glycane nachgewiesen werden (Calabozo *et al.*, 2002).

Ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit war, dass auch in den verarbeiteten Erdnussprodukten (Peanut Cracker, Corny- und Snickers-Riegel, sowie Erdnussbutter) trotz vielfältiger Zutaten nur Erdnussbanden gefunden werden konnten. Dieses lässt sich nicht einfach erklären, denn auch Astwood (1996) konnte bereits zeigen, dass einige Milch- und Eiallergene durchaus eine höhere Verdauungsresistenz aufweisen. Außerdem sollten diese Proteine den Verarbeitungsprozess überstehen, da Nahrungsmittelallergien gegen viele andere Zutaten wie Weizen, Lecithin usw. meist durch

Diskussion

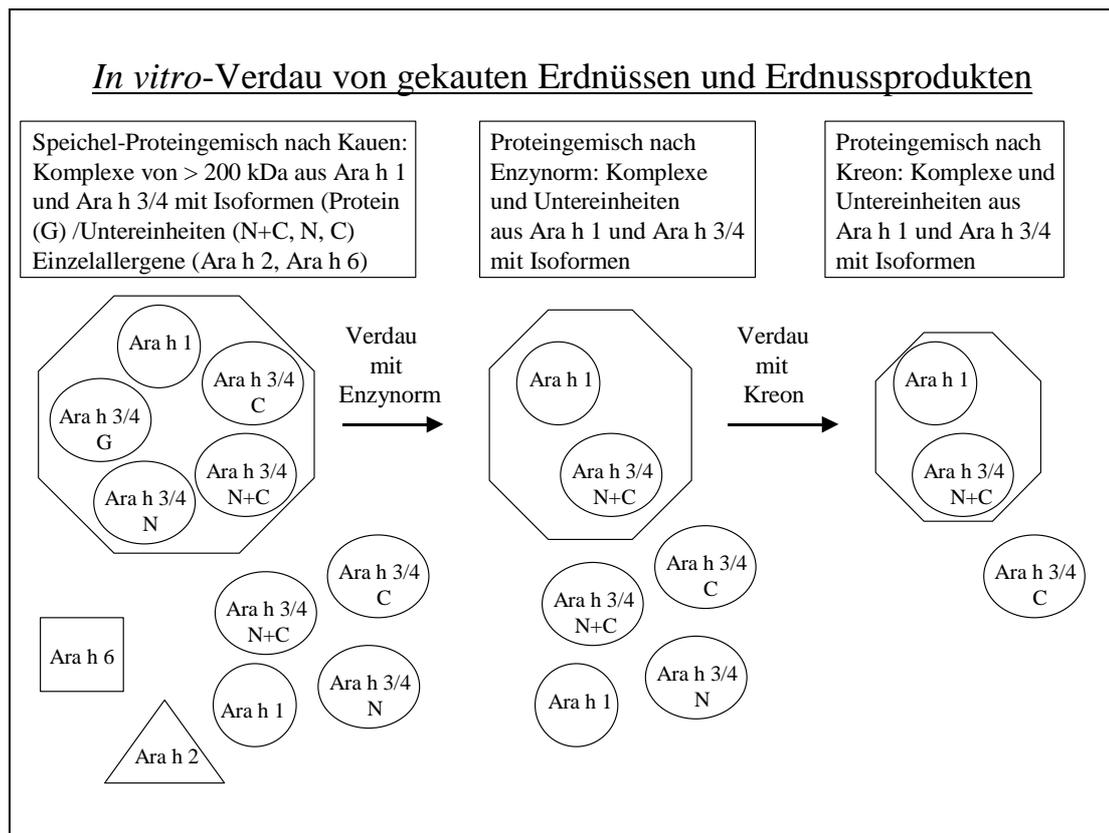
verarbeitete Produkte ausgelöst werden oder über Kreuzreaktivitäten mit Aeroallergenen (Ballmer-Weber *et al.*, 2003).

Warum konnten nun kaum andere Proteinbanden gefunden werden? Lediglich bei dem Corny-Riegel tauchte eine Proteinbande (42 kDa, Abb. 63) auf, die bereits nach 2stündiger Inkubation mit Enzynorm nahezu verschwunden war. Umgekehrt fanden auch andere Autoren (Schäppi *et al.*, 2001, Lepp *et al.*, 2004), dass Erdnussproteine in undecklierten Lebensmitteln vorhanden sein können. Dabei stellten Schäppi *et al.* in 19 von 46 untersuchten Produkten undeckliert vorhandene Erdnussbestandteile von 0,05-0,5 % fest. Und Lepp *et al.* konnten in Körnerbrötchen versteckte Erdnussallergene nachweisen, die anaphylaktische Reaktionen bei den betroffenen Erdnussallergikern, die diese Brötchen verzehrten, auslösten.

Somit müssen die Erdnussallergene durch ihre besondere Stabilität während des Verarbeitungsprozesses über die anderen Proteine dominieren und möglicherweise dadurch ihre Allergenität noch erhöhen.

In dem folgenden Schema soll der komplexe Zusammenhang der fortwährenden Freisetzung von Erdnussallergenen noch einmal kurz dargestellt werden.

Schema 3: *in vivo* und *in vitro* simulierte Passage von Erdnussproteinen durch den menschlichen Gastrointestinaltrakt.



5. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Erdnüsse und Erdnussprodukte in einer simulierten Passage durch den menschlichen Gastrointestinaltrakt untersucht. Weitere Analysen der gastrointestinalen Abläufe mit einer Bestätigung an menschlichen Biopsien oder Lavagen wären wünschenswert, um den *in vitro*-Test zu untermauern.

Es sollte eine Spurenanalyse an verarbeiteten Produkten durchgeführt werden, die Erdnüsse nur als Verunreinigungen enthalten. Diese sollten ebenfalls *in vitro* verdaut werden, um zu prüfen, ob sich die Allergenzusammensetzung in solchen Fällen verändert oder ob weiterhin nur Erdnussallergene detektierbar sind.

Dass auch bereits geringe Proteinmengen eines versteckten Allergenes in Nahrungsmitteln für betroffene Erdnussallergiker schwerwiegende Folgen haben können, konnte bereits gezeigt werden. So sind drei anaphylaktische Reaktionen nach dem Verzehr von angeblich erdnussfreien Körnerbrötchen aufgetreten. Die Herstellerfirma, eine Grossbäckerei, bietet auch deklarierte Erdnussprodukte an, deren Spuren sich als Verunreinigungen in anderen Produkten nachweisen ließen (Lepp *et al.*, 2004). Die klinische Relevanz von iso-Ara h 3, das sich im Laufe dieser Arbeit als wichtige neue Isoform von Ara h 3/4 herauskristallisiert hatte und *in vitro* auch klinische Relevanz zeigte, muss genauer bestimmt werden. Dazu sollte eine klinische Studie mit Skin-Prick- und CAP-Testlösungen, die nur Ara h 3/4 enthalten und solchen, denen auch iso-Ara h 3 zugesetzt wurde, durchgeführt werden.

Die abschließende Bestimmung der klinischen Relevanz von iso-Ara h 3 könnte dann bei einer möglichen Immuntherapie der Erdnussallergie aus Einzelkomponenten genutzt werden, um eine bestmögliche Therapie zu etablieren.

6. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der Erdnussallergene Ara h 1 und Ara h 3/4 mit ihren Isoformen (Ara h 3, Ara h 4, Gly 1, iso-Ara h 3 und Trypsin Inhibitor) sowohl unter natürlichen, nicht denaturierenden als auch unter denaturierenden SDS-PAGE-Bedingungen. Damit sollten die Allergene zunächst in ihrer komplexen Struktur mit der Blue Native PAGE dargestellt und detailliert nach ihrem Zerfall in ihre Untereinheiten durch Denaturierung in der SDS-PAGE genau untersucht werden.

In dieser Arbeit konnte mit der Gelfiltration und BN-PAGE gezeigt werden, dass die Erdnussallergene Ara h 1 und Ara h 3/4 mit Isoformen in hochmolekularen Komplexen vorliegen. Dabei bilden die Viciline, zu denen das Ara h 1 gehört, und die Glycine, zu denen Ara h 3/4 und Isoformen gehören, gemeinsam hexamere Komplexe von 100 bis über 250 kDa aus, die aus unterschiedlichen Anteilen der Allergene zusammengesetzt sind. Dadurch können monoklonale Antikörper, die gegen Ara h 1 (Pn-t) oder Ara h 3/4 und Isoformen (PEI-7B2) gerichtet sind, gleichzeitig Proteinbanden in der BN-PAGE detektieren, die beide Allergene enthalten.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit der komplexe Aufbau der Glycine, die in der Erdnuss als Speicherproteine vorliegen und durch eine Protease posttranslational prozessiert werden, nachgewiesen werden. Nach der Prozessierung durch die Protease an einer konservierten Proteaseschnittstelle (NGLEET) werden die entstandenen sauren (30-40 kDa) und basischen (20 kDa) Untereinheiten über eine Disulfidbrücke zusammengehalten (AS 88 - AS 332). Durch Reduktion dieser Disulfidbrücke können in der 2D-PAGE eine saure und eine basische Proteinuntereinheit nachgewiesen werden.

Mit Hilfe der D-1D- und 2D-PAGE sowie folgender N-terminaler Sequenzierungen bzw. MALDI-TOF-Analysen konnte außerdem gezeigt werden, dass das Erdnussallergen Ara h 3/4 fünf Isoformen hat, die eine Sequenzidentität von 76 bis 96 % aufweisen. Mit 89 DBPCFC-positiven Patientenseren konnte erstmalig gezeigt werden, dass Ara h 3/4 und Isoformen zu den Majorallergenen der Erdnuss gehören, da knapp 50 % der Patienten IgE-Reaktivitäten zeigten. Darüber hinaus wurde deutlich, dass beide Untereinheiten aller Isoformen von Ara h 3/4 IgE-reaktiv sind.

Die IgE-Epitope der Isoformen von Ara h 3/4 und die Bindungsstellen von monoklonalen Antikörpern gegen diese wurden mit synthetischen Peptiden charakterisiert. Dabei konnten für den mAK PEI-7B2 das Epitop SPYSPH und für den mAK Pn-x das Epitop DEEEY gefunden werden. Für die beiden untersuchten Patientenseren JG3 und CAT zeigten sich längere IgE-reaktive Bereiche und wie im Westernblot große Unterschiede in dem Bindungsverhalten zwischen den einzelnen Isoformen. Während JG3 drei IgE-reaktive Bereiche detektierte, die auf den N-terminalen Untereinheiten der Isoformen lagen und das iso-Ara h 3 nur schwach erkannte, zeigte CAT sieben Bindungsstellen über die gesamten Sequenzen aller Isoformen verteilt. Drei IgE-reaktive Bereiche waren auf den C-terminalen Untereinheiten zu finden, was in dieser Arbeit erstmalig beschrieben werden konnte.

Für die Charakterisierung der Allergene sollte die Prozessierung der Erdnussallergene bei einer *in vivo* und *in vitro* simulierten Passage durch den menschlichen Gastrointestinaltrakt verfolgt werden, um Hinweise zu finden, warum allergische oder sogar anaphylaktische Schockreaktionen noch lange nach der Aufnahme des Nahrungsmittels auftreten können. Es konnte gezeigt werden, dass Ara h 1 und Ara h 3/4 mit Isoformen auch in Erdnussextrakten aus gekauten Erdnüssen hochmolekulare Proteinkomplexe bilden, die auf ihrer simulierten Passage durch den Gastrointestinaltrakt weder durch 24stündige Inkubation mit Magensaftäquivalent noch durch

Zusammenfassung

anschließende 24stündige Inkubation mit Pankreassaftäquivalent vollständig zersetzt wurden. Diese Komplexe und eine stetige Freisetzung von Allergenen konnten nach dem Verdauungsprozess nachgewiesen werden. Diese Freisetzung wurde durch Matrixeffekte hervorgerufen wie die Lösung eigentlich unlöslicher Nahrungsbestandteile durch Speichelamylase.

In fertig verarbeiteten Erdnussprodukten, in natur gerösteten oder gekochten und fritierten Erdnüssen waren nur Erdnussproteine nachweisbar. Innerhalb der Erdnüsse konnten 90 % hochmolekulare (Ara h 1 und Ara h 3/4 mit Isoformen) und 10 % niedermolekulare (Ara h 2 und Ara h 6, sowie teilweise nur theoretisch bestimmt Ara h 5, Ara h 7, Ara h 8, LTP und Oleosin) Proteine bei gegebenem pH-Wert (7-8) oder in gekauten Extrakten gefunden werden.

7. Summary

The aim of this study was the characterisation of the peanut allergens Ara h 1 and Ara h 3/4 with its isoforms (Ara h 3, Ara h 4, Gly 1, iso-Ara h 3 and Trypsin inhibitor) under native, non denaturing and under denaturing SDS-PAGE conditions. The allergens were analysed in their native complex structure by Blue Native PAGE and their decay into fragments were characterized after denaturing with SDS-PAGE.

Gelfiltration chromatography and BN-PAGE showed high molecular weight complexes of Ara h 1 and Ara h 3/4 (and isoforms). Vicilins like Ara h1 and Glycinins like Ara h 3/4 and isoforms form hexameric complexes of 100 to >250 kDa, which are composed of different proportions of these allergens. Therefore monoclonal antibodies against Ara h 1 (Pn-t) and against Ara h 3/4 and isoforms (PEI-7B2) detect simultaneously both allergens in one band of the BN-PAGE-gel.

The complex composition of Glycinins, which belong to the seed storage proteins of peanuts and are posttranslationally cleaved with a protease, could be shown. After processing of the protease at a conserved protease cleavage site (NGLEET) the acidic chain (30-40 kDa) and the basic chain (20 kDa) are hold together by one disulfide bond (AS 88 - AS 332). After reduction of this disulfide bond one acidic and one basic chain of the proteins appear in 2D-PAGE.

With D-1D-PAGE and 2D-PAGE and following N-terminal sequencing or MALDI-TOF-analysis it was demonstrated, that the peanut allergen Ara h 3/4 has five isoforms with a sequence identity of 76 to 96%. With 89 DBPCFC-positive patient sera it could be shown that Ara h 3/4 and isoforms belong to the major allergens of peanut because nearly 50% of all patients showed IgE-reactivity. Further it becomes clear for the first time that both chains of Ara h 3/4 and isoforms are IgE-reactive.

IgE-epitopes of Ara h 3/4 isoforms and binding sites for monoclonal antibodies were characterized with synthetic peptides. For mAK PEI-7B2 the epitope SPYSPH and for mAK Pn-x the epitope DEEEY were detected. For both characterized patient sera JG3 and CAT longer IgE-reactive regions were found and as shown in Western blot analysis dramatical differences in their binding to the isoforms occurred. While JG3 detected three IgE-reactive regions on the acidic chain of the isoforms with only weak detection of iso-Ara h3, CAT showed seven binding regions on the whole sequence of all isoforms. Three of these IgE-reactive regions were located on the basic chain of the isoforms, which was described for the first time in this study. Furthermore peanut allergens were characterized by processing in an *in vivo* and *in vitro* simulated passage through the human gastrointestinal tract, to find hints for the question why allergic or anaphylactic shock reactions could occur a long time after ingestion of food. It could be demonstrated that Ara h 1 and Ara h 3/4 with isoforms exist in high molecular weight complexes even in peanut extracts of chewed peanuts. These complexes were not destroyed throughout their simulated passage after 24 h incubation with gastric or after 24 h incubation with pancreatic equivalent enzyme mixtures. They could be detected after the passage and release allergens. This allergen release was the result of matrix effects like solubilisation of precipitated food particles with α -Amylase.

In highly processed food products, in native roasted, cooked or fried peanuts only peanut proteins are detectable. In peanuts 90% of high molecular weight proteins (Ara h 1 and Ara h 3/4 with isoforms) and 10% of low molecular weight proteins (Ara h 2 and Ara h 6, some expected allergens Ara h 5, Ara h 7, Ara h 8, LTP and Oleosin) were detected in extracts at a distinct pH (7-8) as well as in chewed extracts.

8. Literaturverzeichnis

Akkerdaas JH, Wensing M, Knulst AC, Krebitz M, Breiteneder H, de Vries S, Penninks AH, Aalberse RC, Hefle SL, van Ree R. How accurate and safe is the diagnosis of hazelnut allergy by means of commercial skin prick test reagents? *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2003; 132: 132-40.

Al-Muhsen S., Clarke A. E., Kagan R. S. Peanut allergy: an overview. *Can. Med. Ass. J.* 2003; 168: 1279-85

Amon U., Fandrey K., Fedler R. *Dermatologie.* Gustav Fischer Verlag 1996 Lübeck

Astwood J. D., Leach J. N., Fuchs R. L. Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nature Biotechnology* 1996; 14: 1269-73

Ayuso R., Reese G., Leong-Kee S., Plante M., Lehrer S. B. Molecular Basis of Arthropod Cross-Reactivity: IgE-Binding Cross-Reactive Epitopes of Shrimp, House Dust Mite and Cockroach Tropomyosins *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2002; 129: 38-48

Bachert C., Kardoff B., Virchow C. *Allergische Erkrankungen in der Praxis.* Uni-Med Verlag 2001 Bremen

Bannon G. A. What Makes a Food Protein an Allergen? *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2004; 4: 43-46

Ballmer-Weber B. K. Das Kreuz mit den Kreuzallergien. *Mitt. Lebensm. Hyg.* 2002; 93: 576-90

Ballmer-Weber B. K., Scheurer S., Vieths S. Update: Kreuzreaktivität zwischen Allergenen in Nahrungsmitteln und Birkenpollen *Allergologie* 2003; 11: 463-473

Barnett D., Baldo B., Howden M. Multiplicity of allergens in peanuts. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1983; 72: 61-68

Beardslee T., Zeece M., Sarath G., Markwell J. Soybean Glycinin G1 Acidic Chain Shares IgE Epitopes with Peanut Allergen Ara h 3. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2000; 123: 299-307

Beattie J., Fawcett H. A. C., Flint D. J. The use of multiple-pin peptide synthesis in an analysis of the continuous epitopes recognised by various anti-(recombinant bovine growth hormone) sera. Comparison with predicted regions of immunogenicity and location within the three-dimensional structure of the molecule. *Eur. J. Biochem.* 1992; 210: 59-66

Becker W.-M. Characterization of Ara h 1 by Two-Dimensional Electrophoresis Immunoblot and Recombinant Techniques: New Digestion Experiments with Peanuts Imitating the Gastrointestinal Tract. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1997; 113: 118-121

Becker W.-M., Kleber-Janke T., Lepp U. Four Novel Recombinant Peanut Allergens: More Information, More Problems. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2001; 124:100-102

Literaturverzeichnis

- Becker W.-M. Characterization of Allergens from Plants. Food Allergies and Intolerances. DFG Symposium VCH Verlag 1996 Weinheim
- Becker W.-M., Reese G. Immunological identification and characterization of individual food allergens. *J. Chromatogr. B* 2001; 756:131-140
- Becker W.-M., Schocker F., Boldt A. Allergene der Erdnuss: Struktur und Charakteristika. *Allergologie* 2005 eingereicht
- Beilinson V., Chen Z., Shoemaker R. C., Fischer R. I., Goldberg R. B., Nielson, N. C. Genomic organisation of glycinin genes in soybean. *Theor. Appl. Genet.* 2002; 104: 1132-40
- Bernard H., Paty E., Mondoulet L., Burks A. W., Bannon G. A., Wal J. M. Scheinmann P. Serological characteristics of peanut allergy in children. *Allergy* 2003; 58: 1285-92
- Bernhisel-Broadbent J., Sampson H. Cross-allergenicity in the legume botanical family in children with food hypersensitivity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1989; 83: 435-40
- Bernhisel-Broadbent J., Taylor S., Sampson H. Cross-allergenicity in the legume botanical family in children with food hypersensitivity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1989; 84: 701-9
- Besse I., Buchanan B. B. Thioredoxin-linked plant and animal processes: the new generation. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 1997; 38: 1-11
- Bevilacqua C., Montagnac G., Benmerah A., Candalh C., Brousse N., Cerf-Bensussan N., Perdue M. H., Heyman M. Food Allergens Are Protected from Degradation during CD23-Mediated Transepithelial Transport. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2004; 135: 108-16
- Beyer K., Morrow E., Burks W., Sampson H. Effects of cooking methods on peanut allergenicity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001; 107: 1077-81
- Beyer K., Bardina L., Grishina G., Sampson H. A. Identification of sesame seed allergens by 2-dimensional proteomics and Edman sequencing: Seed storage proteins as common food allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2002; 110: 154-9
- Beyer K., Ellman-Grunther L., Järvinen K.-M., Wood R. A. Hourihane J., Sampson H. A. Measurement of peptide-specific IgE as an additional tool in identifying patients with clinical reactivity to peanuts. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003; 112: 202-7
- Bircher A., Hauser C., Pichler W., Wüthrich B. Stellenwert und Indikation der Bestimmung spezifischer IgE- und IgG Antikörper in der Allergiediagnostik. *Schweiz. Ärztezeitung* 2001; 82: 1605-6
- Blom N., Sicheritz-Ponten T., Gupta R., Gammeltoft S., Brunak S. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* 2004; 4: 1633-49
- Bock S., Atkins F. The natural history of peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1989; 83: 900-4
- Bock S., Munoz-Furlong A., Sampson H. Fatalities due to anaphylactic reactions to foods. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001; 107:191-3

Literaturverzeichnis

- Boldt A., Petersen A., Lepp U., Reese G., Vieths S., Becker W.-M. Charakterisierung und Anreicherung des Komplexes Ara h 3/4, einem Hauptbestandteil der Erdnuss. *Allergo J.* 2003; 12: 57
- Boldt A., Fortunato D., Conti A., Petersen A., Ballmer-Weber B., Lepp U., Reese G., Becker W.-M. Analysis of the composition of an IgE-reactive high molecular weight protein complex of peanut extract containing Ara h 1 and Ara h 3/4. *Proteomics* 2005; 5: 675-86
- Bousquet J., Ansotegui I. J., van Ree R., Burney P. G., Zuberbier T., van Cauwenberge P. European Union meets the challenge of the growing importance of allergy and asthma in Europe. *Allergy* 2004; 59: 1-4
- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248-54
- Breiteneder H., Ebner C. Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000; 106: 27-36
- Breiteneder H., Radauer C. A classification of plant food allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004; 113: 821-30
- Breiteneder H., Mills, C. Molecular properties of food allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005; 115: 14-23
- Burks W., Sampson H., Bannon G. Peanut Allergens. *Allergy* 1998; 53: 725-30
- Buschmann L., Petersen A., Schlaak M., Becker W.-M. Reinvestigation of the Major Peanut Allergen Ara h 1 on Molecular Level. *Monogr. Allergy* 1996; 32: 92-98
- Calabozo B., Barber D., Polo F. Studies on the carbohydrate moiety of Pla 1 1 allergen. Identification of a major N-glycan and significance for the immunoglobulin E-binding activity. *Clin. Exp. Allergy* 2002; 32: 1628-34
- Camacho-Carvalajal M. M., Wollscheid B., Aebersold R., Steimle V., Schamel W. W. A. Two-dimensional Blue Native/SDS Gel Electrophoresis of Multi-Protein Complexes from Whole Cellular Lysates Molecular Cell. *Proteomics* 2004; 3: 176-182
- Cardaba B., Del Pozo V., Jurado A., Gallardo S., Cortegano I., Arrieta I., Del Amo A., Tramon P., Florido F., Sastre J., Palomino P., Lahoz C. Olive pollen allergy: searching for immunodominant T-cell epitopes on the Ole e 1 molecule. *Clin. Exper. Allergy* 1998; 28: 413-22
- Chatel J. M., Bernard H., Orson F. M. Isolation and characterization of Two complete Ara h 2 Isoforms cDNA. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2003; 131: 14-18
- Chatel J. M., Song L., Bhogal B., Orson F. M. Various factors (allergen nature, mouse strain, CpG/ recombinant protein expressed) influence the immune response elicited by genetic immunization. *Allergy* 2003; 58: 641-47
- Cehade, M., Mayer, L. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005; 115: 3-12

Literaturverzeichnis

- Chenna R., Sugawara H., Koike T., Lopez R., Gibson T. J., Higgins D. G., Thompson J. D. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31: 3497-500
- Chung S. -Y., Champagne E. T. Allergenicity of Maillard Reaction Products from Peanut Proteins. *J. Agric. Food Chem.* 1999; 47: 5227-31
- Chung S. -Y., Champagne E. T. Association of End-Product Adducts with Increased IgE Binding of Roasted Peanut. *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49: 3911-16
- Chung S. -Y., Maleki S., Champagne E., Buhr K., Gorbet D. High-Oleic Peanuts Are Not Different from Normal Peanuts in Allergenic Properties. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 878-82
- Chung S. -Y., Butts C., Maleki S., Champagne E. Linking Peanut Allergenicity to the Processes of Maturation, Curing and Roasting. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51: 4273-77
- Codina R., Arduoso L., Lockey R. F., Crisci C., Medina I. Allergenicity of varieties of soybean. *Allergy* 2003; 58: 1293-98
- Crowe S. E. Gastrointestinal Food Allergies: Do They Exist? *Curr. Gastroenterology Rep.* 2001; 3: 351-7
- Dell A., Morris H. R. Glycoprotein Structure Determination by Mass Spectrometry. *Science* 2001; 291: 2351-56
- Dodo J. W., Viquez O. M., Maleki S. J., Konan K. N. cDNA Clone of a Putative Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Trypsin Inhibitor Has Homology with Peanut Allergens Ara h 3 and Ara h 4. *J. Agric. Food Chem.* 2004; 52: 1404-9
- Dunwell J. M., Khuri S., Gane P. J. Microbial Relatives of the Seed Storage Proteins of Higher Plants: Conservation of Structure and Diversification of Function during Evolution of the Cupin Superfamily. *Microbiol. Molecular Biol. Rev.* 2000; 64: 153-79
- Eckert R., Randall D., Augustine G. *Tierphysiologie.* 1993 Thieme-Verlag Stuttgart
- Edman P. Sequence determination. *Mol. Biol. Biochem. Biophys.* 1970; 8: 211-55
- Eigenmann P.A., Burks A.W., Bannon G.A., Sampson H.A. Identification of unique peanut and soy allergens in sera adsorbed with cross-reacting antibodies. *Allergy Clin Immunol* 1996; 98: 969-978
- Eigenmann P.A. Do we have suitable in-vitro diagnostic tests for the diagnosis of food allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2004; 4: 211-13
- Eubel H., Jansch L., Braun H. -P. New insights into the respiratory chain of plant mitochondria: supercomplexes and a unique composition of complex II. *Plant Physiol.* 2003; 133: 274-86
- Ewan P., Clark A. Long-term prospective observational study of patients with peanut and nut allergy after participation in a management plan. *Lancet* 2001; 357: 111-15
- Ferencik M., Rovensky J., Matha V., Jensen-Jarolim E. *Wörterbuch Allergologie und Immunologie.* 2005 Springer Verlag Wien

Literaturverzeichnis

- Fleischer D. M., Conover-Walker M. K., Christie L., Burks A. W., Wood R. A. The natural progression of peanut allergy: Resolution and the possibility of recurrence. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003; 112: 183-9
- Frank R. The SPOT-synthesis technique: Synthetic peptide arrays on membrane supports-principles and applications. *Immunol. Methods* 2002; 267: 13-26
- Garcia-Casado G., Pacios L. F., Diaz-Perales A., Sanchez-Monge R., Lombardero M., Garcia-Selles F. J., Polo F., Barber D., Salcedo G. Identification of IgE-binding epitopes of the major peach allergen Pru p 3. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003; 112: 599-605
- Geysen H. M., Meloen R. H., Barteling S. J. Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1984; 81: 3998-4002
- Gruber P., Suhr M., Frey A., Becker W.-M., Hofmann, T. 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.* 2004; 48: 449-458
- Gruber P., Becker W.-M., Hofmann T. Influence of the Maillard Reaction on the Allergenicity of rAra h 2, a Recombinant Major Allergen from Peanut (*Arachis hypogaea*), Its Major Epitopes, and Peanut Agglutinin. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53: 2289-96
- Hales B. J., Bosco A., Mills K. L., Hazell L. A., Loh R., Holt P. G., Thomas W. R. Isoforms of the Major Peanut Allergen Ara h 2: IgE Binding in Children with Peanut Allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2004 135: 101-7
- Hancock K., Tsang V. C. W. India Ink staining of proteins on nitrocellulose paper. *Anal. Biochem.* 1983; 133: 157
- He G., Meng R., Newman M., Gao G., Pittman R. N., Prakash CS Microsatellites as DNA markers in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). *BioMedCentral Plant Biology* 2003; 3: 1-6
- Heine R. G. Pathophysiology, diagnosis and treatment of food protein-induced gastrointestinal diseases. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2004; 4: 221-9
- Henzel W. J., Billeci T. M., Stults J. T., Wong S. C., Grimley C., Watanabe C. Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993; 90: 5011-15
- Henzgen M., Vieths S., Reese I., Erdmann S., Fuchs T., Jäger L., Kleine-Tebbe J., Lepp U., Niggemann B., Saloga J., Vieluf I., Zuberbier T., Werfel T. Nahrungsmittelallergien durch immunologische Kreuzreaktionen. *Allergo J.* 2005; 14: 48-59
- Heukeshoven J., Dernick R. Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 1988; 9: 28-32
- Hiemori M., Bando N., Ogawa T., Shimada H., Tsuji H., Yamanishi R., Terao J. Occurrence of IgE Antibody-Recognizing N-Linked Glycan Moiety of a Soybean Allergen, Gly m Bd 28 K. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2000; 122: 238-45

Literaturverzeichnis

Hird H., Pumphrey R., Wilson P., Sunderland J., Reece P. Identification of peanut and hazelnut allergens by native two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 2000; 21: 2678-2683

Hoffmann-Sommergruber K. Pathogenesis-related (PR)-proteins identified as allergens. *Biochem. Society Transactions* 2002; 30: 930-35

Hourihane J., Kilburn S., Dean P., Warner J. Clinical characteristics of peanut allergy. *Clin. Exp. Allergy* 1997; 27:634-39

Hourihane J., Roberts S., Warner J. Resolution of peanut allergy: case-control study. *Brit. Med. J.* 1998; 316: 1271-75

Jameson B. A., Wolf H. The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *BIOINFORMATICS* 1988; 4:181

Janeway C.A., Travers P., Walport M., Shlomchik M. *Immunologie*. 2002 Spektrum Akad. Verlag Heidelberg

Jenkins J. A., Griffiths-Jones S., Shewry P. R., Breiteneder H., Mills C. Structural relatedness of plant food allergens with specific reference to cross-reactive allergens: An *in silico* analysis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005; 115: 163-70

Kakade M. L., Rackis J. J., McGhee J. E., Puski G. Determination of Trypsin Inhibitor Activity of Soy Products: A Collaborative Analysis of an Improved Procedure. *Cereal Chem.* 1974; 51: 376-82

Kleber-Janke T., Cramer R., Appenzeller U., Schlaak M., Becker W. -M. Selective Cloning of Peanut Allergens, Including Profilin and 2S Albumins, by Phage Display Technology. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1999; 119: 265-74

Kleber-Janke T., Cramer R., Scheurer S., Vieths S., Becker W-M. Patient-tailored cloning of allergens by phage display: Peanut (*Arachis hypogaea*) profilin, a food allergen derived from a rare mRNA. *J. Chromatogr. B* 2001; 756: 295-305

Kleber-Janke T., Becker W. -M. Use of Modified BL21 (DE3) *Escherichia coli* Cells for High-Level Expression of Recombinant Peanut Allergens Affected by Poor Codon Usage. *Prot. Expression Pur.* 2000; 19: 419-24

Kleine-Tebbe J., Fuchs T., Lepp U., Niggemann B., Saloga J., Vieluf I., Vieths S., Werfel T., Zuberbier T., Jäger L. In-vitro-Diagnostik von Nahrungsmittel-Allergien. *Allergo J.* 2001; 10: 333-39

Kleine-Tebbe J., Wangorsch A., Vogel L., Crowell D. N., Haustein U.-F., Vieths S. Severe oral allergy syndrome and anaphylactic reactions caused by a Bet v 1-related PR-10 protein in soybean, SAM 22. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2002; 110: 797-804

Kleter G., Peijnenburg A. Screening of transgenic proteins expressed in transgenic food crops for the presence of short amino acid sequences identical to potential, IgE-binding linear epitopes of allergens. *BioMedCentral Structural Biology* 2002; 2: 8

Knippels L. M. J., van Wijk F., Penninks A. H. Food allergy: what do we learn from animal models? *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2004; 4: 205-9

Literaturverzeichnis

- Kolarich D., Altmann F. N-Glycan Analysis by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Electrophoretically Separated Nonmammalian Proteins. *Anal. Biochem.* 2000; 285: 64-75
- Koppelman S., Carla A., Bruinjnzeel-Koomen C., Hessing M., de Jonghi H. H. J. Heat-induced Conformational Changes of Ara h 1, a Major Peanut Allergen, Do Not Affect Its Allergenic Properties. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 4770-77
- Koppelman S., Vlooswijk R., Knippels L., Bruinjnzeel-Koomen C. Quantification of major peanut allergens Ara h 1 and Ara h 2 in the peanut varieties Runner, Spanish, Virginia, and Valencia, bred in different parts of the world. *Allergy* 2001 56: 132-37
- Koppelman S., et al. Peanut allergen Ara h 3: Isolation from peanuts and biochemical characterization. *Allergy* 2003; 58: 1144-51
- Koppelman S., Wensing M., Ertmann M., Knulst A. C., Knol E. F. Relevance of Ara h 1, Ara h 2 and Ara h 3 in peanut-allergic patients, as determined by immunoglobulin E Western blotting, basophil-histamine release and intracutaneous testing: Ara h 2 is the most important peanut allergen. *Clin. Exp. Allergy* 2004; 34: 583-90
- Kopper R. A., Odum N. J., Sen M., Hem R. M., Stanley J. S., Burks A. W. Peanut Protein Allergens: The Effect of Roasting on Solubility and Allergenicity *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2005; 136: 16-22
- Kortekangas-Savolainen O., Savolainen J., Einarsson R. Gastrointestinal stability of baker's yeast allergens: an *in vitro* study. *Clin. Exp. Allergy* 1993; 23: 587-90
- Kricka L. J. Chemiluminescent and bioluminescent techniques. *Clin. Chem.* 1991; 37: 1472-81
- Küster B., Wheeler S., Hunter A., Dwek R., Harvey D Sequencing of N-Linked Oligosaccharides Directly from Protein Gels: In-Gel Deglycosylation Followed by Spectrometry and Normal-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Anal. Biochem.* 1997; 250: 82-101
- Küster B., Wheeler S., Hunter A., Dwek R., Harvey D Structural determination of N-linked carbohydrates by matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry following enzymatic release within sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide electrophoresis gels. *Electrophoresis* 1998; 19: 1950-59
- Kyhse-Andersen J. Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* 1984; 10: 203-9
- Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-85
- de Leon M. P., Glaspole I. N., Drew A. C., Rolland J. M., O'Hehir R. E., Suphioglu C. Immunological analysis of allergenic cross-reactivity between peanut and tree nuts. *Clin. Exp. Allergy* 2003; 33: 1273-80
- Leonard R., Petersen B. O., Himly M., Kaar W., Wopfner N., Kolarich D., van Ree R., Ebner C., Duus J. O., Ferreira F., Altmann F. Two Novel Types of O-Glycans on the Mugwort Pollen Allergen Art v 1 and Their Role in Antibody Binding. *J. Biol. Chemistry* 2005; 280: 7932-40

Literaturverzeichnis

- Lepp U., Schocker F., Eberhardt F., Becker W.-M. Körnerbrötchen als Träger versteckter Erdnussallergene. *Allergo Journal* 2004; 13: S47
- Lipniunas P. H., Neville D. C. A., Trimble R. B., Townsend R. R. Separation of Biosynthetic Oligosaccharide Branch Isomers Using High-Performance Liquid Chromatography on a Porous Two-Dimensional Graphite Stationary Phase. *Anal. Biochem.* 1996; 243: 203-9
- Lorenz A., Reese G., Haustein D., Vieths S. Versteckte Allergene in Lebensmitteln - noch immer ein Problem. *Bundesgesundheitsblatt* 2001; 44: 666-75
- Madan T., Priyadarsiny P., Vaid M., Kamal N., Shah A., Haq W., Katti S. B., Sarma P. U. Use of a Synthetic Peptide Epitope of Asp f 1, a Major Allergen or Antigen of *Aspergillus fumigatus*, for Improved Immunodiagnosis of Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis. *Clin. Diagnostic Lab. Immunol.* 2004; 11: 552-8
- Magni C., Ballabio C., Restani P., Scarfoni A., Poiesi C., Duranti M. Two-Dimensional Electrophoresis with anti Ara h 3 Basic Subunit IgG Evidence the Cross-Reacting Polypeptides of *Arachis hypogaea*, *Glycine max*, and *Lupinus albus* Seed Proteomes. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53: 2275-81
- Maid B. Ara h 1: Klonierung in *Pichia pastoris* und *in vitro* Untersuchungen unter gastrointestinalen Bedingungen. Dissertation 1998 Marburg
- Maleki S., Kopper R., Shin D., Burks A., Sampson H. Structure of the Major Peanut Allergen Ara h 1 May Protect IgE-Binding Epitopes from Degradation. *J. Immunol.* 2000; 164: 5844-49
- Maleki S., Viquez O., Jacks T., et al The major peanut allergen, Ara h 2, functions as a trypsin inhibitor, and roasting enhances this function. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003; 112: 190-5
- Matsudaira P. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* 1987; 262: 10035-8
- McClure M. A., Vasi T. K., Fitch W. M. Comparative Analysis of Multiple Protein-Sequence Alignment Methods. *Mol. Biol. Evol.* 1994; 11: 571-92
- Mechref Y., Novotny M. V. Structural Investigations of Glycoconjugates at High Sensitivity. *Chem. Rev.* 2002; 102: 321-69
- Mills E. N. C., Jenkins J., Marigheto N., Belton P., Gunning A., Morris V. Allergens of the Cupin superfamily. *Biochem. Soc. Transactions* 2002; 30: 925-29
- Mills E. N. C., Madsen C., Shewry P. R., Wichers H. J. Food allergens of plant origin-their molecular and evolutionary relationships. *Trends Food Sci. Technol.* 2003; 14: 145-56
- Mittag D., Vieths S., Vogel L., Becker W.-M., Rihs H.-P., Helbling A., Wüthrich B., Ballmer-Weber B. K. Soybean allergy in patients allergic to birch pollen: clinical investigation and molecular characterization of allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004; 113: 148-54

Literaturverzeichnis

- Mittag D., Akkerdaas J., Ballmer-Weber B. K., Vogel L., Wensing M., Becker W.-M., Koppelman S. J., Knulst A. C., Helbling A., Hefle S. L., van Ree R., Vieths S. Ara h 8, a Bet v 1-homologous allergen from peanut, is a major allergen in patients with combined birch pollen and peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004; 114: 1410-7
- Moneret-Vautrin D.-A., Guerin L., Kanny G., Flabbee J., Fremont S., Morisset M. Cross-allergenicity of peanut and lupine: The risk of lupine allergy in patients allergic to peanuts. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1999; 104: 883-8
- Moneret-Vautrin D.-A., Morisset M., Flabbee J., Beaudouin E., Kanny G. Epidemiology of life-threatening and lethal anaphylaxis: a review. *Allergy* 2005; 60: 443-51
- Mouecoucou J., Fremont S., Sanchez C., Villaume C., Mejean L. In vitro allergenicity of peanut after hydrolysis in the presence of polysaccharides. *Clin. Exp. Allergy* 2004; 34: 1429-37
- Nielson N. C., Dickinson C. D., Cho T.-J., Thanh V. H., Scallan B. J., Fischer R. L., Sims T. L., Drews G. N., Goldberg R. B. Characterization of the Glycinin Gene Family in Soybean *Plant Cell* 1989 1: 313-28
- Niggemann B., Kleine-Tebbe J., Saloga J., Sennekamp J., Vieluf I., Vieths S., Werfel T., Jäger L. Standardisierung von oralen Provokationstests bei IgE-vermittelten Nahrungsmittelallergien *Allergo J.* 1998; 7: 45-50
- Nordlee J., Taylor S., Jones R., Yunginger J. Allergenicity of various peanut products as determined by RAST inhibition. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1981; 68: 376-82
- Novak N., Bieber T. Pathophysiologie der atopischen Dermatitis. *Deutsches Ärzteblatt* 2004; 101: 108-20
- O'Leary P. F. G., Shanahan F. Food Allergies. *Curr. Gastroenterology Reports* 2002; 4: 373-82
- Packer N., Lawson M., Jardine D., Sanchez J. -C., Gooley A. Analysing glycoproteins separated by two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 1998; 19: 981-88
- Page D., Quillien L., Duc G. Trypsin Inhibitory Activity Measurement : Simplifications of the Standard Procedure used for Pea Seed. *Crop Sci.* 2000; 40: 1482-85
- Perry T. T., Conover-Walker M. K., Pomes A., Chapman M. D, Wood R. A. Distribution of peanut allergen in the environment. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004; 113: 973-6
- Petersen A., Becker W.-M., Schlaak M. Examination of microheterogeneity in grass pollen allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1992; 98: 105-9
- Pomes A., Helm RM., Burks A, Bannon G., Chapman MD. Monitoring peanut allergen in food products by measuring Ara h 1. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003; 111: 640-5
- Pons L., Chery C., Romano A., Namour F., Artesani M. C., Guéant J.-L. The 18 kDa peanut oleosin is a candidate allergen for IgE. *Allergy* 2002; 57: 88-93
- Prabu M. M., Suguna K., Vijayan M. Variability in Quaternary Association of Proteins With the Same Tertiary Fold: A Case Study and Rationalization Involving Legume Lectins. *Proteins: Structure, Function and Bioinf.* 1999; 35: 58-69

Literaturverzeichnis

- Primeau M. -N., Kagan R., Joseph L., Clarke A. The psychological burden of peanut allergy as perceived by adults with peanut allergy and the parents of peanut-allergic children. *Clin. Exp. Allergy* 2000; 30: 1135-43
- Rabjohn P., West C., Connaughton C., Sampson H. A., Helm R. M., Burks A. W., Bannon G. A. Modification of Peanut Allergen Ara h 3: Effects on IgE Binding and T Cell Stimulation. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2002; 128: 15-23
- Rabjohn P., Helm E. M., Stanley J. S., West C., Sampson H., Burks A, Bannon G. A. Molecular cloning and epitope analysis of the peanut allergen Ara h 3. *J. Clin. Invest.* 1999; 103: 535-42
- Raithel M., Hahn E. G., Baenkler H. W. Klinik und Diagnostik von Nahrungsmittelallergien. *Deutsches Ärzteblatt* 2002; 99: 780-86
- Rammensee H.-G., Falk K., Rötzschke O. MHC molecules as peptide receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 1993; 5: 35-44
- Rance F., Bidat E., Bourrier T., Sabouraud D. Cashew allergy : observations of 42 children without associated peanut allergy. *Allergy* 2001; 58: 1311-4
- Rehner G., Daniel H. *Biochemie der Ernährung.* 1999 Spektrum Verlag Heidelberg
- Righetti P. G. *Isoelectric focusing: theory, methodology and applications.* 1983 Elsevier Biomedical Press Amsterdam
- Righetti P. G., Drysdale J. W. Isoelectric focusing in gels. *J. Chromatogr.* 1974; 98: 271-321
- Ring J., Krämer U., Schäfer T., Behrendt H. Why are allergies increasing? *Curr. Opin. Immunol.* 2001 13: 701-8
- Roux K. H., Teube, S. S., Sathe S. K. Tree Nut Allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2003; 131: 234-44
- Sachs M., Jones R., Yunginger J. Isolation and partial characterization of a major peanut allergen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1981; 67: 27-34
- Sampson H., Mendelson L., Rosen J. Fatal and near-fatal anaphylactic reactions to food in children and adolescents. *N. Engl. J. Med.* 1992; 327: 380-4
- Sampson H. Managing peanut allergy. *Brit. Med. J.* 1996; 312: 1050-51
- Sampson H. Food allergy Part 1: Immunopathogenesis and clinical disorders. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1999; 103: 717-28
- Sampson H. What should we be doing for children with peanut allergy? *J. Pediatrics* 2000; 137: 741-43
- Sampson H. Peanut allergy. *N. Engl. J. Med.* 2002; 346: 1294-99
- Sampson H. The Nuts And Bolts Of Peanut allergy. *N. Engl. J. Med.* 2002; 346: 1320-22
- Sampson H. Update on food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004, 113: 805-19

Literaturverzeichnis

- Sampson H. Food allergy: When mucosal immunity goes wrong. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005; 115: 139-41
- Schäfer T., Böhler E., Ruhdorfer S., Ring J. Epidemiology of food allergy/food intolerance in adults: associations with other manifestations of atopy. *Allergy* 2001; 56: 1172-79
- Schägger H., Aquila H., van Jagow G. Coomassie-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis. *Anal. Biochem.* 1988; 173: 201-05
- Schäppi G., Konrad V., Imhof D., Etter R., Wüthrich B. Hidden peanut allergens detected in various foods: findings and legal measures. *Allergy* 2001; 56: 1216-20
- Schäppi G. Methoden zum Nachweis von Allergenen in Lebensmitteln. Anforderungen, Grenzen und Möglichkeiten *Mitt. Lebensm. Hyg.* 2002 93: 550-59
- Schmid-Grendelmeier P., Holzmann D., Himly M., Weichel M., Tresch S., Rückert B., Menz G., Ferreira F., Blaser K., Wüthrich B., Cramer R. Native Art v 1 and recombinant Art v 1 are able to induce humoral and T cell-mediated in vitro and in vivo responses in mugwort allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003; 111: 1328-36
- Schnuch A., Geier J., Lessmann H., Uter W., Brasch W., Frosch P. J. Kontaktallergene im aktuellen Zeitverlauf. *Allergo J.* 2004; 13: 57-69
- Schnyder B., Pichler W. Nahrungsmittelintoleranz und Nahrungsmittelallergie. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 1999; 129: 928-33
- Schocker F. Nahrungsmittelallergien: Identifizierung und Charakterisierung von nicht-birkenpollenassoziierten Allergenen der Haselnuss. Dissertation 2002 Kiel
- Sen M., Kopper R., Pons L., Abraham E. C., Burks A W., Bannon G. A. Protein Structure Plays a Critical Role in Peanut Allergen Stability and May Determine Immunodominant IgE-Binding Epitopes. *J. Immunol.* 2002; 169: 882-87
- Senti G., Ballmer-Weber B., Wüthrich B. Nüsse, Samen und Kerne aus allergologischer Sicht. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 2000; 130: 1795-1804
- Shefcheck K. J., Musser S. M. Confirmation of the Allergenic Peanut Protein, Ara h 1, in a Model Food Matrix Using Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (LC/MS/MS). *J. Agric. Food Chem.* 2004; 52: 2785-90
- Shekar S., Tumaney A. W., Sreenivasa R., Rajasekharan R. Isolation of Lysophosphatidic Acid Phosphatase from Developing Peanut Cotyledons. *Plant Physiol.* 2002; 128: 988-9
- Shin D. S., Compadre C. M., Maleki S. J., Kopper R. A., Sampson H., Huang S. K., Burks A. W., Bannon G. A. Biochemical and Structural Analysis of the IgE Binding Sites on Ara h 1, an Abundant and Highly Allergic Peanut Protein. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 13753-59
- Shutov A. D., Kakhovskaya I.A., Bstrygina A. S., Bulmaga V. P., Horstmann C., Müntz K. United proteolysis of β -conglycinin and glycinin, 7S and 11S storage globulins from soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] structural and evolutionary implications. *Eur. J. Biochem.* 1996; 241: 221-28

Literaturverzeichnis

- Sicherer S., Burks A, Sampson H. Peanut and soy allergy: a clinical and therapeutic dilemma. *Allergy* 2000; 55: 515-21
- Sicherer S., Burks A, Sampson H. Clinical Features of Acute Allergic Reactions to Peanut and Tree Nuts in Children. *Pediatrics* 1998; 102: 1-6
- Sicherer S., Furlong T., Maes H., Desnick J., Sampson H. Genetics of peanut allergy: A twin study. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000; 106: 53-56
- Sickmann A., Mreyen M., Meyer H. E. Mass Spectrometry- a Key Technology in Proteom Research. *Adv. Biochem. Engin./ Biotechnol.* 2003; 83: 141-76
- Skolnick H. S., Conover-Walker M. K., Koerner C. B., Sampson H. A., Burks W., Wood R. A. The natural history of peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001; 107: 367
- Srivastava K. D., Kattan J. D., Zou Z. M., Li J. H., Zhang L., Wallenstein S., Goldfarb J., Sampson H. A., Li X.-M. The Chinese herbal medicine formula FAHF-2 completely blocks anaphylactic reactions in a murine model of peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005; 115: 171-8
- Suhr M., Wicklein D., Lepp U., Becker W.-M. Isolation and characterization of natural Ara h 6: Evidence for a further peanut allergen with putative clinical relevance based on resistance to pepsin digestion and heat. *Mol. Nutr. Food Res.* 2004; 48: 390-399
- Staswick P. E., Hermodson M. A., Nielsen N. C. The Amino Acid Sequence of the A₂B_{1a} Subunit of Glycinin. *J. Biol. Chem.* 1984; 259: 13424-30
- Staswick P. E., Hermodson M. A., Nielsen N. C. Identification of the Cystines Which Link the Acidic and Basic Components of the Glycinin Subunits. *J. Biol. Chem.* 1984; 259: 13431-35
- Taylor S., Busse W., Sachs M., Parker J., Yunginger J. Peanut oil is not allergenic to peanut-sensitive individuals. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1981; 68: 372-75
- Taylor S. L., Hefle S. L., Bindslev-Jensen C., Bock S. A., Burks A. W., Christie L., Hill D. J., Host A., Hourihane J. O'B., Lack G., Metcalfe D. D., Moneret-Vautrin D. A., Vadas P. A., Rance F., Skrypec D. J., Trautmann T. A., Malmheden Yman I., Zeiger R. S. Factors affecting the determination of threshold doses for allergenic foods: How much is too much? *J. Allergy Clin. Immunol.* 2002; 109: 24-30
- Taylor S. L., Hefle S. L., Bindslev-Jensen C., Atkins F. M., Andre C., Bruijnzeel-Koomen C., Burks A. W., Bush R. K., Ebisawa M., Eigenmann P. A., Host A., Hourihane J. O'B., Isolauri E., Hill D. J., Knulst A., Lack G., Sampson H. A., Moneret-Vautrin D. A., Rance F., Vadas P. A., Yunginger J. W., Zeiger R. S., Salminen J. W., Madsen C., Abbott P. A consensus protocol for the determination of the threshold doses for allergenic foods: how much is too much? *Clin. Exp. Allergy* 2004; 34: 689-95
- Teuber S. S., Peterson W. R. Systemic allergic reaction to coconut (*Cocos nucifera*) in 2 subjects with hypersensitivity to tree nut and demonstration of cross-reactivity to legumin-like seed storage proteins: New coconut and walnut food allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1999; 103: 1180-5
- Teuber S. S. Hypothesis: The Protein Body Effect and Other Aspects of Food Matrix Effects. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2002; 964: 111-16

Literaturverzeichnis

- Teuber S. S., Comstock S. S., Sathe S. K., Roux K. H. Tree Nut Allergy. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2003; 3: 54-61
- du Toit G., Lack G. Optimizing the diagnosis of peanut and tree nut allergy. *Clin. Exp. Allergy* 2003; 33: 1019-22
- Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22: 4673-80
- Tomiya N., Awaya J., Kurono M., Endo S., Arata Y., Takahashi N. Analyses of N-Linked Oligosaccharides Using a Two-Dimensional Mapping Technique. *Anal. Biochem.* 1988; 171: 73-90
- Uhlemann L. Identifizierung und Charakterisierung von Erdnußallergenen mit Patientenseren und monoklonalen Antikörpern. Dissertation 1991 Kiel
- Uhlemann L., Becker W.-M., Schlaak M. Nahrungsmittelallergie: Identifizierung und Charakterisierung von Erdnußallergenen mit Patientenseren und monoklonalen Antikörpern. *Z. Ernährungswiss.* 1993; 32: 139-51
- van Kampen V., Haamann F., Merget R., Sander I., Raulf-Heimsoth M., Brüning T. Sensitivität, Spezifität und diagnostische Effizienz verschiedener Roggenmehl- und Latex-Pricktestlösungen in Abhängigkeit vom gewählten Gold-Standard. *Allergo J.* 2005; 14: 31
- van Odijk J., Ahlstedt S., Bengtsson U., Hulthen L., Borres M. Specific IgE antibodies to peanut in western Sweden - has the occurrence of peanut allergy increased without an increase in consumption? *Allergy* 2001; 56: 573-77
- van Ree R., Cabanes-Macheteau M., Akkerdass J., Milazzo J.-P., Loutelier-Bourhis C., Rayon C., Villalba M., Koppelman S., Aalberse R., Rodriguez R., Faye L., Lerouge P. β -(1,2)-Xylose and α (1,3)-Fucose Residues Have a Strong Contribution in IgE Binding to Plant Glycoallergens. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 11451-58
- van Ree R. Clinical importance of cross-reactivity in food allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2004; 4: 235-40
- van Ree R. The create project: EU support for the improvement of allergen standardization in Europe. *Allergy* 2004; 59: 571-74
- Vieths S. Gentechnisch veränderte Lebensmittel: Nutzen oder Risiko für Allergiekranke? *Allergo J.* 2000; 9: 328-32
- Viquez O. M., Konan K. N., Dodo H. W. Structure and organization of the genomic clone of a major peanut allergen gene, Ara h 1. *Mol. Immunol.* 2003; 40: 565-71
- Viquez O. M., Konan K. N., Dodo H. W. Genomic organization of peanut allergen gene, Ara h 3. *Mol. Immunol.* 2004; 41: 1235-40
- Vorm O., Roepstorff P., Mann M. Improved Resolution and Very High Sensitivity in MALDI TOF of Matrix Surfaces Made by Fast Evaporation. *Anal. Chem.* 1994; 66: 3281-87

Literaturverzeichnis

- Wahn V. Immunologische Therapien bei allergischen Erkrankungen. *Allergologie* 2000; 8: 371-95
- Wal J.-M. Thermal processing and allergenicity of foods. *Allergy* 2003; 58: 727-29
- Wang F., Robotham J. M., Teuber S. S., Tawde P., Sathe S. K., Roux K. H. Ana o 1, a cashew (*Anacardium occidentale*) allergen of the vicilin seed storage protein family. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2002; 110: 160-6
- Wang F., Robotham J. M., Teuber S. S., Sathe S. K., Roux K. H. Ana o 2, a Major Cashew (*Anacardium occidentale* L.) Nut Allergen of the Legumin Family. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2003; 132: 27-39
- Wensing M., Penninks A. H., Hefle S. L., Koppelman S. J., Bruijnzeel-Koomen C. A. F. M., Knulst A. C. The distribution of individual threshold doses eliciting allergic reactions in a population with peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2002; 110: 915-20
- Wensing M., Knulst A. C., Piersma S., O'Kane F., Knol E. F., Koppelman S. J. Patients with anaphylaxis to pea can have peanut allergy caused by cross-reactive IgE to vicilin (Ara h 1). *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003; 111: 420-4
- Werhahn W., Braun H. -P. Biochemical dissection of the mitochondrial proteome from *Arabidopsis thaliana* by three-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 2002; 23: 640-46
- Wilson I. B. H., Zeleny R., Kolarich D., Staudacher E., Stroop C. J. M., Kamerling J. P., Altmann F. Analysis of Asn-linked glycans from vegetable foodstuffs: widespread occurrence of Lewis a, core α 1,3-linked fucose and xylose substitutions. *Glycobiology* 2001; 11: 261-74
- Wörle C. Identifizierung und Charakterisierung von Erdnussallergenen des Conglutin-Typs aus Erdnüssen und verarbeiteten Erdnussprodukten. Diplomarbeit 2001 Kiel
- Wu C. H., Lee M. F., Tseng C. Y. IgE-binding epitopes of the American cockroach *Per a 3* allergen. *Allergy* 2003; 58: 986-92
- Wüthrich B., Ballmer-Weber B. Lebensmittelallergien. Begriffbestimmung-Prävalenz-Klinik-Diagnostik-Therapie. *Mitt. Lebensm. Hyg.* 2002; 93: 538-49
- Xiang P., Beardslee T. A., Zeece M. G., Markwell J., Sarath G. Identification and analysis of a conserved immunoglobulin E-binding epitope in soybean G1a and G2a and peanut Ara h 3 glycinins. *Arch. Biochem. Biophys.* 2002; 408: 51-57
- Yano H., Wong J. H., Lee Y. M., Cho M.-J., Buchanan B. B. A strategy for the identification of proteins targeted by thioredoxin. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2001; 98: 4794-99
- Yaklich R. W., Helm R. M., Cockrell G., Herman E. M. Analysis of the Distribution of the Major Soybean Seed Allergens in a Core Collection of *Glycine max* Accessions. *Crop Sci.* 1999; 39: 1444-47
- Yunginger J. W., Jones R. T. A Review of Peanut Chemistry Implications for the Standardization of Peanut Extracts. *Arbeiten aus dem Paul-Ehrlich-Institut Band 80* 1987

9. Anhang

9.1 Auswertung der MALDI-TOF-Ergebnisse

Tab. 20: Übersicht der massenspektrometrischen Analysen (Abb. 32, Tab. 14), Kennzeichnung der gefundenen Peptide aus BN-PAGE/ Tricin-PAGE durch graue Flächen überlappend gezeichnet.

| |
|--|
| <p><u>Probe 1: Ara h 1</u></p> <p>MRGRVSPMLLLLGILVLASVSATHAKSSPYQKKTENPCAQRCLQSCQEQEPDDLKQKACESRCKLEYDPRCVYDPRGHTGTTNQ RSPFGERTRGRQPGDYDDRRQPRREEGGRWGPAGPREREREEDWRQPREDWRRP SHQQPRKIRPEGREGEQEWGTPGSEVREE TSRNNPFYFPSRRFSTRYGNQNGRIRVLQRFDQRSRQFQNLQNHRIVQIEAKPNTLVLPKHADADNILVIQQGQATVTVANGNN RKSFNLDEGHALRIPSGFISYILNRHDNQNLRVAKISMPVNTPGQFEDFFPASSRDQSSYLQGFSRNTLEAAFNAEFNEIRRVL LEENAGGEQEERQRRWSTRSSENNEGVIVKVSKEHVEELTKHAKSVSKKGSEEGDITNPINLREGEPLDSNNFGRLFEVKPD KKNPQLQDLDMMLTCVEIKEGALMLPHFNSKAMVIVVNKGTGNLELVAVRKEQQQRGRREQEEDEDEEEEGSNREVRRYTARL KEGDVFIMPAAHPVAINASSELHLLGFGINAENNHRIIFLAGDKDNVIDQIEKQAKDLAFPGSGEQVEKLIKNQKESHFVSARPQ SQSQSPSSPEKESPEKEDQEEENQGGKGPLLSILKAFN</p> |
| <p><u>Probe 2: Ara h 1</u></p> <p>MRGRVSPMLLLLGILVLASVSATHAKSSPYQKKTENPCAQRCLQSCQEQEPDDLKQKACESRCKLEYDPRCVYDPRGHTGTTNQ RSPFGERTRGRQPGDYDDRRQPRREEGGRWGPAGPREREREEDWRQPREDWRRP SHQQPRKIRPEGREGEQEWGTPGSEVREE TSRNNPFYFPSRRFSTRYGNQNGRIRVLQRFDQRSRQFQNLQNHRIVQIEAKPNTLVLPKHADADNILVIQQGQATVTVANGNN RKSFNLDEGHALRIPSGFISYILNRHDNQNLRVAKISMPVNTPGQFEDFFPASSRDQSSYLQGFSRNTLEAAFNAEFNEIRRVL LEENAGGEQEERQRRWSTRSSENNEGVIVKVSKEHVEELTKHAKSVSKKGSEEGDITNPINLREGEPLDSNNFGRLFEVKPD KKNPQLQDLDMMLTCVEIKEGALMLPHFNSKAMVIVVNKGTGNLELVAVRKEQQQRGRREQEEDEDEEEEGSNREVRRYTARL KEGDVFIMPAAHPVAINASSELHLLGFGINAENNHRIIFLAGDKDNVIDQIEKQAKDLAFPGSGEQVEKLIKNQKESHFVSARPQ SQSQSPSSPEKESPEKEDQEEENQGGKGPLLSILKAFN</p> |
| <p><u>Probe 3: Ara h 1</u></p> <p>MRGRVSPMLLLLGILVLASVSATHAKSSPYQKKTENPCAQRCLQSCQEQEPDDLKQKACESRCKLEYDPRCVYDPRGHTGTTNQ RSPFGERTRGRQPGDYDDRRQPRREEGGRWGPAGPREREREEDWRQPREDWRRP SHQQPRKIRPEGREGEQEWGTPGSEVREE TSRNNPFYFPSRRFSTRYGNQNGRIRVLQRFDQRSRQFQNLQNHRIVQIEAKPNTLVLPKHADADNILVIQQGQATVTVANGNN RKSFNLDEGHALRIPSGFISYILNRHDNQNLRVAKISMPVNTPGQFEDFFPASSRDQSSYLQGFSRNTLEAAFNAEFNEIRRVL LEENAGGEQEERQRRWSTRSSENNEGVIVKVSKEHVEELTKHAKSVSKKGSEEGDITNPINLREGEPLDSNNFGRLFEVKPD KKNPQLQDLDMMLTCVEIKEGALMLPHFNSKAMVIVVNKGTGNLELVAVRKEQQQRGRREQEEDEDEEEEGSNREVRRYTARL KEGDVFIMPAAHPVAINASSELHLLGFGINAENNHRIIFLAGDKDNVIDQIEKQAKDLAFPGSGEQVEKLIKNQKESHFVSARPQ SQSQSPSSPEKESPEKEDQEEENQGGKGPLLSILKAFN</p> |
| <p><u>Probe 4: Ara h 1</u></p> <p>MRGRVSPMLLLLGILVLASVSATHAKSSPYQKKTENPCAQRCLQSCQEQEPDDLKQKACESRCKLEYDPRCVYDPRGHTGTTNQ RSPFGERTRGRQPGDYDDRRQPRREEGGRWGPAGPREREREEDWRQPREDWRRP SHQQPRKIRPEGREGEQEWGTPGSEVREE TSRNNPFYFPSRRFSTRYGNQNGRIRVLQRFDQRSRQFQNLQNHRIVQIEAKPNTLVLPKHADADNILVIQQGQATVTVANGNN RKSFNLDEGHALRIPSGFISYILNRHDNQNLRVAKISMPVNTPGQFEDFFPASSRDQSSYLQGFSRNTLEAAFNAEFNEIRRVL LEENAGGEQEERQRRWSTRSSENNEGVIVKVSKEHVEELTKHAKSVSKKGSEEGDITNPINLREGEPLDSNNFGRLFEVKPD KKNPQLQDLDMMLTCVEIKEGALMLPHFNSKAMVIVVNKGTGNLELVAVRKEQQQRGRREQEEDEDEEEEGSNREVRRYTARL KEGDVFIMPAAHPVAINASSELHLLGFGINAENNHRIIFLAGDKDNVIDQIEKQAKDLAFPGSGEQVEKLIKNQKESHFVSARPQ SQSQSPSSPEKESPEKEDQEEENQGGKGPLLSILKAFN</p> |
| <p><u>Probe 5: iso-Ara h 3</u></p> <p>VTFRQGGEENECQFQRLNAQRPDNRIESEGGYIETWNPNNQEFQCAGVALSRTVLRNRNALRRPFYSNAPLEIYVQQGSGYFGLIF PGCPSTYEPAQEGRRYQSQKPSRRFQVGGDDPSQQQDSDHQVHRFDEGDLIAVPTGVAFWVNDYEDTDDVVTLSDTSSIHNQ LDQFPRRFLYLAGNQEQEFLRYQQQGSRPHYRQISPRVRGDEQENEGSNI FSGFAQEFLQHAFQVDRQTVENLRGENEREQGA I VTVKGLRILSPDEEDESSRSPSRREEFDEDRSRPQQRGKYDENRRGYKNGI EETICSASVKNLGRSSNPDIYNPQAGSLRSV NELDLPILGWLGLSAQHTIYRNAMFVPHYTLNAHTIIVALNGRAHVQVDSNGNRVYDEELQEGHVLVVPQNFAVAAKAQSENY EYLAFKTDSRPSIANLAGENSIIDNLPEEVANSYRLPREQARQLKNNNPFFKFVPPFDHQSMREVA</p> |

Probe 5: Ara h 3/4

ISFRQQPEENACQFQRLNAQRPDNRLESEGGYIETWNPNNQEFECAGVALSRLVLRNLRNLRPFYSNAPQEIFIQQGRGYFGLIFP
 GCPSTYEPAQQGRRHQSQRAPRRFEGEDQSQQQQDSHQKVRFRFDEGDLIAVPTGVAFWYNDHDTDVAVSLTDTNNNDNQLDQ
 FPRRFLNLAGNHEQEFLRYQQSRRRSLPSPSPQPKQEDREFSPRGQHRRERAGQEEENEGGNIFSGFTPEFLAQAFQVDDRQI
 LQNLRGENESDEQGAIVTVRGGRLILSPDRKRQYERPDDEEYDEDEYDEEERQDRRRGRGSRGSGNGIEETICTASFKK
 NIGRNRSPDIYNPQAGSLK**TANLQLNLLILRWLGLSAEYGNLYRNALFVPHYNTNAHSIIYALR**GRAHVQVVDNSGDRVFDEEL
 QEGHVLVVPQNFVAVAGKSQSENFEYVAFK**TDSRPSIANLAGENSFIDNLP**EEVVANSYGLPREQARQLKNNPFFVFPSEQNSL
 RAVA

Probe 6: iso-Ara h 3

VTFR**QGGEE**NECQFQRLNAQRPDNRLESEGGYIETWNPNNQEFQCGVALSRTVLRNLRNLRPFYSNAPLEIYVQQSGYFGLIF
 PGCSTYEPAQEGRRYQSQKPSRRFQVGGDDPSQQQQDSHQKVRFRFDEGDLIAVPTGVAFWYNDHDTDVVTVLSDTSSIHNQ
 LDQFPRRFLNLAGNHEQEFLRYQQSRRRSLPSPSPQPKQEDREFSPRGQHRRERAGQEEENEGGNIFSGFTPEFLAQAFQV
 VTKGGLR**ILSPDEEDES**SRSPSRREEFDEDRSRPQQRGKYDENRRGYKNGIEETICTASVKKNLGRSNDPIYNPQAGLSRV
 NELDLPILGWLGLSAQGTIYRN**NAMFVPHYTLNAHTIVVALN**GRAHVQVVDNSGDRVFDEEL**QEGHVLVVPQNF**AVAAKQSEN
 EYLAFK**TDSRPSIANLAGENSIDNLP**EEVVANSYRLPREQARQLKNNPFFVFPFDHQSMEVA

Probe 6: Gly 1

ISFRQQPEENACQFQRLNAQRPDNRLESEGGYIETWNPNNQEFECAGVALSRLVLRNLRNLRPFYSNAPQEIFIQQGRGYFGLIF
 PGCSTYEPAQQGRRHQSQRAPRRFEGEDQSQQQQDSHQKVRFRFDEGDLIAVPTGVAFWYNDHDTDVAVSLTDTNNNDNQL
 DQFPRRFLNLAGNHEQEFLRYQQSRRRSLPSPSPQPKQEDREFSPRGQHRRERAGQEEENEGGNIFSGFTPEFLAQAFQV
 DDRQIVQNLRGENESDEEAGIIVTKGGLRILSPDRKRGADEEYDEDEYDEEEDRRRGRGSRGRGNGIEETICTASVKNIGR
 NRSPDIYNPQAGSLK**TANDLNLILRWLGLSAEYGNLYRNALFVPHYNTNAHSIIYALR**GRAHVQVVDNSGDRVFDEEL**QEGHVL**
VVPQNFVAVAGKSQSDNFEYVAFKTDSRPNIANFAGENS**IDNLP**EEVVANSYGLPREQARQLKNNPFFVFPSSQQLRAVA

Probe 7: C-terminaler Part von Ara h 3/4

GIEETICTASFKNIGRNRSPDIYNPQAGSLK**TANLQLNLLILRWLGLSAEYGNLYRNALFVPHYNTNAHSIIYALR**GRAHVQV
 VDSNGDRVFDEEL**QEGHVLVVPQNF**VAVAGKSQSENFEYVAFK**TDSRPSIANLAGENSFIDNLP**EEVVANSYGLPREQARQLKNNP
 FFFVFPSEQNSLRAVA

Probe 7: C-terminaler Part von Gly 1

GIEETICTASVKNIGRNRSPDIYNPQAGSLK**TANDLNLILRWLGLSAEYGNLYRNALFVPHYNTNAHSIIYALR**GRAHVQVVD
 SNGNR**VYDEELQEGHVLVVPQNF**VAVAGKSQSDNFEYVAFK**TDSRPNIANFAGENSIDNLP**EEVVANSYGLPREQARQLKNNP
 FFFVFPSSQQLRAVA

Probe 8: Gly 1

ISFRQQPEENACQFQRLNAQRPDNRLESEGGYIETWNPNNQEFECAGVALSRLVLRNLRNLRPFYSNAPQEIFIQQGRGYFGLIF
 PGCSTYEPAQQGRRHQSQRAPRRFEGEDQSQQQQDSHQKVRFRFDEGDLIAVPTGVAFWYNDHDTDVAVSLTDTNNNDNQL
 DQFPRRFLNLAGNHEQEFLRYQQSRRRSLPSPSPQPKQEDREFSPRGQHRRERAGQEEENEGGNIFSGFTPEFLAQAFQVDDRQI
 DRQIVQNLRGENESDEEAGIIVTKGGLRILSPDRKRGADEEYDEDEYDEEEDRRRGRGSRGRGNGIEETICTASVKNIGR
 NRSPDIYNPQAGSLK**TANDLNLILRWLGLSAEYGNLYRNALFVPHYNTNAHSIIYALR**GRAHVQVVDNSGDRVFDEEL**QEGHVL**
 VVPQNFVAVAGKSQSDNFEYVAFK**TDSRPNIANFAGENSIDNLP**EEVVANSYGLPREQARQLKNNPFFVFPSSQQLRAVA

Probe 8: Ara h 3/4

ISFRQQPEENACQFQRLNAQRPDNRLESEGGYIETWNPNNQEFECAGVALSRLVLRNLRNLRPFYSNAPQEIFIQQGRGYFGLIFP
 GCPSTYEPAQQGRRHQSQRAPRRFEGEDQSQQQQDSHQKVRFRFDEGDLIAVPTGVAFWYNDHDTDVAVSLTDTNNNDNQLDQ
 FPRRFLNLAGNHEQEFLRYQQSRRRSLPSPSPQPKQEDREFSPRGQHRRERAGQEEENEGGNIFSGFTPEFLAQAFQVDDRQI
 LQNLRGENESDEQGAIVTVRGGRLILSPDRKRQYERPDDEEYDEDEYDEEERQDRRRGRGSRGSGNGIEETICTASFKK
 NIGRNRSPDIYNPQAGSLK**TANLQLNLLILRWLGLSAEYGNLYRNALFVPHYNTNAHSIIYALR**GRAHVQVVDNSGDRVFDEEL
 QEGHVLVVPQNFVAVAGKSQSENFEYVAFK**TDSRPSIANLAGENSFIDNLP**EEVVANSYGLPREQARQLKNNPFFVFPSEQNSL
 RAVA

Probe 9: Gly 1

ISFRQQPEENACQFQRLNAQRPDNRLESEGGYIETWNPNNQEFECAGVALSRLVLRNLRNLRPFYSNAPQEIFIQQGRGYFGLIF
 PGCSTYEPAQQGRRHQSQRAPRRFEGEDQSQQQQDSHQKVRFRFDEGDLIAVPTGVAFWYNDHDTDVAVSLTDTNNNDNQL
 DQFPRRFLNLAGNHEQEFLRYQQSRRRSLPSPSPQPKQEDREFSPRGQHRRERAGQEEENEGGNIFSGFTPEFLAQAFQV
 DDRQIVQNLRGENESDEEAGIIVTKGGLRILSPDRKRGADEEYDEDEYDEEEDRRRGRGSRGRGNGIEETICTASVKNIGR
 NRSPDIYNPQAGSLK**TANDLNLILRWLGLSAEYGNLYRNALFVPHYNTNAHSIIYALR**GRAHVQVVDNSGDRVFDEEL**QEGHVL**
 VVPQNFVAVAGKSQSDNFEYVAFK**TDSRPNIANFAGENSIDNLP**EEVVANSYGLPREQARQLKNNPFFVFPSSQQLRAVA

Probe 9: Ara h 3/4

ISFRQQPEENACQFQRLNAQRPDNRIESEGGYIETWNPNQEFECAGVALSRLVLRNALRRPFYSNAPQEIFIQQGRGYFGLIFP
 GCPSTYEPAQQGRRHQSRPPRRFQGDQSQQQDSDHQVHRFDEGDLIAVPTGVAFWYNDHDTDVVAVSLTDTNNDNQLDQ
 FPRRNLNLAGNHEQEFRLRYQQSRRRSLPSPSPQPKQEDREFSPRGQHRRRERAGQEQENEGGNIFSGFTPEFLAQAFVDDRQI
 LQNLRGENESDEQGAIVTVRGGLRILSPDRKRRQYERPEDEEYDEDEYDEEERQQDRRRGRGSRGSGNGIEETICTASFKK
 NIGRNRSPDIYNPQAGSLK**TANELQLNLLILRWLGLSAEYGNLYRNALFVPHYNTNAHSIIYALRGRAHVQVVDSDNGDRVFDEEL**
QEGHVLVVPQNFVAVAGKSQSENFEYVAFKTDSPSIANLAGENSFIDNLPPEEVVANSYGLPREQARQLKNNPFFVPPSEQNSL
 RAVA

Probe 10: C-terminaler Part von Gly 1

GIEETICTASVKKNIGRNRSPDIYNPQAGSLK**TANDLNLILRWLGLSAEYGNLYRNALFVPHYNTNAHSIIYALR**GRAHVQVVD
 SNGNRVYDEEL**QEGHVLVVPQNFVAVAGKSQSDNFEYVAFKTDSPNIANFAGENSIIDNLPPEEVVANSYGLPREQARQLKNNP**
KFFVPPSQSLRAVA

Tab. 21: Übersicht der massenspektrometrischen Analysen (Abb. 33, 34, Tab. 15), Kennzeichnung der gefundenen Peptide aus nicht reduzierender IEF/ nativer PAGE bzw. nicht reduzierender IEF/ red. LDS-PAGE durch graue Flächen überlappend gezeichnet.

Probe 1: iso-Ara h 3

VTFRQGGEEENECQFQRLNAQRPDNR**IESEGGYIETWNPNNQEFQCAGVALSRTVLRNALRRPFYSNAPLEIYVQQGSGYFGLIF**
 PGCPSTYEPAQEGRRYQSQKPSRRFQVGGDDPSQQQDSDHQVHRFDEGDLIAVPTGVAFWYNDHDTDVVAVSLTDTNNDNQLDQ
 LDQFPRRFLYLAGNQEFLRYQQQGSRRPHYRQISPRVRGDEQENEGSNI FSGFAQEFQHFQVDRQTVENLRGENEREQGAIV
 TVVKGGLRILSPDEEDESRR**SPPSRREFEDEDRSRPQQRGKYDENRRGYKNGIEETICTASVKNLGRSSNPDIYNPQAGLSRV**
NELDLPILGWLGLSAQHGTYIRNAMFVPHYTLNAHTIIVALNGRAHVQVVDSDNGNRVYDEELQEGHVLVVPQNFVAVAAKAQSENY
EYLAFKTDSPSIANLAGENSIIDNLPPEEVVANSYRLPREQARQLKNNPFFVPPFDHQSMREVA

Probe 2: Gly 1

ISFRQQPEENACQFQRLNAQRPDNRIESEGGYIETWNPNQEFECAGVALSRLVLRNALRRPFYSNAPQEIFIQQGRGYFGLIFP
 GCPSTYEPAQQGRRHQSRAPR**RFEGEDQSQQQDSDHQVRRFDEGDLIAVPTGVALWFMFNDHDTDVVAVSLTDTNNDNQLDQ**
 DQFPRRFLYLAGNHEQEFRLRYQQSRRRSLPSPSPQPKQEDREFSPRGQHRRRERAGQEQENEGGNIFSGFTPEFLAQAFV
 DDRQIVQNLRGENESEEGAI VTVKGGRLILSPDRKRGADDEEYDEDEYDEEEDRRRGRGSRGNGIEETICTASV**KNIGR**
NRSPDIYNPQAGSLKTANDLNLILRWLGLSAEYGNLYRNALFVPHYNTNAHSIIYALRGRAHVQVVDSDNGNRVYDEELQEGHVL
 VVPQNFVAVAGKSQSDN**FEYVAFK**TDSPNIANFAGENSIIDNLPPEEVVANSYGLPREQARQLKNNPFF**VFPVPPSQSLRAVA**

Probe 2: Ara h 3/4

ISFRQQPEENACQFQRLNAQRPDNRIESEGGYIETWNPNQEFECAGVALSRLVLRNALRRPFYSNAPQEIFIQQGRGYFGLIFP
 GCPSTYEPAQQGRRHQSRPPRR**RFQGDQSQQQDSDHQVHRFDEGDLIAVPTGVAFWYNDHDTDVVAVSLTDTNNDNQLDQ**
 FPRRNLNLAGNHEQEFRLRYQQSRRRSLPSPSPQPKQEDREFSPRGQHRRRERAGQEQENEGGNIFSGFTPEFLAQAFVDDRQI
 LQNLRGENESDEQGAIVTVRGGLRILSPDRKRRQYERPEDEEYDEDEYDEEERQQDRRRGRGSRGSGNGIEETICTASF**KK**
NIGRNRSPDIYNPQAGSLKTANELQLNLLILRWLGLSAEYGNLYRNALFVPHYNTNAHSIIYALRGRAHVQVVDSDNGDRVFDEEL
QEGHVLVVPQNFVAVAGKSQSENFEYVAFKTDSPSIANLAGENSFIDNLPPEEVVANSYGLPREQARQLKNNPFFVPPSEQNSL
 RAVA

Probe 3: iso-Ara h 3

VTFRQGGEEENECQFQRLNAQRPDNRIESEGGYIETWNPNNQEFQCAGVALSRTVLRNALRRPFYSNAPLEIYVQQGSGYFGLIFP
 PGCPSTYEPAQEGRRYQSQKPSRRFQVGGDDPSQQQDSDHQVHRFDEGDLIAVPTGVAFWYNDHDTDVVAVSLTDTNNDNQLDQ
 LDQFPRRFLYLAGNQEFLRYQQQGSRRPHYRQISPRVRGDEQENEGSNI FSGFAQEFQHFQVDRQTVENLRGENEREQGAIV
 TVVKGGLRILSPDEEDESRR**SPPSRREFEDEDRSRPQQRGKYDENRRGYKNGIEETICTASVKNLGRSSNPDIYNPQAGLSRV**
NELDLPILGWLGLSAQHGTYIRNAMFVPHYTLNAHTIIVALNGRAHVQVVDSDNGNRVYDEELQEGHVLVVPQNFVAVAAKAQSENY
EYLAFKTDSPSIANLAGENSIIDNLPPEEVVANSYRLPREQARQLKNNPFFVPPFDHQSMREVA

Probe 4: iso-Ara h 3

VTFRQGGEEENECQFQRL**NAQRPDNR**IESEGGYIETWNPNNQEFQCAGVALSRTVLRNALRRPFYSNAPLEIYVQQGSGYFGLIFP
 PGCPSTYEPAQEGRRY**QSQKPSRR**FQVGGDDPSQQQDSDHQVHRFDEGDLIAVPTGVAFWYNDHDTDVVAVSLTDTNNDNQLDQ
 LDQFPRRFLYLAGNQEFLRYQQQGSRRPHYRQISPRVRGDEQENEGSNI FSGFAQEFQHFQVDRQTVENLRGENEREQGAIV
 TVVKGGLRILSPDEEDESRR**SPPSRREFEDEDRSRPQQRGKYDENRRGYKNGIEETICTASVKNLGRSSNPDIYNPQAGLSRV**
NELDLPILGWLGLSAQHGTYIRNAMFVPHYTLNAHTIIVALNGRAHVQVVDSDNGNRVYDEELQEGHVLVVPQNFVAVAAKAQSENY
EYLAFKTDSPSIANLAGENSIIDNLPPEEVVANSYRLPREQARQLKNNPFFVPPFDHQSMREVA

Probe 6: Gly 1

ISFRQQPEENACQFQRLNAQRPDNRLESEGGYIETWNPNNQEFECAGVALSRLVLRNALRRPFYSNAPQEIFIQQGRGYFGLIF
 PGC PSTYE EPAQGGRRHQSRAPRRFEGEDQSQQQQDSHQVRRFDEGDLIAVPTGVALWFMFNDHDTDVAVSLTDTNNDNQLD
 DQFPRRFNLAGNHEQEFLRYQQSRRRSLPYSYSPSQPRQEEREFSPRGQHSRRERAGQEEENEGGNIFSGFTPEFLAQAFQV
 DDRQIVQNLRGENSEEEGAIVTVKGGRLILSPDRKRGADEEEYDEDEYDEEDRRRGRGSRGRNGIEETICTASVKKNIGR
 NRS PDIYNPQAGSLKTANDLNLILLRWLGLSAEYGNLYRNALFVPHYNTNAHSIIYALRGRAHVQVVDNSGNRVYDEELQEGHVL
 VVQNFVAVAGKSQSDNFEYVAFKTD SRPNIANFAGENSII DNLP EEVVANSYGLPREQARQLKNNNPFKFFVPPSQSLRAVA

Probe 7: Ara h 1

MRGRVSPMLLLLGLVLSVSAATHAKSSPYQKKTENPCAQRCLQSCQEPDDLKQKACESRCKLEYDPRCVYDPRGHTGTTNQ
 RSPFGERTRGRQPGDYDDRRQPRREEGGRWGPAGPREREREEDWRQPREDRRPSHQPRKIRPEGRGEQEWEWTPGSEVREE
 TSRNNPFYFPSRRFSTRYGNQNGRIRVLRFDQSRQFQNLQNHRIVQIEAKPNTLVLPKHADADNILLVIQQGQATVTVANGNN
 RKSFNLDEGHALRIPSGFISYILNRHDNQLNRVAKISMPVNTPGQFEDFFPASSRDQSSYLQGF SRNTLEAAFNAEFNEIRRVL
 LEENAGGEQEERQRRWSTRSSENEGVIKVSKEHVEELTKHAKSVSKKGSEEEGDITNPINLREGEPLDSNNFGRLEFKPD
 KKNPQLQDLDMMLTCVEIKEGALMLPHFNKAMVIVVKNKGTGNLELVAVRKEQQQRGREEEEDDEEEEGSNREVRRTARL
 KEGDVFIMPAAHFVAINASSELHLLGFGINAENNRIFLAGDKDNVIDQIEKQAKDLAFFPGSGEQVEKLIKKNQKESHFVSARPO
 SQSQSPSSPEKESPEKEDQEEENQGGKGPLLSILKAFN

Probe 8: N-terminaler Part von Ara h 3/4

ISFRQQPEENACQFQRLNAQRPDNRLESEGGYIETWNPNNQEFECAGVALSRLVLRNALRRPFYSNAPQEIFIQQGRGYFGLIF
 GCPSTYE EPAQGGRRHQSRAPRRFQGDQSQQQDSHQVHRFDEGDLIAVPTGVAFWYNDHDTDVAVSLTDTNNDNQLDQ
 FPRRFNLAGNHEQEFLRYQQSRRRSLPYSYSPQPKQEDREFSPRGQHSRRERAGQEENEGGNIFSGFTPEFLAQAFVDDRQI
 LQNLRGENSEDEGAIVTVRGGRLILSPDRKRQYERPDEEEYDEDEYDEEERQDRRRGRGSRGSGN

Probe 8: Trypsin Inhibitor

ISFRQQPEENACQFQRLNAQRPDNRLESEGGYIETWNPNNQEFECAGVALSRLVLRNALRRPFYSNAPQEIFIQQGRGYFGLIF
 PGC PSTYE EPAQGGRRHQSRAPRRFQGDQSQQQDSHQVHRFDEGDLIAVPTGVAFWYNDHDTDVAVSLTDTNNDNQLD
 QFPRRFNLAGNHEQEFLRYQQSRRRS

Probe 9: N-terminaler Part von Gly 1

ISFRQQPEENACQFQRLNAQRPDNRLESEGGYIETWNPNNQEFECAGVALSRLVLRNALRRPFYSNAPQEIFIQQGRGYFGLIF
 PGC PSTYE EPAQGGRRHQSRAPRRFEGEDQSQQQQDSHQVRRFDEGDLIAVPTGVALWFMFNDHDTDVAVSLTDTNNDNQLD
 DQFPRRFNLAGNHEQEFLRYQQSRRRSLPYSYSPSQPRQEEREFSPRGQHSRRERAGQEEENEGGNIFSGFTPEFLAQAFQV
 DDRQIVQNLRGENSEEEGAIVTVKGGRLILSPDRKRGADEEEYDEDEYDEEDRRRGRGSRGRGN

Probe 9: Trypsin Inhibitor

ISFRQQPEENACQFQRLNAQRPDNRLESEGGYIETWNPNNQEFECAGVALSRLVLRNALRRPFYSNAPQEIFIQQGRGYFGLIF
 PGC PSTYE EPAQGGRRHQSRAPRRFQGDQSQQQDSHQVHRFDEGDLIAVPTGVAFWYNDHDTDVAVSLTDTNNDNQLD
 QFPRRFNLAGNHEQEFLRYQQSRRRS

Probe 10: N-terminaler Part von iso-Ara h 3

VTFRQGGEEENECQFQRLNAQRPDNRLESEGGYIETWNPNNQEFECAGVALSRTVLRNALRRPFYSNAPLEIYVQQGSGYFGLIF
 PGC PSTYE EPAQGGRRHQSRAPRRFQGDQSQQQDSHQVRRFDEGDLIAVPTGVAFWYNDHDTDVAVSLTDTNNDNQLD
 LDQFPRRFYLAGNQEFLRYQQQGSRPHYRQISPRVRGDEQENEGSNI FSGFAQEF LQHAFVDRQTVENLRGENEREQGA I
 VTVKGGRLILSPDEEDESRSPPSRREEFDEDRSRPQRGKYDENRRGYKN

Probe 12: C-terminaler Part von iso-Ara h 3

GIEETICSASVKKNLGRSSNPDIYNPQAGSLR SVNELDLPILGWLGLSAQHGTIYRNAMFVPHYTLNAHTIVVALNGRAHVQV
 DSNGNRVYDEELQEGHVLVVPQNFVAQAQSENIEYLAFAKTD SRPSIANLAGENSII DNLP EEVVANSYRLPREQARQLKNNN
 PFKFFVPPFDHQSMREVA

Anhang

Tab. 22: Übersicht der massenspektrometrischen Analysen (Abb. 35, Tab. 16), Kennzeichnung der gefundenen Peptide aus BN-PAGE/ LDS-PAGE durch graue Flächen überlappend gezeichnet.

| |
|---|
| <p><u>Probe 1: Mittlerer Bereich von iso-Ara h 3</u></p> <p>VTFRQGGEEENCQFQRLNAQRPDNRIESEGGYIETWNPNNQEFQCAGVALSRTVLRRLNALRRPFYSNAPLEIYVQQGSGYFGLIF PGCPSTYEPAQEGRRYQSOKPSRRFOVQDDPSQQQDSDSHQKVRHFDEGDLIAVPTGVAFWMYNDDETDVVTVTLSDTSSIHNQ LDQFPRRFYLAGNQEQEFLRYQQQGSRPHYRQISPRVRGDEQENEGSNI FSGFAQEF LQHAFQVDRQTVENLRGENEREQQGAI VTVKGGLRILSPDEEDESSRSPSPSRREEFDEDRSRPQQRGKYDENRRGYKNGIEETIC SASVKKNLGRSSNPDIYNPQAGSLRSV NELDLPILGWLGLSAQHGTIYRNAMFVPHYTLNAHTI VVALNGRAHVQVVD SNGNRVYDEELQEGHVLVVPQNF AVAAKAQSENY EYLAFKTD SRPSIANLAGENSIIDNLPEEVVANSYRLPREQARQLKNNNPFKFFVPPFDHQS MREVA</p> |
| <p><u>Probe 2: Mittlerer Bereich von Gly 1</u></p> <p>ISFRQQPEENACQFQRLNAQRPDNRLESEGGYIETWNPNNQEFECAGVALSRLVLRRLNALRRPFYSNAPQEIFIQQGRGYFGLIF PGCPSTYEPAQQGRRHQSRAPRRFEGEDQSQQQQDSDSHQKVRHFDEGDLIAVPTGVALWMFNDHDTDVVAVSLTD TNNNDNQL DQFPRRFNLAGNHEQEFLRYQQSRRRSLPSPSPQSQPRQEERFSPRGQHSRERERAGQEEENEGGNIFSGFTPEFLAQAFQV DDRQIVQNLRGENESEEEGAIVTVKGGRLILSPDRKRGADEEEYDEDEYDEEEDRRRGRGSRGNGIEETICTASVKKNIGR NRS PDIYNPQAGSLKTANDLNL LILRWLGLSAEYGNLYRNALFVPHYNTNAHSIIYALRGRAHVQVVD SNGNRVYDEELQEGHVL VVPQNF AVAGKSQSDNF EYVAFKTD SRPNIANFAGENSIIDNLPEEVVANSYGLPREQARQLKNNNPFKFFVPPSQSLRAVA</p> |
| <p><u>Probe 3: C-terminaler Part von Gly 1</u></p> <p>GIEETICTASVKKNIGRNRSPDIYNPQAGSLKTANDLNL LILRWLGLSAEYGNLYRNALFVPHYNTNAHSIIYALRGRAHVQVVD SNGNRVYDEELQEGHVLVVPQNF AVAGKSQSDNF EYVAFKTD SRPNIANFAGENSIIDNLPEEVVANSYGLPREQARQLKNNNPF KFFVPPSQSLRAVA</p> |
| <p><u>Probe 4: N-terminaler Part von iso-Ara h 3</u></p> <p>VTFRQGGEEENCQFQRLNAQRPDNRIESEGGYIETWNPNNQEFQCAGVALSRTVLRRLNALRRPFYSNAPLEIYVQQGSGYFGLIF PGCPSTYEPAQEGRRYQSOKPSRRFOVQDDPSQQQDSDSHQKVRHFDEGDLIAVPTGVAFWMYNDDETDVVTVTLSDTSSIHNQ LDQFPRRFYLAGNQEQEFLRYQQQGSRPHYRQISPRVRGDEQENEGSNI FSGFAQEF LQHAFQVDRQTVENLRGENEREQQGAI VTVKGGLRILSPDEEDESSRSPSPSRREEFDEDRSRPQQRGKYDENRRGYKN</p> |
| <p><u>Probe 5: N-terminaler Part von Gly 1</u></p> <p>ISFRQQPEENACQFQRLNAQRPDNRLESEGGYIETWNPNNQEFECAGVALSRLVLRRLNALRRPFYSNAPQEIFIQQGRGYFGLIF PGCPSTYEPAQQGRRHQSRAPRRFEGEDQSQQQQDSDSHQKVRHFDEGDLIAVPTGVALWMFNDHDTDVVAVSLTD TNNNDNQL DQFPRRFNLAGNHEQEFLRYQQSRRRSLPSPSPQSQPRQEERFSPRGQHSRERERAGQEEENEGGNIFSGFTPEFLAQAFQV DDRQIVQNLRGENESEEEGAIVTVKGGRLILSPDRKRGADEEEYDEDEYDEEEDRRRGRGSRGN</p> |
| <p><u>Probe 6: iso-Ara h 3</u></p> <p>VTFRQGGEEENCQFQRLNAQRPDNRIESEGGYIETWNPNNQEFQCAGVALSRTVLRRLNALRRPFYSNAPLEIYVQQGSGYFGLIF PGCPSTYEPAQEGRRYQSOKPSRRFOVQDDPSQQQDSDSHQKVRHFDEGDLIAVPTGVAFWMYNDDETDVVTVTLSDTSSIHNQ LDQFPRRFYLAGNQEQEFLRYQQQGSRPHYRQISPRVRGDEQENEGSNI FSGFAQEF LQHAFQVDRQTVENLRGENEREQQGAI VTVKGGLRILSPDEEDESSRSPSPSRREEFDEDRSRPQQRGKYDENRRGYKNGIEETIC SASVKKNLGRSSNPDIYNPQAGSLRSV NELDLPILGWLGLSAQHGTIYRNAMFVPHYTLNAHTI VVALNGRAHVQVVD SNGNRVYDEELQEGHVLVVPQNF AVAAKAQSENY EYLAFKTD SRPSIANLAGENSIIDNLPEEVVANSYRLPREQARQLKNNNPFKFFVPPFDHQS MREVA</p> |

Anhang

9.2 Darstellung des Epitopmappings

| 7B2 II | A 1 | A 2 | A 3 | A 4 | A 5 | A 6 | A 7 | A 8 | A 9 | A 10 | A 11 | A 12 | A 13 | A 14 | A 15 | A 16 | A 17 | A 18 | A 19 | A 20 | A 21 | A 22 | A 23 | A 24 | A 25 |
|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| A 1 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 |
| A 2 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 |
| A 3 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | 60 | 61 | 62 | 63 | 64 | 65 | 66 | 67 | 68 | 69 | 70 | 71 | 72 | 73 | 74 | 75 |
| A 4 | 76 | 77 | 78 | 79 | 80 | 81 | 82 | 83 | 84 | 85 | 86 | 87 | 88 | 89 | 90 | 91 | 92 | 93 | 94 | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 100 |
| A 5 | 101 | 102 | 103 | 104 | 105 | 106 | 107 | 108 | 109 | 110 | 111 | 112 | 113 | 114 | 115 | 116 | 117 | 118 | 119 | 120 | 121 | 122 | 123 | 124 | 125 |
| A 6 | 126 | 127 | 128 | 129 | 130 | 131 | 132 | 133 | 134 | 135 | 136 | 137 | 138 | 139 | 140 | 141 | 142 | 143 | 144 | 145 | 146 | 147 | 148 | 149 | 150 |
| A 7 | 151 | 152 | 153 | 154 | 155 | 156 | 157 | 158 | 159 | 160 | 161 | 162 | 163 | 164 | 165 | 166 | 167 | 168 | 169 | 170 | 171 | 172 | 173 | 174 | 175 |
| A 8 | 176 | 177 | 178 | 179 | 180 | 181 | 182 | 183 | 184 | 185 | 186 | 187 | 188 | 189 | 190 | 191 | 192 | 193 | 194 | 195 | 196 | 197 | 198 | 199 | 200 |
| A 9 | 201 | 202 | 203 | 204 | 205 | 206 | 207 | 208 | 209 | 210 | 211 | 212 | 213 | 214 | 215 | 216 | 217 | 218 | 219 | 220 | 221 | 222 | 223 | 224 | 225 |
| A 10 | 226 | 227 | 228 | 229 | 230 | 231 | 232 | 233 | 234 | 235 | 236 | 237 | 238 | 239 | 240 | 241 | 242 | 243 | 244 | 245 | 246 | 247 | 248 | 249 | 250 |
| A 11 | 251 | 252 | 253 | 254 | 255 | 256 | 257 | 258 | 259 | 260 | 261 | 262 | 263 | 264 | 265 | 266 | 267 | 268 | 269 | 270 | 271 | 272 | 273 | 274 | 275 |
| A 12 | 276 | 277 | 278 | 279 | 280 | 281 | 282 | 283 | 284 | 285 | 286 | 287 | 288 | 289 | 290 | 291 | 292 | 293 | 294 | 295 | 296 | 297 | 298 | 299 | 300 |
| A 13 | 301 | 302 | 303 | 304 | 305 | 306 | 307 | 308 | 309 | 310 | 311 | 312 | 313 | 314 | 315 | 316 | 317 | 318 | 319 | 320 | 321 | 322 | 323 | 324 | 325 |
| A 14 | 326 | 327 | 328 | 329 | 330 | 331 | 332 | 333 | 334 | 335 | 336 | 337 | 338 | 339 | 340 | 341 | 342 | 343 | 344 | 345 | 346 | 347 | 348 | 349 | 350 |
| A 15 | 351 | 352 | 353 | 354 | 355 | 356 | 357 | 358 | 359 | 360 | 361 | 362 | 363 | 364 | 365 | 366 | 367 | 368 | 369 | 370 | 371 | 372 | 373 | 374 | 375 |
| A 16 | 376 | 377 | 378 | 379 | 380 | 381 | 382 | 383 | 384 | 385 | 386 | 387 | 388 | 389 | 390 | 391 | 392 | 393 | 394 | 395 | 396 | 397 | 398 | 399 | 400 |
| A 17 | 401 | 402 | 403 | 404 | 405 | 406 | 407 | 408 | 409 | 410 | 411 | 412 | 413 | 414 | 415 | 416 | 417 | 418 | 419 | 420 | 421 | 422 | 423 | 424 | 425 |

| 7B2 IV | A 1 | A 2 | A 3 | A 4 | A 5 | A 6 | A 7 | A 8 | A 9 | A 10 | A 11 | A 12 | A 13 | A 14 | A 15 | A 16 | A 17 | A 18 | A 19 | A 20 | A 21 | A 22 | A 23 | A 24 | A 25 |
|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| A 1 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 |
| A 2 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 |
| A 3 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | 60 | 61 | 62 | 63 | 64 | 65 | 66 | 67 | 68 | 69 | 70 | 71 | 72 | 73 | 74 | 75 |
| A 4 | 76 | 77 | 78 | 79 | 80 | 81 | 82 | 83 | 84 | 85 | 86 | 87 | 88 | 89 | 90 | 91 | 92 | 93 | 94 | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 100 |
| A 5 | 101 | 102 | 103 | 104 | 105 | 106 | 107 | 108 | 109 | 110 | 111 | 112 | 113 | 114 | 115 | 116 | 117 | 118 | 119 | 120 | 121 | 122 | 123 | 124 | 125 |
| A 6 | 126 | 127 | 128 | 129 | 130 | 131 | 132 | 133 | 134 | 135 | 136 | 137 | 138 | 139 | 140 | 141 | 142 | 143 | 144 | 145 | 146 | 147 | 148 | 149 | 150 |
| A 7 | 151 | 152 | 153 | 154 | 155 | 156 | 157 | 158 | 159 | 160 | 161 | 162 | 163 | 164 | 165 | 166 | 167 | 168 | 169 | 170 | 171 | 172 | 173 | 174 | 175 |
| A 8 | 176 | 177 | 178 | 179 | 180 | 181 | 182 | 183 | 184 | 185 | 186 | 187 | 188 | 189 | 190 | 191 | 192 | 193 | 194 | 195 | 196 | 197 | 198 | 199 | 200 |
| A 9 | 201 | 202 | 203 | 204 | 205 | 206 | 207 | 208 | 209 | 210 | 211 | 212 | 213 | 214 | 215 | 216 | 217 | 218 | 219 | 220 | 221 | 222 | 223 | 224 | 225 |
| A 10 | 226 | 227 | 228 | 229 | 230 | 231 | 232 | 233 | 234 | 235 | 236 | 237 | 238 | 239 | 240 | 241 | 242 | 243 | 244 | 245 | 246 | 247 | 248 | 249 | 250 |
| A 11 | 251 | 252 | 253 | 254 | 255 | 256 | 257 | 258 | 259 | 260 | 261 | 262 | 263 | 264 | 265 | 266 | 267 | 268 | 269 | 270 | 271 | 272 | 273 | 274 | 275 |
| A 12 | 276 | 277 | 278 | 279 | 280 | 281 | 282 | 283 | 284 | 285 | 286 | 287 | 288 | 289 | 290 | 291 | 292 | 293 | 294 | 295 | 296 | 297 | 298 | 299 | 300 |
| A 13 | 301 | 302 | 303 | 304 | 305 | 306 | 307 | 308 | 309 | 310 | 311 | 312 | 313 | 314 | 315 | 316 | 317 | 318 | 319 | 320 | 321 | 322 | 323 | 324 | 325 |
| A 14 | 326 | 327 | 328 | 329 | 330 | 331 | 332 | 333 | 334 | 335 | 336 | 337 | 338 | 339 | 340 | 341 | 342 | 343 | 344 | 345 | 346 | 347 | 348 | 349 | 350 |
| A 15 | 351 | 352 | 353 | 354 | 355 | 356 | 357 | 358 | 359 | 360 | 361 | 362 | 363 | 364 | 365 | 366 | 367 | 368 | 369 | 370 | 371 | 372 | 373 | 374 | 375 |
| A 16 | 376 | 377 | 378 | 379 | 380 | 381 | 382 | 383 | 384 | 385 | 386 | 387 | 388 | 389 | 390 | 391 | 392 | 393 | 394 | 395 | 396 | 397 | 398 | 399 | 400 |
| A 17 | 401 | 402 | 403 | 404 | 405 | 406 | 407 | 408 | 409 | 410 | 411 | 412 | 413 | 414 | 415 | 416 | 417 | 418 | 419 | 420 | 421 | 422 | 423 | 424 | 425 |

Abb. 69 Auswertung des monoklonalen Antikörpers PEI-7B2 auf den Filtern II und IV
Mittelgrau markiert Antikörper-bindende Bereiche und dunkelgraue Schattierungen zeigen Hauptepitop

Anhang

| Pnx II | A 1 | A 2 | A 3 | A 4 | A 5 | A 6 | A 7 | A 8 | A 9 | A 10 | A 11 | A 12 | A 13 | A 14 | A 15 | A 16 | A 17 | A 18 | A 19 | A 20 | A 21 | A 22 | A 23 | A 24 | A 25 |
|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| A 1 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 |
| A 2 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 |
| A 3 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | 60 | 61 | 62 | 63 | 64 | 65 | 66 | 67 | 68 | 69 | 70 | 71 | 72 | 73 | 74 | 75 |
| A 4 | 76 | 77 | 78 | 79 | 80 | 81 | 82 | 83 | 84 | 85 | 86 | 87 | 88 | 89 | 90 | 91 | 92 | 93 | 94 | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 100 |
| A 5 | 101 | 102 | 103 | 104 | 105 | 106 | 107 | 108 | 109 | 110 | 111 | 112 | 113 | 114 | 115 | 116 | 117 | 118 | 119 | 120 | 121 | 122 | 123 | 124 | 125 |
| A 6 | 126 | 127 | 128 | 129 | 130 | 131 | 132 | 133 | 134 | 135 | 136 | 137 | 138 | 139 | 140 | 141 | 142 | 143 | 144 | 145 | 146 | 147 | 148 | 149 | 150 |
| A 7 | 151 | 152 | 153 | 154 | 155 | 156 | 157 | 158 | 159 | 160 | 161 | 162 | 163 | 164 | 165 | 166 | 167 | 168 | 169 | 170 | 171 | 172 | 173 | 174 | 175 |
| A 8 | 176 | 177 | 178 | 179 | 180 | 181 | 182 | 183 | 184 | 185 | 186 | 187 | 188 | 189 | 190 | 191 | 192 | 193 | 194 | 195 | 196 | 197 | 198 | 199 | 200 |
| A 9 | 201 | 202 | 203 | 204 | 205 | 206 | 207 | 208 | 209 | 210 | 211 | 212 | 213 | 214 | 215 | 216 | 217 | 218 | 219 | 220 | 221 | 222 | 223 | 224 | 225 |
| A 10 | 226 | 227 | 228 | 229 | 230 | 231 | 232 | 233 | 234 | 235 | 236 | 237 | 238 | 239 | 240 | 241 | 242 | 243 | 244 | 245 | 246 | 247 | 248 | 249 | 250 |
| A 11 | 251 | 252 | 253 | 254 | 255 | 256 | 257 | 258 | 259 | 260 | 261 | 262 | 263 | 264 | 265 | 266 | 267 | 268 | 269 | 270 | 271 | 272 | 273 | 274 | 275 |
| A 12 | 276 | 277 | 278 | 279 | 280 | 281 | 282 | 283 | 284 | 285 | 286 | 287 | 288 | 289 | 290 | 291 | 292 | 293 | 294 | 295 | 296 | 297 | 298 | 299 | 300 |
| A 13 | 301 | 302 | 303 | 304 | 305 | 306 | 307 | 308 | 309 | 310 | 311 | 312 | 313 | 314 | 315 | 316 | 317 | 318 | 319 | 320 | 321 | 322 | 323 | 324 | 325 |
| A 14 | 326 | 327 | 328 | 329 | 330 | 331 | 332 | 333 | 334 | 335 | 336 | 337 | 338 | 339 | 340 | 341 | 342 | 343 | 344 | 345 | 346 | 347 | 348 | 349 | 350 |
| A 15 | 351 | 352 | 353 | 354 | 355 | 356 | 357 | 358 | 359 | 360 | 361 | 362 | 363 | 364 | 365 | 366 | 367 | 368 | 369 | 370 | 371 | 372 | 373 | 374 | 375 |
| A 16 | 376 | 377 | 378 | 379 | 380 | 381 | 382 | 383 | 384 | 385 | 386 | 387 | 388 | 389 | 390 | 391 | 392 | 393 | 394 | 395 | 396 | 397 | 398 | 399 | 400 |
| A 17 | 401 | 402 | 403 | 404 | 405 | 406 | 407 | 408 | 409 | 410 | 411 | 412 | 413 | 414 | 415 | 416 | 417 | 418 | 419 | 420 | 421 | 422 | 423 | 424 | 425 |

| Pnx IV | A 1 | A 2 | A 3 | A 4 | A 5 | A 6 | A 7 | A 8 | A 9 | A 10 | A 11 | A 12 | A 13 | A 14 | A 15 | A 16 | A 17 | A 18 | A 19 | A 20 | A 21 | A 22 | A 23 | A 24 | A 25 |
|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| A 1 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 |
| A 2 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 |
| A 3 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | 60 | 61 | 62 | 63 | 64 | 65 | 66 | 67 | 68 | 69 | 70 | 71 | 72 | 73 | 74 | 75 |
| A 4 | 76 | 77 | 78 | 79 | 80 | 81 | 82 | 83 | 84 | 85 | 86 | 87 | 88 | 89 | 90 | 91 | 92 | 93 | 94 | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 100 |
| A 5 | 101 | 102 | 103 | 104 | 105 | 106 | 107 | 108 | 109 | 110 | 111 | 112 | 113 | 114 | 115 | 116 | 117 | 118 | 119 | 120 | 121 | 122 | 123 | 124 | 125 |
| A 6 | 126 | 127 | 128 | 129 | 130 | 131 | 132 | 133 | 134 | 135 | 136 | 137 | 138 | 139 | 140 | 141 | 142 | 143 | 144 | 145 | 146 | 147 | 148 | 149 | 150 |
| A 7 | 151 | 152 | 153 | 154 | 155 | 156 | 157 | 158 | 159 | 160 | 161 | 162 | 163 | 164 | 165 | 166 | 167 | 168 | 169 | 170 | 171 | 172 | 173 | 174 | 175 |
| A 8 | 176 | 177 | 178 | 179 | 180 | 181 | 182 | 183 | 184 | 185 | 186 | 187 | 188 | 189 | 190 | 191 | 192 | 193 | 194 | 195 | 196 | 197 | 198 | 199 | 200 |
| A 9 | 201 | 202 | 203 | 204 | 205 | 206 | 207 | 208 | 209 | 210 | 211 | 212 | 213 | 214 | 215 | 216 | 217 | 218 | 219 | 220 | 221 | 222 | 223 | 224 | 225 |
| A 10 | 226 | 227 | 228 | 229 | 230 | 231 | 232 | 233 | 234 | 235 | 236 | 237 | 238 | 239 | 240 | 241 | 242 | 243 | 244 | 245 | 246 | 247 | 248 | 249 | 250 |
| A 11 | 251 | 252 | 253 | 254 | 255 | 256 | 257 | 258 | 259 | 260 | 261 | 262 | 263 | 264 | 265 | 266 | 267 | 268 | 269 | 270 | 271 | 272 | 273 | 274 | 275 |
| A 12 | 276 | 277 | 278 | 279 | 280 | 281 | 282 | 283 | 284 | 285 | 286 | 287 | 288 | 289 | 290 | 291 | 292 | 293 | 294 | 295 | 296 | 297 | 298 | 299 | 300 |
| A 13 | 301 | 302 | 303 | 304 | 305 | 306 | 307 | 308 | 309 | 310 | 311 | 312 | 313 | 314 | 315 | 316 | 317 | 318 | 319 | 320 | 321 | 322 | 323 | 324 | 325 |
| A 14 | 326 | 327 | 328 | 329 | 330 | 331 | 332 | 333 | 334 | 335 | 336 | 337 | 338 | 339 | 340 | 341 | 342 | 343 | 344 | 345 | 346 | 347 | 348 | 349 | 350 |
| A 15 | 351 | 352 | 353 | 354 | 355 | 356 | 357 | 358 | 359 | 360 | 361 | 362 | 363 | 364 | 365 | 366 | 367 | 368 | 369 | 370 | 371 | 372 | 373 | 374 | 375 |
| A 16 | 376 | 377 | 378 | 379 | 380 | 381 | 382 | 383 | 384 | 385 | 386 | 387 | 388 | 389 | 390 | 391 | 392 | 393 | 394 | 395 | 396 | 397 | 398 | 399 | 400 |
| A 17 | 401 | 402 | 403 | 404 | 405 | 406 | 407 | 408 | 409 | 410 | 411 | 412 | 413 | 414 | 415 | 416 | 417 | 418 | 419 | 420 | 421 | 422 | 423 | 424 | 425 |

Abb. 70 Auswertung des monoklonalen Antikörpers Pn-x auf den Filtern II und IV
Mittelgrau markiert Antikörper-bindende Bereiche und dunkelgraue Schattierungen zeigen Hauptepitope

Anhang

| JG3 I | A 1 | A 2 | A 3 | A 4 | A 5 | A 6 | A 7 | A 8 | A 9 | A 10 | A 11 | A 12 | A 13 | A 14 | A 15 | A 16 | A 17 | A 18 | A 19 | A 20 | A 21 | A 22 | A 23 | A 24 | A 25 |
|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| A 1 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 |
| A 2 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 |
| A 3 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | 60 | 61 | 62 | 63 | 64 | 65 | 66 | 67 | 68 | 69 | 70 | 71 | 72 | 73 | 74 | 75 |
| A 4 | 76 | 77 | 78 | 79 | 80 | 81 | 82 | 83 | 84 | 85 | 86 | 87 | 88 | 89 | 90 | 91 | 92 | 93 | 94 | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 100 |
| A 5 | 101 | 102 | 103 | 104 | 105 | 106 | 107 | 108 | 109 | 110 | 111 | 112 | 113 | 114 | 115 | 116 | 117 | 118 | 119 | 120 | 121 | 122 | 123 | 124 | 125 |
| A 6 | 126 | 127 | 128 | 129 | 130 | 131 | 132 | 133 | 134 | 135 | 136 | 137 | 138 | 139 | 140 | 141 | 142 | 143 | 144 | 145 | 146 | 147 | 148 | 149 | 150 |
| A 7 | 151 | 152 | 153 | 154 | 155 | 156 | 157 | 158 | 159 | 160 | 161 | 162 | 163 | 164 | 165 | 166 | 167 | 168 | 169 | 170 | 171 | 172 | 173 | 174 | 175 |
| A 8 | 176 | 177 | 178 | 179 | 180 | 181 | 182 | 183 | 184 | 185 | 186 | 187 | 188 | 189 | 190 | 191 | 192 | 193 | 194 | 195 | 196 | 197 | 198 | 199 | 200 |
| A 9 | 201 | 202 | 203 | 204 | 205 | 206 | 207 | 208 | 209 | 210 | 211 | 212 | 213 | 214 | 215 | 216 | 217 | 218 | 219 | 220 | 221 | 222 | 223 | 224 | 225 |
| A 10 | 226 | 227 | 228 | 229 | 230 | 231 | 232 | 233 | 234 | 235 | 236 | 237 | 238 | 239 | 240 | 241 | 242 | 243 | 244 | 245 | 246 | 247 | 248 | 249 | 250 |
| A 11 | 251 | 252 | 253 | 254 | 255 | 256 | 257 | 258 | 259 | 260 | 261 | 262 | 263 | 264 | 265 | 266 | 267 | 268 | 269 | 270 | 271 | 272 | 273 | 274 | 275 |
| A 12 | 276 | 277 | 278 | 279 | 280 | 281 | 282 | 283 | 284 | 285 | 286 | 287 | 288 | 289 | 290 | 291 | 292 | 293 | 294 | 295 | 296 | 297 | 298 | 299 | 300 |
| A 13 | 301 | 302 | 303 | 304 | 305 | 306 | 307 | 308 | 309 | 310 | 311 | 312 | 313 | 314 | 315 | 316 | 317 | 318 | 319 | 320 | 321 | 322 | 323 | 324 | 325 |
| A 14 | 326 | 327 | 328 | 329 | 330 | 331 | 332 | 333 | 334 | 335 | 336 | 337 | 338 | 339 | 340 | 341 | 342 | 343 | 344 | 345 | 346 | 347 | 348 | 349 | 350 |
| A 15 | 351 | 352 | 353 | 354 | 355 | 356 | 357 | 358 | 359 | 360 | 361 | 362 | 363 | 364 | 365 | 366 | 367 | 368 | 369 | 370 | 371 | 372 | 373 | 374 | 375 |
| A 16 | 376 | 377 | 378 | 379 | 380 | 381 | 382 | 383 | 384 | 385 | 386 | 387 | 388 | 389 | 390 | 391 | 392 | 393 | 394 | 395 | 396 | 397 | 398 | 399 | 400 |
| A 17 | 401 | 402 | 403 | 404 | 405 | 406 | 407 | 408 | 409 | 410 | 411 | 412 | 413 | 414 | 415 | 416 | 417 | 418 | 419 | 420 | 421 | 422 | 423 | 424 | 425 |

| JG3 III | A 1 | A 2 | A 3 | A 4 | A 5 | A 6 | A 7 | A 8 | A 9 | A 10 | A 11 | A 12 | A 13 | A 14 | A 15 | A 16 | A 17 | A 18 | A 19 | A 20 | A 21 | A 22 | A 23 | A 24 | A 25 |
|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| A 1 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 |
| A 2 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 |
| A 3 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | 60 | 61 | 62 | 63 | 64 | 65 | 66 | 67 | 68 | 69 | 70 | 71 | 72 | 73 | 74 | 75 |
| A 4 | 76 | 77 | 78 | 79 | 80 | 81 | 82 | 83 | 84 | 85 | 86 | 87 | 88 | 89 | 90 | 91 | 92 | 93 | 94 | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 100 |
| A 5 | 101 | 102 | 103 | 104 | 105 | 106 | 107 | 108 | 109 | 110 | 111 | 112 | 113 | 114 | 115 | 116 | 117 | 118 | 119 | 120 | 121 | 122 | 123 | 124 | 125 |
| A 6 | 126 | 127 | 128 | 129 | 130 | 131 | 132 | 133 | 134 | 135 | 136 | 137 | 138 | 139 | 140 | 141 | 142 | 143 | 144 | 145 | 146 | 147 | 148 | 149 | 150 |
| A 7 | 151 | 152 | 153 | 154 | 155 | 156 | 157 | 158 | 159 | 160 | 161 | 162 | 163 | 164 | 165 | 166 | 167 | 168 | 169 | 170 | 171 | 172 | 173 | 174 | 175 |
| A 8 | 176 | 177 | 178 | 179 | 180 | 181 | 182 | 183 | 184 | 185 | 186 | 187 | 188 | 189 | 190 | 191 | 192 | 193 | 194 | 195 | 196 | 197 | 198 | 199 | 200 |
| A 9 | 201 | 202 | 203 | 204 | 205 | 206 | 207 | 208 | 209 | 210 | 211 | 212 | 213 | 214 | 215 | 216 | 217 | 218 | 219 | 220 | 221 | 222 | 223 | 224 | 225 |
| A 10 | 226 | 227 | 228 | 229 | 230 | 231 | 232 | 233 | 234 | 235 | 236 | 237 | 238 | 239 | 240 | 241 | 242 | 243 | 244 | 245 | 246 | 247 | 248 | 249 | 250 |
| A 11 | 251 | 252 | 253 | 254 | 255 | 256 | 257 | 258 | 259 | 260 | 261 | 262 | 263 | 264 | 265 | 266 | 267 | 268 | 269 | 270 | 271 | 272 | 273 | 274 | 275 |
| A 12 | 276 | 277 | 278 | 279 | 280 | 281 | 282 | 283 | 284 | 285 | 286 | 287 | 288 | 289 | 290 | 291 | 292 | 293 | 294 | 295 | 296 | 297 | 298 | 299 | 300 |
| A 13 | 301 | 302 | 303 | 304 | 305 | 306 | 307 | 308 | 309 | 310 | 311 | 312 | 313 | 314 | 315 | 316 | 317 | 318 | 319 | 320 | 321 | 322 | 323 | 324 | 325 |
| A 14 | 326 | 327 | 328 | 329 | 330 | 331 | 332 | 333 | 334 | 335 | 336 | 337 | 338 | 339 | 340 | 341 | 342 | 343 | 344 | 345 | 346 | 347 | 348 | 349 | 350 |
| A 15 | 351 | 352 | 353 | 354 | 355 | 356 | 357 | 358 | 359 | 360 | 361 | 362 | 363 | 364 | 365 | 366 | 367 | 368 | 369 | 370 | 371 | 372 | 373 | 374 | 375 |
| A 16 | 376 | 377 | 378 | 379 | 380 | 381 | 382 | 383 | 384 | 385 | 386 | 387 | 388 | 389 | 390 | 391 | 392 | 393 | 394 | 395 | 396 | 397 | 398 | 399 | 400 |
| A 17 | 401 | 402 | 403 | 404 | 405 | 406 | 407 | 408 | 409 | 410 | 411 | 412 | 413 | 414 | 415 | 416 | 417 | 418 | 419 | 420 | 421 | 422 | 423 | 424 | 425 |

Abb. 71 Auswertung des Patientenserums JG3 auf den Filtern I und III
Mittelgrau markiert Antikörper-bindende Bereiche und dunkelgraue Schattierungen zeigen IgE-Epitope

Anhang

| CAT II | A 1 | A 2 | A 3 | A 4 | A 5 | A 6 | A 7 | A 8 | A 9 | A 10 | A 11 | A 12 | A 13 | A 14 | A 15 | A 16 | A 17 | A 18 | A 19 | A 20 | A 21 | A 22 | A 23 | A 24 | A 25 |
|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| A 1 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 |
| A 2 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 |
| A 3 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | 60 | 61 | 62 | 63 | 64 | 65 | 66 | 67 | 68 | 69 | 70 | 71 | 72 | 73 | 74 | 75 |
| A 4 | 76 | 77 | 78 | 79 | 80 | 81 | 82 | 83 | 84 | 85 | 86 | 87 | 88 | 89 | 90 | 91 | 92 | 93 | 94 | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 100 |
| A 5 | 101 | 102 | 103 | 104 | 105 | 106 | 107 | 108 | 109 | 110 | 111 | 112 | 113 | 114 | 115 | 116 | 117 | 118 | 119 | 120 | 121 | 122 | 123 | 124 | 125 |
| A 6 | 126 | 127 | 128 | 129 | 130 | 131 | 132 | 133 | 134 | 135 | 136 | 137 | 138 | 139 | 140 | 141 | 142 | 143 | 144 | 145 | 146 | 147 | 148 | 149 | 150 |
| A 7 | 151 | 152 | 153 | 154 | 155 | 156 | 157 | 158 | 159 | 160 | 161 | 162 | 163 | 164 | 165 | 166 | 167 | 168 | 169 | 170 | 171 | 172 | 173 | 174 | 175 |
| A 8 | 176 | 177 | 178 | 179 | 180 | 181 | 182 | 183 | 184 | 185 | 186 | 187 | 188 | 189 | 190 | 191 | 192 | 193 | 194 | 195 | 196 | 197 | 198 | 199 | 200 |
| A 9 | 201 | 202 | 203 | 204 | 205 | 206 | 207 | 208 | 209 | 210 | 211 | 212 | 213 | 214 | 215 | 216 | 217 | 218 | 219 | 220 | 221 | 222 | 223 | 224 | 225 |
| A 10 | 226 | 227 | 228 | 229 | 230 | 231 | 232 | 233 | 234 | 235 | 236 | 237 | 238 | 239 | 240 | 241 | 242 | 243 | 244 | 245 | 246 | 247 | 248 | 249 | 250 |
| A 11 | 251 | 252 | 253 | 254 | 255 | 256 | 257 | 258 | 259 | 260 | 261 | 262 | 263 | 264 | 265 | 266 | 267 | 268 | 269 | 270 | 271 | 272 | 273 | 274 | 275 |
| A 12 | 276 | 277 | 278 | 279 | 280 | 281 | 282 | 283 | 284 | 285 | 286 | 287 | 288 | 289 | 290 | 291 | 292 | 293 | 294 | 295 | 296 | 297 | 298 | 299 | 300 |
| A 13 | 301 | 302 | 303 | 304 | 305 | 306 | 307 | 308 | 309 | 310 | 311 | 312 | 313 | 314 | 315 | 316 | 317 | 318 | 319 | 320 | 321 | 322 | 323 | 324 | 325 |
| A 14 | 326 | 327 | 328 | 329 | 330 | 331 | 332 | 333 | 334 | 335 | 336 | 337 | 338 | 339 | 340 | 341 | 342 | 343 | 344 | 345 | 346 | 347 | 348 | 349 | 350 |
| A 15 | 351 | 352 | 353 | 354 | 355 | 356 | 357 | 358 | 359 | 360 | 361 | 362 | 363 | 364 | 365 | 366 | 367 | 368 | 369 | 370 | 371 | 372 | 373 | 374 | 375 |
| A 16 | 376 | 377 | 378 | 379 | 380 | 381 | 382 | 383 | 384 | 385 | 386 | 387 | 388 | 389 | 390 | 391 | 392 | 393 | 394 | 395 | 396 | 397 | 398 | 399 | 400 |
| A 17 | 401 | 402 | 403 | 404 | 405 | 406 | 407 | 408 | 409 | 410 | 411 | 412 | 413 | 414 | 415 | 416 | 417 | 418 | 419 | 420 | 421 | 422 | 423 | 424 | 425 |

| CAT IV | A 1 | A 2 | A 3 | A 4 | A 5 | A 6 | A 7 | A 8 | A 9 | A 10 | A 11 | A 12 | A 13 | A 14 | A 15 | A 16 | A 17 | A 18 | A 19 | A 20 | A 21 | A 22 | A 23 | A 24 | A 25 |
|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| A 1 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 |
| A 2 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 |
| A 3 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | 60 | 61 | 62 | 63 | 64 | 65 | 66 | 67 | 68 | 69 | 70 | 71 | 72 | 73 | 74 | 75 |
| A 4 | 76 | 77 | 78 | 79 | 80 | 81 | 82 | 83 | 84 | 85 | 86 | 87 | 88 | 89 | 90 | 91 | 92 | 93 | 94 | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 100 |
| A 5 | 101 | 102 | 103 | 104 | 105 | 106 | 107 | 108 | 109 | 110 | 111 | 112 | 113 | 114 | 115 | 116 | 117 | 118 | 119 | 120 | 121 | 122 | 123 | 124 | 125 |
| A 6 | 126 | 127 | 128 | 129 | 130 | 131 | 132 | 133 | 134 | 135 | 136 | 137 | 138 | 139 | 140 | 141 | 142 | 143 | 144 | 145 | 146 | 147 | 148 | 149 | 150 |
| A 7 | 151 | 152 | 153 | 154 | 155 | 156 | 157 | 158 | 159 | 160 | 161 | 162 | 163 | 164 | 165 | 166 | 167 | 168 | 169 | 170 | 171 | 172 | 173 | 174 | 175 |
| A 8 | 176 | 177 | 178 | 179 | 180 | 181 | 182 | 183 | 184 | 185 | 186 | 187 | 188 | 189 | 190 | 191 | 192 | 193 | 194 | 195 | 196 | 197 | 198 | 199 | 200 |
| A 9 | 201 | 202 | 203 | 204 | 205 | 206 | 207 | 208 | 209 | 210 | 211 | 212 | 213 | 214 | 215 | 216 | 217 | 218 | 219 | 220 | 221 | 222 | 223 | 224 | 225 |
| A 10 | 226 | 227 | 228 | 229 | 230 | 231 | 232 | 233 | 234 | 235 | 236 | 237 | 238 | 239 | 240 | 241 | 242 | 243 | 244 | 245 | 246 | 247 | 248 | 249 | 250 |
| A 11 | 251 | 252 | 253 | 254 | 255 | 256 | 257 | 258 | 259 | 260 | 261 | 262 | 263 | 264 | 265 | 266 | 267 | 268 | 269 | 270 | 271 | 272 | 273 | 274 | 275 |
| A 12 | 276 | 277 | 278 | 279 | 280 | 281 | 282 | 283 | 284 | 285 | 286 | 287 | 288 | 289 | 290 | 291 | 292 | 293 | 294 | 295 | 296 | 297 | 298 | 299 | 300 |
| A 13 | 301 | 302 | 303 | 304 | 305 | 306 | 307 | 308 | 309 | 310 | 311 | 312 | 313 | 314 | 315 | 316 | 317 | 318 | 319 | 320 | 321 | 322 | 323 | 324 | 325 |
| A 14 | 326 | 327 | 328 | 329 | 330 | 331 | 332 | 333 | 334 | 335 | 336 | 337 | 338 | 339 | 340 | 341 | 342 | 343 | 344 | 345 | 346 | 347 | 348 | 349 | 350 |
| A 15 | 351 | 352 | 353 | 354 | 355 | 356 | 357 | 358 | 359 | 360 | 361 | 362 | 363 | 364 | 365 | 366 | 367 | 368 | 369 | 370 | 371 | 372 | 373 | 374 | 375 |
| A 16 | 376 | 377 | 378 | 379 | 380 | 381 | 382 | 383 | 384 | 385 | 386 | 387 | 388 | 389 | 390 | 391 | 392 | 393 | 394 | 395 | 396 | 397 | 398 | 399 | 400 |
| A 17 | 401 | 402 | 403 | 404 | 405 | 406 | 407 | 408 | 409 | 410 | 411 | 412 | 413 | 414 | 415 | 416 | 417 | 418 | 419 | 420 | 421 | 422 | 423 | 424 | 425 |

Abb. 72 Auswertung des Patientenserums CAT auf den Filtern II und IV
Mittelgrau markiert Antikörper-bindende Bereiche und dunkelgraue Schattierungen zeigen IgE-Epitope

Danksagung

Meinem Betreuer Dr. Wolf-Meinhard Becker gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des spannenden Themas, die Bereitstellung der notwendigen Mittel für die Versuchsdurchführungen, die Korrekturen von Manuskripten, die Möglichkeiten an nationalen und internationalen Kongressen teilnehmen und meine Ergebnisse präsentieren zu können, die regen Diskussionen, Unterstützungen, Anregungen und Möglichkeiten auch eigene Ideen zu verwirklichen und die angenehme Arbeitsatmosphäre innerhalb der Laborgruppe.

Mein besonderer Dank gilt auch PD Dr. Arnd Petersen für die Übernahme des Korrekturlesens von Manuskripten, die vielen hilfreichen Vorschläge und Ideen für eine bessere Umsetzung eigener Ideen, die vielen Sequenzierungen, ohne die diese Arbeit nicht so umfangreich geworden wäre und die angenehme Arbeitsatmosphäre in unserem Raum.

Herrn Prof. Dr. Peter Zabel danke ich für die Möglichkeit, in der Arbeitsgruppe Biochemische und Molekulare Allergologie des Forschungszentrums Borstel arbeiten zu können.

Herrn Prof. Dr. Thomas Peters danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Herrn PD Dr. Buko Lindner danke ich für die vielen MALDI-TOF-Analysen, ohne die die komplexen Zusammenhänge der hochmolekularen Erdnussallergene nicht erklärbar wären.

Ebenso danke ich Herrn Dr. Amedeo Conti für seine MALDI-TOF-Analysen, die erste Ergebnisse unterstützten.

Herrn PD Dr. Andreas Frey, Herrn Dr. Steffen Brade und Herrn Hans-Heiner Gorries danke ich für die Herstellung der synthetischen Peptide.

Herrn Dr. Gerald Reese danke ich für die Bereitstellung von PEI-7B2, die regen Diskussionen und Kommentare während dieser drei Jahre.

Herrn Prof. Dr. Hans-Peter Braun danke ich für die Möglichkeit, die Blue Native PAGE in seiner Laborgruppe in Hannover erlernen zu können.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern meiner Laborgruppe Cornelia Blume, Marisa Böttger, Yasemin Darcan, Gerda Finner, Steffi Fox, Evelyn Knaack, Susanne Riecken, Dr. Frauke Schocker, Dany Warnecke und Dr. Daniel Wicklein möchte ich für die freundschaftliche und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre danken, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Ein besonderer Dank geht an meine zuletzt betreute Auszubildende Anke Kowallik, die mir mit ihrer fleißigen und hervorragenden Arbeit sehr geholfen hat.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern Joachim und Ilse Boldt. Ohne ihre Liebe, Hilfe und Unterstützung, ihre Ermutigung in schwierigen Zeiten nicht aufzugeben, hätte ich es nicht geschafft. Meinem Verlobten Tim Lynsche danke ich dafür, dass er immer für mich da war.

Veröffentlichungen

Originalarbeiten:

Andrea Boldt, Donatella Fortunato¹, Amadeo Conti¹, Arnd Petersen, Barbara Ballmer-Weber², Ute Lepp, Gerald Reese³, Wolf-Meinhard Becker
Research Center Borstel, Borstel, Germany, ¹CNR – ISPA, Torino, Italy, ²University Hospital, Zürich, Switzerland, ³Paul-Ehrlich-Institut, Langen, Germany
Analysis of the composition of an IgE-reactive high molecular weight protein complex of peanut extract containing Ara h 1 and Ara h 3/4
Proteomics 5, 3:675-686 (2005)

Wolf-Meinhard Becker, Frauke Schocker, Andrea Boldt
Allergene der Erdnuss: Struktur und Charakteristika
Allergologie eingereicht (2005)

Abstracts:

A. Boldt, A. Petersen, U. Lepp, G. Reese¹, S. Vieths¹, W.-M. Becker
¹Paul-Ehrlich-Institut, Langen
Charakterisierung und Anreicherung des Komplexes Ara h 3/4, einem Hauptbestandteil der Erdnuss.
Allergo Journal 12:57 (2003)

A. Boldt, A. Petersen, U. Lepp, W.-M. Becker
Characterisation and enrichment of the natural complex Ara h 3/4 in peanut extract
Journal of the World Allergy Organisation, Allergy and Clinical Immunology International, Abstractbook, Supplement 1:194 (2003)

A. Boldt, A. Conti¹, A. Petersen, B. Lindner, W.-M. Becker
¹CNR – ISPA, Torino, Italy
Charakterisierung des Komplexes aus Ara h 1 und Ara h 3/4 im Erdnussextrakt
Allergo Journal 13:32 (2004)

A. Boldt, A. Conti¹, A. Petersen, B. Lindner, W.-M. Becker
¹CNR – ISPA, Torino, Italy
Characterisation of the native complex Ara h 1 and Ara h 3/4 in peanut extract
Book of Abstracts 9th international Symposium on Immunological, Chemical and Clinical Problems of Food Allergy 124 (2004)

A. Boldt, B. Ballmer-Weber¹, A. Petersen, W.-M. Becker
¹University Hospital, Zürich, Switzerland
Die simulierte Passage von Erdnussprodukten durch den Gastrointestinaltrakt: Analyse der Allergenzusammensetzung bei unterschiedlichen Zubereitungen
Allergo Journal 13:S29 (2004)

Veröffentlichungen

A. Boldt, S. Bade, H.-H. Gorris, G. Reese¹, S. Riecken, W.-M. Becker

¹*Paul-Ehrlich-Institut, Langen*

Charakterisierung der Isoformen von Ara h 3/4 (Ara h 3, Ara h 4, Gly 1 und iso-Ara h 3) durch Epitopmapping mit Patientenseren und monoklonalen Antikörpern

Allergo Journal 14:31 (2005)

Vorträge:

A. Boldt, A Conti¹, A. Petersen, B. Lindner, W.-M. Becker

¹*CNR – ISPA, Torino, Italy*

Charakterisierung des Komplexes aus Ara h 1 und Ara h 3/4 im Erdnussextrakt

16. Mainzer Allergie-Workshop, Mainz 11.-13. März 2004

A. Boldt, B. Ballmer-Weber¹, A. Petersen, W.-M. Becker

¹*University Hospital, Zürich, Switzerland*

Die simulierte Passage von Erdnussprodukten durch den Gastrointestinaltrakt: Analyse der Allergenzusammensetzung bei unterschiedlichen Zubereitungen

Allergiekongress 2004, Aachen 15.-19. September 2004

Poster:

A. Boldt, A. Petersen, U. Lepp, G. Reese¹, S. Vieths¹, W.-M. Becker

¹*Paul-Ehrlich-Institut, Langen*

Charakterisierung und Anreicherung des Komplexes Ara h 3/4, einem Hauptbestandteil der Erdnuss.

15. Mainzer Allergie-Workshop, Mainz 13.-15. März 2003

A. Boldt, A. Petersen, U. Lepp, W.-M. Becker

Characterisation and enrichment of the natural complex Ara h 3/4 in peanut extract

World Allergy Organization Congress XVIII ICACI, Vancouver 7.-12. September 2003

A. Boldt, A Conti¹, A. Petersen, B. Lindner, W.-M. Becker

¹*CNR – ISPA, Torino, Italy*

Characterisation of the native complex Ara h 1 and Ara h 3/4 in peanut extract

9th International Symposium on Immunological, Chemical and Clinical Problems of Food Allergy, Budapest 17.-21. April 2004

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Andrea Boldt
geboren am 21.12.1972 in Preetz

Schulausbildung:

| | |
|-------------|----------------------|
| 1979 - 1983 | Grundschule Seekrug |
| 1983 - 1992 | Gymnasium Lütjenburg |
| Mai 1992 | Abitur |

Berufsausbildung:

| | |
|-------------------|--|
| 08/1992 – 06/1995 | Ausbildung zur Biologielaborantin am Max-Planck-Institut für Limnologie in Plön |
|-------------------|--|

Studium:

| | |
|-------------------|--|
| 10/1995 – 12/2000 | Biologiestudium an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel |
| März 2001 | Diplom in Zoologie, Limnologie, Biochemie und Mikrobiologie Thema der Diplomarbeit: „Vergleichende Untersuchungen zur Ektoparasitenfauna auf Greifvogelnestlingen“ |

Berufspraxis:

| | |
|-------------------|---|
| 07/1995 – 09/1995 | Biologielaborantin am Max-Planck-Institut für Limnologie in Plön |
| 1996 | Wissenschaftliche Hilfskraft im Geomar in Kiel mit mehrwöchiger Forschungsfahrt auf der Meteor |
| 04/1997 – 12/2000 | Wissenschaftliche Hilfskraft für Monitoring, Analytik, Systematik und Ökologie in der Ökosystemforschung der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel |
| September 1998 | Biologin im Praktikum im Tierpark Warder |
| 04/2001-05/2002 | Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Biochemischen Institut der Universität Kiel, Forschungsgebiet „Pathophysiologie des viralen Interleukin 6“ |
| 06/2002-06/2005 | Promotion im Forschungszentrum Borstel Laborgruppe (Biochemische und Molekulare Allergologie) Leiter: Dr. W.-M. Becker Thema der Doktorarbeit: „Charakterisierung der Erdnussallergene Ara h 1, Ara h 3/4 und ihrer Isoformen“ |
| September 2002 | Schulung zum Projektleiter für gentechnische Anlagen |
| Juni 2005 | Promotion zum Dr. rer. nat. |