

**Identifizierung und Charakterisierung
IgE- reaktiver Proteine
in der Tomate
(*Lycopersicon esculentum*)**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
"doctor rerum naturalium"
(Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin "Biochemie"

eingereicht an
der Mathematisch - Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Universität Potsdam

aus dem
Max - Planck - Institut
für Molekulare Pflanzenphysiologie
Wissenschaftspark Potsdam - Golm

von
Olivia Bäßler
aus Potsdam

Potsdam den 07.Juli 2008

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2005 bis März 2008 unter Anleitung von PD Dr. habil Wolfram Weckwerth am Max- Planck- Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie in der Abteilung für „Integrative Proteomics“ angefertigt.

Gutachter:

PD Dr. habil Wolfram Weckwerth
Prof. Dr. Burkhard Micheel
Prof. Dr. Margitta Worm

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
<http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2008/2695/>
urn:nbn:de:kobv:517-opus-26953
[<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus-26953>]

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Das wären vor allem:

- Herr PD Dr. habil Wolfram Weckwerth (Max- Planck- Institut, „Integrative Proteomics“) für die Aufnahme in seine Fachgruppe, die vorzügliche instrumentelle Ausstattung und die Freiräume, die er mir während meiner Promotion gewährt hat.
- Herr Prof. Dr. Burkhard Micheel (Universität Potsdam, Lehrstuhl Biotechnologie), für die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit und die kritische Hinterfragung zahlreicher Details.

- Frau Dr. Stefanie Wienkoop für die fundierte Einführung in die Welt der Massenspektrometrie, das Vertrauen in meine Fähigkeiten und für die Hilfe innerhalb der Methodenentwicklung.
- Frau Dr. Ute Lehmann für die inhaltlichen Diskussionen, die konstruktive Kritik und die unkomplizierte kollegiale Zusammenarbeit.
- Herr Dr. Mirko Glinski für die langjährige Zusammenarbeit in der Analytik.
- Julia Weiß für die interessante und aufmunternde Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Proteinmodellierung.
- Herr Dr. Stefan Kempa für die Hilfsbereitschaft bei allen Fragestellungen.
- Allen Kollegen und Kolleginnen der Arbeitsgruppe „Signaling Proteomics“ von Frau Dr. Waltraud Schulze vom MPIMP.
- Allen Kollegen des MPIMP´s die mir jederzeit hilfsbereit zur Seite standen.
- Herr Dr. Olaf Behrsing, Herr Jörg Schenk und Herr Dr. Frank Sellrie der Arbeitsgruppe „Biotechnologie“ der Universität Potsdam für die tatkräftige Unterstützung und die zahlreichen anregenden Gespräche.
- Allen Kollegen und Kolleginnen aus dem Allergie- Centrum- Charité von Frau Prof. Margitta Worm für die gute Zusammenarbeit und die klinisch relevanten Diskussionen für zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.
- Herr Prof. Dr. Hubert Köster von der caprotec bioanalytics GmbH Berlin für die Begutachtung dieser Arbeit und die gute Zusammenarbeit.

Außerhalb meines Arbeitsumfeldes möchte ich vor allem meinem LAG Frank für die moralische und tatkräftige Unterstützung in jeder Lebenslage danken.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen ehemaligen Lehrerinnen Frau Junek und Frau Kästner von der Eliteschule des Sports in Potsdam für das aufgebrachte Engagement in den Fächern Biologie und Chemie bedanken.

Des Weiteren danke ich meiner Schwester Dajana und meinen Freunden für die allseits moralische Unterstützung innerhalb der letzten Jahre. Und selbstverständlich danke ich allen, die sich angesprochen fühlen und in dieser Aufzählung vergessen wurden.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Die Nahrungsmittelallergie	2
1.2 Die Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	4
1.3 Pathogenese allergischer Reaktionen.....	6
1.4 Die Tomatenallergie	8
1.5 Immunologische Kreuzreaktivität.....	9
1.6 Einteilung von Allergenen.....	11
1.6.1 Allergene der Cupin- Superfamilie	12
1.6.1.1 Das Protein Legumin	14
1.6.1.2 Das Protein Vicilin	15
1.7 Charakterisierung von Patientenseren	16
2 Zielstellung	18
3 Material.....	20
3.1 Patientenseren	20
3.2 Tomaten	20
4 Methoden	21
4.1 Methodenübersicht.....	21
4.2 Serumgewinnung	21
4.3 Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford	22
4.4 Blot- Verfahren	22
4.4.1 Dot Blot	22
4.4.2 Immunoblot (Western- Blot)	23
4.4.3 Epitop- Kartierung mittels SPOT- Membranen	24
4.5 Massenspektroskopische Methoden	25
4.5.1 In- Gel- Trypsinverdau für LC- ESI- MS/MS	25
4.5.2 Komplexproben- Verdau/ Shotgun Proteomics	25
4.5.3 LC- ESI- MS/ MS Messung	25
4.5.4 Absolute Proteinquantifizierung mittels stabiler Isotopen- markierter Peptide.....	27
4.6 Proteinextraktionsmethoden.....	29
4.6.1 Aceton- Fällung	29
4.6.2 Harnstoff- Extraktion	29
4.6.3 Methanol- Fällung	30
4.6.4 Ammonium- Sulfat- Fällung.....	30
4.7 Proteinfraktionierung mittels zweidimensionaler Flüssigchromatographie .	31
4.8 Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS- PAGE)	32
4.9 Basophilenaktivierungstest.....	32
4.10 Computergestützte Proteinanalyse	34
4.10.1 Computergestützte FARRP- Datenbankvergleiche und Sequenzanalysen.....	35
4.10.2 Strukturmodellierung mittels MODELLER- Programm	35
5 Ergebnisse	36
5.1 Dot- Blot Analyse einzelner Tomatenbestandteile.....	36
5.2 Nano- LC- MS/MS Analyse von verschiedenen Tomatenproteinextrakte...	37
5.3 Trennung und Identifizierung der Tomatensamenproteine mittels zweidimensionaler Flüssigchromatographie und LC- MS/ MS	39

5.3.1	Trennung der Tomatensamenproteine mittels Chromatofokussierung	39
5.3.2	Identifizierung IgE- reaktiver Proteine nach CF- Fraktionierung.....	41
5.3.3	Trennung der Tomatensamenproteine mittels RP- Chromatographie.	42
5.4	Serumspezifische IgE- Immunoblot Analyse	43
5.5	Identifizierung und Charakterisierung der IgE- reaktiven Tomatenproteine	45
5.6	Basophilen- Test	48
5.7	Quantifizierung putativer Tomatenallergene in kommerziellen Produkten..	50
5.8	Computergestützte Strukturanalyse putativer Tomatenallergene.....	53
5.8.1	Computergestützte FARRP- Sequenzanalysen	54
5.8.2	Strukturmodellierung	55
5.8.2.1	Legumin	56
5.8.2.2	Vicilin.....	60
5.9	Peptid- Epitop- Kartierung	65
6	Proteinidentifizierung in den fünf Bestandteilen der Tomate	68
6.1	Identifizierung IgE- reaktiver Proteine nach einer zweidimensionalen Proteinauftrennung.....	72
6.2	Serumspezifische IgE- Immunoblot Analyse	76
6.3	Basophilenaktivierungstest.....	78
6.4	Sequenzhomologien und Strukturaufklärung putativer Tomatenallergene .	79
7	Ausblick/ Zusammenfassung.....	89
8	Anhang.....	I
8.1	Proteinkonzentrationsbestimmung	I
8.2	Charakterisierung verwendeter Patientenseren	III
8.3	LC- MS/ MS- Proteomics Ergebnisse.....	IV
8.4	Basophilen Test.....	VIII
8.5	Peptid- Epitop- Daten	VIII
8.6	Proteinquantifizierung mittels LC- MS/ MS.....	IX
8.7	Sequenzuntersuchungen	XI
9	Literatur	XIX
10	Erklärung	XXXII

Abkürzungsverzeichnis

AA	Peakfläche
Ana o	Anacardium occidentale
AP	Alkalische Phosphatase
Ara h	Arachis hypogaea
AS	Aminosäure
ASB	Aminosäurebereich
AQUA	Absolute Proteinquantifizierung
BCIP	5- Brom- 4- chlor- 3- indolyphosphat
Ber e	Bertholletia excelsa
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovine serum albumine</i>)
Bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C18	Hydrophobes Säulenmaterial
ca	Circa
CCD	Kreuzreaktive Kohlenhydrat- Determinanten (engl. <i>Crossreactive Carbohydrate Determinants</i>)
CD	Differenzierungscluster (eng. <i>Cluster of Differentiation</i>)
CF	Chromatofokussierung
cm	Zentimeter
Cor a	Corylus avellana
CPT™	Reaktionsgefäß zur Zellpräparation (engl. <i>Cell Preparation Tube</i>)
DBPCFC	doppelblinde placebokontrollierte orale Nahrungsmittelallergen- Provokation
EAST	Enzymallergosorbent- Test
ECL	Emittergekoppelte Logik (engl. <i>emitter coupled logic</i>)
EMBL	Europäisches molekularbiologisches Labor (engl. <i>European Molecular Biology Laboratory</i>)
ENPP3	Ecto- Nucleotidpyrophosphatase/ Posphodiesterase 3
EST	Expremiertes Gefragment (engl. <i>expressed sequence tag</i>)
EU	Europäische Union
FACS	Durchflusszytometrie (engl. <i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>)
Fag e	Fagopyrum esculentum
FAO	Welternährungsorganisation
FARRP	Food Allergy Research and Resource Program
FEIA	Fluoreszenz- Enzym- Immunoassay
Fc	Konstantes Fragment
ggf	Gegebenenfalls
GUI	Graphical user interface
h	Stunde
HRP	Meerrettich Peroxidase
i.d.R.	in der Regel
IFBC	International Food Biotechnology Council
Ig	Immunglobulin
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IUIS	Internationale Vereinigung der immunologischen Gesellschaft (engl. <i>International union of immunological societies</i>)
Jug r	Juglans regia
kDa	Kilodalton
kU/l	Kilounit pro Liter
LC- MS/MS	Flüssigkeitschromatographie gekoppelte Massenspektrometrie
Len c	Lens culinaris

LTQ	LTQ- Massenspektrometer von Thermo Fisher
Lyc e	Lycopersicon esculentum
MALDI	Matrix- unterstützte Laser- Desorption/ Ionisation (engl. <i>Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization</i>)
MG	Molekulargewicht
min	Minute
Mio	Million
mm	Millimeter
MPI	Max- Planck- Institut
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem- Massenspektrometrie
nsLTP	nicht- spezifisches Lipid- Transfer Protein
mTorr	Milli Torr
m/z	Masse- zu- Ladungs- Verhältnis
NAP	Nukleinsäure Aufreinigung (engl. <i>nucleic acid purification</i>)
NBT	Nitrotetrazolium-Blau
NC	Nitrocellulose
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OAS	Orales Allergie Syndrom
o.g.	Oben genannt
PBMCs	Mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (engl. <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>)
pdb	Protein- Datenbank
PE	Phycoerythrin
pl	isoelektrischer Punkt
pmol	Picomol
Q	Quadropol
RAST	Radio- Allergo- Sorbens- Test
RP	Umkehrphase
RT	Raumtemperatur
SEC	Größenausschlußchromatographie (engl. <i>Size Exclusion Chromatography</i>)
SEV	Sekundär- Elektronen- Vervielfacher
SDS	Natriumdodecylulfat (engl. <i>Sodium dodecyl sulphate</i>)
SPOT	(engl. <i>Solid- Phase Synthetic Peptide Technology</i>)
SRM	Selektierte Übergangsaufzeichnung (engl. <i>selected reaction monitoring</i>)
Tab	Tabelle
TBS	Trisgepufferte Kochsalzlösung (engl. <i>Tris buffered saline</i>)
TCR	T- Zell Rezeptor
TSQ	TSQ- Massenspektrometer von Thermo Fisher
TTBS	Trisgepufferte Kochsalzlösung mit 0.1% Tween20
U	Unit
u.a.	und andere
U/ min	Umdrehungen pro Minute
ü.N.	über Nacht
VMD	Visual Molecular Dynamics
VMM	Verborgenes Markow- Modell (engl. <i>Hidden Markov Model</i>)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl. <i>World health organisation</i>)
Xcorr	Kreuzkorrelationsfaktor
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
µl	Mikroliter

1 Einleitung

Einer Schätzung zufolge leiden vier bis acht Millionen Menschen in der EU an einer Nahrungsmittelallergie. Allein in Deutschland sind ca. 30 Millionen Menschen von einer Allergie betroffen. Bis zum Jahr 2015, so die Schätzung der „European Academy of Allergology and Clinical Immunology“ (EACCI), wird die Hälfte aller Europäer allergiekrank sein. Allein an Heuschnupfen leiden heute rund 15 Millionen Deutsche. Besonders beunruhigend ist die Entwicklung in den vergangenen Jahren. Die Zahl der Erwachsenen, die an Heuschnupfen leiden, hat innerhalb von acht Jahren um 70 % zugenommen. Laut Johannes Ring, dem Vorsitzenden der Deutschen Akademie für Allergologie und Umweltmedizin, steigt die Zahl der Allergiker stetig (Ring, 2006; Steinke *et al.*, 2007).

Aufgrund dieser Tatsachen werden der große Forschungsbedarf und die ausführliche Analyse von Allergien deutlich. Bisher ist bekannt, dass eine Reihe identifizierter Allergene pflanzlichen Ursprungs sind. Diese kommen vor allem in Samen, Körnern, Früchte- und Gemüsesorten sowie Pollen vor. Praktisch alle Lebensmittelallergene pflanzlichen Ursprungs gehören zu der Klasse der Schutz- oder Lagerproteine (IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee list: Ballmer-Weber BK, 2003). Diejenigen Proteine, die eine Entwicklung einer allergenen Reaktion durch den Gastrointestinaltrakt auslösen, sind fast ausschließlich zu zwei Protein- Superfamilien zugehörig, die Getreide- Prolamin- Superfamilie und die Cupin- Superfamilie. Die Cupin- Superfamilie beinhaltet zu einem Großteil Albumine und Globuline. Globuline lassen sich in die 7S Vicilinine und die 11S Legumine unterteilen (Hinz *et al.*, 1997; Osborne, 1913). Weiterhin stellen Legumine und Viciline die Hauptproteine in Angiospermen (Bedecktsamer) und Gymnospermen (Nacktsamer) dar. Proteine aus dieser Klasse konnten bereits in Nahrungsmitteln, wie beispielsweise in Erdnuss, Linsen oder Sesam als Allergene identifiziert werden (Breiteneder & Radauer, 2004).

1.1 Die Nahrungsmittelallergie

Die Nahrungsmittelallergie bzw. Lebensmittelallergie ist eine besondere Form der Nahrungsmittelunverträglichkeit. Sie ist gekennzeichnet durch eine spezifische Überempfindlichkeit (Allergie) gegen bestimmte Stoffe (Allergen), die in der Nahrung enthalten sind und mit ihr aufgenommen werden. Nahrungsmittelallergien sind immunologische Reaktionen auf pflanzliche oder tierische Proteine. Der Begriff Allergie stammt aus dem Griechischen und bedeutet soviel wie: allos = anders und ergon = Wirkung. Somit reagiert das Immunsystem von der Norm abweichend. Die Allergie gehört neben der Neurodermitis zu den atopischen Erkrankungen.

Die Nahrungsmittelallergie stellt eine individuelle Erkrankung des Organismus dar, welche sich in einer Vielzahl von klinischen Symptomen manifestieren kann. Die vier am häufigsten betroffenen Organe bzw. Organsysteme sind die Haut, der Respirationstrakt, der Gastrointestinaltrakt sowie das Herz- Kreislaufsystem (Wüthrich, 1996). Das deutet die Schwierigkeit einer Lebensmittelallergie- Diagnose an, da die Symptome in den genannten Organsystemen mit einer zeitlichen Verzögerung auftreten können. Dadurch ist der Zusammenhang zwischen erfolgter Nahrungsmittelaufnahme und klinischer Manifestation oft schwer diagnostizierbar (Chandra, Gill & Kumari, 1993; Ring, Eberlein-Koenig & Behrendt, 2001; Sampson, 1999b; Sampson & Metcalfe, 1992). Daneben weisen Patienten nur wenige der typischen Symptome einer Nahrungsmittelallergie wie z.B. Rhinitis, Asthma, Urtikaria, Dermatitis oder Diarrhö gleichzeitig auf (Hefle, Nordlee & Taylor, 1996). Daraus resultieren die voneinander variierenden Angaben über die Prävalenz von Nahrungsmittelallergien. Der weltweite Anteil von Säuglingen und Kindern, die von einer Nahrungsmittelallergie betroffen sind, wird mit 0.3- 7.8 % angegeben (Chandra, 1997; Sampson, 1991, 1999a, b; Stanley & Bannon, 1999). Dagegen ist der Anteil der erwachsenen Nahrungsmittelallergiker mit 1- 2 % deutlich niedriger (Chandra, 1997; Sampson, 1991, 1999a, b; Sicherer, 2006; Stanley *et al.*, 1999).

Weiterhin ist auffällig, dass eine geographische Verteilung bestimmter Nahrungsmittelallergien vorherrscht. So leiden in Skandinavien und Nordamerika die meisten Menschen an einer Fischallergie (Bernhisel-Broadbent, Scanlon & Sampson, 1992; Hansen *et al.*, 1996), am mexikanischen Golf tritt am häufigsten die Schalentierallergie (Daul *et al.*, 1988), in den USA die Erdnussallergie (Sampson, 1996) und in mediterranen Regionen die Steinobstallergie auf (Pastorello *et al.*,

1994). Grundsätzlich können alle Lebensmittel bzw. dessen Inhaltsstoffe allergen wirken, jedoch sind die allergischen Potenziale unterschiedlich.

Zu den Lebensmitteln, die Allergene für Reaktionen vom so genannten Soforttyp enthalten, zählen unter anderem Sellerie, Steinobst, Kuhmilch, Hühnerei, Fisch, Nüsse, Getreide, Tomaten und Soja. Allergien lassen sich in 4 Haupttypen unterteilen (siehe Tabelle 1, (Coombs, 1963; Renz, 2002).

Die Typ- I- Allergie ist die sogenannte Soforttyp- Allergie. Klinische Beispiele sind Heuschnupfen, allergisches Asthma, Nahrungsmittelallergie und die Insektengift- Allergie. Die Soforttyp- Allergie hat zahlenmäßig die größte Bedeutung unter den Allergietypen. Beim Soforttyp handelt es sich um eine durch Immunglobulin der Klasse E (IgE)- vermittelte Reaktion. Die Bezeichnung Soforttyp rührt daher, da die Immunantwort innerhalb von Sekunden oder Minuten stattfindet.

Von den verschiedenen immunologischen Mechanismen ist die IgE- bedingte Überreaktion am häufigsten. Da ein Großteil der IgE- Antikörper im menschlichen Organismus an Zellen gebunden vorliegt, sind daher nur 0.001 % des IgEs im Blut frei löslich. Trotz der geringen Konzentration im Blut spielt IgE bei über 90 % aller allergischen Prozesse eine wichtige Rolle. Unter den Nahrungsmittelallergien ist die pollenassoziierte Nahrungsmittelallergie die häufigste Form. Diese beruht auf dem Mechanismus der Kreuzreaktivität zwischen Inhalations- und Nahrungsmittelallergen (De Martino *et al.*, 1988; Foetisch *et al.*, 2003).

Tabelle 1: Klassifizierung von Allergien (Quelle: modifiziert nach Janeway)

	Pathogenese	Dauer bis zum Auftreten der Symptome	Krankheitsbilder (Beispiele)	Antikörper	Allergene
Typ I die allergische Sofortreaktion	IgE-Bildung und IgE-vermittelte Mediatorfreisetzung (u.a. Histamin)	< 30 Minuten	Heuschnupfen, Bindehautentzündung, Nesselsucht (Urtikaria), Gastroenteritis, allergisches Asthma, Anaphylaxie (Schock)	IgE-vermittelt	z.B. Pollen, Milben, Tierhaare, Schimmelpilze, Nahrungsmittel, Insektengifte, Arzneimittel
Typ II	zellzerstörende (zytotoxische) Antikörper	in Minuten	z.B. Transfusions- und Transplantationsreaktionen, Autoimmunreaktionen	Zytotoxische Antikörper der Klassen IgG, IgM	-
Typ III	Zirkulierende Immunkomplexe	3-8 Stunden	Exogen Allergische Alveolitis, z.B. Farmerlunge, Vogelhalterlunge	hauptsächlich durch IgG vermittelt	z.B. Schimmelpilze, Bakterien (thermophile Aktinomyzeten)
Typ IV die verzögerte Reaktion	durch sensibilisierte Lymphozyten	24-48 Stunden	z.B. Kontaktekzem, Arzneimittel-Exanthem	keine (zellvermittelt)	Kontaktallergene (z.B. Nickel), häufig Berufsallergene, Arzneimittel

1.2 Die Tomate (*Lycopersicon esculentum*)

Die im Andengebiet Perus beheimatete Tomatenpflanze gehört zur botanischen Familie der *Solanaceae* (Nachtschattengewächse), der Abteilung der Bedecktsamer. Diese bilden die größte Abteilung der Samenpflanzen. Charakteristisch für alle Bedecktsamer sind die nicht sichtbaren Samenanlagen, da diese in einem Fruchtknoten eingeschlossen sind. Erst beim Öffnen der Frucht werden diese frei. Früchte lassen sich in Chorikarpe und Coenokarpe unterteilen. Bei den coenokarpen Früchten sind mehrere Fruchtblätter untereinander verwachsen. Die Tomatenfrucht gehört zu den coenokarpen Früchten (siehe Abbildung 1). Bei coenokarpen Früchten sind die Fruchtblätter nur teilweise miteinander verwachsen. Aus botanischer Sicht zählt die Tomatenfrucht zu den Beeren.

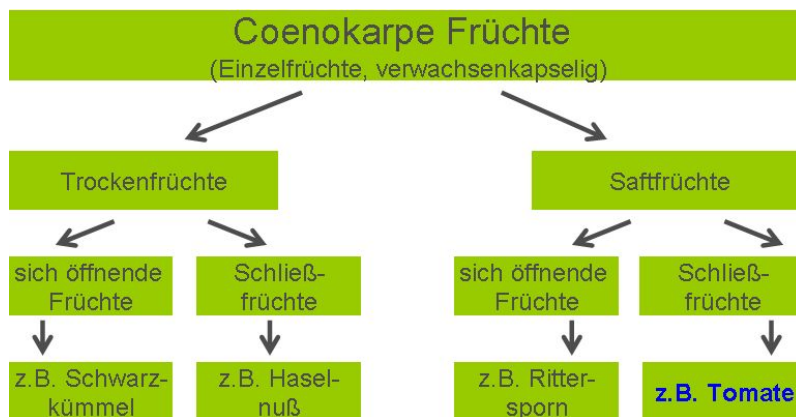
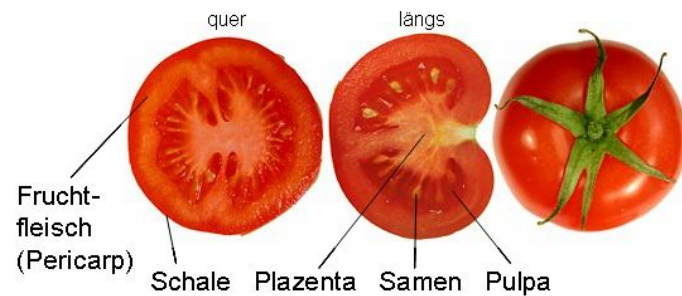


Abbildung 1: Zuordnung der Tomate in die Gruppe der coenokarpen Früchte nach Brückner (Brueckner, 2008)

Die einjährige, strauchartige Pflanze erzeugt einen bis zu 1.5 m hohen, sympodial verzweigten Spross, der mit großen unterbrochenen Blättern besetzt ist. Die oberständigen Fruchtknoten der gelben Blüten gehen aus zwei, z.T. auch drei bis vier, je nach Züchtung, miteinander verwachsenen Fruchtblättern hervor. Dabei entstehen zentral an den bis zur Mitte eingeschlagenen Fruchtblättern die markreichen Plazenten, an denen zahlreiche Samen ansitzen (siehe Abbildung 2). Ihre Samenschalen weisen zunächst ein stark verschleimendes Zylinderepithel auf, das zusammen mit der ebenso verschleimenden Plazenta die saftige Gallerte (Pulpa)

um die Samen herum erzeugt. Durch die Bildung von Carotinoiden, überwiegend Lycopin, verfärbt sich das festere Fruchtfleisch (Perikarp) während der Reifung von grün nach rot.

Abbildung 2: Anatomischer Aufbau der Tomate im Längs- und Querschnitt



Neben dem Hauptbestandteil Wasser (etwa 95 %) enthält die Tomate Vitamin A, B1, B2, C, E, Niacin, sekundäre Pflanzenstoffe sowie Mineralstoffe, besonders Kalium und Spurenelemente. Nach der Entdeckung Amerikas gelangte die Tomate vorerst als Zierpflanze nach Europa und rückte erst nach 1920 zur Weltwirtschaftspflanze auf. Im Durchschnitt isst jeder Deutsche rund 22 kg Tomaten pro Jahr. Davon wird fast die Hälfte als frische Tomaten verzehrt. Nur 6 % der in Deutschland vermarkteten Tomaten werden auch dort produziert. Insgesamt werden in der EU 17 Mio. Tonnen Tomaten auf einer Fläche von 290 000 Hektar jährlich angebaut. In der EU sind die führenden Tomatenproduktionsländer Italien (ca. 7 Mio. Tonnen); Spanien, (ca. 4 Mio. Tonnen) und Griechenland (ca. 2 Mio. Tonnen) (Stand, Februar 2006). Die Weltproduktion der Tomate liegt bei etwa 120 Mio. Tonnen. Dabei ist die Volksrepublik China mit 31 Mio. Tonnen weltweit der größte Tomatenproduzent. Die USA ist an zweiter Stelle mit einer Produktion von 11 Mio. Tonnen und die Türkei an dritter Stelle mit 9,7 Mio. Tonnen zu nennen (Stand 2005).

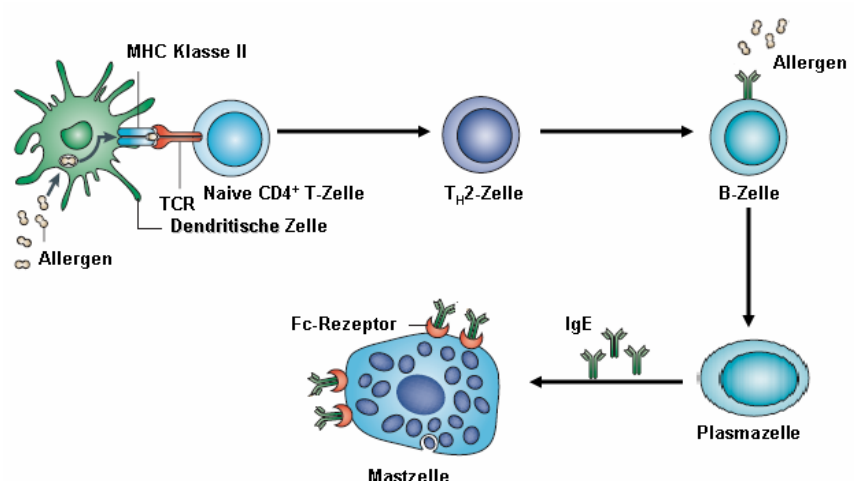
1.3 Pathogenese allergischer Reaktionen

Das menschliche Immunsystem kann zwischen körpereigenen und körperfremden Substanzen unterscheiden und unterteilt diese nochmals in schädliche und unschädliche Stoffe. Dadurch schützt uns unser Körper vor Krankheitserregern, Viren und Bakterien.

Bei einer Allergie werden unschädliche Stoffe als schädlich eingestuft. Dem klinischen Ausbruch einer Soforttyp-Allergie, kann eine mehrjährige initiale Sensibilisierungsphase gegen das betreffende Allergen voraus gehen. Bei dem ersten Kontakt zwischen Allergen und Immunsystem wird kein offensichtlicher Effekt auf die Zellen des Organismus ausgeübt. Somit erscheint diese Phase ohne klinische Symptomatik. Die in Abbildung 3 illustrierte Sensibilisierungsphase beginnt mit der Aufnahme und der enzymatischen Spaltung des Allergens in kleinere Fragmente durch dendritische Zellen, die als antigenpräsentierende Zellen fungieren.

Die erhaltenen Fragmente werden den T-Lymphozyten als T-Zellepitop präsentiert. T-Lymphozyten erkennen diese Allergenfragmente über spezifische Rezeptoren (TCR) auf ihrer Oberfläche und schütten Lymphokine, wie z.B. Interleukin 4 oder γ -Interferon aus. Diese freigesetzten Vermittlersubstanzen induzieren eine Differenzierung von B-Lymphozyten zu Antikörper-sezernierenden-Plasmazellen. Das auf diesem Weg produzierte IgE bindet über hochaffine Fc-Rezeptoren an der Oberfläche von Mastzellen oder Basophilen und Eosinophilen.

Abbildung 3: Erste Phase einer allergischen Reaktion – die Sensibilisierung

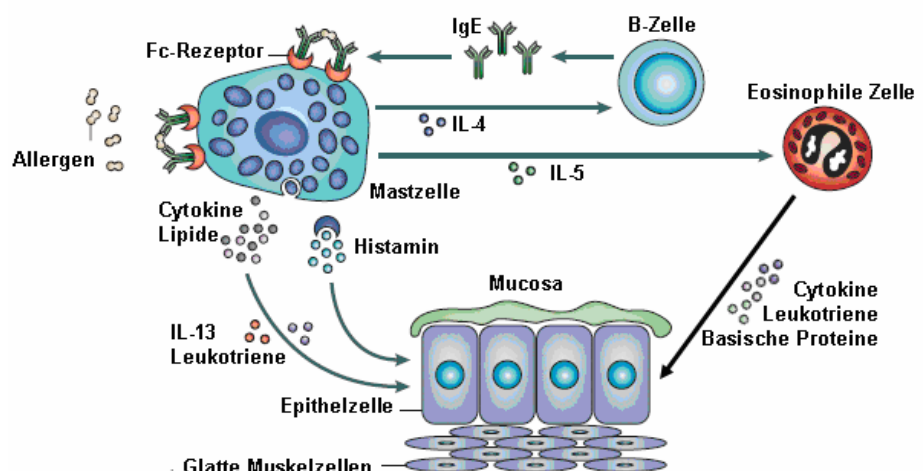


Erst eine erneute Exposition des Organismus mit dem Allergen hat innerhalb von Sekunden bis Minuten eine allergische Reaktion zur Folge. Die akute Phase und deren Reaktionskaskade ist vereinfacht in Abbildung 4 dargestellt.

Bei allergischen Erkrankungen wird für das jeweilige Allergen spezifisches IgE durch differenzierte Plasmazellen gebildet und freigesetzt. In dieser Phase bindet das Allergen-Epitop an das IgE-Paratop, welches an der Oberfläche von Granulozyten gebunden vorliegt. Das zellgebundene IgE fungiert gewissermaßen als „Brücke“ zwischen Allergen und Zelle, an die sich das eindringende Allergen anlagert (Kroegel, 2001). Im Anschluss erfolgt die Freisetzung von Effektormolekülen aus cytoplasmatischen Granula der Mastzelle durch eine degranulierende Exozytose. Hierbei sind vor allem vasoaktive Amine wie z.B. Histamin und Serotonin sowie inflammatorische Lipide wie z.B. Prostaglandine und Leukotriene zu nennen.

Durch die IgE-vermittelte Aktivierung der Mastzellen wird eine Kaskade von Entzündungsreaktionen ausgelöst. Die physiologische Rolle des IgEs umfasst die unmittelbare Einleitung einer lokalen Abwehrreaktion gegen bestimmte infektiöse Partikel, wie z.B. Parasiten. Bei prädisponierten Individuen hingegen erstreckt sich die pathophysiologische Rolle auf die Vermittlung allergischer Sofortreaktionen (Kroegel, 2002).

Abbildung 4: Zweite Phase einer allergischen Reaktion - die Manifestierung



1.4 Die Tomatenallergie

Nahrungsmittelallergien können zunächst in 2 Gruppen unterteilt werden. In die erste Gruppe gehören inhalative Allergene, wie z.B. Pollen (Bircher *et al.*, 1994; Ma, Sicherer & Nowak-Wegrzyn, 2003; Ronchetti *et al.*, 2007).

Zu einer zweiten Gruppe der Nahrungsmittelallergene können Allergene der Kuhmilch, des Hühnereis sowie der Hülsenfrüchte eingeordnet werden. Die Gemeinsamkeit dieser Allergene besteht darin, dass sie gegen die Verdauungsenzyme des Gastrointestinaltrakts resistent sind (Host & Halken, 1990; Ronchetti *et al.*, 2007).

Von der Tomatenfrucht sind ausschließlich Allergene der zweiten Gruppe bekannt. Diese Form der Allergie lässt sich dem ersten Typ zuordnen. Unter den IgE-vermittelten Überempfindlichkeitsreaktionen gegen die Pflanzengruppe der *Solanaceae* stellt die IgE-Sensibilisierung gegen Tomaten die häufigste klinische Form dar. Die Symptome der allergischen Reaktion reichen vom oralen Allergie Syndrom (OAS - Jucken der Zunge, des Mundes und des Rachens), über Irritationen der Haut bis hin zu mit Krämpfen verbundene Leibscherzen und Übelkeit. In Mitteleuropa zählt die Tomatenallergie zwar mit einem Anteil von 1.5 % unter den Nahrungsmittelallergien zu den selteneren Ursachen (Wüthrich, 1993), ist jedoch bei der mediterranen Bevölkerung mit einer Prävalenz von bis zu 20.6 % der wichtigste Auslöser des OAS (Ortolani *et al.*, 1988).

Tomatenallergene, wie Lyc e 1, 2 und 3, sind in der Allergen-Datenbank der Weltgesundheitsorganisation (<http://www.allergome.org/>) erfasst und von der „International union of immunological societies“ (IUIS) bestätigt. Lyc e 1 wurde als 14 kDa großes Profilin (gi2499814) identifiziert. Profiline sind ubiquitäre eukaryotische Proteine, die u.a. für die Ausbildung des Zytoskeletts in der Zelle wichtig sind. Das Lyc e 2- Allergen ist eine β - Fruktofuranosidase mit einem MG von 50 kDa (gi18542113). Die β - Fruktofuranosidase (oder auch Invertase) gehört zu den Disaccharidasen und ist in die hydrolytische Spaltung von Disacchariden involviert. Das Lyc e 3- Allergen konnte als ein nicht-spezifisches Lipid-Transfer Protein (nsLTP, gi2497745) mit einem MG von 6 kDa identifiziert werden. NsLTPs sind kleine Proteine mit 8 konservierten Cystein-Einheiten, die untereinander Disulfidbrücken ausbilden, wobei eine hydrophobe Tasche entsteht. Dadurch sind diese in der Lage, spezifisch nicht membranbildende Lipide wie Triglyceride und Cholesterolester zu

transportieren (Rueckert & Schmidt, 1990; Scallen *et al.*, 1985). Weitere Tomatenallergene sind die Polygalacturonase 2A (46 kDa), die Superoxid Dismutase (18 kDa), eine anionische Peroxidase (45 kDa), die Pektinesterase (14 kDa) die Lyce Chitinase (30 kDa) (Kondo, Urisu & Tokuda, 2001) sowie die Glukanase. Diese Tomatenallergene sind jedoch bisher nicht von der IUIS bestätigt worden.

1.5 Immunologische Kreuzreaktivität

Durch immunologische Kreuzreaktionen ausgelöste Nahrungsmittelallergien bezeichnet man als sekundäre oder „assozierte“ Nahrungsmittelallergien. Gerade bei Nahrungsmitteln spielen Kreuzreaktionen eine besondere Rolle. Kreuzreaktivität ist das Resultat eines Wettstreites zwischen Liganden um dasselbe Bindungsmolekül. Bei einer Allergie reagieren verschiedene Allergene mit demselben IgE- Molekül. Dasselbe IgE- Molekül kann an verschiedene Allergene mit einem ähnlichen Epitop binden. Die Affinität des IgE- Moleküls ist dennoch zu jenem Allergen am höchsten, das die IgE- Synthese durch das Immunsystem hervorgerufen hat. Grund für Kreuzreaktionen kann beispielsweise eine hohe Homologie zweier Aminosäuresequenzen von Allergenen sein. Ein weiterer Grund, dass es zu einer Kreuzerkennung von Allergenen kommen kann, ist eine strukturelle Homologie. Die Tertiärstruktur von Proteinen, speziell der bindenden Epitope, spielt für die IgE- Bindung eine große Rolle. Ähnlich räumliche Epitope verschiedener Allergene reagieren kreuz (Stadler, 2004).

Viele Allergene sind Glycoproteine (Altmann, 2007). Diese enthalten komplexe Oligosaccharidketten, die an Proteinanteile der Allergene gebunden sind. Da solche Oligosaccharidketten eine signifikante strukturelle Homologie über die Grenzen von Proteinfamilien hinaus zeigen können, sind diese Strukturen für eine breite Kreuzreaktivität verantwortlich. Daraus leitet sich die Bezeichnung „Cross- reactive Carbohydrat Determinants“ oder „CCD“ ab. Diese Kohlehydratketten sind antikörperbindend und können die IgE- Synthese beim Menschen induzieren. CCDs sind ubiquitär vorhandene N- verknüpfte Zucker. Vermutlich resultiert die hohe Immunogenität dieser CCDs aus der Art der Verknüpfung der Monosaccharide mit deren Grundgerüst, welche in Säugern nicht vorkommen (Aalberse & van Ree, 1997; Foetisch *et al.*, 2003; Kristensen, Schou & Roepstorff, 1997; Tretter *et al.*, 1993). Die beiden Strukturen $\alpha(1,3)$ - Fruktose und $\beta(1,2)$ -Xylose stehen im Verdacht, für die

IgE- Bindung verantwortlich zu sein und Kreuzreaktionen auszulösen (Garcia-Casado *et al.*, 1996; Wilson & Altmann, 1998).

Tabelle 2 gibt einen Überblick über bisher bekannte Kreuzreaktivitäten mit inhalativen Allergenen und Nahrungsmitteln. Vermutlich werden manche dieser genannten Kreuzreaktionen durch Strukturhomologien oder CCDs hervorgerufen. Allerdings ist man sich bei den meisten Kreuzreaktionen jedoch noch nicht sicher, welche Mechanismen oder Moleküle dafür verantwortlich sind.

Von allergischen Reaktionen oder Sensibilisierungen gegen die Tomatenfrucht wird oftmals im Zusammenhang mit einer Inhalationsallergie berichtet (Brehler *et al.*, 1997; Czaja-Bulsa & Bachorska, 1998; De Martino *et al.*, 1988; Hannuksela & Lahti, 1977; Petersen *et al.*, 1996; Wüthrich & Schmid-Grendelmeier, 1995). Die hohe Relevanz der Kreuzreaktionen der Tomate mit Pollen zeigte sich unter anderem in der Studie von Fötisch *et al.* (Foetisch *et al.*, 2003). In 9 % der Serumproben von 357 Pollinosepatienten konnten IgE- Antikörper gegen Tomaten nachgewiesen werden. Die häufig mit einer Tomatenallergie in Zusammenhang gebrachten inhalativen Allergene sind Gräser-, Birken und Beifußpollen (De Martino *et al.*, 1988; Foetisch *et al.*, 2003; Hannuksela *et al.*, 1977; Vieths, Scheurer & Ballmer-Weber, 2002; Westphal *et al.*, 2004b). Im Gegensatz zur klassischen Nahrungsmittelallergie mit einer gastrointestinalen Sensibilisierung gegen vorwiegend stabile Nahrungsmittelallergene geht man bei Kreuzreaktionen davon aus, dass die primäre Sensibilisierung durch das Inhalationsallergen erfolgt.

Das sog. Latex- Frucht- Syndrom stellt eine weitere Form einer durch Kreuzreaktionen vermittelten Lebensmittelallergie dar, die während der letzten Jahre zunehmend an Bedeutung gewonnen hat (Beezhold *et al.*, 1996; Brehler *et al.*, 1997). Bei diesem Syndrom scheinen die Tomatenallergene ebenfalls eine wichtige Rolle zu spielen (Garcia Ortiz *et al.*, 1998; Reche *et al.*, 2001).

Tabelle 2: Mögliche Kreuzreaktionen zwischen bekannten inhalativen Allergenen und Nahrungsmitteln, bekannte Kreuzreaktionen im Zusammenhang mit der Tomate sind blau gekennzeichnet (Ortolani *et al.*, 1998; Ortolani *et al.*, 1989).

Name	Allergen	Mögliche kreuzreagierende Nahrungsmittel
Birkenpollen- Nuss-Obst- Syndrom und weitere Kreuzreaktionen zu anderen Pflanzenfamilien	Birkenpollen-allergene Bet v 1 Bet v 2	Haselnussgewächse: Haselnuss Rosengewächse: Apfel, Birne, Pfirsich, Aprikose, Kirsche, Pflaume, Mandel Bananengewächse: Bananen Doldenblütler: Sellerie, Karotte, Fenchel, Dill, Anis, Koriander, Kümmel, Liebstöckel Nachtschattengewächse: Tomate , Kartoffel, Chilipfeffer Sumachgewächse: Mango, Pistazien, Cashewnüsse Lorbeergewächse: Kiwi, Litschi, Avocado Lippenblütler: Basilikum, Majoran, Oregano, Thymian, Pfefferminz
Beifuß- Sellerie- Gewürz- Syndrom und weitere Kreuzreaktionen	Beifußpollen-allergene	Doldenblütler: Sellerie, Karotte, Fenchel, Dill, Anis, Koriander, Kümmel, Liebstöckel Nachtschattengewächse: Tomate , Kartoffel, Chilipfeffer Pfeffergewächse: Schwarzer und grüner Pfeffer Sumachgewächse: Mango, Pistazien, Cashewnüsse Lorbeergewächse: Kiwi, Litschi, Avocado Lippenblütler: Basilikum, Majoran, Oregano, Thymian, Pfefferminz Korbblütler: Artischocke, Sonnenblume, Estragon, Kamille, Wermut, Löwenzahn, Traubenkraut Kürbisgewächse: Kürbis, Gurke, Melone
Gräser- Getreide- Reaktionen	Gräserallergene	Getreide: Roggen, Weizen Hülsenfrüchte: Erbse, Erdnuss, Linse, Sojabohne Kürbisgewächse: Kürbis, Gurke, Melone Nachtschattengewächse: Tomate , Kartoffel, Chilipfeffer Lippenblütler: Basilikum, Majoran, Oregano, Thymian, Pfefferminz Korbblütler: Artischocke

1.6 Einteilung von Allergenen

Allen IgE- reaktiven Allergenen ist gemein, dass sie sehr gut wasserlösliche und sehr stabile Proteine bzw. Glykoproteine sind. Es handelt sich meist um kleine Proteine in der Größe von 5 bis 80 kDa. Ansonst sind Allergene in ihrer Struktur, Aminosäuresequenz oder ihrer biologischen Funktion sehr unterschiedlich. Die Frage, „was ein Allergen zu einem Allergen macht“, konnte bisher noch nicht befriedigend geklärt werden (Brusic *et al.*, 2003; Chapman *et al.*, 2007; RING J, 2004).

Nahrungsmittelallergene lassen sich generell in drei dominante Hauptgruppen unterteilen, die Prolamin- Allergen Familie, die Cupin- Superfamilie sowie in die

Familie 10 der Pathogenese- verwandten Proteine (Breiteneder & Clare Mills, 2005; Radauer & Breiteneder, 2007). In manchen Publikationen wird die Familie der Pathogenese- verwandten Proteine in die Profilin- Familie und Bet v 1- Familie weiter unterteilt (Radauer *et al.*, 2007). Zu der Prolamin- Superfamilie gehören Protease Inhibitoren, wozu auch die pflanzlichen Nahrungsmittelallergene 2S Albumine und die Gruppe der nicht-spezifischen Lipid- Transfer Proteine (nsLTP) gehören. Proteine der Cupin- Superfamilie sind funktionell sehr divers und weisen einen gemeinsamen evolutionären Ursprung auf (Radauer *et al.*, 2006). Pathogenese- verwandte (PR) Proteine sind in frischen Früchten und Gemüse enthalten und wurden in der Literatur als erste Allergene beschrieben (Breiteneder & Ebner, 2000). Der aus der englischen Terminologie stammende Begriff „PR- Protein“ beschreibt Proteine, die in Reaktion auf einen Befall von Krankheitserregern gebildet werden und deren biologische Funktion noch nicht vollständig geklärt ist (Bowles, 1990). Im Weiteren soll besonders auf die Cupin- Superfamilie eingegangen werden.

1.6.1 Allergene der Cupin- Superfamilie

Wie bereits im vorangegangenen Kapitel erwähnt lassen sich Allergene in die Cupin- Superfamilie einordnen, welche eine der drei Allergen- Gruppen darstellt. Alle Proteine dieser Gruppe weisen eine β - Zylinder- Kernstruktur auf. Das Wort Zylinder wird im Lateinischen mit *cupa* übersetzt, wodurch der Begriff Cupin entstanden ist (Dunwell, 1998; Dunwell, Purvis & Khuri, 2004). Diese Proteine bilden große variable Aggregate, die nach proteolytischer Spaltung über Disulfidbrückenbindungen zusammengehalten werden. Sie sind in verschiedenen Salzlösungen löslich und zeichnen sich durch eine große Sequenzhomologie aus.

In Abbildung 5 sind alle bekannten Legumin und Vicilin Proteine in einem phylogenetischen Baum dargestellt. Bislang identifizierte Allergene aus dieser Proteinfamilie sind grau schattiert und lassen sich vornehmlich den globulinen Speicherproteinen der Hülsenfrüchte und Nüsse zuordnen. Allergene der Cupin- Superfamilie lassen sich als hitze- und säurestabile Speicherproteine mit zylinderartiger Struktur charakterisieren (Lehrer, Horner & Reese, 1996).

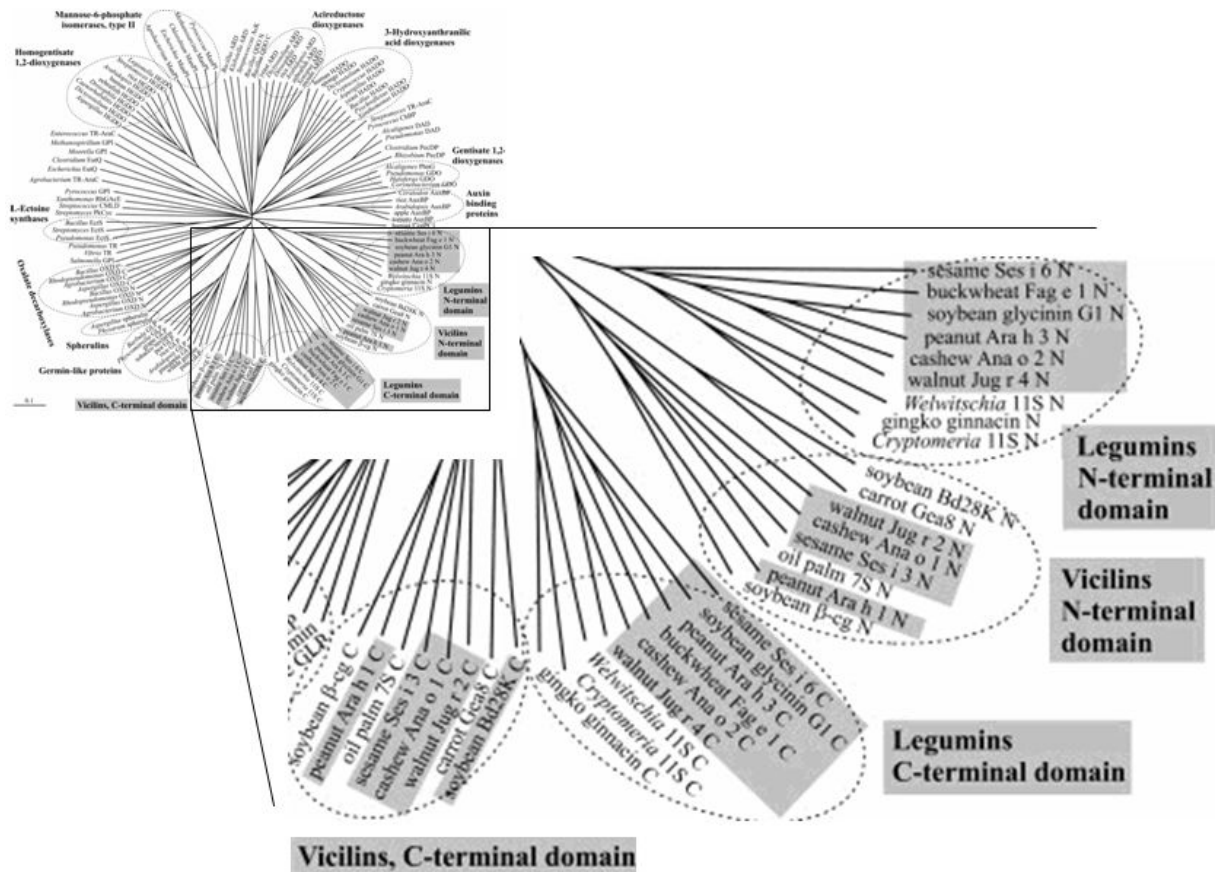


Abbildung 5: Phylogenetischer Baum der Cupin- Superfamilie. Im Bildausschnitt sind alle bekannte Allergene (grau hinterlegt) dieser Superfamilie gezeigt (Radauer *et al.*, 2007)

Legumin und Vicilin sind Samenspeicherproteine, die während der Samenbildung produziert und im Samen gespeichert werden. Dort dienen sie dem sich entwickelnden Embryo während der Keimung als Stickstoffquelle. Weiterhin ist bekannt, dass diese Proteine eine hohe Homologie in verschiedenen Leguminosearten aufzeigen. Wichtige Eigenschaften der Legumin und Vicilin Proteine sind in Tabelle 3 gezeigt (Hegenauer R, 1994).

Tabelle 3: Einige Eigenschaften der Proteine Legumin und Vicilin (Hegenauer R, 1994)

Eigenschaften	Legumin	Vicilin
Löslichkeit in verdünnten Salzlösungen	Weniger löslich	Besser löslich
Temperaturbeständigkeit von Lösungen	Beständig bei 95°C	Präzipitiert bei 95°C
N- Gehalt	Höher (etwa 18%)	Niedriger (etwa 17.4%)
S- Gehalt	Höher (etwa 0.42%)	Niedriger (etwa 0.18%)
Tryptophangehalt	Höher	Niedriger
Sedimentationskoeffizient	11- 12 S	Etwa 7 S
Molekulargewicht (MG)	300 000- 400 000	50 000- 200 000
Proteinnatur	Holoprotein	Glycoprotein
Disulfidbrücken	Oft vorhanden	Keine
Assoziation der Polypeptide oder monomeren Proteine	Tri- und Hexamere	Tri- und Hexamere

1.6.1.1 Das Protein Legumin

Legumine sind heterohexamere Holoproteine mit einem MG von 320- 400 kDa. Während der Leguminsynthese findet eine posttranslationale Prozessierung statt, die in Abbildung 6 schematisch dargestellt ist. Zu Beginn der Leguminsynthese besitzt ein vollständiges Präprolegumin (siehe a) ein primäres Translationsprodukt (t). Die N- terminale Transitsequenz ist zum Passieren (1) durch eine Membran notwendig und wird danach abgespalten. Anschließend wird eine Disulfidbrücke ausgebildet (b). Daraufhin entsteht das Prolegumin. Wird die so entstandene Polypeptidkette durch eine Asparaginy- Endopeptidase gespalten (2), entstehen eine α - und eine β - Leguminkette (Jung *et al.*, 1998b; Muntz, 1998). Beiden Untereinheiten bleiben durch Disulfidbrücke vereint.

Das resultierende Holoprotein besteht aus 6 polymorphen, meist nicht glykosylierten Untereinheiten. Das Holoprotein hat die Form eines Rotationsellipsoids und besteht aus 2 übereinander liegenden Trimeren (Domoney, Barker & Casey, 1986; Horstmann, 1993; Muentz, 1986, 1999).

In Abbildung 8 ist die Struktur des Homotrimer am Beispiel der Sojabohne, welche durch Röntgenkristallstrukturanalyse identifiziert wurde und auf der pdb-Datenbank frei zugänglich ist, gezeigt. Weiterhin ist bekannt, dass die polymorphen

Untereinheiten der Proteine von Multigenfamilien kodiert werden (Heim, Baumlein & Wobus, 1994; Heim *et al.*, 1989; Slightom, Sep 1985; Wobus *et al.*, 1986).

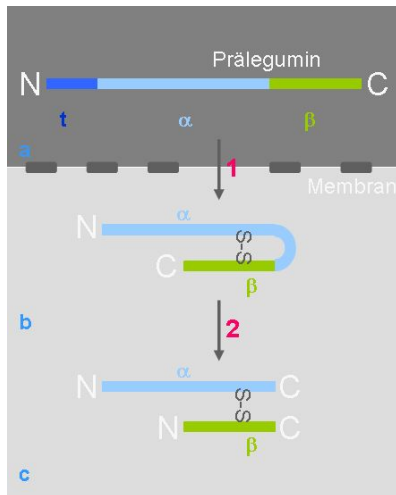


Abbildung 6: Schematische Darstellung der posttranslationalen Prozessierung von Leguminen (modifiziert nach Muntz, 1998)
a) Präprolegumin besitzt eine primäre Transitsequenz (t)
b) eine Disulfidbrücke wird ausgebildet, Prolegumin entsteht
c) Polypeptidkette wird durch eine Asparaginyl-Endopeptidase gespalten

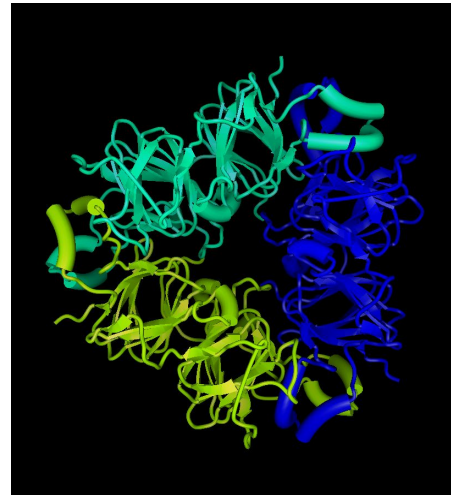


Abbildung 7: Kristallstruktur des Legumin-Homotrimers der Sojabohne (Quelle: pdb- Datenbank)

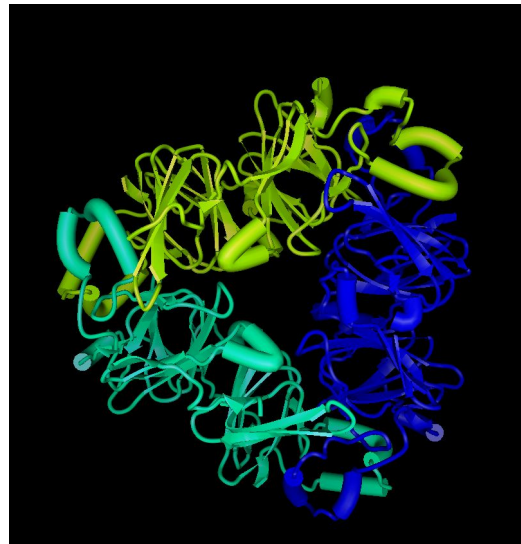
1.6.1.2 Das Protein Vicilin

Viciline weisen zumeist ein MG von 150 - 240 kDa auf. Im Holoprotein Vicilin kommen 2 verschiedene Untereinheiten vor. Die größere der beiden mit MG von 70 - 80 kDa wird als Convicilin-ähnliches Polypeptid bezeichnet. Die kleinere Untereinheit beispielsweise des Erbsen-Vicilins beträgt 50 kDa (Muentz, 1996). Es ist bekannt, dass die kleine Untereinheit des Vicilins glykosyliert (Shewry, 1995) und die Convicilin-ähnliche Untereinheit nicht glykosyliert vorliegt (Muentz, 1999). Da diese beiden Untereinheiten frei zu Oligomeren kombinierbar sind, kommen sowohl homo- als auch hetero- oligomere Trimere vor (Thanh & Shibasaki, 1977). Alle bisher identifizierten Vicilin-Sequenzen sind Cystein-frei, woraus sich das Fehlen von Disulfidbrücken zwischen den Polypeptidketten von Vicilinen erklärt (Bewly & Black, 1994).

Vicilin-Untereinheiten werden, wie die Untereinheiten des Legumins, durch Multigenfamilien codiert (Muentz, 1999). Das Vicilin-Holoprotein hat ebenfalls die

Gestalt eines Rotationsellipsoids, das jedoch weitaus flacher ist als beim Legumin- Holoprotein. In Abbildung 8 ist das Vicilin- Homotrimer aus der Sojabohne in seiner dreidimensionalen Struktur abgebildet. Die Struktur wurde mittels Kristallographie bestimmt und ist auf der pdb- Datenbank abgelegt (Maruyama et al., 2001).

Abbildung 8:
Kristallstruktur des Vicilin
Homotrimer der Sojabohne
(Quelle: pdb- Datenbank)



Viciline wurden bereits in einer Vielzahl von Nahrungsmitteln als Allergen identifiziert. Vicilin- Allergene sind in der Lupine (Peeters, 2007), Cashew- (Teuber et al., 2002) , Erd- (Gubesch et al., 2007) , Hasel- (Lauer et al., 2004) ,Walnuss (Teuber et al., 1999) sowie in der Sojabohne (Burks, Brooks & Sampson, 1988), Linse (Lopez-Torrejon et al., 2003), Erbse (Wensing et al., 2003) und im Sesam (Beyer et al., 2002) bekannt. Bisher bekannte Eigenschaften zu den jeweiligen Allergenen sind auf der Allergome- Datenbank (<http://www.allergome.org/index.php>) gezeigt.

1.7 Charakterisierung von Patientenseren

Die Diagnose einer Allergie umfasst viele verschiedene Untersuchungen, denn nahezu jede Substanz steht im Verdacht allergische Reaktionen hervorzurufen. Die Anamnese ist dabei Voraussetzung für die Diagnose einer Allergie. Hier befragt der Allergologe den Patienten gezielt über seine ggf. allergisch bedingten Beschwerden und die begleitenden Faktoren.

Es gibt leicht und schwer festzustellende Allergien. Die Diagnose ist in vielen Fällen einfach, weil nach dem Genuss von Nahrungsmitteln sofort die typischen Symptome auftreten. Um die Pollenallergie und auch die kreuzreagierenden Nahrungsmittel auszutesten, bieten sich gängige Allergietests, wie der Pricktest und die Bestimmung von spezifischen IgEs an. Sie geben ausreichende Sicherheit bei der Klärung auslösender Nahrungsmittel wie z.B. Karotte, Sellerie, Kirsche, Apfel, Tomate, Orange und Pfirsich. In Einzelfällen kann es sinnvoll sein genauere Hauttests mit frischen unverarbeiteten Nahrungsmitteln in einem "Prick in Prick- Test" durchzuführen (Ortolani et al., 1999).

Der Pricktest (Stech- Test) ist der bekannteste Hauttest. Dazu werden stark verdünnte standardisierte Allergenextrakte direkt auf die Haut geträufelt, die dann mit einer Lanzettnadel angeritzt wird. Bei einer Allergie bilden sich innerhalb von Minuten Rötungen oder juckende Quaddeln um die Einstichstelle. Um eine Diagnose weiter zu sichern wird mittels Radio- Allergo- Sorbens- Test (RAST) eine weitere Charakterisierung vorgenommen. Dieser wird bei Verdacht auf eine Allergie vom Soforttyp durchgeführt. Im RAST wird bestimmt, wie viel allergenspezifisches Gesamt- IgE im Blutserum des Patienten vorhanden ist. Haut- und Serumanalysen geben jedoch nur eine Sensibilisierung an und müssen immer im Zusammenhang mit der Anamnese bzw. den Symptomen bewertet werden.

Ein weiterer Test zur Bestimmung einer Nahrungsmittelallergie, ist die doppelblinde placebokontrollierte orale Nahrungsmittelallergen- Provokation (DBPCFC) (Anderson, 1994; Bahna, 1994). Dazu werden dem Patienten mit einer hypoallergenen Grundnahrung (wie z.B. Kartoffelbrei oder Sojapudding) in einem Abstand von 30 min verschiedene Nahrungsmittel zugeführt und die Verträglichkeit beobachtet. Dabei wird das Nahrungsmittel durch β - Carotin, Rote Beete-, Johannisbeer- oder Karottensaft maskiert. Um den Geschmack anzugleichen wird ein Geschmackstoff hinzugefügt und mit Zucker oder Birnendicksaft gesüßt.

2 Zielstellung

Obwohl bereits intensive Forschungsarbeit im Bereich der Allergieentstehung und -therapie investiert wurde, ist die Fehlsteuerung des Immunsystems noch nicht vollends verstanden. Derzeit ist die einzige Therapiemöglichkeit für Allergiker häufig symptomorientiert, wobei die Karenz des Allergens neben einer Desensibilisierung oder einer medikamentösen Vorsorge häufig die einzige Behandlungsform darstellt. Für eine verbesserte Diagnose und Therapie von Allergien ist die Identifizierung und molekulare Charakterisierung relevanter Lebensmittelallergene eine wichtige Grundvoraussetzung (Bhalla, Swoboda & Singh, 2001). Um eine IgE- Antikörperproduktion, die durch ein entsprechendes Allergen verursacht wird, zu untersuchen, ist es von großer Bedeutung, diese Allergene für strukturelle und immunologische Studien eindeutig zu identifizieren.

In diesem vom BMBF (Bundesministerium für Bildung und Forschung) finanzierten Projekt "Bioprofil Nutrigenomics", sollte in erster Linie die Allergenizität der Tomatenfrucht untersucht werden. Das Nahrungsmittel Tomate zählt unter den *Solanaceae* zu den häufigsten Auslösern einer IgE- vermittelten Überempfindlichkeitsreaktion. Die Prävalenz einer Tomatenallergie liegt bei Allergikern zwischen 1.5 % - 20.6 % in verschiedenen Populationen (Westphal *et al.*, 2004a).

In dieser Arbeit wurden zur Untersuchungen der Allergenizität von Tomatenfrüchten folgende Methoden verwendet, die Immunoblot- Analyse mit Seren von Tomaten- sensibilisierten Patienten, Massenspektrometrie und die computergestützten Proteinanalyse.

Tomatenallergene (siehe Kapitel 1.4), die bisher bekannt sind wurden ausschließlich im Fruchtfleisch der Tomate identifiziert. Um die Allergenizität der Tomatenfrucht zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit zunächst die IgE- Reaktivität einzelner Tomatenbestandteile mittels Immunoblot- Technik untersucht. Enthaltene IgE- reaktive Proteine sollten anschließend mittels Chromatographie angereichert und mittels Massenspektrometrie (LC- MS/ MS) eindeutig identifiziert werden. Die somit angereicherten Proteinfractionen sollten im Weiteren zur Testung an Patientenblut, die an einer Tomatenallergie leiden, mit dem sogenannten Basophilen- Test charakterisiert werden.

Einen weiteren Punkt dieser Arbeit stellte die Charakterisierung der identifizierten putativen Tomatenallergene dar. Dazu sollten Sequenz- und Strukturuntersuchungen zum Vergleich von bereits bekannten Allergenen dieser Proteinfamilie heran gezogen werden. Unter Verwendung von Strukturmodellen der IgE- reaktiven Proteine sollte die Strukturhomologie in Hinblick auf putative Epitope diskutiert werden.

Um diese theoretisch bestimmten Epitope der putativen Tomatenallergene zu verifizieren, sollten im Weiteren Peptid- Epitop- Kartierungsexperiment durchgeführt werden.

Um die Relevanz dieser Arbeit herauszustellen, wird das Vorhandensein der IgE- reaktiven Proteine in kommerziellen Tomatenprodukten durch die Methode der absoluten Proteinquantifizierung (AQUA) mittels Massenspektrometrie bestimmt. Die AQUA- Methode ist die Methode der Wahl für eine absolute Quantifizierung von Proteinen in einer komplexen Mischprobe durch die Verwendung von LC- MS/MS. Dabei werden synthetische, Isotopen- markierte Peptide, Analoga zu nativen Peptiden des Proteins, als interner Standard in einer definierten Menge zur Probe gemischt.

3 Material

3.1 Patientenseren

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Seren, resultieren aus einer Kooperation mit dem Allergie- Centrum der Charité in Berlin und stammen von Patienten mit einer Soforttyp- Allergie gegen Tomate. Ein Teil der rekrutierten Probanden leidet zudem unter einer nachgewiesenen Gräser, Beifuss, Birke oder Karottenallergie. Allergenspezifisches IgE wurde im Humanserum durch das Phadia CAP- FEiA (Fluoreszenz- Enzym- Immunoassay, Phadia Diagnostics, Uppsala, Schweden) System™ bestimmt. Mit diesem System wird die Gesamt- Immunglobulin E (IgE) Konzentration bestimmt. Die unverdünnten Serumproben werden zunächst mit einem anti- IgE ImmunoCAP inkubiert. Der Anti- IgE ImmunoCAP ist ein an einen Trägerstoff gekoppelter, monoklonaler Antikörper der Maus gegen humanes IgE. Das Gesamt- IgE in der Serumprobe bindet an die ImmunoCAP gebundenen anti- IgEs. Anschließend werden monoklonale Enzym- markierte Antikörper gegen IgE (β - Galactosidase Maus anti- human IgE Antikörper) zugefügt. Dadurch bildet sich ein Komplex aus, der nach einer Inkubationszeit ein Fluoreszenzsignal gibt, welches der IgE- Konzentration im Serum direkt proportional ist.

Das CAP- FEiA System™ ist bis heute als internationaler Goldstandard für die serologische Allergie- Diagnostik anerkannt. Das Referenzsystem ist am Standard der Weltgesundheitsorganisation kalibriert. Die Ergebnisse werden quantitativ in der Einheit KU/l ausgegeben. Dabei entspricht 1U der Menge von 2.4 ng des IgE- Moleküls. Der Messbereich wird von 0.35 bis 100 KU/l in 6 Klassen unterteilt (siehe Anhang, Tab. 4). Die verwendeten Allergiker- Seren in dieser Arbeit weisen eine EAST (Enzymallergosorbent- Test) - Klasse >2 auf (siehe Anhang, Tab. 5) bzw. sind positiv im SPT. Als Negativkontrolle wurde Serum eines nicht- atopischen Individuums mit einer EAST- Klasse = 0 eingesetzt.

3.2 Tomaten

In dieser Arbeit wurden für alle Untersuchungen handelsübliche rote reife Tomaten verwendet (Deutsche Rispentomaten aus Thüringen von TOGAZ GmbH, 07646 Laasdorf).

4 Methoden

4.1 Methodenübersicht

Folgende Methoden wurden in dieser Arbeit verwendet:

<ul style="list-style-type: none">• Methoden zur Probenaufarbeitung <ul style="list-style-type: none">- Aceton- Fällung- Harnstoff- Extraktion- Methanol- Fällung- Ammoniumsulfat- Fällung- Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976)	<ul style="list-style-type: none">• Elektrophoretische Verfahren <ul style="list-style-type: none">- SDS- PAGE- Semidry- Blot
<ul style="list-style-type: none">• Immunologische Verfahren <ul style="list-style-type: none">- Immunoblot- Dot- Blot- Peptid- Epitop- Kartierung	<ul style="list-style-type: none">• Verfahren zur Isolierung von Proteinen <ul style="list-style-type: none">- Chromatofokussierung (CF)- Umkehrphasen Chromatographie (RP)
<ul style="list-style-type: none">• Massenspektroskopische Methoden <ul style="list-style-type: none">- LTQ Identifizierung- Absolute Proteinquantifizierung am TSQ (AQUA- Methode)	<ul style="list-style-type: none">• Computergestützte Proteinanalyse <ul style="list-style-type: none">- FARRP Datenbank- HHpred Programm- MODELLER Programm

4.2 Serumgewinnung

Einem nicht provozierten Patienten wird Blut abgenommen und in ein CPT™-Röhrchen der Firma BD (Heidelberg, Deutschland) überführt. Dieses Röhrchen enthält ein kombiniertes Dichtentrennsystem aus Ficoll und Gel, das bei der Zentrifugation die mononukleären Zellen (PBMCs) dauerhaft von den anderen Blutzellen trennt. Anschließend wird das Patientenblut für 30 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wird das Blut 10 min bei 3000 U/min

zentrifugiert. Das Blutentnahme- System erlaubt somit eine direkte Isolierung von mononukleären Zellen innerhalb von 20 min. Das Serum wird bis zur Nutzung bei -20°C aufbewahrt.

4.3 Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt wird mit dem Bradford- Test durchgeführt (Bradford, 1976). Dazu wurden 10 µl einer Proteinprobe in einer Mikrotiterplatte mit 100 µl Bradford- Reagenz vermischt. Nach zehnmütiger Inkubation bei 37 °C wird die Absorption bei λ_{595} gemessen. Eine Eichgerade mit dem Standardprotein BSA dient der Berechnung der Proteinkonzentration.

4.4 Blot- Verfahren

4.4.1 Dot Blot

Dot- Blot ist der englische Begriff für das punktförmige Auftragen isolierter Protein-Proben auf Trägermaterialien wie Papier, Nitrozellulose- oder Nylonfilter. In dem Proteingemisch befindet sich das zu detektierende Antigen. Freie Bindungsstellen auf der Membran werden mit einem unspezifischen Protein blockiert. Anschließend wird der primäre Antikörper zugegeben, der spezifisch an das zu detektierende Antigen bindet. Der markierte sekundäre Antikörper bindet dann an den primären Antikörper und kann durch eine enzymatische Farbreaktion detektiert werden.

Die Proteinlösung wird in 10 µl Anteilen auf eine 1 x 1 cm große Nitrozellulosemembran (NC) pipettiert. Nach dem Trocknen besteht die Möglichkeit erneut 10 µl, je nach gewünschter Proteinkonzentration der jeweiligen Proteinlösung auf die Membran zu geben.

In dieser Arbeit wurde diese Technik zur Untersuchung der IgE- Reaktivität von Patientenserum auf verschiedene Tomatenbestandteilen verwendet. Dabei wurde eine Proteinmenge von jeweils 100 µg auf die Membran aufgebracht. Die Membranen wurden für 1 h bei RT mit dem Patientenserum (1: 20) jeweils in 4 ml Trisgepufferte Kochsalzlösung (TBS, 100 mM) und 2.5 % Milchpulver schüttelnd inkubiert und im Anschluss dreimal für je 10 min in Trisgepufferte Kochsalzlösung mit

0.1 % Tween20 (TTBS) gewaschen. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation mit einem polyklonalen Ziege- anti- human- IgE Antikörper (1mg/ ml, US Biological Massachusetts, USA). Nach Angaben des Herstellers wurde eine Verdünnung von 1: 1000 verwendet. Dieser Antikörper ist mit einer alkalischen Phosphatase (AP) konjugiert. Dieser AP- konjugierte Antikörper wurde mit dem „NBT/ BCIP Detektionssystem“ (BioRad, München, Deutschland) detektiert.

4.4.2 Immunoblot (Western- Blot)

Die Immunoblot- Technik ist der Dot- Blot Technik (siehe 4.4.1) sehr ähnlich, da hier ebenso Proteine spezifisch detektiert werden. Allerdings werden bei dieser Immunoblot- Technik die Proteine vor der Untersuchung elektrophoretisch getrennt. Anschließend erfolgt der Transfer der Proteine aus dem SDS- Gel auf eine Membran. Der Transfer erfolgt durch ein elektrisches Feld. Die Membran besteht aus Nitrocellulose (NC) und hat eine sehr hohe Proteinbindungskapazität (Stott, 2000).

Zwischen zwei als Elektroden dienenden Graphitplatten werden puffergetränkte Elektrodentücher (Whatman, Maidstone, England), das Gel sowie eine NC- Membran platziert. Ein effektiver und gleichmäßiger Transfer der Proteine auf eine NC- Membran wird durch die Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems gewährleistet. Nach dem Transfer liegen die Proteine bzw. ihre Bindungsstellen für spezifische Reaktionen mit Makromolekülen, wie z.B. IgE- Antikörpern, frei zugänglich vor. Eine Bindung an die Membran erfolgt wahrscheinlich über hydrophobe Wechselwirkungen, wobei eine Renaturierung der Proteine nach dem Verlust von SDS, während der Elektrophorese, angenommen wird (Aalberse & Van Ree, 2000).

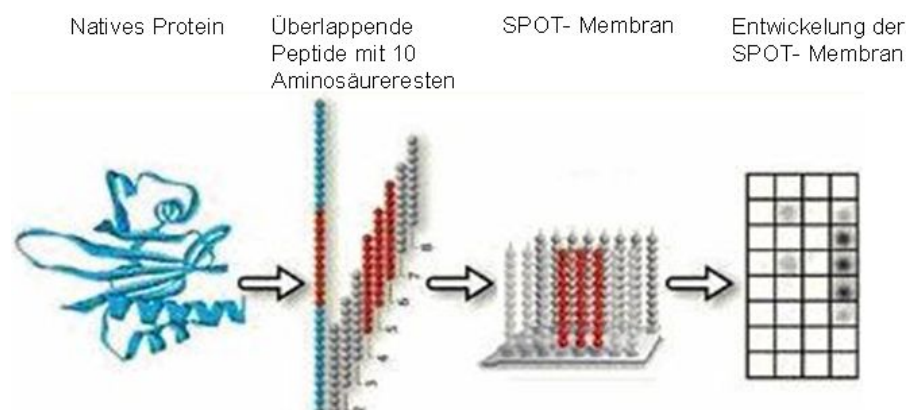
Nach dem Transferieren der Proteine auf eine NC- Membran wurden diese dreimal für je 5 min in TTBS gewaschen. Die Membran wurde anschließend für eine Stunde mit Patientenserum bzw. mit einem Gemisch aus Patientenseren (1: 20, Nr. 1- 7, 9, siehe Anhang, Tab. 5) in 10 ml TBS und 2.5 % Milchpulver schüttelnd inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran dreimal für jeweils 10 min mit TTBS gewaschen. Es folgte eine einstündige Inkubation mit einem Ziege- anti- human- IgE Antikörper (1: 1000), welcher mit einer AP- konjugiert vorliegt. Die Detektion von AP- konjugierten Antikörpern erfolgte mit dem „NBT/ BCIP Detektionssystem“ (BioRad, München, Deutschland).

4.4.3 Epitop- Kartierung mittels SPOT- Membranen

Unter Verwendung der SPOT- Synthese- Technik (Frank & Overwin, 1996; Reineke, Kramer & Schneider-Mergener, 1999) (Hilpert, Winkler & Hancock, 2007) wurden 184 überlappende Tomatenlegumin- Peptide und 188 Tomatenvicilin- Peptide synthetisiert. Diese wurden direkt auf einer Zellulosemembran (Whatman, Maidstone, England) hergestellt. Im Verlauf wird jedes Peptid auf dieser Membran als Spot bezeichnet. Jedes Peptide ist je 13 Aminosäuren lang und überlappt mit der Sequenz des Folgepeptids mit 10 Aminosäureresten (siehe Abbildung 9). Die Synthese wurde von der Firma jpt GmbH (Berlin, Deutschland) durchgeführt. Die Gesamtheit aller Peptide deckt somit die vollständige Aminosäuresequenz der Proteine Legumin und Vicilin der Tomate ab.

Jeder Spot enthält ca. 5 pmol kovalent gebundene Peptide. Für die Analyse der Epitopbereiche wurden die Membranen jeweils für 5 min mit Methanol inkubiert und anschließend 3 Mal je 10 min mit TBS gewaschen. Zum Blockieren der Membranen wurde das BD Chemiluminescence Kit laut Hersteller (Roche, Mannheim, Deutschland) verwendet. Die Membranen werden für 1 h mit einem Gemisch aus acht Patientenserum (Nr. 1- 7, 9, siehe Anhang, Tab. 5) in einer Verdünnung von 1: 20 inkubiert. Anschließend wurden diese für je 10 min mit TBS- 0.1% Tween20 gewaschen. Gebundene IgE- Antikörper werden mit einem Maus- anti- human- IgE- Antikörper, welcher mit einer Meerrettich- Peroxidase (POD) konjugiert ist (Southern Biotech, Eching, Deutschland) detektiert. Dieser wird für 1 h bei RT in einer Verdünnung von 1: 1000 inkubiert. Die Detektion erfolgte mit dem BD Chemolumineszenz Kit nach Herstellerangaben auf einem Röntgenfilm (Kodak).

Abbildung 9: Prinzip der Peptidsynthese auf einer Zellulosemembran
(Quelle: jpt GmbH)



4.5 Massenspektroskopische Methoden

4.5.1 In- Gel- Trypsinverdau für LC- ESI- MS/MS

Zur massenspektrometrische Analyse von Proteinen aus dem SDS- Gel wurden Gelbanden zunächst proteolytisch verdaut und die entstandenen Peptide anschließend eluiert (Wienkoop et al., 2004). Ausgeschnittene SDS- Gelstücke wurden dazu für 16 h bei 30 °C mit Trypsin (Roche, Penzberg, Germany) in einer Konzentration von 1.25 µg/ml inkubiert (Otto et al., 1996). Dieses hydrolysiert C- terminale Peptidbindungen spezifisch an den Aminosäuren Lysin und Arginin. Resultierende Peptide werden aus dem Gel eluiert und massenspektrometrisch analysiert. Die Elution erfolgt durch passive Diffusion mit aufsteigenden Acetonitrilkonzentrationen (5, 50, and 90 %, jeweils mit 1 % Ameisensäure) aus den Gelbanden.

4.5.2 Komplexproben- Verdau/ Shotgun Proteomics

Zur Proteinidentifizierung komplexer biologischer Proben, wie z.B. Urin, Blut oder Pflanzenextrakt eignet sich besonders die Massenspektrometrie. Unter einer Komplexprobe wird eine Probe von 10 – 10 000 Proteinen, an der keine oder nur kaum Vorreinigungsschritte durchgeführt wurden, verstanden

Zur Analyse komplexer Tomatenproteinextrakte, wird das Proteinpellet zunächst in 0.5 M Tris- HCl- Puffer pH 7.8 gelöst und mit 2 µl Porozyme™ (0.1 µg/µl, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) pro 10 µg Protein für 16 h bei 30 °C tryptisch verdaut. Porozyme™ sind Kügelchen, an die Trypsin kovalent gebunden vorliegt. Danach wurden die Porozyme™- Kügelchen von den resultierenden tryptischen Peptiden durch Zentrifugation abgetrennt. Die tryptischen Peptide werden im Anschluss massenspektrometrisch analysiert

4.5.3 LC- ESI- MS/ MS Messung

Die Massenspektrometrie (MS) ist ein Verfahren zur Bestimmung freier Ionen im Hochvakuum. Jedes Massenspektrometer, unabhängig von der Vielzahl technischer Lösungen, besteht aus einer Ionenquelle, in der ein Strahl gasförmiger Ionen erzeugt

wird. Dabei werden die Ionen nach ihrem Masse/ Ladungs- Verhältnis (m/z) im Massenanalysator getrennt. Der Massendetektor kann unter anderem ein Sekundär- Elektronen- Vervielfacher (SEV) oder Photomultiplier sein (Budzikiewicz, 2007). Aus dem resultierenden Massenspektrum kann dann abgelesen werden, in welchen relativen Mengen Ionen einer bestimmten Masse gebildet wurden.

Die resultierenden tryptischen Peptide wurden zunächst mittels nano- HPLC (Agilent 1100 Series LC, Böblingen, Germany) fraktioniert. Die dazu verwendete Kapillarsäule weist einen Innendurchmesser von 0.1 mm auf (Chromolith CapRod RP18e, 1506 ID Säule). Die fraktionierten Peptide werden mit einem LTQ- Massenspektrometer (Thermo Fisher, Waltham, MA), welches eine lineare Ionenfalle besitzt, analysiert. Beim MS/ MS- Scan, auch Tandem- MS genannt, werden im Verlauf eines Scans, die drei häufigsten Ionen- Signale (von 500 bis 2000 m/z) detektiert. Ionen entsprechender Masse werden anschließend isoliert, fragmentiert und das Produktionenspektrum, auch MS/ MS- Spektrum genannt, aufgenommen.

Die MS/ MS- Spektren werden unter Verwendung von Turboquest (Eng, McCormack & Yates, 1994) mit einer Tomaten Nukleotid- Datenbank (<http://www.tigr.org>) in Bioworks 3.1 (Thermo Fisher) verglichen. Das Programm ist in der Lage die Nukleotidsequenzen in der Datenbank in alle möglichen Proteinsequenzen umzuschreiben und theoretische tryptische Peptide daraus zu generieren und abschließend zu vergleichen. Treffer einer bestimmten Aminosäuresequenzen aus dieser Datenbank müssen einen Xcorr von mindestens 2.0, 1.5, und 3.3 für einfach, zweifach und dreifach geladene Peptide und einen ΔC_n - Wert (Differenz des 1. und 2. Xcorr) von 0.1 ergeben. Der Xcorr stellt einen sogenannten Kreuz- Korrelationsfaktor, der durch den bildlichen Vergleich zwischen theoretischem und gemessenem Spektrum für jedes Peptid berechnet wird. Peptide mit der höchsten Übereinstimmung erhalten den größten Xcorr. Weiterhin muss ein Peptid eine Minimum- Korrelation von 0.1 ergeben, damit es als identifiziert gilt (Peng et al., 2003).

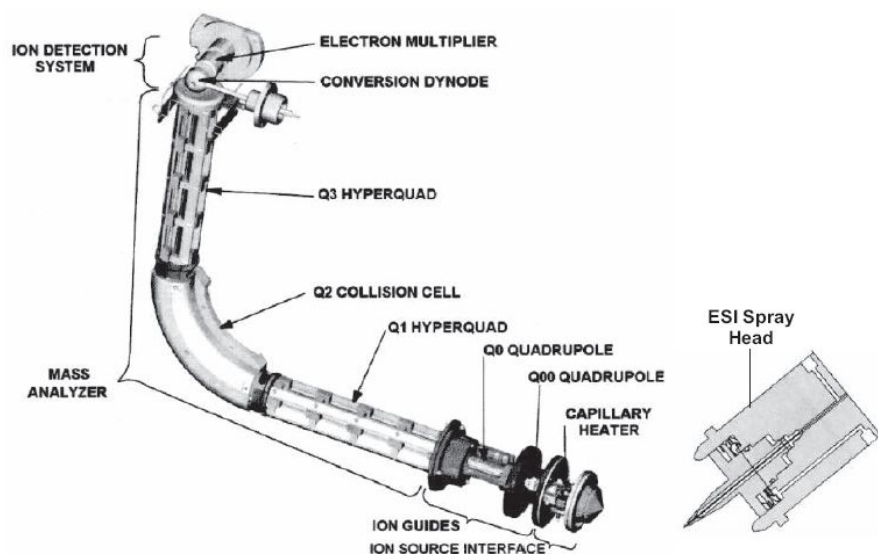
Unter Verwendung des Programms DTA Select (Tabb, McDonald & Yates, 2002) wurden alle redundanten Spektren, Peptide and Proteine selektiert. Weiterhin wurden die resultierenden Spektren mit Hilfe des Programms DTA- Select graphical user interface (GUI) manuell ausgewertet. Die Peptidspektren, die zur Proteinidentifizierung verwendet wurden, sind in der Promi- Datenbank gespeichert (<http://promex.mpimp-golm.mpg.de/home.shtml>) (Hummel et al., 2007).

4.5.4 Absolute Proteinquantifizierung mittels stabiler Isotopen- markierter Peptide

Eine Quantifizierung von Proteinen ist bisher nur durch den relativen Vergleich unterschiedlicher Proteinproben möglich. Bei der hier verwendeten Methode werden synthetisch markierte Peptide als interner Standard bei der massenspektrometrischen Messung eingesetzt. Diese Methode ermöglicht eine absolute Proteinquantifizierung in einer Probe. Dabei werden synthetische Peptide, die zuvor eindeutig einem Protein als proteolytisches Peptid zugeordnet wurden und somit als Referenzpeptide dienen, an der Aminosäure Leucin, Isoleucin oder Phenylalanin mit dem stabilen Isotop ^{13}C und ^{15}N markiert.

Die Messungen wurden an einem TSQ Quantum der Firma Thermo Fisher Scientific durchgeführt. Mit über 300 SRM- Übergängen (Selected Reaction Monitoring) pro Sekunde ist das TSQ Quantum zur Zeit eines der schnellsten und leistungsfähigsten Massenspektrometer. Zu den herausragenden Merkmalen gehören die hyperbolischen Quadrupol- Stäbe, die eine höhere Selektivität für den ersten Quadrupol (Q1) erlauben. Bei diesem Detektor werden drei Quadrupol Systeme (Q1, Q2, Q3) zur Selektion verwendet. (Abbildung 10).

Abbildung 10:
Schematischer Aufbau
des verwendeten
Massenspektrometers
mit Triple Quadrupol-
technik (Quelle:
Thermo Finnigan)



Ein Vorteil des Triple Quadrupol MS ist seine hohe Selektivität der MS/MS-Fragmentierung in Verbindung mit einer hohen Empfindlichkeit. Q2 dient als Stoßzelle für die Fragmentierung, in die Argon (1.5 mTorr) als Kollisionsgas für die reaktiven Stöße eingelassen wird. Die Q1 und Q3 Quadrupole dienen zur Massenselektion. Entsprechend der elektromagnetischen Einstellung des Quadrupols sind nur Ionen mit einem bestimmten m/z in der Lage, den Quadrupol zu passieren. Der Q1 wird auf die Masse des Vorläufer-Ions (Precursor Ion) eingestellt. Der Q3 wird auf die Masse des Produkt-Ions vor bzw. nach der Fragmentierung eingestellt. Dieser Operationsmodus wird als „Selected Reaction Monitoring“ (SRM) bezeichnet und besitzt eine hohe Empfindlichkeit. Für das Zielprotein Legumin wurden die Peptide: AGQNGFEFAVFR und GGESFLLSPQR und für Vicilin die Peptide: SNNPYLFESQR und NSFNLQKGDVIR verwendet.

Um ein sensitives und spezifisches Peptidsignal in einer komplexen Probe zu detektieren, werden zunächst vier SRM-Übergänge, für das interne Standardpeptid gemessen. Die theoretischen Ionenmassen werden im Vorhinein mittels „Peptide Mass Calculator v3.2“ (<http://rna.rega.kuleuven.ac.be/masspec/pepcalc.htm>) berechnet. Aus diesen 4 SRMs wird der beste Übergang mit einer entsprechenden Kollisionsenergie für die weitere Analyse ausgewählt (Wienkoop *et al.*, 2006a).

Die synthetischen Peptide werden in einer Reinheit von 90 % von der Firma Thermo Fisher (Ulm, Germany) synthetisiert. Durch die Markierung einer Aminosäure (z.B. Leucin und Isoleucin) erfährt das synthetische Peptid eine Massenverschiebung von +7 Da im Vergleich zum nativen Peptid. Beide Peptide eluieren zur gleichen Zeit von der Säule und lassen sich im Massenspektrum durch eine Massenverschiebung detektieren (siehe Abbildung 11). Zur Berechnung der absoluten Proteinmengen wird die Peakfläche (AA) des nativen und markierten Peptides verwendet. Basierend auf diesen Werten wird die absolute Proteinmenge berechnet.

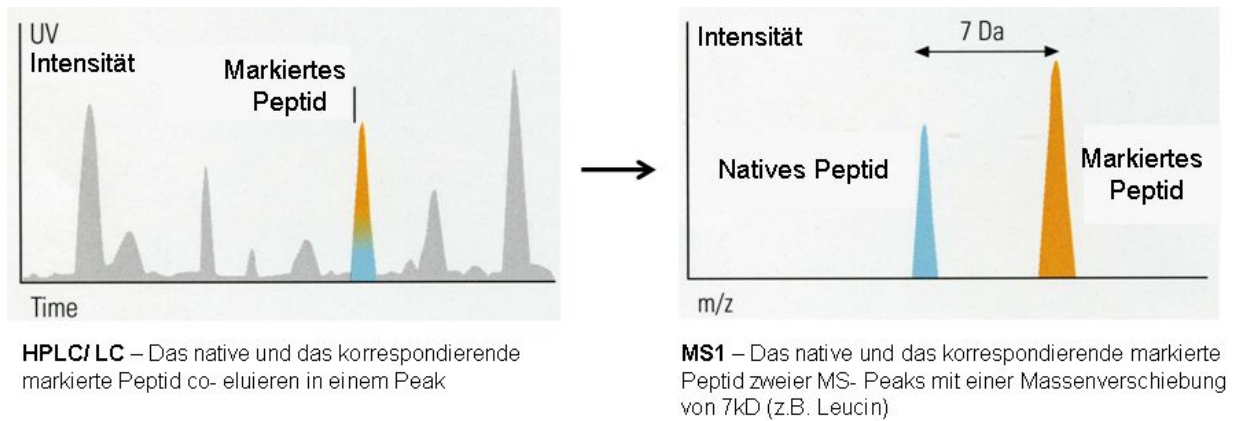


Abbildung 11: Prinzip der absoluten Proteinquantifizierung mittels LC- ESI-MS/MS.

blau: natives Peptid, orange: markiertes Peptid (Quelle: Thermo Finnigan)

4.6 Proteinextraktionsmethoden

4.6.1 Aceton- Fällung

Die Aceton- Fällung wurde zur Proteinextraktion verschiedener Tomatenbestandteile verwendet. Dazu wurden die zu untersuchenden Tomatenbestandteile voneinander getrennt und für eine Proteinextraktion mit flüssigem Stickstoff (Schale, Samen) gemörsert bzw. mit einem Mixgerät (Fruchtfleisch, Pulpa, Plazenta) homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend bei 4000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem Verhältnis 1: 5 (v/w) mit Aceton gemischt. Dadurch werden enthaltene Proteine über Nacht (ü.N.) bei -20 °C ausgefällt. Am nächsten Tag wurden die Proteine durch starke Zentrifugation (30 min bei 4000 g) pelletiert. Die resultierenden Proteinpellets wurden zur weiteren Verwendung in 0.5 M Tris- HCl Puffer pH 7.8 aufgenommen bzw. bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

4.6.2 Harnstoff- Extraktion

Das zu untersuchende Tomatenmaterial wurde für eine Proteinextraktion mit Stickstoff in einer Kugelmühle homogenisiert. Anschließend erfolgte durch Zugabe eines 0.1 M Imidazol, 7 M Harnstoff- Puffers (pH 8 mit Iminodiessigsäure) in einem Verhältnis von 1: 5 (v/w), unter Rühren die Proteinextraktion bei RT. Zur Abtrennung

der löslichen Proteine wurde der Extrakt 10 min bei 16400 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einem Filter, der eine Porenweite von 0.45 µm aufweist (Schleicher & Schuell, Mannheim, Deutschland), filtriert.

4.6.3 Methanol- Fällung

Diese Methode wurde zum Ausfällen von Harnstoff- haltigen Chromatographie- Fraktionen verwendet. Dazu wurden die Fraktionen in einem Verhältnis 1: 5 (w/v) vermischt und ü.N. bei -20 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proteinlösungen 10 min bei 16400 rpm zentrifugiert. Die resultierenden Proteinpeletts wurden bei RT getrocknet und für die SDS- PAGE vorbereitet.

4.6.4 Ammonium- Sulfat- Fällung

Bei der Ammonium- Sulfat- Fällung werden Proteine durch eine gesättigte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - Lösung ausgefällt. Proteinmoleküle besitzen in Lösung hydrophobe Regionen, an die sich Wassermoleküle anordnen. Durch das Hinzufügen von Salzen aggregieren die Proteine, da sich deren Hydrathülle zum Salzmolekül verschiebt. Folglich werden die hydrophoben Regionen wieder frei und stehen zur Aggregation mit anderen Proteinen zur Verfügung. Somit findet ein Ausfällen von Proteinen statt.

In dieser Arbeit wurde die Ammonium- Sulfat- Fällung zur Proteinextraktion von kommerziell erhältlichen Tomatenprodukten (Tomatenmark und Tomatensauce) verwendet. Dazu wurde das entsprechende Tomatenprodukt 45 min bei 3400 rpm und bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde zu 80 % mit einer gesättigten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - Lösung versetzt und bei -20 °C für 1 h inkubiert. Anschließend wurde die Lösung erneut bei 3400 rpm für 45 min und 4 °C zentrifugiert. Da der hohe Salzgehalt in der Proteinlösung einen anschließenden Proteinverdau stört, wurde die Lösung unter Verwendung sogenannter NAP- Säulen der Firma GE Healthcare (Buckinghamshire, UK) entsalzt und umgepuffert. Dazu wurde ein Tris- HCl- Puffer pH 7.8 verwendet.

4.7 Proteinfractionierung mittels zweidimensionaler Flüssigchromatographie

Für die Trennung von Tomatensamenproteinen wurde in dieser Arbeit ein automatisches zweidimensionales Chromatographiesystem verwendet (PF2D von Beckman- Coulter Proteome Lab, Fullerton, USA). Dieses nutzt in der ersten Dimension das Verfahren der Chromatofokussierung (CF) und in der zweiten Dimension das Verfahren der Umkehrphasen Chromatographie (RP) (siehe Abbildung 12).

Bei der CF- Chromatographie erfolgt die Proteintrennung mit Hilfe eines pH- Gradienten, der in der Säule durch zwei Pufferlösungen mit verschiedenen pH- Werten und einer positiv geladenen Säule erzeugt wird. Der Gradient beginnt mit einem pH- Wert von 8.5 (Startpuffer) und schaltet dann auf pH 4 (Elutionspuffer) um. Während des Probenlaufs entsteht somit ein pH- Gradient in der Säule (Wall et al., 2000). Proteine sind auf Grund saurer oder basischer Seitengruppe einzelner Aminosäuren negativ oder positiv geladen. Entsprechend des pH- Wertes der umgebenden Lösung ändert das Protein seinen Gesamtladungszustand. Dieses amphotere Verhalten wird in der Chromatofokussierung genutzt, um Proteine entsprechend ihres isoelektrischen Punktes (pI , ihrem Neutralpunkt) aufzutrennen. Negativ geladene Proteine werden an der Säule gebunden und positiv geladene Proteine von der Säule abgestoßen. Neutrale Materialien bewegen sich genauso schnell wie der pH- Gradient.

Bei RP- Chromatographie ist die stationäre Phase unpolar und die mobile Phase polar. Hier wird ein Gradient von 100 % Wasser zu 100 % Acetonitrile erzeugt. Die Trennung erfolgt durch Wechselwirkungen zwischen dem hydrophoben Trägermaterial und entsprechender hydrophober Bereiche im Protein. Substanzen mit hydrophoben Oberflächenbereichen werden reversibel an die hydrophoben Alkylketten des Säulenmaterials gebunden. Durch die Erhöhung des organischen Anteils im Eluenten wird die Molekülhydrathülle des Proteins verringert. Dadurch kommt es bei der kritischen Konzentration des organischen Lösungsmittels zur Desorption und zur chromatographischen Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Hydrophobizität. Die Hydrophobizität hängt im Wesentlichen von dem prozentualen Anteil der unpolaren Aminosäuren, wie Valin, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Tryptophan und Methionin, ab.



Abbildung 12: Das in unserem Labor verwendete zweidimensionale Chromatographie- System (PF2D) von der Firma Beckman Coulter

4.8 Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS- PAGE)

Die Elektrophorese stellt eine etablierte Methode zur Auftrennung von Proteinen dar. Sie basiert auf der „Wanderung“ geladener Moleküle in einem Gleichstromfeld. Die Trennung der Moleküle erfolgt aufgrund unterschiedlicher Ladungen und/ oder Massen. Die Trennschärfe wird dabei durch die Wanderungsgeschwindigkeit, der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und dem Trägermaterial beeinflusst. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in dieser Arbeit durch ein Trennsystem bestehend aus einem 5 % igen Sammelgel und einem 15 % igen Trenngel. Die Trennung erfolgte unter Verwendung einer Mini- Protean Kammer™ (München, BioRad). Die Gele werden anschließend mit Coomassie Brilliant Blue auf einem Horizontalschüttler gefärbt, wobei die Proteine fixiert und positiv geladen werden.

4.9 Basophilenaktivierungstest

Der Begriff Basophile kürzt die Bezeichnung basophile Granulozyten (weiße Blutkörperchen) ab. Diese enthalten Granula, die sich durch einen basophilen Farbstoff bläulich färben lassen. Basophile gehören zu den Leukozyten.

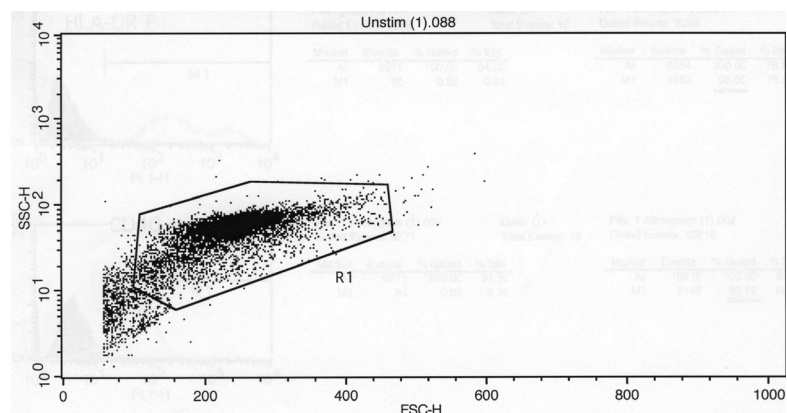
Eine moderne Methode zum Nachweis allergischer Sensibilisierungen ist der Basophilenaktivierungstest. Dabei wird *in vitro* die physikalische Situation einer Typ- I Reaktion simuliert, indem einem nicht provozierten Tomaten- sensibilisierten

Patienten Frischblut entnommen und für den Test verwendet wird. In dieser Arbeit wurde die Expression des Oberflächenmarkers CD203c auf basophilen Leukozyten mittels FACS gemessen. Dieser Nachweis wurde an der Charité in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Worm in Berlin durchgeführt.

Das Frischblut wird im Test mit einem entsprechenden Allergen (meist in verschiedenen Konzentrationen) in Kontakt gebracht. So kann festgestellt werden, ob ein Protein in der Lage ist, gebundenes IgE auf basophilen Leukozyten kreuzzuvernetzen.

Zur Detektion des CD203c-Markers wurde ein Maus anti-human CD203c konjugierter Phycoerythrin (PE) Antikörper der Firma Immunotech (Marseille, Frankreich) in einer Verdünnung von 1:20 verwendet. Zur Durchflußzytometrie wurde ein FACScan der Firma BD (Heidelberg) verwendet, der über einen G3 Macintosh (Apple Computer) gesteuert wurde. FACS steht in der englischen Terminologie für „Fluorescence activated cell sorting“ und beschreibt ein Verfahren zur Messung der Eigenschaften von Zellen. Als Analysesoftware diente das Programm Cell Quest 3.2.1 (BD). In diesem Programm wurde ein Fenster (Gate) zur Festlegung der Zellen orientiert. Dabei werden die Zellen nach Größe und Granularität durch die Lichtstreuung (FSC: forward scatter und SSC: sideward) festgelegt (siehe Abbildung 13). So können Zelltrümmer, Vesikel und Verunreinigungen ausgeblendet werden. Jeweils nach 10.000 Ereignisse (Events) wurde das Fenster geschlossen und die Daten zur Auswertung zugeführt.

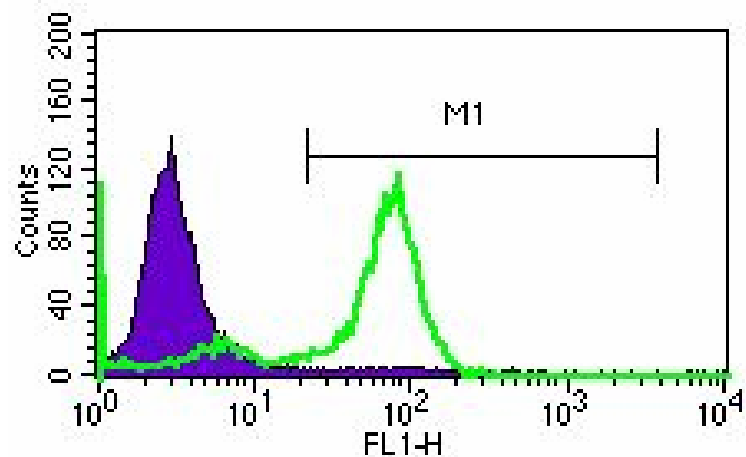
Abbildung 13: FACS Gate. Dot-Plot der Lichtstreuung und Definition des Fensters (Gate), das die Zellen repräsentiert. FSC-H: Partikel-/Zellvolumen, SSC-H: Granularität



Die Fluoreszenzintensität

wurde dann im ersten Kanal (FL1-H) gemessen und numerisch bestimmt (siehe Abbildung 14). Die fluoreszierende Intensität der IgE- stimulierten basophilen Leukozyten wurde einer 100 % relativen Expression gleichgesetzt.

Abbildung 14: Beispiel FACS-Messung, Ergebnisdarstellung aus dem definierten Fenster, wobei die Ereignismenge auf der Abszisse dargestellt ist und die fluoreszierende Intensität auf der Ordinate (FL1-H), M1 definiert den Bereich der spezifischen Fluoreszenz des CD203c- Markers vermittelten Leuchtintensität.



4.10 Computergestützte Proteinanalyse

Die Abfolge der Aminosäuren in einer Polypeptidkette bestimmt unter definierten Umgebungsverhältnissen deren Faltung (oder Entfaltung) in einer festgelegte dreidimensionale Struktur, die Tertiärstruktur. Es gibt zwei Methoden dreidimensionale Proteinstrukturen experimentell in hoher Auflösung zu bestimmen. Zum einen per Röntgenkristallografie oder zum anderen per NMR- Spektroskopie. Dazu sind hohe Proteinkonzentrationen und eine sehr hohe Reinheit der Proteine notwendig.

Eine Alternative ist die Vorhersage der dreidimensionalen Proteinstruktur mittels computergestützter Modellierung. Diese benutzt bekannte dreidimensionale Strukturen als Template zur experimentellen Bestimmung von dreidimensionalen Strukturen von homologen Proteinen zur Vorhersage. *De-novo-* Vorhersagen von dreidimensionalen Proteinstrukturen basierend auf deren Primärsequenz sind nach wie vor sehr problematisch und stellen somit nur eine erste Prognose dar.

4.10.1 Computergestützte FARRP- Datenbankvergleiche und Sequenzanalysen

Beim Vergleich zweier Proteinsequenzen sprechen wir zunächst von einer Sequenzübereinstimmung (Identität) oder Sequenzähnlichkeit (Ähnlichkeit). Dazu wird eine so genannte Alignierung durchgeführt. In einer Alignierung nehmen die gepaarten Zeichen, die direkt untereinander stehen, verschiedene Zustände ein. Sind die beiden Positionen gleich, spricht man von einer Übereinstimmung. Stehen unterschiedliche Zeichen untereinander, handelt es sich um eine Nichtübereinstimmung. Erst aus diesem Vergleich heraus kann eine Aussage getroffen werden, ob die gefundenen Übereinstimmungen wirklich homolog sind. In dieser Arbeit soll die Sequenzübereinstimmung und -ähnlichkeit der identifizierten putativen Tomatenallergene zu bereits bekannten Allergenen berechnet werden. Dazu wurde die FARRP- (Food Allergy Research and Resource Program) Allergendatenbank (<http://www.allergenonline.com/>) verwendet. Diese Datenbank liefert eine umfassende Proteinliste von bis zu 1251 Sequenzeinträgen bekannter Potenzieller Allergene.

4.10.2 Strukturmodellierung mittels MODELLER- Programm

Mit Hilfe des Programms MODELLER wurde in dieser Arbeit die Aminosäuresequenzen in ein pdb- Datenformat (Proteindatenbank) umgewandelt. MODELLER ist ein Protein- Modell- Server. Dieser modelliert nicht nur die Hauptkettenatome in seiner dreidimensionalen Form unter Zuhilfenahme bekannter dreidimensionaler Proteinstrukturen, sondern auch die Seitenkettenatome.

Um Strukturanalysen an den putativen Tomatenallergenen durchzuführen, wurde das Programm VMD (Visual Molecular Dynamics) heran gezogen. Dieses unterstützt das pdb- Datenformat und ist im Internet frei erhältlich. Das VMD- Modellierprogramm ist ein dreidimensionales Grafikprogramm, welches in der Lage ist, Biomoleküle darzustellen. Damit wurde die Strukturhomologiesuche der dreidimensionalen Protein- Modelle vom Legumin (Tomate), Vicilin (Tomate) sowie der Allergene Ana o 2 (Cashewnuss) und Ara h 1 (Erdnuss) untersucht.

5 Ergebnisse

5.1 Dot- Blot Analyse einzelner Tomatenbestandteile

In diesem Versuch sollte gezeigt werden, wie IgE Antikörper die im Serum von Tomaten sensibilisierten Patienten vorliegen im Dot- Blot auf Extrakte verschiedener Tomatenbestandteile reagieren.

Dazu wurde die Tomate in ihre fünf Hauptbestandteile Fruchtfleisch, Plazenta, Pulpa, Schale und Samen zerlegt. Von jedem Proteinextrakt (siehe 4.6.1) sind je 100 µg auf einer 1 x 1 cm große NC- Membran aufgetragen worden. Die Absorptionswerte zur Proteinkonzentrations- Berechnung sind im Anhang 8.1 zu finden. Die aufgetragenen Proteinpunkte sind aufgrund manueller Auftragung nicht uniform und zeigen somit eine laterale Auftragsform.

In Abbildung 15 ist die Dot- Blot Untersuchung mit 18 Tomaten sensibilisierte Patientenseren und einem Kontrollserum in einer Verdünnung von 1:20 (Charakterisierung siehe Anhang 8.2) gegen die fünf Tomatenbestandteile gezeigt. Jede Membran wurde mit einem Einzelserum für eine Stunde bei RT inkubiert. Gebundene Serum- IgE Antikörper konnten durch einen spezifischen anti- IgE (AP) Antikörper in einer Verdünnung 1: 1000 detektiert werden.

Somit wird eine differenzielle Untersuchung einzelner Tomatenbestandteile auf ihre Allergenizität gezeigt.

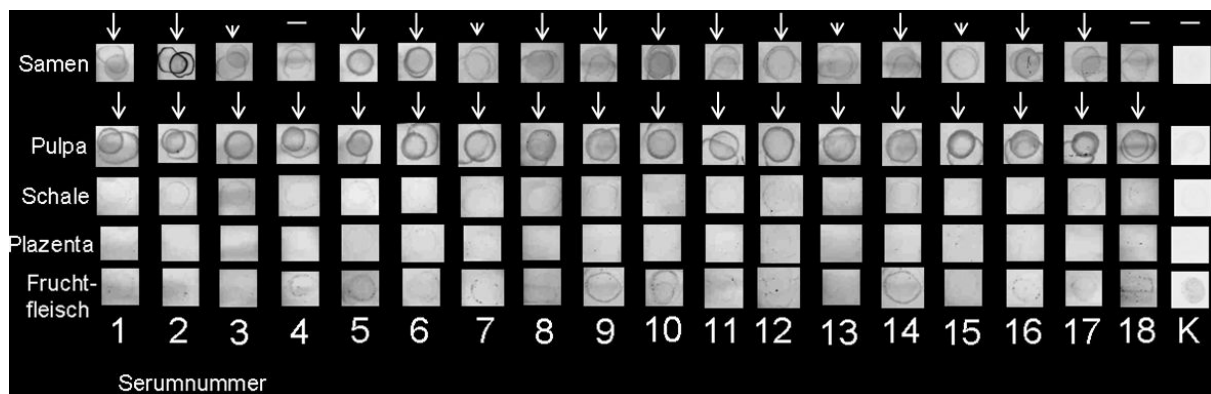


Abbildung 15: Dot- Blot: IgE- Erkennung gegenüber den fünf Bestandteilen der Tomate.

Signifikantes IgE- Detektionssignal: ↓
Schwachere IgE- Detektionssignal: v
Kein IgE- Detektionssignal: -

Weiterhin wurde in diesem Dot- Blot Versuch ein Serum eines nicht- allergischen Individuums (siehe Anhang 8.2) verwendet, wobei dieses Serum parallel mit den Allergikerseren inkubiert wurde. Dieses Serum soll als Negativkontrolle dienen.

Dieses Experiment wurde jeweils durch 3 Versuche verifiziert. Im Ergebnis zeigte das Serum von vier Tomaten sensibilisierten Patienten (Serumnummer: 5, 9, 10, 14) gegenüber dem Fruchtfleisch- Proteinextrakt eine schwaches IgE- Reaktivität. Die restlichen Allergikerseren zeigten keine signifikante IgE- Bindung gegenüber dem Fruchtfleischextrakt. Dahingegen wurden die Proteinextrakte der Tomatenplazenta und der Schale durch keines der 18 verwendeten Patientenseren detektiert. Im Gegensatz dazu konnte ein starkes IgE- Detektionssignal aller 18 verwendeten Patientenseren gegenüber dem Tomaten- Pulpaextrakt beobachtet werden.

Im Vergleich dazu zeigen 9 der 18 Patientenseren (Nummer: 1, 2, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 17) ein starkes IgE- reaktives Signal gegenüber dem Tomatenkeimextrakt. Die restlichen Seren weisen entweder eine schwaches (Nummer: 3, 7, 13, 15) bzw. kein IgE- Detektionssignal (Nummer: 4 und 18) auf.

In der Negativkontrolle konnte gegen keines der fünf immobilisierten Tomatenextrakte eine IgE- Reaktivität beobachtet werden.

5.2 Nano- LC- MS/MS Analyse von verschiedenen Tomatenproteinextrakte

Um erste Hinweise auf enthaltene Allergene bzw. IgE- reaktive Protein der fünf Tomatenbestandteile zu erhalten, wurde eine nano- LC- MS/ MS Analyse durchgeführt. Somit können in erster Annäherung Proteine identifiziert werden, die für die IgE- Detektionssignale im Dot- Blot (siehe Abbildung 15, S. 36) verantwortlich sind. Ob die Detektionssignale durch Tomatenallergene oder durch bisher unbekannte IgE- reaktive Tomatenproteine hervorgerufen wurden, kann mit Hilfe dieser Untersuchungsmethode nicht überprüft werden. Allerdings bekommt man Anhaltspunkte, welches Gewebe der Tomate bekannte Allergene exprimieren und daher ein allergenes Potenzial besitzen könnten.

Bislang wurden Untersuchung zum allergenen Potenzial der Tomate ausschließlich an Extrakten der gesamten Tomatenfrucht durchgeführt. In Tab. 6 im Anhang auf Seite IV sind einige identifizierten Proteine der untersuchten Tomatenbestandteile, die mittels LC- MS/ MS identifiziert wurden, belegt.

Im Ergebnis konnten im Tomatenfruchtfleisch 8 Proteine eindeutig identifiziert werden. Unter anderem wurde ein Profilin (TC162738) und ein Pathogenesis verwandtes Protein (TC162694) detektiert. Diese Proteine weisen jedoch keine hohe Sequenzhomologie zum Tomatenallergen Lyc e 1 Profilin (gi2499814) auf. Weiterhin konnte eine Pektinesterase (TC162057) identifiziert werden. Dieses Protein wird als potenzielles Allergen vermutet (Kondo et al., 2001).

Die Pektinesterase (gi6174913) wurde in einer Studie mittels N-terminaler Sequenzierung identifiziert (Kondo et al., 2001). Die identifizierte Peptidsequenz (IIANAVVAQDGTGDY) stimmt mit der Proteinsequenz aus dieser Arbeit überein. Somit könnten die Detektionssignale im Dot-Blot (siehe Abbildung 15) durch die Pektinesterase (gi6174913) hervorgerufen worden sein. Weiterhin konnten im Plazenta- und Schalenproteinextrakt jeweils sechs signifikante Proteine identifiziert werden. Allerdings weisen diese Proteine keine Homologie zu bekannten oder vermuteten Tomatenallergenen auf. Dies könnte das Fehlen eines IgE-Detektionssignal im Dot-Blot begründen. Im Vergleich dazu zeigten alle verwendeten Patientenserum eine IgE-Reaktivität zum Pulpaextrakt. In diesem Extrakt konnten sechs signifikante Proteine identifiziert werden, unter anderem das Minorallergen Fruktofuranosidase der Tomatenfrucht. Dieses Protein konnte durch fünf signifikante Peptide mittels LC-MS/MS identifiziert werden. Nach einem Sequenzvergleich wurde die Fruktofuranosidase als Lyc e 2-Allergen identifiziert werden. Somit lässt sich das IgE-Dot-Blot-Signal mit hoher Wahrscheinlichkeit auf dieses Protein zurückführen.

Weiterhin konnten im Tomatensamenextrakt neun Proteine eindeutig identifiziert werden. Überraschenderweise wies keines der identifizierten Proteine eine Sequenzhomologie zu bereits bekannten Tomatenallergenen auf. Daraus lässt sich schließen, dass sich in den Tomatensamen IgE-reaktive Proteine enthalten sind, diese jedoch bisher nicht identifiziert wurden. Um diese zu isolieren und anschließend zu analysieren sind weitere Reinigungs- und Anreicherungsschritte notwendig, auf die in dieser Arbeit im Weiteren eingegangen wird.

5.3 Trennung und Identifizierung der Tomatensamenproteine mittels zweidimensionaler Flüssigchromatographie und LC- MS/ MS

Da im Tomatensamen eine relativ hohe Proteinkonzentration von etwa 22- 33 % auf Trockengewicht- Basis vorherrscht und die Samen der Tomate generell einfach isolierbar sind, sollte im Weiteren das allergene Potenzial dieser untersucht werden.

Dieses geschah in einem ersten Reinigungsschritt unter Verwendung der zweidimensionalen Flüssigchromatographie und anschließender LC- MS/ MS. Mit diesem Versuch soll gezeigt werden, um welche IgE- reaktiven Proteine es sich handelt, die im Dot- Blot Versuch zu einem Detektionssignal geführt haben (siehe Abbildung 15, Seite 36).

Die zweidimensionale Fraktionierung wurde mit einem System von Beckman- Coulter (Fullerton, USA) durchgeführt. Die Funktionsweise der Proteinfractionierung mit diesem System ist in Kapitel 4.7 auf Seite 31 beschrieben. Mit diesem System lassen sich Proteine automatisch in einer ersten Trenndimension aufgrund ihres pH- Wertes (Chromatofokussierung) und in einer zweiten Dimension aufgrund deren Hydrophobizität trennen. Die Ergebnisse dieses Versuchs werden im Folgenden separat für jede Trenndimension erläutert.

5.3.1 Trennung der Tomatensamenproteine mittels Chromatofokussierung

Bei dem hier verwendeten Chromatographie- System wird in der ersten Dimension das Verfahren der Chromatofokussierung (CF) genutzt. Zur Proteinisolierung wurde die Harnstoff- Extraktionsmethode (siehe 4.6.2) verwendet und eine Proteinkonzentration von 1 mg/ ml Tomatensamenprotein erreicht. Dieses Puffersystem, welches sowohl zur Extraktion als auch zur Chromatographie geeignet ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit entwickelt und optimiert. Der Vorteil dieser Extraktionsmethode ist, dass keine Umpufferung der extrahierten Proteine notwendig ist, da es sich beim Extraktionspuffer gleichzeitig um den Startpuffer für dieses System handelt. Da das System über eine 5 ml- Probenschleife verfügt, wurden demzufolge 5 mg Totalprotein injiziert.

In Abbildung 16 ist das 205- minütige Chromatogramm der Tomatensamen- Chromatographie dargestellt. Im Chromatogramm ist der Verlauf des pH- Wertes und der des UV_{280nm}- Signals über die Zeit abgebildet. In den anfänglichen 45 min wird

die Probe bei einem konstanten pH- Wert von 8 auf die Säule geladen. Danach ist die Generierung eines pH- Gradienten bis zu einem pH- Wert von 4 zu erkennen.

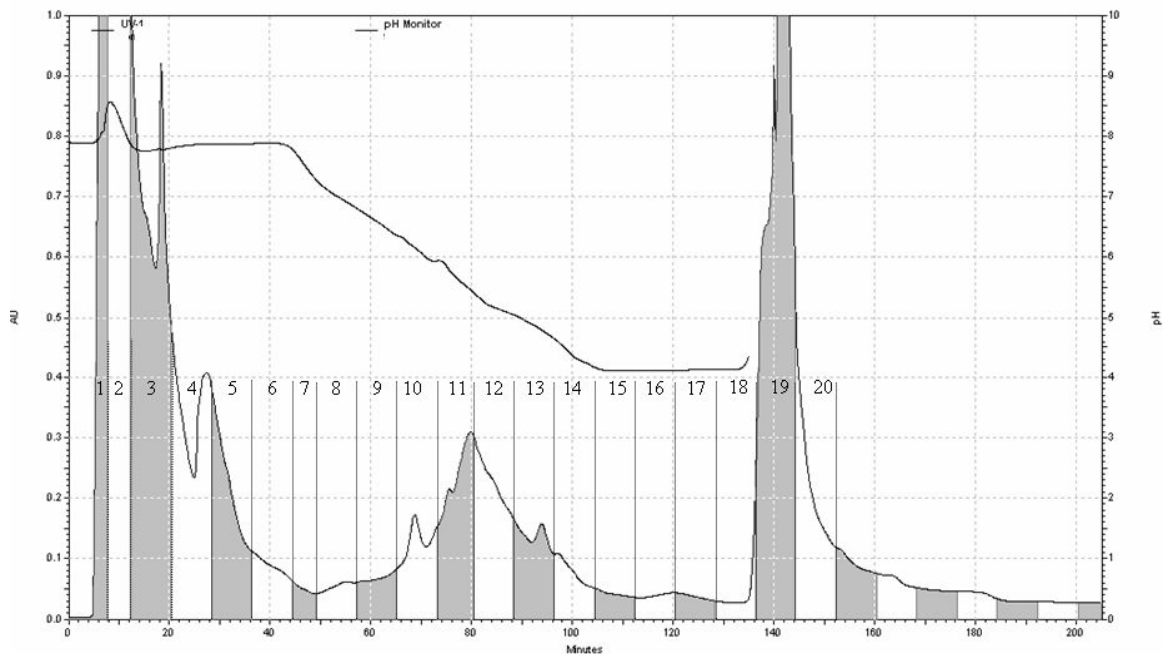


Abbildung 16: Chromatogramm der ersten Trenndimension des Tomatensamenextraktes: 20 resultierende Fraktionierung eines Tomatensamenextraktes mittels Chromatofokussierungs- Säule von Beckman Coulter durch einen pH- Gradienten von 8 bis 4

Die resultierenden Fraktionen schwanken in einem Volumen von 0.1 – 1 ml, da eine Fraktionierung nach dem pH- Wert erfolgte. Nach der Fraktionierung wurde jede Fraktion nach der Methanol- Methode gefällt (siehe 4.6.3). Die gemessenen Proteinkonzentrationen der einzelnen Fraktionen sind im Anhang in Tab. 3 angeführt.

Anschließend wurde jede Fraktion geteilt und parallel auf jeweils ein 15 % SDS- Gele aufgetragen. Es wurde ein Gel zur Coomassie- Färbung (siehe Abbildung 17:A, Seite 41) und ein Gel zur IgE- Immundetektion (siehe Abbildung 17:B) verwendet.

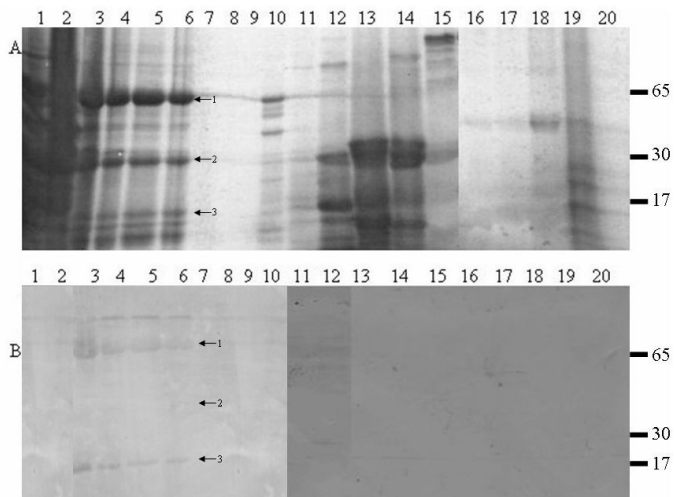


Abbildung 17: A) SDS- PAGE der 20 Chromatofokussierungs- Fraktionen des Tomatensamenextraktes und B) korrespondierender IgE- Immunoblot unter Verwendung eines Serumgemisches von 8 Tomaten- sensibilisierten Patienten

Dabei sind im Immunoblot in den Fraktionen 3 – 6 jeweils 2 Banden apparent (siehe Abbildung 17:B). Die größere der beiden Banden mit einem Molekulargewicht (MG) von 65 kDa (siehe Abbildung 17, Pfeil 1) und die zweite Bande mit einem MG von 17 kDa (siehe Abbildung 17, Pfeil 3) sind mit abnehmender Intensität im Zeitverlauf zu erkennen. Die 30 kDa Proteinbande in den Fraktionen 1 bis 6 (siehe Abbildung 17, Pfeil 2) sowie folgender Fraktionen (7 – 20) werden nach der CF- Fraktionierung nicht durch Serum- IgE Antikörper gebunden und weisen somit kein IgE- Detektionssignal auf.

Da keine weiteren Proteinbanden im IgE- Immunoblot detektiert werden, ist es mit dieser Untersuchung möglich das MG der Proteine, die bereits im IgE- Dot- Blot detektiert wurden (siehe Abbildung 15, Seite 36), näher zu bestimmen. Somit weisen die IgE- reaktiven Proteine ein MG von 65 und 17 kDa auf. Diese Banden werden im Weiteren mittels LC- MS/ MS analysiert.

5.3.2 Identifizierung IgE- reaktiver Proteine nach CF- Fraktionierung

Um die IgE- bindenden Proteine zu identifizieren wurden die detektierten Banden aus dem dazugehörigen Coomassie gefärbten SDS- Gel ausgeschnitten und mittels Trypsin proteolytisch verdaut. Resultierende Peptide wurden mittels LC- MS/ MS analysiert.

Im Anhang in Tab. 7 sind alle identifizierten Proteine, sowohl aus den IgE- reaktiven Banden (17 und 65 kDa), als auch aus der nicht IgE- reaktiven Bande (30 kDa) gezeigt. In der 65 kDa Bande konnten eindeutig fünf Proteine und in der 17 kDa Bande vier Proteine identifiziert werden. Demzufolge ist es nicht möglich einem bestimmten Protein die IgE- Reaktivität zuzuordnen. Jedoch konnte mit dieser Untersuchung die Suche nach putativen Allergenen weiter spezifiziert werden. Und zwar weisen die Fraktionen 3 - 6 einen basischen pH- Wert von ca. 8 auf. Da in darauffolgenden Fraktionen keine IgE- Signal zu erkennen sind, wird im Weiteren nicht auf anschließende Fraktionen eingegangen.

5.3.3 Trennung der Tomatensamenproteine mittels RP- Chromatographie

Im Anschluss CF- Fraktionierung wurden 0.5 ml der basischen CF- Fraktion Nummer 3 (siehe Abbildung 17) automatisch in der zweiten RP- Dimension bei einer Flussgeschwindigkeit von 0.75 ml/min fraktioniert. Eine Fraktionierung erfolgte nach 0.8 min, dies entspricht einem Volumen von 0.6 ml. Nach einer RP- Trennung wurde das enthaltende Lösungsmittel (Wasser/ Acetonitril- Gemisch) jeder Fraktion unter Verwendung einer Vakuumzentrifuge verdampft. Anschließend wurde jede Fraktion in 40 µl Tris- Puffer gelöst und auf zwei 15 % ige SDS- Gele verteilt. Das resultierende 50- minütige Chromatogramm und das dazu gehörige SDS- Gel von 26 Fraktionen sind in Abbildung 18 dargestellt.

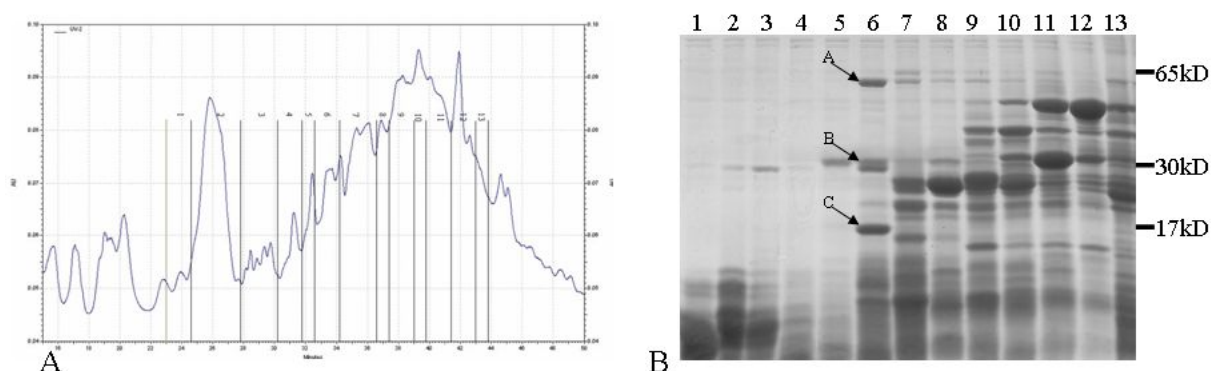


Abbildung 18: A) Umkehrphasen- Chromatogramm der basischen IgE- reaktiven CF- Fraktion und B) das dazugehörige Coomassie gefärbte SDS- Gel der 13 RP- Fraktionen

Die untersuchten Fraktionen beginnen ab einer Retentionszeit von 23 bis 43.8 Minuten, die in

Tab. 9 im Anhang erfasst sind. Es konnten relevante Fraktionen in einer Retentionszeit zwischen 20 bis 40 Minuten beobachtet werden. Fraktionen ab der 0. bis 20. Minute sowie Fraktionen nach der 40. Minute weisen keinen sehr hohen Proteingehalt bzw. keine Proteintrennung auf. Das erste Gel wurde zur Coomassie-Färbung (siehe Abbildung 18:B) und das zweite SDS- Gel für einen IgE- Immunoblot (nicht gezeigt) verwendet.

Im Ergebnis konnte gezeigt werden, dass eine Trennung einzelner Proteinbanden gleicher Proteingröße im SDS- Gel zu erkennen ist. Im IgE- Blot wurden drei Proteinbanden in Fraktion 6 mit einem MG von 65, 30 und 17 kDa (siehe Abbildung 19, Pfeil A, B und C) erkannt. Dieser Versuch wurde durch dreimaliges Wiederholen verifiziert und ergab in jedem Probenlauf eine reproduzierbare Fraktionierung mit einer Erkennung von drei IgE- reaktiven Proteinbanden im o.g. MG- Bereich. In den restlichen Fraktionen konnten keine weiteren Proteinbanden durch Serum- IgE- Antikörper detektiert werden.

5.4 Serumspezifische IgE- Immunoblot Analyse

Wie bereits im Kapitel 5.3.2 beschrieben, wird Fraktion 6, nach einer zweidimensionalen Fraktionierung des gesamten Samenextraktes, im Immunoblot durch ein Serumgemisch aus acht Seren IgE- detektiert (siehe Abbildung 18). In dieser Fraktion wurden 3 Proteinbanden mit einem MG von 65, 30 und 17 kDa erkannt. Um die Verteilung der IgE- Reaktivität einzelner Seren auf die IgE- bindenden Proteine zu testen, wurde die entsprechende Proteinfraction zunächst auf eine NC- Membran transferiert. Anschließend wurde jede Membran mit einem der 18 Patientenseren bzw. mit einem Kontrollserum eines nicht- allergischen Individuums in einer Verdünnung von 1:20 inkubiert (siehe Abbildung 19). Gebundene IgE- Antikörper werden mit einem anti- IgE (AP) Antikörper detektiert.

Die 65 kDa Bande, welche eindeutig als Tomaten Vicilin (AM932874) identifiziert werden konnte, zeigt in 9 von 18 verwendeten Patientenseren (2, 6, 7, 9,

10,13, 14, 16, 17) eine IgE- Bindung. Da 50 % der Patientenseren die 65 kDa Bande im Western Blot detektieren, könnte das putative Tomatenallergen Vicilin nach Vorschriften der WHO als Intermediärallergen gelten (Dreborg, 1994; Geha, 1995; Vieths, 1996; WHO, 2001b). Weiterhin zeigen 5 der 18 Seren (1, 4, 11, 14, 17) ein IgE- Detektionssignal gegen die 17 kDa β - Legumin Bande. Hingegen weisen nur vier der fünf Seren (1, 11, 14, 17) auch die 30 kDa α - Legumin Bande auf. Da 5 von 18 Seren (28 %) eine IgE- Reaktivität auf das Tomaten Legumin (TC165005) aufzeigen, könnte nach WHO- Richtlinien von einem Minorallergen gesprochen werden (Dreborg, 1994; Geha, 1995; Vieths, 1996; WHO, 2001b).

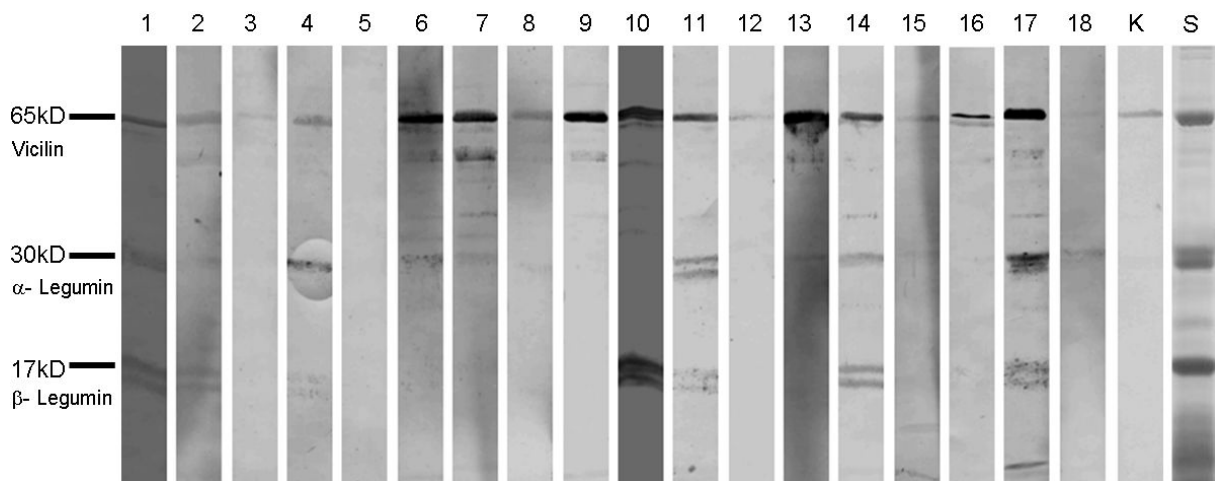


Abbildung 19: IgE- Blot mit Tomatenproteinextrakt aus dem Samen, 1 – 18 verwendete Seren von tomatensensibilisierten Patienten, K – Kontrollserum eines Nicht- Allergikers, S – Coomassie gefärbtes Gel des Tomatenproteinextraktes aus dem Samen

5.5 Identifizierung und Charakterisierung der IgE- reaktiven Tomatenproteine

Die drei IgE- detektierten Proteinbanden wurden aus dem Coomassie- gefärbten Gel geschnitten und enthaltene Proteine proteolytisch verdaut. Alle durch LC- MS/MS gemessenen Peptide und die identifizierten Proteine der drei IgE- reaktiven Proteinbanden mit einem MG von 65, 30 und 17 kDa sind im Anhang in Tab. 8, Seite VI gezeigt.

Die 65 kDa Bande konnten eindeutig als Vicilin Protein (TC164469 und BE458586) der Tomate identifiziert werden. Beide Vicilin- Proteinsequenzen (TC164469 und BE458586) konnten den folgenden EST – Sequenzen zugeordnet werden. Expressed Sequence Tags (EST) sind transkribierte Nukleotidsequenzen, die durch Sequenzierung einer cDNA- Bibliothek erhalten werden.

Das BE458586- Vicilinprotein wird durch das EST 413878, welches in der Alcalá Studie (Alcalá, 2000) sequenziert wurde, kodiert. Das TC164469- Tomatenprotein wird dahingegen sowohl durch die Nukleotidsequenz EST 278357- (Alcalá, 2000) als auch durch die Sequenz gi124222276 (Yamamoto et al., 2005) kodiert. Diese drei Sequenzen (EST413878, EST 278357 und gi124222276) wurden unter Verwendung des Programms Bioedit der contig TC164469- Sequenz, die auf der „Gene Index Database“ abgelegt ist, zugeordnet werden. Diese contig TC164469- Sequenz (siehe Abbildung 20) konnte auf der Internetseite http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/tc_report.pl?tc=-TC164469&species=Tomato des „Gene Index Project“ entnommen werden. Das „Gene Index Project“ hat zum Ziel alle verfügbaren ESTs und Gensequenzen zu sammeln und dadurch neue Erkenntnisse über bestimmte Gene der Öffentlichkeit zur Verfügung zu stellen.

Ein Contig (abgeleitet aus dem engl. contiguous = angrenzend, zusammenhängend) ist ein Set überlappender DNA- Stücke, die von derselben genetischen Quelle stammen. Ein solches Contig kann dazu genutzt werden, die Original- DNA- Sequenz dieser genetischen Quelle abzuleiten.

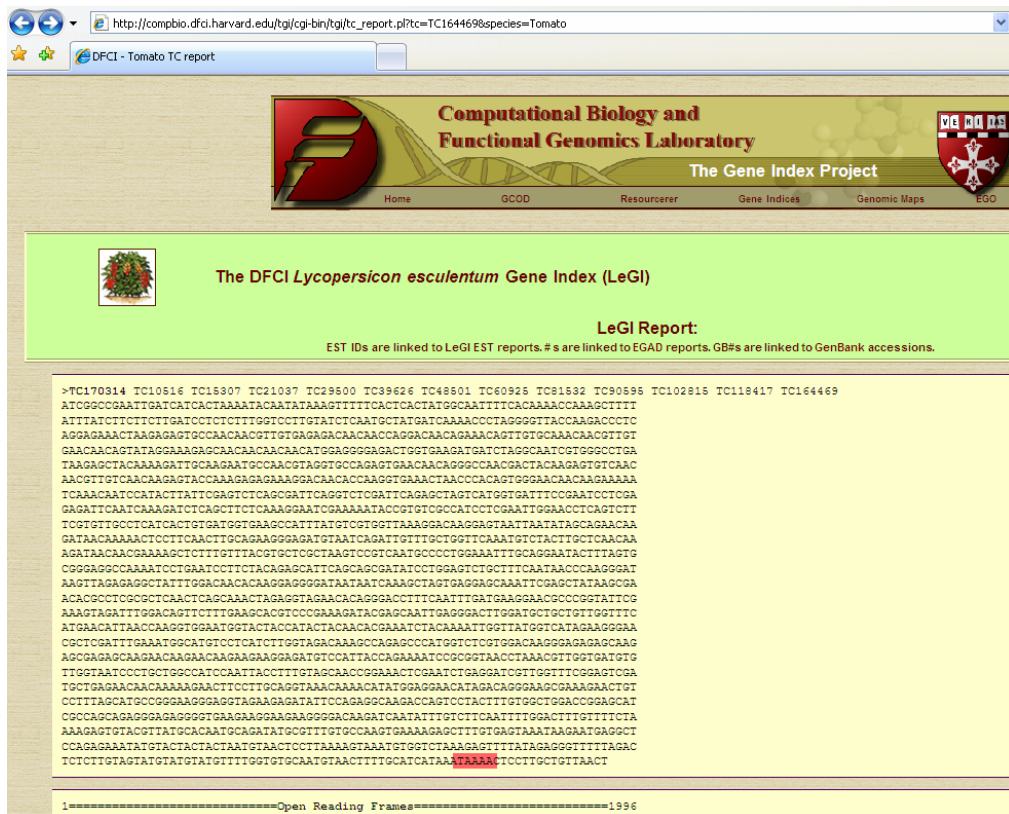


Abbildung 20: Verwendete contig TC164469 Vicilin Nukleotidsequenz zur Proteinsequenzbestimmung des Vicilin Proteins aus der Tomate

Die Sequenz EST 413878 weist mit der contig TC164469- Sequenz im Nukleotid (nt)- Bereich von 322 - 936nt eine 100%ige Übereinstimmung auf. Weiterhin wird die contig TC164469 Sequenz durch die Sequenzen EST 278357 und gi124222276 im Bereich von 1176 – 1682 nt und von 1617 – 1996 nt vollkommen bestätigt. Demzufolge stimmen diese nt- Sequenzen in bestimmten Bereichen mit der 1996 nt langen contig TC164469- Sequenz überein (siehe Anhang, Abb. 5 Seite XII). Die Richtigkeit der zugeordneten und fehlenden Proteinsequenzen konnte durch Peptide, die mittels LC- MS/ MS identifiziert wurden, vervollständig bestätigt werden (siehe Anhang, Tab. 8 Seite VI).

Die vollständige Proteinsequenz wurde an die EMBL „Nucleotide- Sequence Database“ (<http://www.ebi.ac.uk/>) übermittelt, welche die neue Vicilin- Sequenz mit der Bezeichnung AM932874 benannt hat.

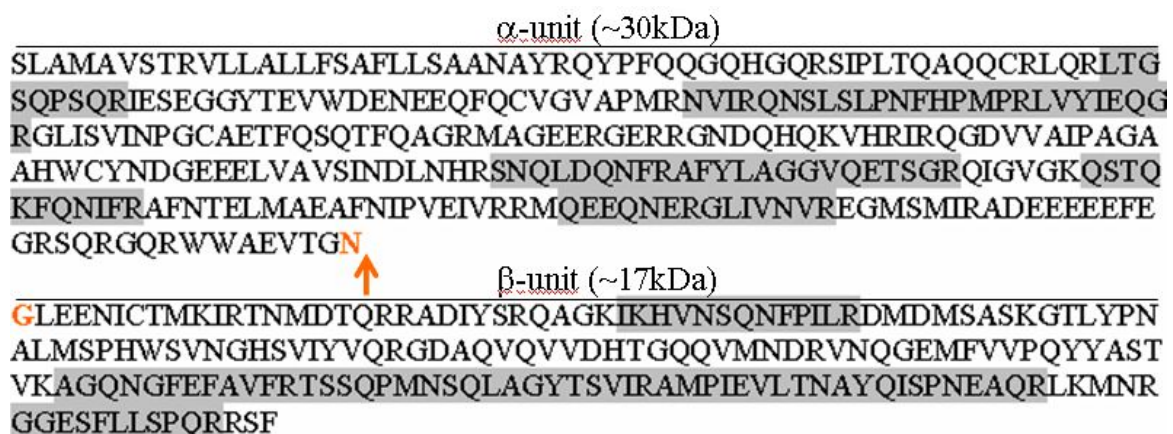
Die 30 und 17 kDa Banden konnten eindeutig einem TC165005 Legumin Protein aus der Tigr- Tomatenproteindatenbank zugeordnet werden. Durch Translation der Tigr- Nukleotidsequenz des TC165005 Proteins, die zur MS- Analyse verwendet wird, kann ein MG von 55 kDa berechnet werden. Daraufhin konnte der 17 kDa Bande

durch gezielte Peptidstrukturanalyse dem C-terminale Teil des Legumin Proteins (TC165005) zugeordnet werden, wobei die 30 kDa Bande dem N-terminalen Teil des Legumins zugeordnet werden konnte. Diese Eigenschaft konnte bereits in anderen Legumin- Untersuchungen gezeigt werden (Jung *et al.*, 1998b; Muntz, 1998; Muntz *et al.*, 2001). Es ist bekannt, dass Legumine durch posttranslationale Modifikationen in eine β - Untereinheit und eine α - Untereinheit durch eine Asparaginy- Endopeptidase gespalten werden (Jung *et al.*, 1998b; Muntz, 1998; Muntz *et al.*, 2001). Der Syntheseweg ist in Kapitel 1.6.1.1 beschrieben.

Aufgrund der noch unbekanntenen Spaltstelle des Tomatenlegumins, wurde in dieser Arbeit das homologe Buchweizen- Legumin, zum Homologievergleich herangezogen. Das Buchweizen- Legumin weist ebenfalls eine NG- Spaltstelle, die durch eine Endopeptidase spezifisch erkannt wird, auf. Dadurch wird das Legumin in seine α - und β - Untereinheit getrennt (Yoshioka *et al.*, 2004). Durch eine Sequenzalignierung konnte eine 49 % ige Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz, zwischen dem α - Buchweizen- Legumin und dem putativen α - Tomaten- Legumin, berechnet werden (siehe Tabelle 5). Weiterhin weisen beide Legumine eine homologe NG- Spaltstelle auf (siehe Anhang, Abb. 9).

Die hypothetische Spaltung des Tomatenlegumins an der Asparagin- Glycin (NG)- Peptidbindung und die identifizierten MS- Peptide (grau hinterlegt) sind in Abbildung 21 gezeigt.

Abbildung 21: Aminosäuresequenz des Tomatenprotein Legumin (TC165005): Putative



Spaltungsprodukte (α - und β - Einheit) an der Asparagin- Glycin Schnittstelle (NG, orange), identifizierten MS/MS- Peptiden sind grau hinterlegt

5.6 Basophilen- Test

Für den Basophilen- Test wurden Fraktionen verwendet, die die Proteine Legumin und Vicilin enthalten. Diese wurden in einem dritten Fraktionierungsschritt durch eine RP- Säule getrennt. Das resultierende Chromatogramm ist in Abbildung 22:A dargestellt. Zur Überprüfung der resultierenden RP- Fraktionen wurden diese im Abstand von 0.8 min aufgefangen. Bei einer Flussgeschwindigkeit von 0.75 ml/ min entspricht das einem Volumen von 0.6 ml. Zur Auftrennung auf einem SDS- Gel (Abbildung 22:B) wurden 0.2 ml verwendet. Diese wurden lyophilisiert und in einem minimalen Volumen Probenpuffer aufgenommen. Die verbleibenden 0.4 ml wurden ebenfalls lyophilisiert und für den folgenden Basophilen- Test verwendet.

Im SDS- Gel ist eine Trennung der 17 kDa β - Legumin Bande von der 65 kDa Bande zu erkennen. Die 30 kDa α - Legumin Bande tritt in fast allen Fraktionen auf. Somit war es nicht möglich, die drei Proteine vollständig von einander zu trennen. Einige weitere Proteinbanden sind ebenfalls zu erkennen. Diese konnten jedoch nicht massenspektroskopisch identifiziert werden, da die Konzentration im Gel zu gering war. Die Legumin- und Vicilin- Proteinbanden dominieren jedoch deutlich im SDS- Gel.

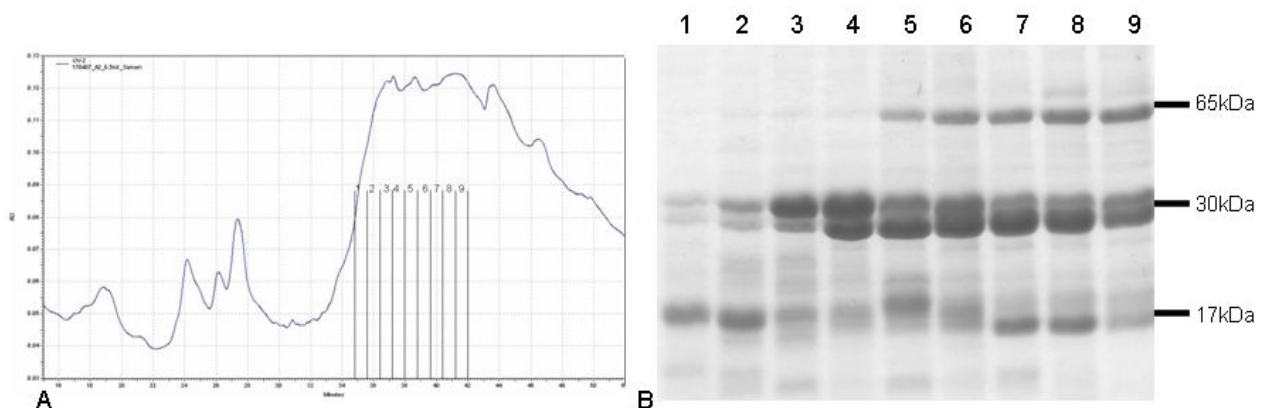


Abbildung 22: A) Chromatogramm und B) SDS- PAGE der gekennzeichneten Fraktionen (1- 9)

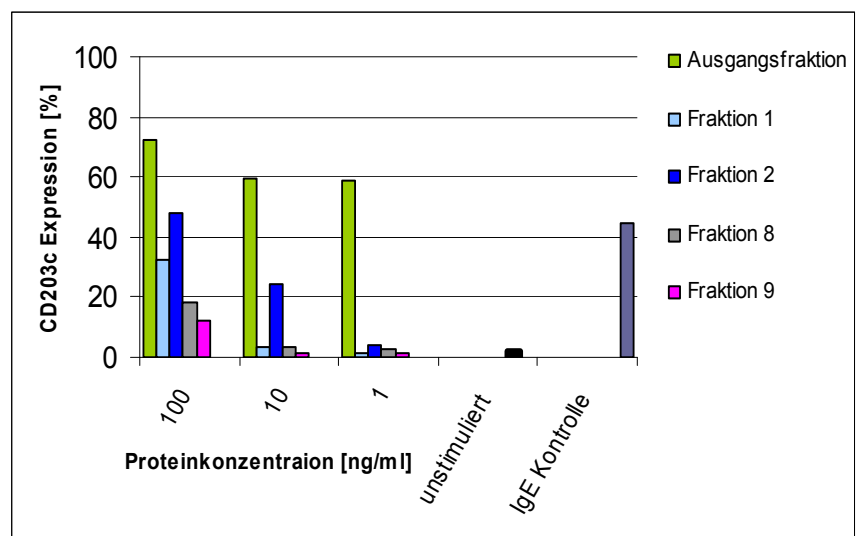
Für den Basophilen Test wurde zum einen eine Ausgangsfraction (CF- Fraction 3) verwendet. Diese wurde im weiteren über eine RP- Säule fraktioniert. Das resultierende Chromatogramm ist in Abbildung 22:A abgebildet. Weiterhin wurden die Fraktionen 1, 2, 8, und 9 mit dem Basophilen Test untersucht (siehe Abbildung 22). Diese Fraktionen wurden ausgewählt, da diese IgE- reaktiven Proteine in angereicherter Form aufweisen. Das 17 kDa große Legumin tritt verstärkt in den Fraktionen 1 und 2 auf. Wohingegen das 30 kDa große Legumin hauptsächlich in den Fraktionen 3 bis 9 zu erkennen ist. Das IgE- bindende Vicilin Protein mit einem MG von 65 kDa ist in den Fraktionen 5 bis 9 enthalten.

Als Negativkontrolle wurde die CD203c- Expression auf der Oberfläche von unstimulierten Mastzellen gemessen. Als Positivkontrolle dienten Mastzellen, deren IgE- Rezeptoren durch die Zugabe von anti- IgE Antikörpern unter saturierenden Bedingungen quervernetzt wurden und somit der maximalen CD203c- Expression entspricht.

Abbildung 23: Messung der CD203c- Expression auf der Oberfläche von basophilen Leukozyten: die Stimulation erfolgte durch Legumin- und Vicilin- enthaltene Tomatensamenproteinfraktionen

-grün: Ausgangsfraction
 -hellblau: Fraktion 1
 -dunkelblau: Fraktion 2
 -grau: Fraktion 8
 -pink: Fraktion 9 verwendete Konzentrationen: 100, 10, 1 ng/ml

-rot: unstimulierte Basophile,
 -violett: IgE- Kontrolle (maximale Stimulation durch Zugabe von anti- human IgE- Antikörpern)



Alle Werte des Basophilen- Tests sind im Anhang 8.4 aufgeführt. Die stärksten CD203c- Expressionssignale sind in der Ausgangsfraction detektiert worden. Weiterhin ist ein Abfall der Intensität des CD203c- Expressionssignal mit sinkender Proteinkonzentration bei allen fünf Proteinfraktionen zu verzeichnen.

Auswertend ist zu sagen, dass nach einer RP- Proteintrennung der Ausgangsfraction generell eine Verringerung der CD203c- Expression auf der Oberfläche der Basophilen zu verzeichnen ist. Auf die enthaltenden Proteine der Fraktion 2 ist die stärkste CD203c- Expression zu verzeichnen. Als Reaktion der Basophilen auf Proteine der Fraktion 2 in einer Konzentration von 100 ng/ ml, findet eine CD203c- Expression von 48 % statt.

Im Vergleich dazu bewirken die Fraktionen 1, 8 und 9 eine verringerte CD203c- Expression. Tomatenproteine der Fraktion 1 stimulieren ebenfalls eine die Basophilen. Eine Stimulation ist jedoch nicht in dem Maße wie in Fraktion 2 zu erkennen. Fraktionen 8 und 9 zeigen hingegen das schwächste Signal. Die Signalstärke der Fraktionen 8 und 9 weisen dennoch ein höheres Signal als die Negativkontrolle auf.

Abschließend kann man sagen, dass generell eine Stimulation der Mastzellen durch die basischen Tomatenproteine nach einer CF- Fraktionierung hervorgerufen wird, jedoch ist eine weitere Proteintrennung notwendig.

5.7 Quantifizierung putativer Tomatenallergene in kommerziellen Produkten

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die Proteine Legumin und Vicilin aus Tomatensamen als IgE- reaktive Proteine identifiziert werden. Im Fall, dass diese Proteine eine klinische Relevanz haben sollten, stellt sich die Frage, ob diese Proteine in herkömmlichen Lebensmitteln vorkommen und somit für Allergiker relevant sind.

Um dieser Fragestellung Rechnung zu tragen wurden zunächst in einem Vorversuch alle enthaltenen Proteine einer kommerziellen Tomatensauce mittels LC- MS/ MS gemessen. Dabei konnte kein Legumin oder Vicilin detektiert werden. Auf Grund dessen wurde die sensitive SRM- MS/ MS Methode zur absoluten Proteinquantifizierung angewendet. Dazu wurden für jedes der beiden Tomatenproteine zwei synthetische Peptide verwendet. Für das Legumin die Peptide, Le2 und Le4 (Aminosäuresequenz: AGQNGFEFAVFR und GGESFLLSPQR) und für das Vicilin, Vi2 und Vi3 (Aminosäuresequenz: SNNPYLFESQR und NSFNLQKGDVIR). Die entsprechenden Massen der Peptide sowie die Massen der zwei- bzw. dreifach geladenen Vorläuferionen wurden mit dem „Peptide Mass Calculator v3.2“ berechnet und sind in Tabelle 4 aufgeführt. Weiterhin sind in Tabelle

4 jeweils die zwei signifikantesten SRM- Übergänge jedes Peptides, die am TSQ bestimmt wurden, angezeigt. Die somit ermittelten Peptidfragment- Massen wurden für die absolute Proteinquantifizierung der Proteine Legumin und Vicilin in einer Tomatensauce verwendet.

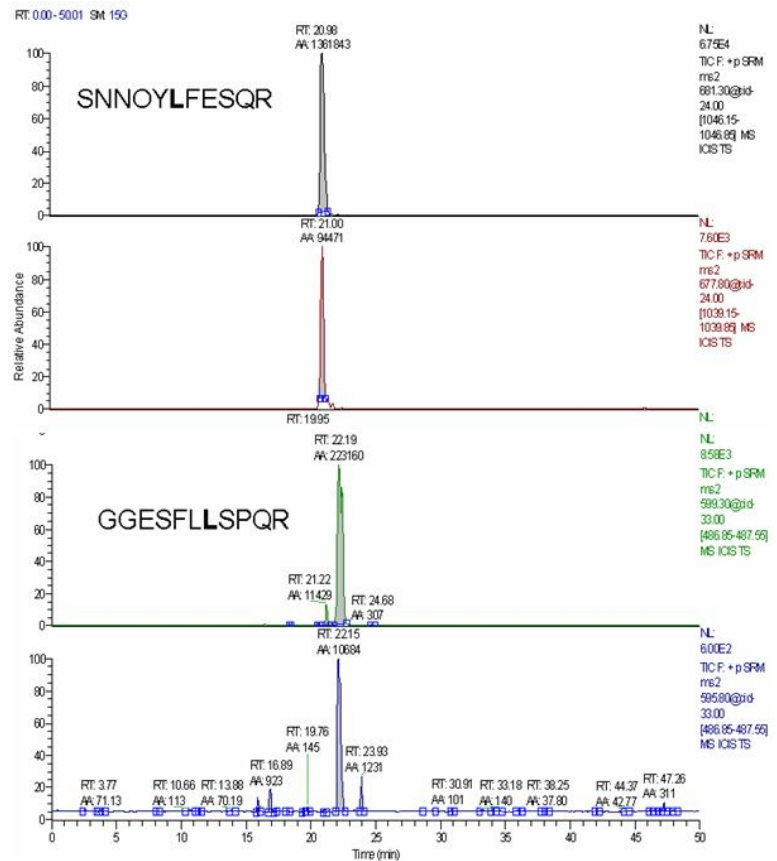
Tabelle 4: Verwendete synthetische Peptide (Le2, Le4, Vi2 und Vi3) und deren berechnete Massen. Zwei ermittelten Produktionen (m/ z) bei einer definierten Kollisionsenergie (V) wurden für die SRM- Methode verwendet.

Protein	Nr.	Peptid-sequenz	Masse (Da)	Vorläuferion [M]2+ [m/z]	Vorläuferion [M]3+ [m/z]	Produkt -Ion/ SRM [m/z]	Kollisionsenergie (V)
TC156005	Le2	AGQNGFEFAVFR	1351.64	676.831	451.55663	1096.537	21
						649.362	27
	Le4	GGESFLLSPQR	1196.60	599.3123	399.87743	487.263	33
						600.347	17
AM932874	Vi2	SNNPYLFESQR	1360.63	681.3234	454.55153	1046.521	24
						666.321	23
	Vi3	NSFNLQKGDVIR	1396.73	699.376	466.58663	559.1	19
						387.272	34

Dazu wurden zunächst die Proteine einer kommerziell erhältlichen Tomatensauce durch eine Ammoniumsulfat- Fällung isoliert und anschließend tryptisch verdaut. Für die absolute Quantifizierung der Proteine Legumin und Vicilin am TSQ wurde für jede Verdünnungsstufe 300 µg des Tomatensaucen- Extraktes (50 ml Tomatensauce) eingesetzt und tryptisch verdaut. Anschließend wurden die verdauten Proben mit unterschiedlichen Konzentrationen der vier Standardpeptide versetzt. Es wurden folgende Konzentrationen der synthetischen Peptide zu der Probe gegeben: 5 pmol, 1.25 pmol und 625 fmol. Jede Messung wurde in zwei technischen Replikaten durchgeführt. Die lyophilisierten Synthetikpeptide wurden zunächst in 0.1 % Ameisensäure/ Wasser Gemisch gelöst (Wienkoop & Weckwerth, 2006b). Als Ausgangskonzentration wurden 10 µM- Lösungen (10 pmol/ µl) gewählt (siehe Anhang, Tab. 11 Seite IX).

In Abbildung 24 sind beispielhaft die Massenspuren der markierten Peptide Vi2 (grau) und Le4 (grün) und jeweils die dazugehörigen Massenspektren der nativen Peptide Vi2 (rot) und Le4 (blau) gezeigt. Die resultierenden Peakflächen [AA] sind im Anhang in Tab. 12 für die jeweiligen gemessenen Konzentrationen der vier Standardpeptide gezeigt.

Abbildung 24: Darstellung zweier Massenspektren der Standardpeptide (Vi2-SNNOQLFESQR und Le4-GGESFLLSPQR, grau und grün) und deren korrespondierenden nativen Peptidspektren (rot und blau).



Zur Konzentrationsbestimmung der Proteine Legumin und Vicilin in der Probe (Tomatensauce), wurde die Peakfläche des unmarkierten Peptides mit der des markierten Peptides bekannter Konzentration verglichen. Die resultierenden Konzentrationen (pmol) der unmarkierten Peptide wurden auf jeweils ein Peptid eines gesuchten Proteins bezogen. Anschließend wurden die Peptidkonzentration von Le2 und Le4 gemittelt, um das Gesamt-Legumin in der Probe zu errechnen. Für das Protein Vicilin wurde die Berechnung analog durchgeführt (siehe Anhang 8.6, Tab. 12).

Im Ergebnis konnten die enthaltenen Proteinmengen in einer kommerziell erhältlichen Tomatensauce für Legumin und Vicilin auf jeweils 40 bis 50 pg/ 50ml Tomatensauce bestimmt werden. Durch dieses Experiment konnte gezeigt werden, dass die IgE-reaktiven Proteine Legumin und Vicilin in kommerziell erhältlichen Tomatensaucen enthalten sind, trotz der Vermutung, dass diese Proteine durch Isolierung der Tomatensamen vor der Produktion entfernt werden. Somit ist die physiologische Relevanz für entsprechend gefährdete Patienten gezeigt.

5.8 Computergestützte Strukturanalyse putativer Tomatenallergene

Die Allergenizität ist keine vollständig vorhersagbare inhärente Eigenschaft eines Proteins, da sie auch von der genetischen Konstitution des jeweiligen Individuums bestimmt wird. Valide Testverfahren, mit denen sich die Allergenität eines Proteins bei oraler Aufnahme voraussagen lässt, sind derzeit nicht verfügbar. Derzeit wird eine Kombination unterschiedlicher Untersuchungsverfahren zur Gewinnung von Informationen genutzt, die in ihrer Gesamtheit eine Abschätzung des allergenen Potenzials ermöglichen.

Die Bewertung des allergenen Potenzials beruht im Wesentlichen auf Sequenzvergleichen der Proteine mit bekannten Allergenen. Dazu ist zunächst eine Untersuchung auf Sequenzebene der Proteine durchzuführen. Im Anschluss dazu ist die strukturelle Ähnlichkeit zu bekannten Allergenen zu prüfen. In bioinformatische Analysen wird die Aminosäuresequenz des fraglichen Proteins abschnittsweise mit den in Datenbanken gespeicherten Sequenzen bekannter Allergene verglichen. Im Anschluss daran können Übereinstimmungen oder Ähnlichkeiten mit linear angeordneten IgE- Bindungseptopen aufzeigen werden (Wal, 1999).

5.8.1 Computergestützte FARRP- Sequenzanalysen

Im Folgenden soll gezeigt werden, inwieweit die in dieser Arbeit identifizierten IgE-reaktiven Tomatenproteine Legumin und Vicilin in ihrer Struktur mit bereits bekannten Allergenen übereinstimmen. Im Weiteren soll abgeschätzt werden in welchen Regionen der Legumin und Vicilinproteine Epitope zu vermuten sind, aufgrund von Strukturvergleichen von bekannten Epitopen bestimmter Allergene.

Zunächst wurde die Methode der Sequenzalignierung zur Identifizierung von homologen Allergenen genutzt. Zur Sequenzalignierung und Vorbereitung von Sequenzdaten für die phylogenetische Analyse wurde die FARRP - Datenbank (Food Allergy Research and Resource Program) verwendet (<http://www.allergenonline.com/>). Diese Allergen Datenbank zur Allergen- Suche stellt homologe Sequenzbereiche dar (Pearson & Lipman, 1988).

In Tabelle 5 sind die Suchergebnisse aus dieser Datenbank aufgeführt. Die höchste Identität zum Legumin Tomatenprotein zeigte das Ber e 2- Allergen (gi30313867) aus der Paranuss (*Bertholletia excelsa*) mit einer 45.5 % igen Sequenzübereinstimmung (Alignierung siehe, Abb. 7). Eine ähnliche Sequenzidentität (43 %) weist das Ana o 2-Allergen (gi25991543) der Cashewnuss (*Anacardium occidentale*) zum Tomatenlegumin auf. Das Fag e 1 - Allergen (gi2317674) aus Buchweizen (*Fagopyrum esculentum*) weist eine 38.5 % ige Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz auf. Das Fag e 1- Allergen (gi2317674) besitzt laut Allergome- Datenbank (<http://www.allergome.org/>) ein MG von 65 kDa. In einer Peptid- Epitop- Studie des Fag e 1- Allergens von Yoshioka et al. wird lediglich die β - Untereinheit des Buchweizen- Allergens (gi29839419) untersucht (Yoshioka et al., 2004). Aus diesem Grund wurde ebenfalls eine Homologieuntersuchungen zwischen der β - Untereinheit des Buchweizen- Legumins und der β - Untereinheit des hier identifizierten Legumins durchgeführt. Dabei konnte eine 49% ige Identität in der Sequenz festgestellt werden (Alignierung siehe Anhang, Abb. 6).

Homologe Allergene zum Vicilinprotein aus der Tomate stellt das Walnuss- Vicilin (*Juglans regia*, gi6580762) dar. Dieses weist eine 46 % ige Identität zur Primärstruktur des AM932874- Tomatenvicilins auf (Alignierung siehe Anhang, Abb. 8 Seite XIV). Weiterhin ist das Ara h 1- Allergen (gi1168390) der Erdnuss (*Arachis hypogaea*) zu nennen. Dieses besitzt eine 30.5 % ige Sequenzübereinstimmung zum Tomatenvicilin laut FARRP- Datenbank- Suche (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Homologieberechnung zwischen den Tomatenproteinen Legumin und Vicilin und bekannten Legumin- und Vicilin- Allergene anderer Spezies

Protein	Allergen	Organismus	Identität (%)	Ähnlichkeit/ Homologie (%)
Legumin (TC156005)	Ber e 2 (gi30313867)	Paranuss	45.5	76.5
	Ana o 2 (gi25991543)	Cashewnuss	43	77
	Fag e 1 (gi2317674)	Buchweizen	38	74
Legumin β - Einheit	Fag e 1 (β - Einheit) (gi29839419)	Buchweizen	49	n.b.
Vicilin (AM932874)	Jug r 2 (gi6580762)	Walnuss	46	81
	Ara h 1 (gi1168390)	Erdnuss	30.5	66.5

Die WHO und die Welternährungsorganisation (FAO) haben Regeln erstellt (<http://www.who.int/foodsafety/en/>), nach denen ein Protein ein allergisches Potenzial besitzen kann. Als Richtwert gibt die WHO eine Sequenzhomologie von 35 % an. Weist ein putatives Allergen diese Sequenzhomologie zu einem identifizierten Allergen auf, ist dies ein erstes Indiz dafür, dass es sich um Allergen handeln kann (WHO, 2001a). Neben der Aminosäuresequenz ist der Vergleich der Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins und die Lokalisierung von homologen Sequenzen im Protein ist wichtig. Dazu wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit eine Strukturmodellierung der Proteine Legumin und Vicilin aus der Tomate durchgeführt.

5.8.2 Strukturmodellierung

Da die Kristallstrukturen der Tomatenproteine Legumin und Vicilin bisher noch nicht bestimmt wurden wird hier auf die Methode der computergestützten Proteinmodellierung zurückgegriffen.

Um neue Strukturen in einem Proteinmodell zu erstellen, bietet sich die Nutzung bekannter Proteininformation an. Dabei wird das bekannte Protein als "Modellervorlage" verwendet. Bisher gibt es eine Reihe von bekannten

Kristallstrukturen der Proteinklasse Legumin und Vicilin. Allerdings wird in diesem Versuch auf Modellervorlagen zurückgegriffen, die eine möglichst hohe Sequenzhomologie zu den Tomatenproteinen aufweisen.

Proteine verfügen über wiederkehrende Struktur motive, wie α -Helices und β -Faltblätter. Es wird vermutet, dass es lediglich 1000 bis 10.000 verschiedene Proteinstrukturfamilien gibt (Jones et al., 1998). Ursprünglich wurde dieser Ansatz genutzt, um zwei verwandte Aminosäuresequenzen zu vergleichen (Homologie-Modellierung).

Das Programm HHpred ist in der Lage ähnliche Strukturen zur Proteinmodellierung zu erzeugen. HHpred ist ein schneller Server zur Erfassung von Proteinhomologien und zur Strukturvorhersage, basierend auf dem Verborgenen Markov-Modell (VMM, engl. Hidden Markov Model, HMM). Das VMM ist ein stochastisches Modell, das sich durch zwei Zufallsprozesse beschreiben lässt (Merkl, 2002). Dabei greift das Programm auf die Strukturinformationen von Proteinen zurück, die auf pdb-Datenbank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) gespeichert sind.

Obgleich der Ablauf einer allergischen Reaktion mittlerweile weitgehend bekannt ist, bleibt noch immer offen, welche Eigenschaften eine Substanz allergen machen. Eine entscheidende Rolle kommt dabei den Bindungsstellen für spezifische IgE-Antikörper zu. Obwohl IgE-Epitope häufig konformationsabhängig sind und an der Oberfläche der Moleküle liegen, wurden bisher vor allem lineare Epitope untersucht.

Im Folgenden soll durch theoretisches Strukturmodellieren und putative Epitopvorhersage im Strukturabgleich die Relevanz als Allergen der Proteine Legumin und Vicilin aus der Tomate gezeigt werden.

5.8.2.1 Legumin

Um weiterreichende Kenntnisse in Hinblick auf die Tertiärstruktur und somit auf putative Epitope zu erhalten, wurde ein dreidimensionales Modell des Tomatenproteins Legumin (TC156005) und des dazugehörigen homologen Ana o 2-Allergens erstellt. Von beiden Proteinen sind bisher keine Kristallstrukturen bekannt. Aus diesem Grund wurde das Programm HHpred verwendet (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>) (Soding, Biegert & Lupas, 2005), um eine

Modellierung anhand ähnlicher Kristallstrukturen durchführen zu können. HHpred konnte für die jeweiligen Proteine folgende homologe Strukturvorlagen (pdb- Bezeichnungen) finden: 1fxz, 2evx, 2d5f, 2cav und 2ea7 für TC156005 und 1fxz, 2evx, 2d5f, 2cav und 1uij für Ana o 2 (jeweils die A- Kette). Basierend auf den fünf Strukturen, die am besten alignierten wurde eine pdb- Datei für TC156005 und Ana o 2 generiert. Dies geschah unter Verwendung des Programms MODELLER (Marti-Renom *et al.*, 2000; Sanchez & Sali, 1997). Das Allergen Ana o 2 wurde für diesen Strukturvergleich herangezogen, da von diesem Allergen bereits Epitope bekannt sind. Laut FAO/ WHO geben neben Sequenzähnlichkeiten zu bekannten Allergenen auch Strukturübereinstimmung einen Hinweis auf das Vorhandensein eines allergenen Potenzials (WHO, 2001a, b).

Das Allergen Ana o 2 weist in seiner Primärstruktur eine 77 %ige Ähnlichkeit zum Tomaten Legumin auf. In einer Ana o 2- Epitop Studie wurden sieben Epitope des Ana o 2- Allergens mittels SPOT- synthetisierter Membran identifiziert (Wang *et al.*, 2003a). In dieser Studie wurden 32 Patientenseren auf 58 überlappende synthetische Peptide des Ana o 2- Allergens untersucht (Wang *et al.*, 2003a). Die Aminosäurebereiche (ASB) der Epitope des Ana o 2- Allergens sind in Tabelle 6 gezeigt.

Tabelle 6: Bekannte Epitopsequenzen (3, 6, 11, 13, 15 und 22) des Ana o 2 Cashewnussallergen aus der Wang Studie und die putativen homologen Proteinbereiche vom Tomatenlegumin (TC156005), die durch Strukturalignierung identifiziert wurden

Ana o 2 Epitop Nr. (Wang <i>et al.</i> , 2003a)	Ana o 2 Allergen Epitop ASB (Wang <i>et al.</i> , 2003a)	AS- Sequenz (Wang <i>et al.</i> , 2003a)	TC156005 Tomaten Legumin (putative homologe ASB)	AS- Sequenz	Epitop Farb- mark- ierung
3	24 - 29	SRQEWQQQDECQIDR	49 – 54	RSIPLTQAQQCRLQR	Violet
6	105 - 119	YQAPQQGRQQGQSGR	130 – 150	FQSFQAGRMAGEERGERRG	Rot
11	185 - 199	VFQQQQQHQSRRNL	215 – 233	TSGRQKQSTQKFQNI	Orange
13	233 - 247	KVKDDWELRVIRPSRS	268 - 282	NVREGMSMIRADEE	Gelb
14	241 - 255	VIRPSRSQSSESGES	275 – 287	MIRADEEEEEFE	Grün
15	257 - 271	EESEDEKRRWGQRDN	283 – 304	GRSQRGQRWWAEVTGN	Pink
22	425 - 439	FQISREDARKIKFNN	456 - 470	FAKMKQERLVFRSKCNE	Cyan

Das Ana o 2- Allergen weist eine Gesamtlänge von 450 AS auf. Das Tomaten Legumin verfügt über 562 AS. Um nach den homologen ASB im Tomatenlegumin zu suchen, wurde zunächst ein Sequenzalignment durchgeführt. Im Weiteren konnten die im Sequenzalignment identifizierten homologen ASB durch ein Strukturalignment (siehe Abbildung 25:A) bestätigt oder korrigiert werden.

Die erzeugten Strukturen für TC156005 und Ana o 2 wurden mittels Ramachandran Plots (Procheck (<http://www.biochem.ucl.ac.uk/~roman/procheck/procheck.html>) überprüft (siehe Abbildung 25:B). Ein Ramachandran-Plot stellt die Auftragung der Winkel Φ und Ψ für eine Proteinstruktur gegeneinander dar und zeigt die erlaubten Konformationen für die Aminosäuren in einer Peptidkette. Die Konformationen können vollständig über die Werte der beiden Rotationswinkel Φ und Ψ im Peptidrückgrat beschrieben werden. Die Verteilung der Aminosäuren und der Grad der erlaubten Winkel- Konformationen jeder AS sind in Tabelle 7 gezeigt.

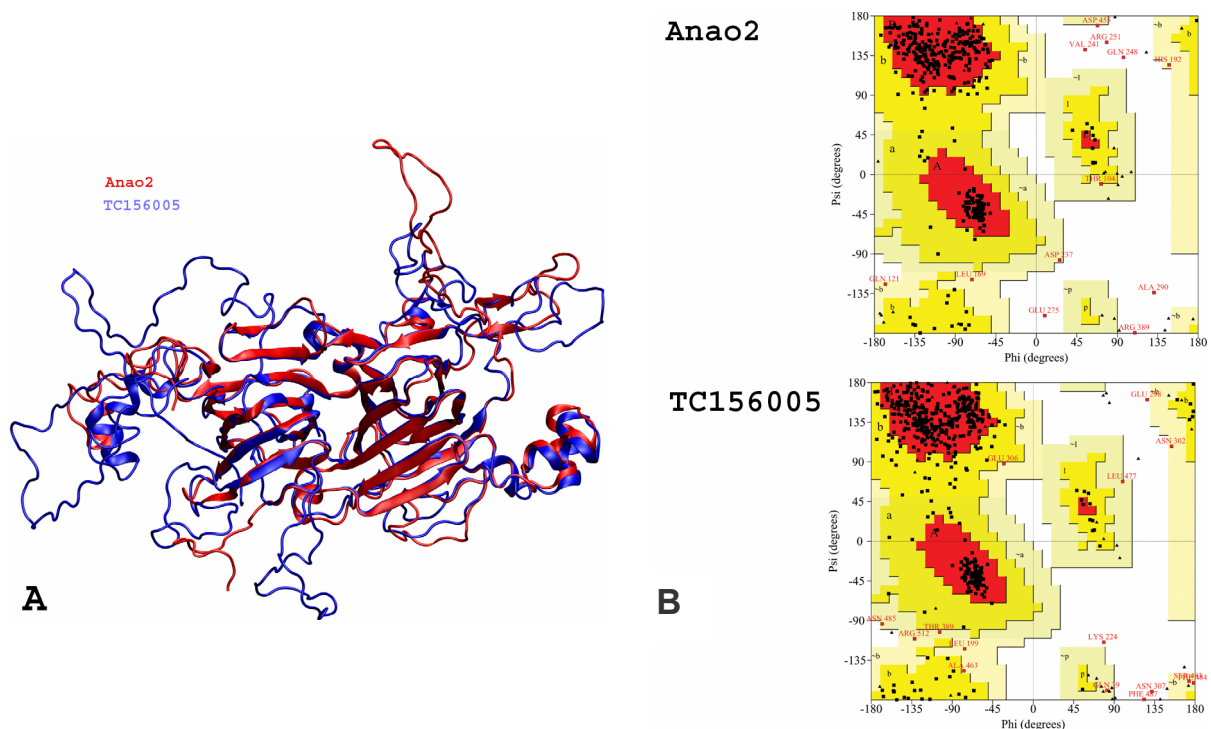


Abbildung 25: A) Strukturalignierung (RMSD 1,14 Å) der Leguminproteine Ana o 2 (rot) und dem Tomatenlegumin (TC156005, blau), B) Ramachandran Plot der Modellstrukturen der Proteine Ana o 2 und TC156005

Tabelle 7: Verteilung der Aminosäuren im Ramachandran Plot der Proteine TC156005 und Ana o 2

	TC156005	Ana o 2
Aminosäurereste in favorisierten Bereichen [A, B, L, rot]	394	341
Aminosäurereste in erlaubten Bereichen [a, b, l, p, ~a, ~b, ~l, ~p, gelb]	101	54
Aminosäurereste in nicht erlaubten Bereichen	4	6
Gesamtanzahl der Aminosäurereste	562	457

In Abbildung 26 ist am Beispiel von Epitop 13 des Ana o 2 Allergens die Zuordnung des strukturell homologen ASB des Tomatenlegumins (L13) im Strukturvergleich gezeigt. Die analogen ASB des Tomatenlegumins zum Ana o 2-Allergen sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Um die tatsächliche IgE-Reaktivität eines Epitops zu überprüfen ist jedoch eine Testung mit Allergikerserum notwendig. In diesem Abschnitt wird sich lediglich mit der putativen Verteilung von Epitopen auf der Oberfläche des Tomatenproteins Legumin beschäftigt.

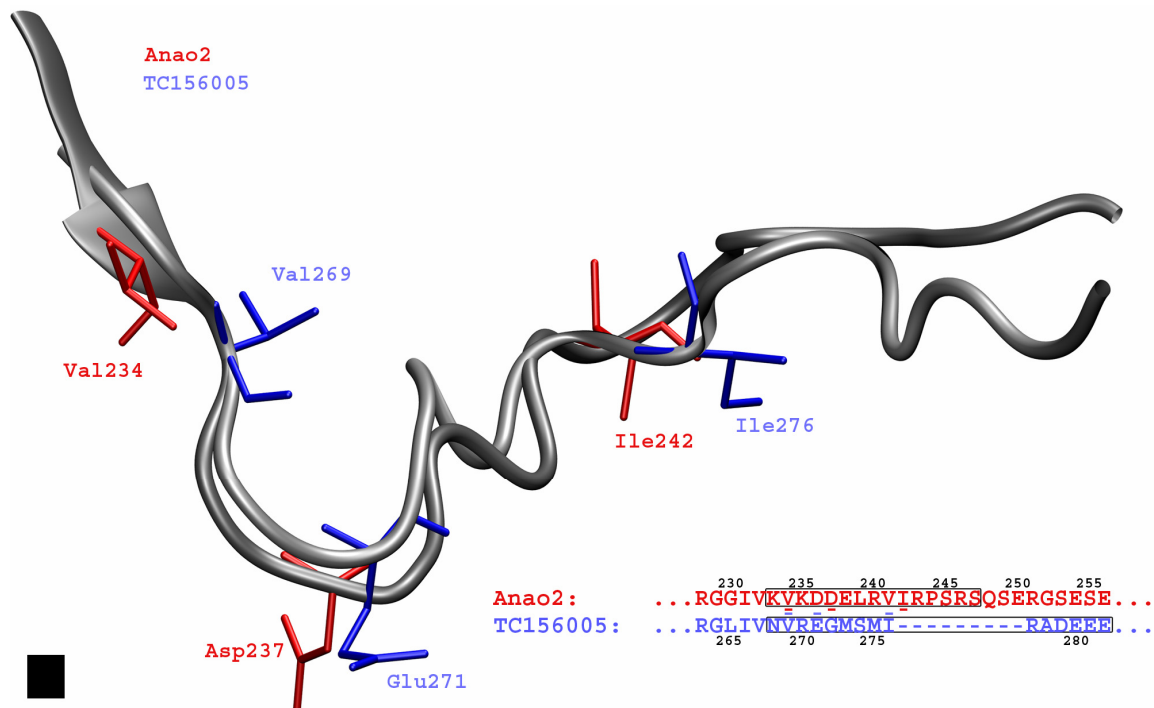


Abbildung 26: Bestimmung des homologen Bereichs an der Tomatenleguminstruktur TC156005 (blau) am Beispiel des Ana o 2 (rot) Epitops Nummer 13

In Abbildung 27 sind beide dreidimensionalen Proteinstrukturen mit den bekannten Epitopen des Ana o 2- Allergens und den homologen Bereichen im TC156005- Legumin farblich gekennzeichnet. Mit der Methode der Strukturmodellierung konnten Vergleiche bezüglich der Ähnlichkeit und somit auch Vermutungen in Hinsicht auf putative Epitopbereiche des Tomaten- Legumins aufgestellt werden. Wie man in Abbildung 27 erkennen kann, weisen beide Proteine eine signifikante Strukturhomologie und eine ähnliche Verteilung der gekennzeichneten Epitope zu einander auf.

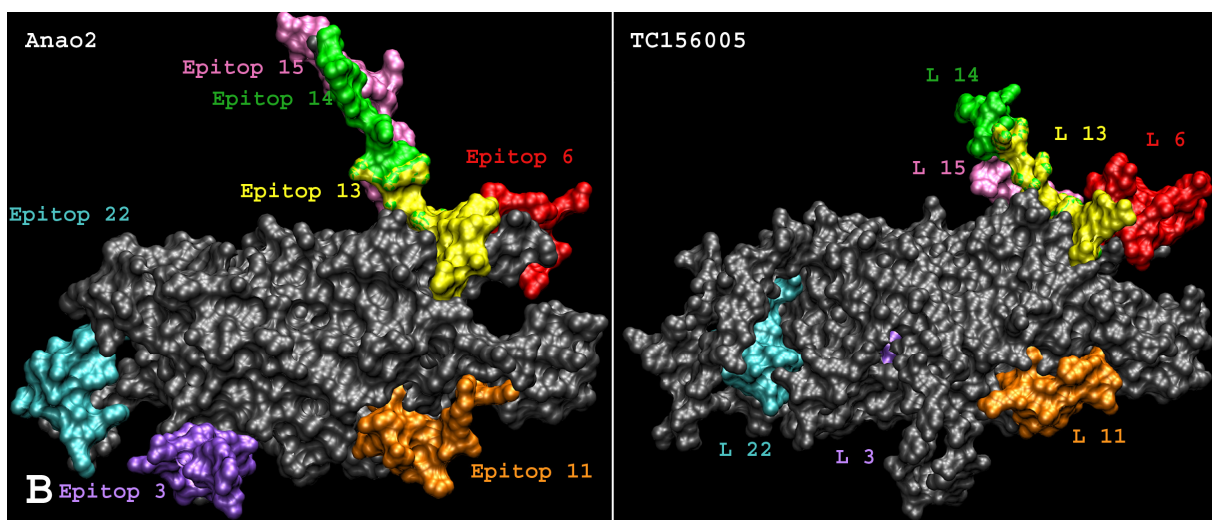


Abbildung 27: dreidimensionale Struktur der Leguminproteinen Ana o 2 und TC156005 mit 7 Epitop-Bereichen in verschiedenen Aminosäurebereichen

5.8.2.2 Vicilin

Um Hinweise auf Epitope des putativen Tomaten Vicilin Allergens zu erhalten, wurden analog zum Tomaten Legumin, pdb-Dateien aus der AS-Sequenz des AM93874- Proteins (Tomatenvicilin) und des Ara h 1- Allergens (Erdnussvicilin) generiert. Bisher wurden Epitopstudien an den Vicilin- Allergenen Ara h 1, Jug r 2 und Cor a 11 durchgeführt (Burks et al., 1997; Shin et al., 1998). Wie im vorhergehenden Kapitel gezeigt, weist das Tomaten- Vicilin eine 30 % ige Aminosäureübereinstimmung zum Ara h 1 Allergen auf. Um eine Modellierung anhand von Kristallstrukturen mit größtmöglicher Ähnlichkeit durchzuführen, wurde das Programm HHpred verwendet (Soding et al., 2005).

HHpred konnte für die jeweiligen Proteine folgende Strukturvorlagen (pdb- Bezeichnungen) vorschlagen: 2ea7, 1uij, 2cav, 2phl und 2evx für AM932874 und 2ea7, 1uij, 2cav, 2phl und 1fxz für Ara h 1 (jeweils die A- Kette). Basierend auf diesen fünf homologen dreidimensionalen Strukturen wurden, unter Verwendung des Programms MODELLER, pdb- Dateien für die Proteine AM932874 und Ara h 1 generiert (Marti-Renom *et al.*, 2000; Sanchez *et al.*, 1997). Aufgrund unzureichender Kristallstrukturvorlagen konnte in beiden Vicilin- Strukturen ein Loopbereich nicht modelliert werden. Aus diesem Grund wurde die Funktion des „Loop- refinement“ im MODELLER- Programm zur verbesserten Modellierung dieses Proteinbereiches verwendet. Im Tomatenvicilin befindet sich dieser Loop in einem ASB von 15 – 150, im Ara h 1- Allergen in einem ASB von 39 – 162. In Abbildung 28:A sind beide generierten Proteinstrukturen in einem Strukturalignment gezeigt.

Die erzeugten Strukturen für AM932874 und Ara h 1 wurden mittels Ramachandran Plots (Procheck, <http://www.biochem.ucl.ac.uk/~roman/procheck/procheck.html>, siehe Abbildung 28:B). Die Verteilung der Aminosäuren und der Grad der erlaubten Winkel- Konformationen sind in Tabelle 8 gezeigt.

In einer Ara h 1- Epitop Studie wurden mittels SPOT- Membran 22 Epitope identifiziert. Dabei wurden 15 Patientenseren, die auf Erdnuss sensibilisiert sind, auf synthetische Peptide des Ara h 1- Allergens untersucht (Shin *et al.*, 1998).

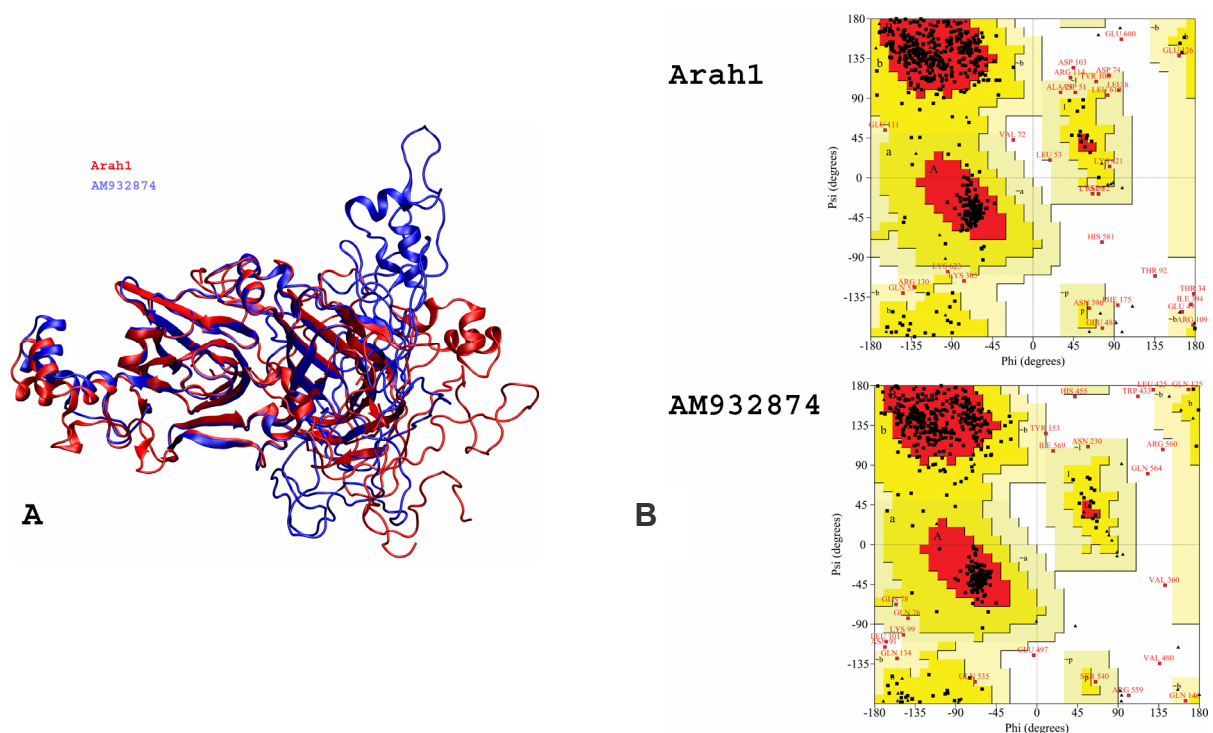


Abbildung 28: A) Strukturvergleich (RMSD 1,01 Å) beider Vicilinproteine, B) Ramachandran Plot der Modellstrukturen der Proteine Ara h 1 und AM932874

Tabelle 8: Verteilung der Aminosäuren im Ramachandran Plot der Proteine AM932874 und Ara h 1

	AM932874	Ara h 1
Aminosäurereste in favorisierten Bereichen [A, B, L, rot]	401	432
Aminosäurereste in erlaubten Bereichen [a, b, l, p, ~a, ~b, ~l, ~p, gelb]	92	100
Aminosäurereste in nicht erlaubten Bereichen	12	9
Gesamtanzahl der Aminosäurereste	574	626

In dieser Arbeit wurden nicht alle 22 linearen Epitope zum Strukturvergleich zwischen den beiden Vicilinproteinen herangezogen. Nach Prüfung der Lokalisation aller 22 Epitope des Erdnussallergens (Ara h 1) konnte festgestellt werden, dass nicht alle Epitope auf der Oberfläche des Proteins, sondern einige auch zum Teil im Kernbereich des Proteins exponiert sind (wie z.B. Epitop 15, 16 und 18). Aufgrund dessen wurden zunächst die Epitope, die auf der Oberfläche exponiert sind für einen Strukturvergleich herangezogen. Weiterhin konnte zu einigen Epitopen des Ara h 1-Allergens kein Strukturvergleich aufgestellt werden, da diese in

nicht- alignierten Loopbereichen vorlagen (wie z.B. Epitop 1, 2, 5, 6, 8, 9, 14, 17, 20, 21 und 23).

Die meisten Proteine sind aus Kombinationen von regelmäßigen Sekundärstrukturelementen, wie z.B. α - Helices und β - Faltblätter, aufgebaut. Diese sind durch Loopregionen irregulärer Länge und variabler Form verbunden. Viele dieser Loops befinden sich an der Proteinoberfläche. Die identifizierten Epitope des Ara h 1- Allergens und deren Aminosäurebereiche (ASB), die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 9 gezeigt (Burks et al., 1997) (Shin et al., 1998).

Die Epitope 19 und 22 des Ara h 1- Allergens zeigten eine Alignierung mit der Vicilinstruktur (Tomate). Da diese auf der gegenüberliegenden Seite des Proteins lokalisiert sind, sind diese in Abbildung 30 allerdings nicht sichtbar.

Um zu verdeutlichen, wie die homologen AS- Sequenzen im AM932874- Protein bestimmt wurden, ist in Abbildung 29 beispielhaft ein Ausschnitt des Strukturalignments zwischen Epitop 12 des Ara h 1- Allergens und dem Tomatenvicilin (V12) dargestellt. Die bestimmten homologen ASB des Vicilinproteins aus der Tomate sind in Tabelle 9 gezeigt.

Tabelle 9: Bekannte Epitope (3, 4, 7, 10, 11, 12 und 13) des Ara h 1 Erdnußallergens aus der Burks und Shin Studie und die putativen homologen Proteinbereiche vom Tomatenvicilins (AM932874), die durch Strukturalignierung identifiziert wurden

Ara h 1 Epitop Nr. (Burks <i>et al.</i> , 1997; Shin <i>et al.</i> , 1998)	AS- Sequenz	Ara h 1 Allergen Epitop ASB	Putative Epitop Nr. AM93287	AS- Sequenz der (putativen homologen ASB)	AM932874 Tomaten Vicilin homologer ASB	Epitop Farb- mark- ierung
3	65 - 74	LEYDPRLUYD	V3	38 - 47	YQDPQEKLRE	Violet
4	89 - 98	GERTRGRQPG	V4	54 - 62	RQQPGQQKQ	Rot
7	123 -132	REEREEDWRQP	V7	78 - 93	QQQHGGGETGEDDLGNR	Pink
10	294 – 303	TPGQFEDFFP	V10	271 - 281	NAPGNLQEYFS	Grün
11	311 – 320	SYLQEFSRNT	V11	288 - 312	ESFYRAFSSDI	Orange
12	325 – 334	FNAEFNEIRR	V12	302 - 312	AFNNPRDKLER	Cyan
13	344 – 353	EQEERGQRRW	V13	314 - 323	FGQHKEGIII	Gelb

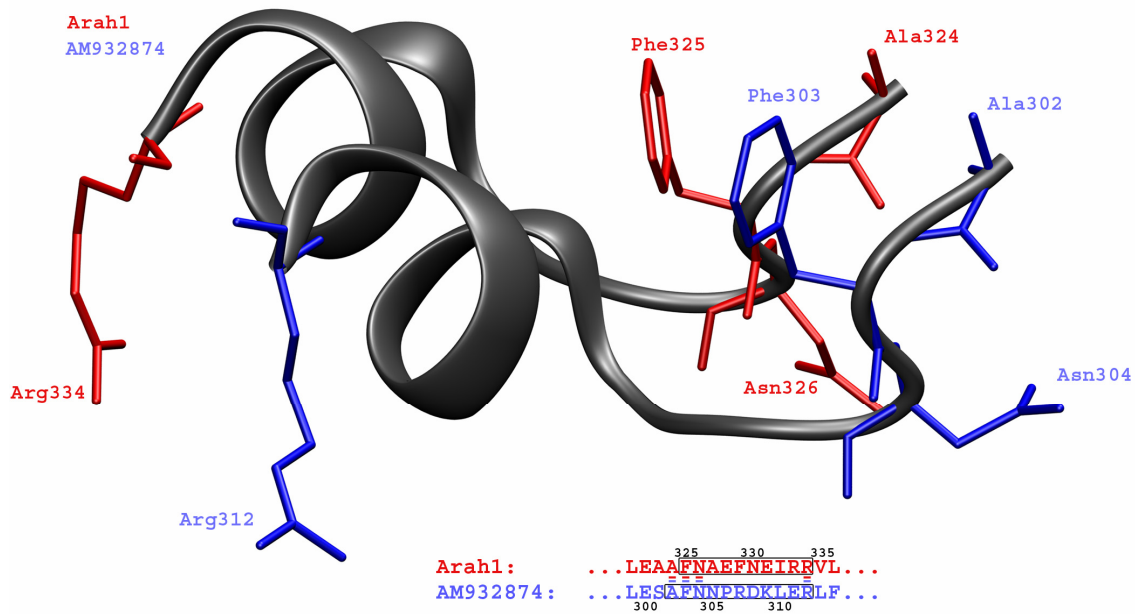


Abbildung 29: Bestimmung des homologen Bereichs an der Tomatenleguminstruktur AM932874 (blau) am Beispiel des Erdnuß Ara h 1 Epitops Nummer 12 (rot)

In Abbildung 30 sind beide dreidimensionalen Proteinstrukturen mit den bekannten Epitopen des Ara h 1- Allergens und den homologen Bereichen im AM932874- Vicilin farblich gekennzeichnet. Mit diesem Versuch konnten Vergleiche bezüglich der Strukturähnlichkeit und somit Vermutungen auf putative epitope Bereiche des Tomaten- Legumins aufgestellt werden. Um die putativen Epitope der Tomatenproteine Legumin und Vicilin weiter zu untersuchen wurde eine Epitop- Kartierung durchgeführt, auf die in Kapitel 5.9 eingegangen wird.

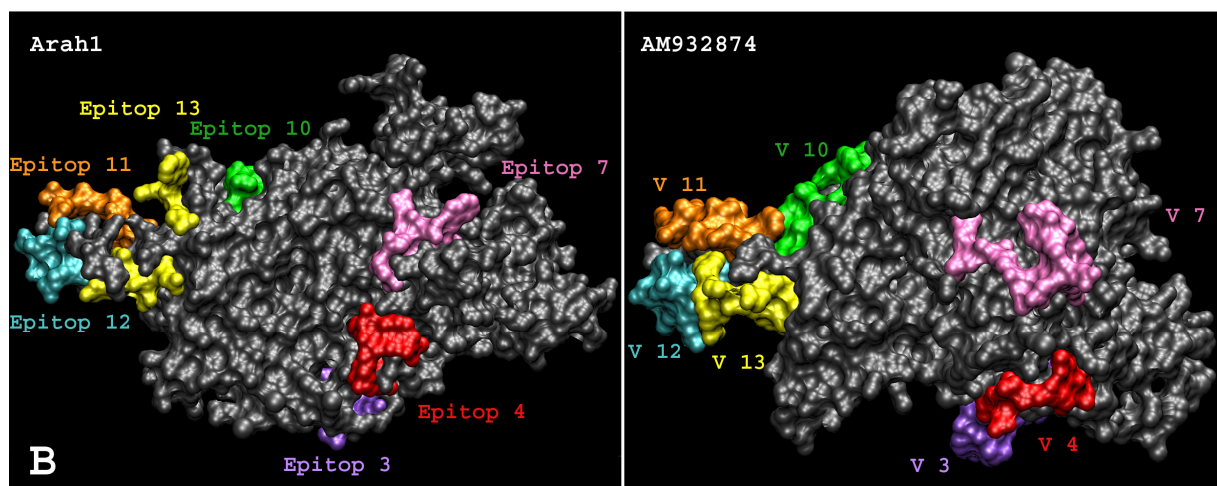


Abbildung 30: Dreidimensionale Struktur der Vicilinproteine Ara h 1 (Erdnuß) und AM932874 (Tomate) mit deren 7 epitopen Bereichen (3, 4, 7, 10, 11, 12 und 13)

Um die tatsächliche IgE- Reaktivität eines Epitops zu überprüfen ist jedoch eine Testung mit Allergikerserum notwendig. In diesem Abschnitt wird sich lediglich mit der putativen Verteilung von Epitopen auf der Oberfläche des Tomatenproteins Vicilin beschäftigt. Um dazu weitere Anhaltspunkte zu erhalten wird in der Allergenforschung auf die Methode der Peptid- Epitop- Kartierung zurückgegriffen. Mit dieser Methode ist es möglich aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten und vermutete Epitope, die durch Strukturabgleich zu bereits bekannten Allergenen zu bestätigen bzw. zu korrigieren.

5.9 Peptid- Epitop- Kartierung

Für die Untersuchung des putativen Tomaten Legumin- Allergens, bestehend aus 562 AS, wurde eine SPOT- Membran mit insgesamt 184 überlappenden Peptiden verwendet. Für das 574 AS große putative Vicilin- Allergen wurden 188 Peptide auf einer Peptidmembran via SPOT- Synthese hergestellt. Im Anhang 0 in Abb. 3 sind alle überlappenden SPOT- Peptidsequenzen abgebildet.

Für diesen Versuch wurden die Membranen zunächst mit einem Serumgemisch aus acht Seren (Nr. 1-7, 9, siehe Anhang, Tab. 5) in einer Verdünnung von 1: 20 inkubiert und das gebundene IgE durch einen anti- human IgE Antikörper (POD markiert) (1: 1000) detektiert. In Abbildung 31 sind die entwickelten Membranen gezeigt.

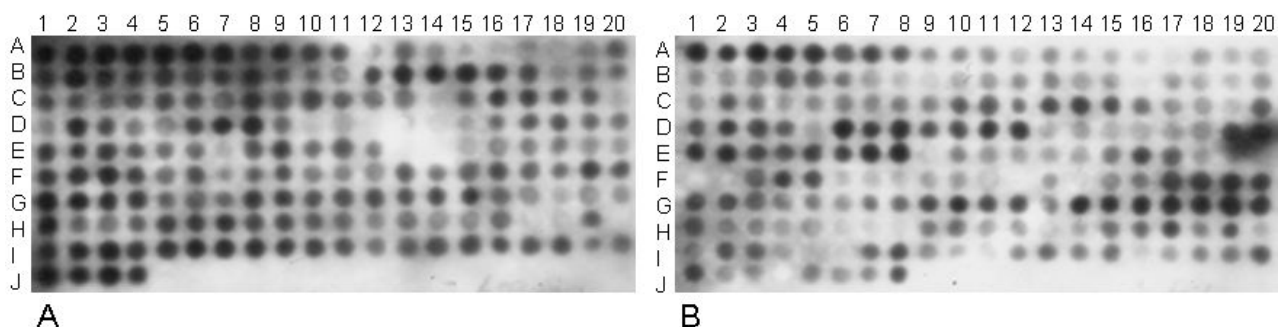


Abbildung 31: Epitop- Kartierung: Charakterisierung der Immunreaktion eines Patientenserum- Gemisch gegen die Proteine Legumin (A, TC156005) und Vicilin (B, AM932874).

Jeder Punkt entspricht ca. 5 pmol synthetischem Peptid mit einer Länge von 13 AS und einer überlappenden AS-Sequenz von jeweils 10 AS. Aufgrund der hohen Hintergrunddetektion, hervorgerufen durch Chemolumineszenz wurde eine reverse Darstellungsweise für die SPOT-Membranen gewählt. Demzufolge entspricht jedes helle Signal einer IgE-Detektion und ein dunkler Punkt einer Nicht-Detektion.

Die Membranen wurden folgendermaßen ausgewertet. Jedem nicht detektierten Punkt, wie z.B. in Membran A die Punkte A1 – A7, wurden mit (-/-) bewertet. Eindeutig detektierte Signale wurden mit (+/+) bewertet. Punkte die nicht eindeutig zugeordnet werden konnten, wurde mit (+/-) beurteilt. Um Anhaltspunkte hinsichtlich der Richtigkeit der putativen Epitope der Tomatenproteine zu erhalten, wurden die homologen Bereiche aus einem Sequenzalignment zum jeweiligen Allergen Ana o 2 (für TC156005) und Ara h 2 (für AM932874) herangezogen (Abbildung 32). Wie bereits im vorhergehenden Kapitel gezeigt, sind von diesen Allergenen die Epitope bekannt. Die homologen putativen Epitope der Tomatenproteine, zu den jeweiligen Allergenen Ana o 2 (Legumin) und Ara h 1 (Vicilin) Allergenen sind im Anhang Abb. 10 und Abb. 11 aufgeführt.

Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass Peptid-Epitope durch das Allergikerserum erkannt werden. Im Fall des Tomatenlegumins sind leichte Übereinstimmungen in der Epitoperkennung im Bereich von Epitop 3, 6, 11, 13, 14, 15 und 22 zu erkennen (siehe Abb. 10). Jedoch sind ebenso stark Peptiddetektionen außerhalb der vermuteten Epitope detektiert worden. Für das Tomatenprotein Vicilin kann kaum eine Aussage getroffen werden, da hier im SPOT-Testdoppelt so viele Peptide wie angenommene Epitopbereiche detektiert wurden. Eine signifikante Aussage ist somit nicht möglich, da manche Peptide außerhalb der erwarteten ASB liegen.

Um diese Ergebnisse zu verifizieren müsste dieser Test ein weiteres Mal durchgeführt werden. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch aus Zeitgründen nicht noch einmal wiederholt werden.

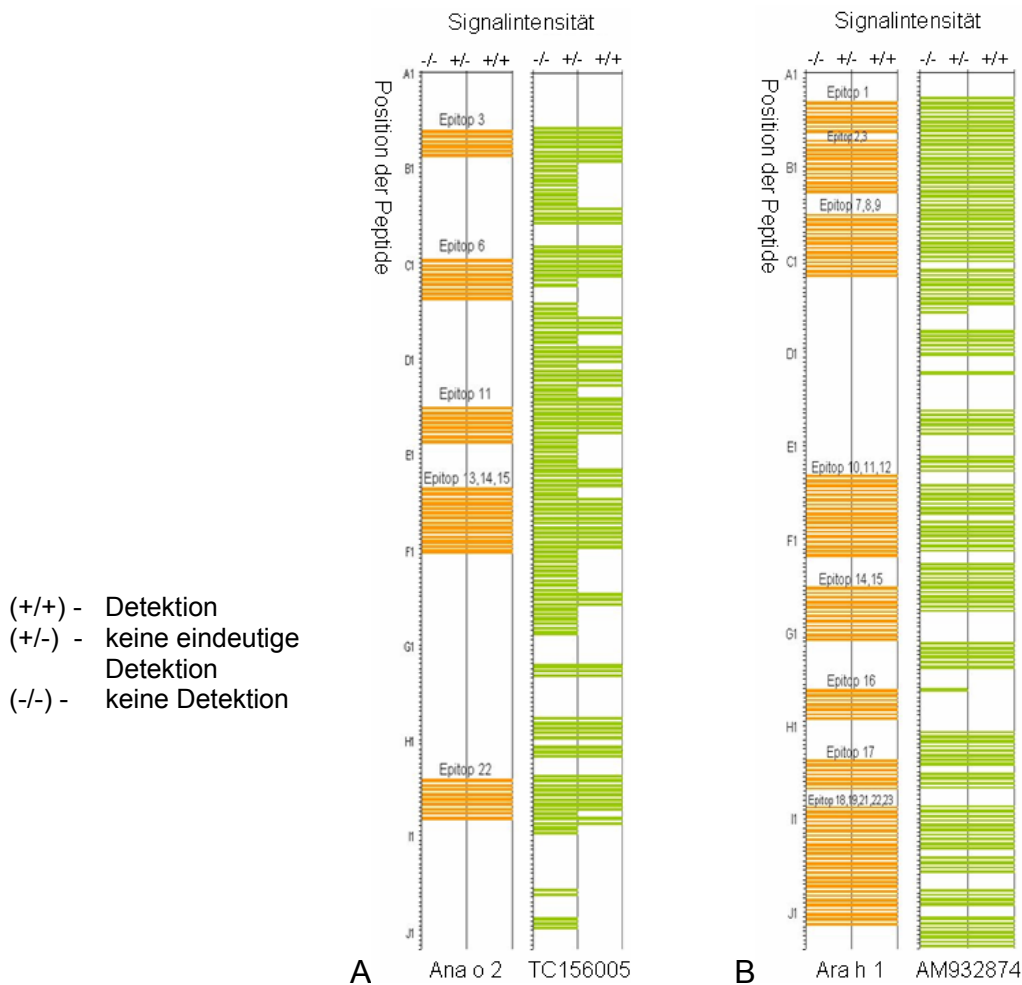


Abbildung 32: Graphische Darstellung der detektierten Peptid auf einer SPOT- Membran (grün) und die dazugehörigen erwarteten epitopen Bereiche (orange), A) Detektierte Peptide der Tomatenleguminsequenz (TC156005, grün) und die Epitope des Ana o 2 Allergens (orange) dazu im Vergleich, B) Detektierte Peptide der Tomatenvicilinsequenz (AM932874, grün) und die Epitope des Ara h 1 Allergens (orange) dazu im Vergleich

6 Proteinidentifizierung in den fünf Bestandteilen der Tomate

Die Allergene Lyc e 1, 2 und 3 sind in der Tomatenfrucht bereits identifiziert worden. Diese wurden von der IUIS als Allergene anerkannt und sind in der Allergome- Datenbank (<http://www.allergome.org/>) mit weiteren Informationen aufgeführt.

Um die Allergenizität der Tomate zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit zunächst einzelne Proteinextrakte der Tomatenfrucht (Schale, Fruchtfleisch, Plazenta, Pulpa und Samen) untersucht. Dies geschah unter Verwendung von achtzehn Tomaten- sensibilisierte Patientenserum und einem Nicht- Allergikerserum in einem Dot Blot (siehe Abbildung 15, Seite 36). Anschließend wurde jeder Tomatenbestandteil auf das Vorhandensein bereits identifizierter Allergene mittels LC - MS/ MS untersucht.

Dabei konnte das Lyc e 2 Allergen, die β - Fruktofuranosidase (50 kDa, gi18542113) (Westphal et al., 2003), in der Tomatenpulpa eindeutig mittels LC- MS/MS nachgewiesen werden. Dieses Allergen konnte weiterhin ausschließlich in dem Tomatenbestandteil - Pulpa - identifiziert werden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Detektionssignale im Dot Blot vermutlich durch dieses Minorallergen hervorgerufen wurden, da keine weiteren bekannten Allergene der Tomate identifiziert wurden. Ob weitere Ig- reaktive Proteine für das Detektionssignal im Dot- Blot verantwortlich sind konnte durch dieses Experiment nicht geklärt werden. Jedoch wurden weitere Proteine im Pulpaproteinextrakt identifiziert, die im Anhang mit ihren jeweiligen Peptiden aufgeführt sind (Tab. 6, Seite IV). Diese Proteine weisen jedoch keine Sequenzhomologie mit derzeit bekannten oder vermuteten Allergenen auf.

Weiterhin konnten verschiedene Profiline im Fruchtfleisch (TC162694, TC162738), in der Schale (TC153553) und im Samen (TC153878) der Tomate identifiziert werden (siehe Anhang, Tab. 6). Jedoch wies keines dieser Profiline eine signifikante Sequenzübereinstimmung mit dem Lyc e 1 Allergen auf (Westphal *et al.*, 2004a). Gegen den Schalenextrakt der Tomate konnte in dieser Arbeit jedoch keine IgE- Reaktivität im Dot- Blot beobachtet werden. Dort konnte ebenfalls Profilin mittels LC – MS/ MS detektiert werden. Weiterhin wurde Profilin im Samenextrakt der Tomate detektiert, welches ebenso einen Einfluss auf die IgE- Bindung im Dot- Blot haben kann, was jedoch durch das durchgeführte Experiment nicht geklärt wurde.

Weiterführend könnten diese Vermutungen durch rekombinante Profilin Isoformen genauer untersucht werden. Darnowski et al. vermuteten als Erste das Vorkommen von Profilinen in der Tomate (Darnowski, 1996). Peterson et al. und Fötisch et al. identifizierten ein 16 kDa Allergen als Profilin (Foetisch *et al.*, 2003; Peterson, 2000) in der Tomate. Willerroider et al. hingegen gab für das Tomatenprofilin nach erfolgter Klonierung ein MG von 14.252 kDa an. Dieses wurde als erstes Tomatenallergen mit Lyc e 1 benannt (Willeroider et al., 2003).

Weiterhin wird dieses Protein als kreuzreagierendes Panallergen in pflanzlichen Ressourcen angesehen (Scheurer et al., 2001b). Profileine konnten bereits in einer Vielzahl von Pflanzen als Minorallergen nachgewiesen werden, wobei jeweils ein MG von ca. 14 kDa angegeben wird (Ebner *et al.*, 1995; Radauer *et al.*, 2006; Valenta *et al.*, 1992; Vallier *et al.*, 1992; van Ree *et al.*, 1992; Westphal *et al.*, 2004a). Da bisher nur die klonierte Isoform des Tomatenprofilins Lyc e 1 auf die IgE- Reaktivität untersucht wurde, ist es ebenso möglich, dass andere in dieser Arbeit identifizierten Profileine (TC162694, TC162738, TC153553 und TC153878) eine IgE- Reaktivität aufweisen. Falls dies der Fall sein sollte, könnte dadurch das positive Signal gegen den Fruchtfleischextrakt im Dot- Blot erklärt werden.

Mit diesem Experiment konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das Dot- Blot Signal im Pulpaextrakt höchstwahrscheinlich durch das Lyc e 2- Allergen (β - Fruktofuranosidase). Weiterhin könnte man vermuten, dass das Dot- Blot Signal im Fruchtfleischextrakt durch Profileine hervorgerufen wurde, da dort keine bisher bekannten Allergene mittels LC- MS/ MS identifiziert werden konnten.

Ferner sind, neben den Allergenen Lyc e 1, 2 und 3, drei weitere putative Allergene der Tomate in der Allergome- Datenbank zu finden. Diese sind bisher nicht von der IUIS offiziell als Tomatenallergene anerkannt. Bei diesen Proteinen handelt es sich um die Lyc e Chitinase, Lyc e Glukanase und die Lyc e Peroxidase.

In dieser Arbeit konnte mittels LC- MS/ MS im Tomatenschalenextrakt eine Glukanase (TC161909) identifiziert werden. Da bisher keine Sequenzinformationen des Glukanase- Allergens vorhanden sind, konnten keine Sequenzvergleiche durchgeführt werden. Es kann jedoch darauf geschlossen werden, dass es sich bei der identifizierten Glukanase- Isoform um keine IgE- reaktive Isoform der Glukanase handelt, da im Dot- Blot kein IgE- Detektionssignal zu beobachten war (siehe

Abbildung 15, Seite 13). Die Lyc e Glukanase wird in der Tomatenfrucht mit einem allergenen Potenzial vermutet.

Allgemein wird in der Schale von Früchten ein besonders hohes allergenes Potenzial erwartet, da bereits in der Familie der *Rosaceae* (Rosengewächse), wozu Apfel, Birne und Pfirsich gehören, ein erhöhtes allergenes Potenzial der Schale gegenüber dem Fruchtfleisch festgestellt wurde (Fernandez-Rivas & Cuevas, 1999). Im Gegensatz dazu konnten in der Kartoffelknolle keine Differenzen der IgE- Bindung zwischen Mark und Schale festgestellt werden (Castells *et al.*, 1986; Seppala *et al.*, 1999). In erster Linie wird über Allergien auf rohe Kartoffeln berichtet (Wüthrich, 1993). Die Kartoffel ist mit der Tomate phylogenetisch verwandt, weil beide in die Gruppe der Nachtschattengewächse (*Solanaceae*) einzuordnen sind. In dieser Castells Studie konnte ebenfalls kein allergenes Potenzial der Schale gegenüber dem Fruchtfleisch festgestellt werden.

In dieser Arbeit konnte die Glukanase- Isoform (TC161909) im Schalenextrakt mittels LC- MS/ MS detektiert werden. Jedoch war kein IgE- reaktives Signal im Dot- Blot Experiment dieser Arbeit zu erkennen. Demzufolge konnte dieser Zusammenhang, der bereits von der Kartoffel bekannt ist, in dieser Studie bestätigt werden. Dies lässt den Schluss zu, dass in der Schale keine bzw. nur in geringen Konzentrationen IgE- reaktiver Proteine vorkommen. Diese Vermutung müsste in fortführenden Experimenten genauer untersucht werden

Weiterhin konnten im Pulpa- und Fruchtfleischextrakt zwei Peroxidase- Isoformen (TC158002 und TC154577) mittels LC- MS/ MS identifiziert werden. Da die Proteinsequenz der Lyc e Peroxidase bisher nicht bestimmt wurde, konnten keine Sequenzvergleiche in dieser Arbeit durchgeführt werden. Im Dot- Blot Versuch konnten jedoch Signale gegenüber dem Pulpa- und Fruchtfleischproteinextrakt detektiert werden (siehe Abbildung 15, Seite 36). Diese Ergebnisse geben dennoch keinerlei Aufschluss darüber, ob die Dot- Blot Signale (siehe Abbildung 15, Seite 36) gegenüber dem Fruchtfleischextrakt durch die Peroxidase, die Pektinesterase oder durch die Profilin- Isoformen hervorgerufen wurden. Weiterhin kann man nicht mit Sicherheit sagen, ob das Lyc e 2- Allergen oder auch die Peroxidase für die IgE- Detektion gegenüber dem Pulpaproteinextrakt verantwortlich ist. Um in diesem Punkt aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, ist es notwendig exakte Allergenproteinsequenzen zu veröffentlichen. Diese dienen dazu,

Vergleich mit den durch Massenspektrometrie identifizierten Proteinensequenzen heranzuziehen.

Nach einer LC- MS/ MS- Untersuchung des Tomatensamenextraktes konnten trotz starker IgE- Reaktivität im Dot- Blot keine bekannten Allergene identifiziert werden (siehe Abbildung 15, Seite 36). Wie bereits diskutiert könnten die IgE- Signale durch eine der Profilin- Isoformen (TC153878) hervorgerufen worden sein, da diese in dieser Arbeit nur im Samenextrakt der Tomate identifiziert werden konnte. Weiterhin konnten Samenspeicherproteine identifiziert werden. Proteine aus dieser Familie sind bereits als Allergene identifiziert worden, allerdings bisher nicht in der Tomatenfrucht. Aus diesem Grund richtete sich im Folgenden der Schwerpunkt dieser Arbeit auf das allergene Potenzial der Tomatensamen. Dazu war es zunächst notwendig enthaltene Proteine voneinander zu trennen, sodass eine eindeutige Zuordnung der IgE- Detektionssignale möglich wurde. Dazu wurde ein zweidimensionales Chromatographiesystem zur Trennung des Tomatensamenproteinextraktes verwendet.

6.1 Identifizierung IgE- reaktiver Proteine nach einer zweidimensionalen Proteinauftrennung

Zunächst wurde der Tomatensamenextrakt in einer ersten Dimension durch Chromatofocussierung (CF) aufgetrennt. Dabei erfolgt die Trennung nach dem pI der enthaltenen Proteine. Resultierende CF- Fraktionen wurden danach mittels Immunoblot- Technik auf deren IgE- Reaktivität untersucht (siehe Abbildung 17, Seite 41).

Im IgE- Immunoblot konnten basische Fraktionen mit einem pI von ca. 8 im detektiert werden. Da nach dieser ersten Dimension keine hohe Proteintrennung erfolgte, wurden im Folgenden die Fraktionen nach der zweiten Proteintrennung unter Verwendung einer RP- Säule auf die IgE- Reaktivität untersucht. Durch ein SDS- Gel konnte die Anreicherung von basischen IgE- reaktiven Proteinen des Tomatensamenextraktes gezeigt werden (siehe Abbildung 17, Seite 41). Dort konnte eine 65 kDa und eine 17 kDa- Bande im IgE- Blot detektiert werden. Die 30 kDa- Bande wurde hingegen nicht detektiert. Bei der 65kDa- Bande handelt es sich um das Tomaten Vicilin und bei den 30 und 17kDa- Banden um das Legumin Protein der Tomate. Wie im SDS- Gel ersichtlich ist, konnte nach dem ersten Trennungsschritt zwar keine sehr hohe Proteintrennung erreicht werden, jedoch eine Anreicherung der IgE- reaktiven Proteine.

Der IgE- Immunoblot wurde mit einem Gemische aus acht verschiedenen Seren (Serum Nr. 1- 7, 9, siehe Anhang) von Tomaten sensibilisierten Patienten durchgeführt. Dies könnte auch die mögliche Ursache für das Ausbleiben der Detektion im Immunoblot sein. Der Serummix besitzt eine Gesamtaktivität tomatenspezifischer IgE Antikörper von 0.625 kU/ l (Phadia CAP- FEiA Test). Somit wird durch das Mischen der verschiedenen Seren die Aktivität einzelner Seren mit hohem spezifischen IgE gegen Tomatenallergene verdünnt. Beispielsweise wurde das Serum 1 dadurch um ein Dreifaches verdünnt (siehe Anhang, Tab. 5). Jedoch sollte der Vortest des ersten Trennungsschritts nur als Anhaltspunkt für die darauf folgende Trennung dienen.

In der zweiten Dimension wird diese angereicherte basische IgE- reaktive Fraktion durch eine C18- Säule erneut fraktioniert. Die resultierenden RP- Fraktionen zeigten eine hohe Auftrennung der Proteine (siehe Abbildung 18, Seite 45). Im Immunoblot konnte schließlich eine Fraktion mit drei apparenten Proteinbanden

detektiert werde. Diese Banden weisen wiederum ein MG von 65 und 17 kDa auf und manche Seren weisen auch eine Detektion gegenüber der 30kDa- Bande auf.

Die IgE- reaktiven Proteinbanden konnten mittels LC- MS/ MS in dieser Arbeit eindeutig durch die Abtrennung überlagerter Proteine bestimmter Tomatenproteine zugewiesen werden. Die 30 und 17 kDa Banden konnten somit dem Legumin (TC156005) und die 65 kDa- Bande dem Vicilin (AM932874) Protein zugeordnet werden (siehe Anhang, Tab. 8).

Dieses Bandenmuster der apparenten IgE- reaktiven Samenproteine konnte bereits in einer Studie von Berry und Bewley in Tomatensamen mittels SDS- PAGE gezeigt werden (Berry & Bewley, 1992). Berry und Bewley beobachteten vier Hauptgruppen mit einem MG von ca. 45, 30, 23 und 20 kDa im Tomatensamenextrakt. In der Berry und Bewley Studie erfolgte jedoch keine Identifizierung dieser Proteine.

In einer neueren Studie von Sheoran et al. wurden ebenfalls Tomatensamen auf ihren Proteingehalt hin untersucht. Hier wurde ebenfalls dieses Bandenmuster mit den MG von 44, 35 und 25 kDa gezeigt (Sheoran et al., 2005). Dort konnte eine Proteinidentifizierung mittels MALDI durchgeführt werden. Die Analyse ergab für die 44 kDa- Bande ein Vicilin und für die 35 und 25 kDa- Banden ein Legumin Protein. Diese Proteine weisen einen pI in einem Bereich von 8.7 bis 5.8 auf (Sheoran et al., 2005). Somit stützt die Sheoran et al. Studie das in dieser Arbeit identifizierte Bandenmuster der IgE- reaktiven Proteine und die vorhandene Basizität der einzelnen Proteine.

Weiterhin ist im Immunoblot erkennbar (siehe Abbildung 18, Seite 45), dass im Vergleich zu der 65 kDa- Vicilin- Bande, die 30 und 17 kDa Legumin- Banden schwächer detektiert werden. Dies kann zum einen durch unterschiedliche Proteinmengen des Legumins und Vicilins im Proteinextrakt hervorgerufen werden. Eine Proteinbestimmung der beiden Proteine im Ausgangsextrakt wurde nicht berechnet.

Zum anderen kann eine höhere IgE- Reaktivität der Seren gegenüber der Vicilin- Bande die Ursache sein. Die Vermutung liegt nahe, dass eine erhöhte IgE- Reaktivität durch die Glycosylierung des Vicilins hervorgerufen wird. Viciline liegen i.d.R. glycolysiert, wohingegen Legumine meistens nicht- glycolysiert vorliegen

(Bassuner *et al.*, 1987; Slightom *et al.*, 1985). Ob dies auch für Tomatenproteine der Fall ist konnte in dieser Arbeit nicht bestimmt werden. Weiterhin ist bekannt, dass viele Allergene zu der Gruppe der Glykoproteine gehören und somit CCDs besitzen (Aalberse *et al.*, 1997; Altmann, 2007; Foetisch *et al.*, 2003; Kristensen *et al.*, 1997; Tretter *et al.*, 1993). Dieser Zusammenhang konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden und stellt lediglich eine Vermutung dar.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit konnte durch Zuordnung LC-MS/MS identifizierter Peptidsequenzen, das Tomatenlegumin genauer charakterisiert werden. Durch die Massenspektrometrie ist eine eindeutige Zuordnung von Peptidmassen (Masse zu Ladung Verhältnis) zu bestimmten Proteinen möglich. Dadurch konnte die 30 kDa- Bande als N- terminaler Teil und die 17kDa- Bande als C- terminaler Teil des Tomaten Legumins identifiziert werden.

Diese Art von Spaltung in zwei Untereinheiten ist von Leguminen in verschiedenen Organismen bekannt. Die Spaltung wird durch eine Asparaginy-Endopeptidase katalysiert. Es entsteht in den meisten Fällen eine kleinere N- terminale β - Untereinheit und eine größere C- terminale α - Untereinheit (Jung *et al.*, 1998a; Muntz, 1998; Muntz *et al.*, 2001). Die resultierenden MG von 30 und 17 kDa des Tomatenlegumins zeigen eine Übereinstimmung mit den Legumin- Untereinheiten der Cashewnuss (Teuber *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003b).

Die putative Asparagin- Glycin (NG)- Spaltstelle des Tomatenlegumins konnte durch einen Sequenzvergleich mit dem Legumin aus der Cashewnuss (Ana o 2) bestimmt werden (siehe Abbildung 21 Seite 47 und Anhang, Abb. 9). Die NG- Spaltungsstelle wurde bereits in Leguminarten anderer Spezies identifiziert (Yoshioka *et al.*, 2004)(Wang *et al.*, 2003a). In neuesten Allergen- Untersuchungen wird bereits zwischen den einzelnen Ketten einiger Leguminallergene unterschieden. Beispielsweise wird das Ana o 2- Allergen als Ana o 2 N- und C- Allergen (Cashewnuss) oder das Ara h 1- Allergen als Ara h 3 N- und C- Allergen (Erdnuss) bezeichnet (Jung *et al.*, 1998b; Radauer *et al.*, 2007; Rout & Chrungoo, 1996).

Die 65 kDa- Bande konnte eindeutig mittels LC- MS/ MS als Vicilin identifiziert werden. Da das Tomatengenom bisher nicht vollständig sequenziert ist, konnte zunächst keine eindeutige Proteinzuzuordnung erfolgen. Zu Beginn dieser Arbeit wurden 2 Proteine mit den Bezeichnungen TC164469 und BE458586 in der 65 kDa- Gelbande identifiziert. Durch einen Sequenzvergleich mit dem

Jug r 2- Allergen aus Walnuss (gi6580762) konnte eine Sequenzübereinstimmung gezeigt werden. Dabei weist das BE458586- Tomatenprotein eine 100 % ige Sequenzübereinstimmung im N- terminalen Bereich des Jug r 2- Proteins und das TC164469- Protein eine 100 % ige Sequenzübereinstimmung im C- terminalen Bereich des Jug r 2- Proteins (siehe Anhang, Abb. 12). Die Proteine TC164469 und BE458586 überlappen jedoch nicht in der Sequenzalignierung. Das deutet darauf hin, dass die Sequenz nicht über die beiden Proteinteile TC164469 und BE458586 abgedeckt werden. Aus diesem Grund wurde in der Gene Index Datenbank nach neuen EST- Sequenzen gesucht (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/plant.html>). Es wurde die vollständige Nukleotidsequenz gefunden (siehe Anhang, Abb. 5). Im Weiteren wurde die Nukleotidsequenz durch spezifische Peptidzuordnung bestätigt. Die vollständige Vicilinsequenz ist in der EMBL- Nukleotiddatenbank mit der Nummer AM932874 gespeichert. Im Rahmen dieser Arbeit ist es somit gelungen, die vollständige Sequenz des Tomatenvicilins mit einem MG von 65 kDa durch Nukleotidsequenzvergleiche in der EST- Datenbank zu bestimmen.

Die massenspektrometrisch identifizierten Tomatenproteine wurden durch die beschriebene zweidimensionale Proteintrennung angereichert und im Immunoblot detektiert (siehe Abbildung 19, Seite 44).

6.2 Serumspezifische IgE- Immunoblot Analyse

Ein Lebensmittel beinhaltet in der Regel eine Vielzahl verschiedener Allergene, welche hinsichtlich ihrer Relevanz für den Patienten aus allergologischer Sicht unterteilt werden. Bindet ein Allergen in mehr als 50 % der getesteten Atopiker- Seren spezifisches IgE, so wird dieses nach Richtlinien der WHO als Majorallergen beschrieben (WHO, 2001a, b). Wird bei weniger als 10 % der Patienten eine Sensibilisierung nachgewiesen, liegt ein Minorallergen zugrunde (WHO, 2001a, b). Intermediärallergene sind in der Lage, eine Sensibilisierung zwischen 10 und 50 % hervorzurufen (Dreborg, 1994; Geha, 1995; Vieths, 1996; WHO, 2001a, b). Wie man in Abbildung 18 (Seite 42) erkennt, wurde die Vicilin- Bande von 9 der 18 Seren erkannt. Nach WHO Empfehlung würde das Protein somit zu den Intermediärallergenen zählen, da 50 % der Patientenserum eine IgE- Reaktivität aufzeigen.

Gegen die Legumin- Bande reagieren fünf der 18 Seren (28 %). Ein Detektionssignal gegenüber der 30 kDa Legumin- Bande im Vergleich zur 17 kDa Legumin Bande weisen dahingegen nur vier der fünf Seren auf. Demzufolge könnte man das Leguminprotein den sogenannten Minorallergenen zuordnen. Weiterhin ist im Immunoblot (siehe Abbildung 18, Seite 42) erkennbar, dass die Intensität der spezifischen IgE- Detektion der Vicilin- Banden (65 kDa) nicht nur häufiger, sondern auch stärker von Patientenserum erkannt werden. Im Gegensatz dazu wurden beide Legumin- Banden schwächer durch die Patientenserum detektiert. Durch Abschätzen der Proteinmengen vom SDS- Gel, erscheint die Konzentration aller drei Proteinbanden gleich hoch. Ursache der unterschiedlich starken Bandenerkennung im IgE- Immunoblot, könnte eine schwächere IgE- Reaktivität durch die Patientenserum der Legumin- Banden (30 und 17 kDa) und eine stärkere IgE- Erkennung der Vicilin- Bande (65 kDa) sein. Eine weitere Ursache könnten unterschiedliche Transferraten der Proteine auf die NC- Membran sein. Aufgrund einer höheren Transfergeschwindigkeit kleinerer Proteine während des Transfer- Vorgangs, kann es zum Verlust der 17 kDa Proteine gekommen sein. Dadurch wäre ein geringeres Detektionssignal zu verzeichnen. Weiterhin würde man im Vorhinein erwarten, dass die Signalstärke zu beiden Legumin- Untereinheiten gleich groß ist, da diese im Samen äquimolar vorkommen. Dies ist bei drei der fünf Seren (1, 11, 14), die das Legumin- Protein im Immunoblot detektiert haben, der Fall.

Bei Serum 4 und 17 erscheint die 30 kDa- Bande kräftiger als die 17 kDa- Leguminbande. Untersuchungen des Fag e 1 Legumin Allergens (gi2317674) aus Buchweizen, welches laut Allergome- Datenbank ein MG von 65 kDa besitzt, zeigt im Immunoblot lediglich ein IgE- Signal gegenüber der 19 kDa β - Untereinheit des Legumins (Kondo *et al.*, 1993; Urisu, 1994). Im Unterschied dazu konnte in einer Studie von Park *et al.* sowohl die 19 kDa β - Untereinheit als auch die 24 kDa α - Untereinheit im Immunoblot detektiert werden (Park *et al.*, 2000).

Überdies wurde in einer Epitop- Studie von Yoshioka *et al.* nur die β - Untereinheit des Legumin (gi29839419) untersucht, welche in dieser Untersuchung als Majorallergen bezeichnet wird (Yoshioka *et al.*, 2004). Das zeigt, dass es bisher noch keine einheitlichen Aussagen über die IgE- Reaktivität gegenüber der β - Untereinheit bzw. zu beiden Untereinheiten gibt.

Weiterhin gibt es auch zum Teil Unklarheiten darüber, welche Proteinsequenz als Allergen bezeichnet wird, wie am Beispiel des Fag e 1- Allergens zu beobachten ist. Beide Buchweizen Legumine gi2317674 (Kondo *et al.*, 1993; Urisu, 1994) und gi29839419 (Yoshioka *et al.*, 2004) werden in verschiedenen Studien als Fag e 1- Allergen beschrieben, obwohl sie unterschiedliche Sequenzen besitzen (Homologie 72 %, siehe Anhang, Abb. 13). Im Verlauf dieser Arbeit wird die gi29839419- Sequenz zur putativen Epitop- Modellierung genutzt, da in dieser Studie beide Untereinheiten untersucht wurden.

Eine Detektion der 61 kDa Legumin Bande ist im Immunoblot nicht zu erkennen, diese entspricht nach LC- MS/ MS- Analyse dem nicht- reduzierten ungespaltenen Legumin. Das 61 kDa Protein konnte in den RP- Fraktionen 11 und 12 mittels LC- MS/ MS detektiert werden (siehe Abbildung 18, Seite 42). Dieses zeigt keine IgE- Reaktivität im Immunoblot. Zu diesem Ergebnis kamen ebenfalls Park *et al.*, die eine SDS- PAGE des Buchweizen- Legumins unter reduzierenden und nicht- reduzierenden Bedingungen durchführten. Dabei konnte festgestellt werden, dass unter nicht- reduzierenden Bedingungen keine 24 und 16 kDa Bande und keine 61 kDa Legumin- Bande im Immunoblot detektiert werden (Park *et al.*, 2000). Diese Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass sich die epitopen Bereiche in den Spaltbereichen des Legumins befinden.

6.3 Basophilenaktivierungstest

Damit eine Substanz als Allergen wirken kann, ist es unabdingbar, dass sie im Patienten zur Freisetzung von Mediatoren (z.B. Histamin) führt. Dazu muss es zur Quervernetzung der IgE- Rezeptoren auf den entsprechenden Zellen (vor allem Mastzellen und Basophilen) kommen. Basophilen kommt, neben den Mastzellen als Effektorzelle bei allergischen Soforttypreaktionen eine zentrale Bedeutung zu. In den letzten Jahren wurden spezifische Oberflächenantigene identifiziert. Diese Oberflächenantigene sind beispielsweise CD203 und CD63, die bei einer Basophilenaktivierung vermehrt exprimiert werden (Buhring, Streble & Valent, 2004; Hauswirth *et al.*, 2002; Hauswirth *et al.*, 2007). CD203c wird unter den Zellen des peripheren Blutes ausschließlich auf basophilen Mastzellen exprimiert und spezifisch vom monoklonalen Antikörper 97A6 erkannt (Buhring *et al.*, 2001; Buhring *et al.*, 1999; Ghannadan *et al.*, 2002). In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit konnte für 22 Insektengiftallergiker gezeigt werden, dass die *in vitro* Stimulation der Basophilen mit Wespen- oder Bienengiftextrakten zu einer signifikanten und spezifischen Zunahme der CD203c- Expression führt (Platz *et al.*, 2001). Die Fähigkeit der Tomatenproteine Legumin und Vicilin, Mediatoren freizusetzen, wurde deshalb anhand einer CD203c Expression auf basophilen Granulozyten untersucht.

Die stärksten CD203c- Signale konnten in der vorfraktionierten CF- Fraktion gemessen werden (72 %), die fast doppelt so hoch ist, wie die der Positivmessung (44 %). Ein Abfall der CD203c- Signalintensität ist mit sinkender Proteinkonzentration bei allen fünf Proteinfractionen zu verzeichnen. Indes liegt der Messwert bei einer Konzentration von 1 ng/ ml für die Fraktionen 1, 8 und 9 unter der Nachweisgrenze. Durch Fraktion 2 ist bei dieser Konzentration nur eine Stimulation von ungefähr 2 % messbar. Die Ausgangsfraktion hingegen zeigte selbst bei dieser niedrigen Konzentration eine starke CD203- Expression von ca. 56 %.

Weiterhin ist anhand der Messwerte zu erkennen, dass die Detektionssignale für die CD203- Expression nach einer weiteren Proteinfractionierung mittels RP- Säule stark abnimmt. Das lässt darauf schließen, dass die Proteinkonzentration der IgE- reaktiven Tomatenproteine verringert wird, die eine Stimulation der Basophilen hervorrufen. Als Reaktion auf die Proteine der Fraktion 2, welche die 30 und 17 kDa Leguminproteine enthalten, findet eine CD203- Expression von 48 % statt (bei 100 ng/ ml). Dieser Wert entspricht annähernd einer maximalen

Mastzellenstimulierung in diesem Test. Ferner ist eine Zunahme der CD203-Expression von Fraktion 1 zu Fraktion 2 zu erkennen. Dieses Ergebnis spiegelt den Proteingehalt der 30 und 17 kDa Legumine im SDS- Gel wieder. Im Vergleich dazu ist die CD203- Signalintensität bei der Untersuchung der Fraktionen 8 und 9 (18 und 12 %) insgesamt niedriger als in den Fraktionen 1 und 2. Sie liegt dennoch über der gemessenen Negativkontrolle (2 %). In weiteren Untersuchungen könnte beispielsweise eine Proteintrennung der drei Banden aufgrund von Größenausschluß (SEC) erfolgen. Somit wäre eine Untersuchung der einzelnen Proteine möglich.

6.4 Sequenzhomologien und Strukturaufklärung putativer Tomatenallergene

In den letzten Jahren gelang es vermehrt, die molekulare Struktur von Pflanzen- und Insektenallergenen zu identifizieren (King & Spangfort, 2000; Scott *et al.*, 1990; Valenta *et al.*, 1998). Durch Auftrennung von Allergengemischen oder dem Einsatz gentechnischer Methoden ist es heute möglich, definierte gereinigte oder rekombinante Einzelallergene herzustellen (Breiteneder *et al.*, 1997). Sie finden ihre Anwendung in der Erforschung immunologischer Grundlagen, werden jedoch in letzter Zeit auch verstärkt für die klinische Diagnostik von Typ- I- Allergien verwendet (Cramer, 1998; Hemmann *et al.*, 1999; Kraft *et al.*, 1999).

Eine Methode um die Struktur eines putativen Allergens zu analysieren, ist zunächst die Bestimmung der Sequenzähnlichkeiten zu bereits bekannten Allergenen durch eine Sequenzalignierung. Die FARRP- Datenbank (<http://www.allergenonline.com/>) bietet eine automatisierte Sequenzalignierung nach bekannten Allergenen (Pearson *et al.*, 1988). Laut FAO/ WHO- Verordnung gibt das Vorhandensein einer Sequenzübereinstimmung, bei vier bis acht aufeinander folgenden Aminosäuren in einem Aminosäurebereich von 80 AS und einer Sequenzübereinstimmung von 35 % zwischen zwei Sequenzen, einen Hinweis auf ein allergenes Potenzial (WHO, 2001a).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Tomaten- Legumin die größte Sequenzhomologie zum Ber e 2 Allergen (gi30313867), welches in der Paranuss vorkommt, aufweist. Hierbei konnte eine Homologie in den Aminosäuresequenz der beiden Proteine von 76.5 % und eine Übereinstimmung von 45.5 % berechnet werden. Weiterhin konnten sieben aufeinander folgende

Aminosäuren mit einer 100%igen Übereinstimmung im ASB von 132–138 (DQHQQKVH) des TC156005-Proteins identifiziert werden (siehe Anhang, Abb. 7). Somit geben diese Berechnungen erste Hinweise darauf, dass es sich bei dem Tomatenlegumin um ein putatives Allergen handeln könnte.

Um weiterführende Kenntnisse über die räumliche Struktur im Vergleich zu bereits bekannten Allergenen zu erlangen, wurde die Methode der Struktur-Modellierung verwendet. Bisher sind keine dreidimensionalen Strukturen von Legumin-Allergenen, die in Tabelle 5 für einen Homologievergleich mit den Tomatenproteinen Legumin und Vicilin herangezogen wurden, bekannt. Jedoch sind Kristallstrukturen von Leguminen und Vicilinen aus anderen Organismen identifiziert worden. Daher wurden in dieser Arbeit Proteinstrukturen von anderen Organismen wie z.B. der Sojabohne (pdb-Code: 1fxz) oder dem Kürbis (2evx), zur Strukturvorhersage herangezogen. Um Proteinkristallstrukturen zu finden, die eine möglichst hohe Homologie zu den Tomatenproteinen bzw. den dazu homologen Allergenen aufweisen, wurde das Programm HHpred verwendet. Durch dieses Programm wird eine möglichst genaue Strukturvorhersage aller vier Proteine erzeugt.

Für einen Strukturvergleich zu einem bereits bekannten Allergen, wurde das Legumin-Allergen Ana o 2 aus Cashewnuss ausgewählt. Dieses Allergen wurde für einen Strukturvergleich herangezogen, da es sich hierbei ebenfalls um ein Leguminprotein handelt und weil an diesem Allergen bereits Epitopuntersuchungen durchgeführt wurden. Erstmals wurde das Ana o 2-Allergen in einer Studie von Teuber et al. beschrieben (Teuber et al., 2002). Dort wurden zwei Hauptbanden des Legumins unter reduzierenden Bedingungen und unter Verwendung von 15 Cashewnuss-sensibilisierten Patientenseren im IgE-Immunblot detektiert. Die Ana o 2-Proteine wiesen in der Teuber Studie ein MG von 30-35 kDa und 18-24 kDa auf. Im Weiteren konnte dort eine 45 kDa IgE-reaktive Proteinbande, welche dem Cashewnuss-Vicilinprotein entspricht, identifiziert werden. Dieses wird in späteren Veröffentlichungen als Ana o 1-Allergen bezeichnet. Die Identifizierung der Proteine in dieser Studie erfolgte mittels N-terminaler Sequenzierung. Diese Daten konnten teilweise durch die Studie von Wang et al. bestätigt werden (Wang et al., 2003a). Dort konnte ebenfalls ein IgE-reaktives Legumin-Protein in zwei Banden im Immunblot detektiert werden. Im Unterschied zu der Teuber-Studie weisen diese zwei Proteinebanden ein MG von 53 und 33 kDa auf. Dabei wird die 33 kDa-Bande als Hauptbande bezeichnet.

Diese Proteinerkennung durch IgE- Antikörper bestätigt die Ergebnisse in dieser Arbeit, da auch hier eine schwächere Detektion der 35kDa- Bande im Vergleich zur 17 kDa- Leguminbande sichtbar ist. Hingegen zeigen die Tomatenleguminbanden ähnliche MG wie die Legumine in Teubers Studie (Teuber et al., 2002). Da das Ana o 2- Allergen eine hohe Sequenzhomologie und ein ähnliches Detektionsmuster im Immunoblot aufweist, wurde das Ana o 2- Allergen für Strukturvergleiche herangezogen. Durch ein Strukturalignment konnte eine Strukturähnlichkeit zwischen den Proteinen Ana o 2 (Cashewnuss) und TC156005 (Tomate) gezeigt werden (siehe Abbildung 25:A, Seite 58). Das Ana o 2- Protein wurde für diese Arbeit nicht nur aufgrund der hohen Sequenzübereinstimmung, sondern auch wegen bereits durchgeführter Epitopuntersuchungen ausgewählt. Dieser Ansatz wurde bereits in einer anderen Studie zur putativen Epitopbestimmung von Leguminallergenen verwendet (Barre et al., 2007). Die Peptid- Epitope des Ana o 2- Allergens konnten mittels SPOT- Membran identifiziert werden. Unter Verwendung einer SPOT- Analyse ist es möglich, linearere, jedoch nicht konformationsabhängige Epitope zu identifizieren. Diese Sequenzbereiche geben Anhaltspunkte darüber, wie gut eine Strukturvorhersage ist, da sich die Sequenzbereiche der Peptid- Epitope auf der Oberfläche eines Allergen- Strukturmodells befinden müssen. In der Wang Studie konnten 22 lineare Peptid- Epitope identifiziert werden, wobei sieben Peptid- Epitope besonders stark detektiert wurden (Wang et al., 2003a). Daraufhin wurden in dieser Arbeit die sieben linearen Peptid- Epitope zum Strukturmodellierungsexperiment verwendet. Diese sieben Peptid- Epitope wurden in der Wang Untersuchung am häufigsten detektiert. So konnte gezeigt werden, dass nicht nur die putativen Epitope (L3 – L22), auf der Oberfläche des Strukturmodells exponiert sind, sondern auch, dass die Epitopbereiche sehr ähnlich im Vergleich zum Cashewnuss- Allergen (Epitop3 - Epitop22) verteilt sind (siehe Abbildung 27, Seite 60). Demzufolge konnte gezeigt werden, dass zwischen den beiden Leguminproteinen TC156005 (Tomate) und Ana o 2 (Cashewnuss) eine hohe Sequenzhomologie (77 %) und Strukturähnlichkeit besteht.

Die putativen Epitope des Tomatenlegumins sollten mittels Peptid- Epitop- Kartierung überprüft werden (siehe Abbildung 31:A, Seite 65). Die entwickelten Membranen ergaben jedoch keine signifikanten Ergebnisse.

In diesem Versuch wurde zunächst mit einem sekundären Maus anti human- IgE- Antikörper, der durch einen tertiären Ziege anti- Maus (POD)- Antikörper detektiert wird, gearbeitet. Mit diesem Versuchsaufbau, konnten keine Ergebnisse erzielt werden. Aus diesem Grund wurde im Weiteren mit einem sekundären Maus anti- human- IgE – Antikörper, der ebenfalls mit dem Enzym POD konjugiert ist, in verschiedenen Konzentrationen gearbeitet. Mit einer Verdünnung von 1:1000 konnten die geeignetsten Ergebnisse erbracht werden. Es hätten weitere Optimierungsschritte für diesen Versuch stattfinden müssen, jedoch sind die Membranen nur für die Anwendungen von 5 bis 10 geeignet. In dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass die Membranen ab der achten Verwendung keine deutlichen Punkte mehr aufweisen. Das lässt darauf schließen, dass die Peptide bei jedem Versuch etwas von der Membran entfernt werden.

Dennoch konnten Peptid- Epitope in homologen Sequenzbereichen des Ana o 2- Allergens detektiert werden. Somit kann nur vermutet werden, dass diese ASB putative Epitope darstellen, da auch außerhalb der vermuteten Sequenzbereiche Detektionssignale erkannt wurden (siehe Abbildung 32:A, Seite 67).

Zur Strukturaufklärung des Tomatenvicilins wurden bekannte Vicilinallergene zum Vergleich herangezogen. Dabei konnte eine 81 % ige Sequenzhomologie zwischen dem Jug r 2 Walnuss- Vicilinallergen und dem Tomatenvicilin (AM932874) berechnet werden (siehe Anhang, Abb. 8). Eine Sequenzübereinstimmung von sieben aufeinander folgenden Aminosäuren ist in einem ASB von 398 – 404 (FGQFFEA) des Jug r 2- Allergens zu erkennen (siehe Anhang, Abb. 12).

Zum Strukturvergleich, des in dieser Arbeit identifizierten Vicilinproteins, wurde das Ara h 1- Vicilinallergen aus der Erdnuss herangezogen. Dieses weist eine Sequenzhomologie von 66.5 % und Sequenzidentität von 30.5 % zum Tomatenvicilin auf. Das Ara h 1- Vicilinallergen wurde ausgewählt, da von diesem Protein bereits Peptid- Epitope identifiziert wurden (Burks *et al.*, 1997);(Shin *et al.*, 1998). Die Methode der dreidimensionalen Modellierung wurde bereits für die Vicilinallergene Ana o 1, Cor a 11, Jug r 2 und Len c 1 zur putativen Epitopbestimmung durchgeführt (Barre, Borges & Rouge, 2005; Barre *et al.*, 2008).

Die Erdnuss stammt ursprünglich aus Brasilien und gehört zu der Familie der Hülsenfrüchte (Leguminosen). Die Erdnussallergie gehört zu den stärksten Lebensmittelallergien mit Symptomen von milder Urtikaria bis hin zum

lebensbedrohlichen anaphylaktischen Schock, der in einzelnen dokumentierten Fällen auch zum Tode führte (Pons, Palmer & Burks, 2005). In der Erdnuss konnten bisher elf Allergene als Allergenquellen nachgewiesen werden. Ara h 1, Ara h 3 und Ara h 4 gehören zur Proteinsuperfamilie der Cupine. Ara h 2, Ara h 6 und Ara h 7 sind zugehörig zur Superfamilie der Prolamine. Wohingegen Ara h 5 und Ara h 8 aeroallergenassoziiert sind. Das Ara h 1- Allergen wurde erstmals 1993 in einer Studie von Uhlemann et al. als IgE- bindendes Protein beschrieben (Uhlemann, Becker & Schlaak, 1993). Dieses Allergen stellt eines der wichtigsten Allergene in der Erdnuss dar. In weiteren Untersuchungen konnte dem Ara h 1- Allergen ein MG von 64.5 kDa und ein pI von 4.6 – 8.0 zugeordnet werden. Weiterhin zählt das Ara h 1- Allergen zu den Glykoproteinen. Man vermutet, dass es in mehreren Isoformen und als Dimer und Trimer vorkommt (Becker, 1997).

In einer Studie von van Boxtel et al. wird das Allergen mit einem MG von 63 kDa beschrieben (van Boxtel et al., 2008). In dieser Studie konnten die 22 identifizierten Epitope des Ara h 1- Allergens aus den vorhergehenden Studien von Burks et al. (Burks *et al.*, 1997) und Shin et al. (Shin *et al.*, 1998) bestätigt werden. Aufgrund dessen wurde das Erdnuss- Allergen als Vergleichsmolekül zum Tomatenvicilin verwendet. Zum einen liegt eine hohe Sequenzübereinstimmung vor und zum anderen ist das Ara h 1- Allergen gut charakterisiert. Die Strukturmodelle wurden mit dem Programm MODELLER aus den Primärstrukturen des Tomatenvicilin (AM932874) und dem Ara h 1- Allergen erzeugt. Nach der Erstellung eines Strukturalignments konnte eine Strukturähnlichkeit zwischen den Proteinen Ara h 1 (Erdnuss) und AM932874 (Tomate) deutlich gezeigt werden (siehe Abbildung 28:A, Seite 62). Die erzeugte Struktur für das Ara h 1- Allergen zeigt eine Übereinstimmung mit dem dreidimensionalen Modell zur Epitopsuche aus der Shin Studie (Shin et al., 1998). Das erzeugte Ara h 1- Modell in dieser Arbeit konnte im Vergleich zum Ara h 1- Modell aus der Shin- Studie energieärmer und somit wirklichkeitsgetreuer modelliert werden. Diese Aussage kann durch den Ramachandran Plot bestätigt werden (siehe Abbildung 28:B, Seite 62). In der Shin Arbeit konnten 309 AS, dagegen im Modell 432 AS von insgesamt 574 AS des Ara h 1- Allergens, in den favorisierten Bereichen, modelliert werden (siehe Tabelle 8) (Shin et al., 1998). Im Shin- Modell des Ara h 1- Allergens wurden die Epitope 10 bis 21 dargestellt. Die Epitope 1 bis 9 konnten im Modell nicht gezeigt werden, da es nicht möglich war, den C- terminalen Bereich zu modellieren. Dies ist jedoch in dieser

Arbeit gelungen (Shin et al., 1998). Zum Strukturvergleich zwischen Ara h 1 und dem Tomatenvicilin wurden die Epitope 3, 4, 7, 10, 11, 12, 13 und 14 verwendet (siehe Abbildung 30, Seite 64). Die Epitope 15 bis 22 wurden hier nicht gezeigt, da diese im N-terminalen variablen Loop-Bereich der Modelle lokalisiert sind und nicht mit dem Tomatenvicilin-Modell alignierten. Da Loops generell sehr variable und bewegliche Proteinbereiche sind, könnte durch manuelle Modellierung dieses Bereichs die Alignierung verbessert werden. Zum Strukturvergleich beider Vicilinproteine war die Darstellung der Epitope 3, 4, 7, 10, 11, 12, 13 und 14 ausreichend.

Dass einige Epitope des Ara h 1-Allergens vornehmlich im N-terminalen Loop auftreten, konnte auch in der van Boxtel Studie von Pepsin-resistenten Epitopen des Ara h 1-Allergen gezeigt werden. Die Pepsin-resistenten Epitope befinden sich insbesondere im N-terminalen Teil des Proteins (van Boxtel et al., 2008). Dieser Proteinbereich weist kaum Homologien zu anderen Vicilinproteinen auf und wurde aus diesem Grund in der Epitop-Untersuchung von Shin nicht berücksichtigt (Shin et al., 1998). Es wird vermutet, dass dieser stringente N-terminalen Loop-Bereich dem Ara h 1-Allergen seine allergene Eigenschaft verleiht (van Boxtel et al., 2008).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Epitope meist in Loopbereichen lokalisiert vorliegen, da diese sich meist an der Oberfläche und in ihrer Struktur variabel verändern können (Pacios et al., 2008). Beispielsweise ist ein sogenannter P-Loop in Allergenen als Epitop bekannt. Der P-Loop konnte in Profilinallergenen, wie z.B. dem Birkenallergen Bet v 1 (ASB 46 – 54) oder dem Kirschprofilin Pru a 1 identifiziert werden. Dieser weist eine hoch konservierte Glycin-reiche Region, gefolgt von einem Lysin Rest auf (GXGGXGXXK) (Scheurer et al., 1999).

Folglich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass beide Vicilinproteine AM932874 (Tomate) und Ara h 1 (Erdnuss), sowohl eine hohe Sequenzhomologie (66.5 %) als auch eine Strukturähnlichkeit zu einander aufweisen. Diese konnte aufgrund eines Strukturalignments (siehe Abbildung 28:A, Seite 62) und einer putativen Epitopverteilung (siehe Abbildung 30, Seite 64) erstmals gezeigt werden. Somit geben diese Strukturuntersuchungen erste Hinweise darauf, dass es sich bei dem in dieser Arbeit identifizierten Tomatenprotein Vicilin (AM932874) möglicherweise, um ein putatives Allergen nach den Vorschriften der FAO/WHO handelt (WHO, 2001a, b).

Ferner ist bekannt, dass die Mehrzahl IgE-vermittelter Nahrungsmittelallergien im Erwachsenenalter durch kreuzreagierende Allergene hervorgerufen werden. Ähnliche Molekülstrukturen in Inhalations- und Nahrungsmittelallergenen bedingen die Bildung kreuzreagierender IgE-Antikörper (Henzgen M, 2004). Wie bereits in Kapitel 1.5 aufgezeigt, können Kreuzreaktionen zum einen durch Sequenzhomologien zweier unterschiedlicher Proteine ausgelöst werden, d.h. die Allergene mit dem höchsten Grad an Aminosäurehomologie reagieren am wahrscheinlichsten kreuz, zum anderen kann es zu einer Kreuzerkennung von Allergenen kommen, wenn eine strukturelle Homologie vorliegt. Eine Kreuzallergie ist somit immer eine Folge einer bereits vorhandenen Allergie. Kreuzreaktionen von IgE-Antikörpern basieren auf der Reaktivität mit homologen Strukturen, die mit dem eigentlichen Auslöser der IgE-Antwort, dem Immunogen, Ähnlichkeit besitzen. Bei Proteinen gleicher Funktion können die Strukturen auch zwischen Organismen, die nur eine geringe phylogenetische Verwandtschaft aufweisen, noch hoch konserviert und damit auch kreuzreaktiv sein. Ein Beispiel dafür sind die Profiline, die in sämtlichen eukaryotischen Zellen, die an der Regulation der Aktinpolymerisation beteiligt sind, als Regulatoren der Muskelkontraktion beteiligt sind (Radauer *et al.*, 2006; Sankian *et al.*, 2005). Vielfach wird die Meinung vertreten, dass klinisch relevante Kreuzreaktionen bei Proteinen mit einer Aminosäure-Sequenzidentität von weniger als 50 % nicht mehr zu erwarten sind. Dem widersprochen wird jedoch durch den Befund, dass beispielsweise die Hauptallergene Api g 1 aus Sellerie sowie Dau c 1 aus Karotten weniger als 40 % Sequenzidentität mit dem Bet v 1-Allergen aus Birkenpollen aufweisen. Es ist daher davon auszugehen, dass in Einzelfällen auch klinisch relevante Kreuzreaktionen zwischen gering verwandten Proteinen auftreten können.

Zur Tomate sind eine Reihe kreuzreaktiver Reaktionen bekannt (Ortolani *et al.*, 1998). Die Beobachtung, dass Allergien gegen Früchte, Nüsse und Gemüse v.a. Birkenpollen vermittelt entstehen, trifft für mediterrane Länder nicht zu (Pastorello *et al.*, 1999a; Sanchez-Monge *et al.*, 1999b). Im Gegensatz zu Zentral- und Nordeuropa können Patienten aus mediterranen Ländern auch unabhängig von einer Birkenpollen-Sensibilisierung Allergien auf Früchte wie Pfirsich (Pastorello *et al.*, 1999a; Sanchez-Monge *et al.*, 1999b), Apfel (Pastorello *et al.*, 1999b; Sanchez-Monge *et al.*, 1999b), Aprikose (Pastorello *et al.*, 2000), Pflaumen (Pastorello *et al.*, 2001), Tomate (Asero *et al.*, 2007b) und Reis (Asero *et al.*, 2007a) entwickeln.

IgE- Antikörper dieser Patienten sind gegen ein kleines und sehr stabiles Allergen (6– 10 kDa), das sogenannte nicht- spezifische Lipid- Transfer Protein (nsLTP), gerichtet (Lleonart et al., 1992). Das nsLTP- Protein ist in der Tomatenfrucht als Lye 3 Allergen bekannt (6kDa, gi2497745). Verschiedene nsLTPs, die aus Mitgliedern der Familie der *Prunoideae* isoliert wurden, zeigen untereinander eine hohe Aminosäuresequenz- Identität und sind verantwortlich für die klinisch häufig beobachtete Kreuzreaktivität zwischen *Prunoideae*- Früchten. In einigen Studien wurde nach einer möglichen Kreuzreaktivität zwischen nsLTPs aus Lebensmitteln und Pollen gesucht (Asero et al., 2000; Duro et al., 1997). Eine partielle Kreuzreaktivität wurde zwischen nsLTP aus Pfirsich, Apfel und Aprikose sowie Beifuss, Kastanien und Parietaria Pollen beschrieben. Eine Kreuzreaktivität zu Gras- oder Birkenpollen trat nicht auf (Costa et al., 1994; Costa et al., 2000; Duro et al., 1997; Pastorello et al., 1994). Aufgrund der Beobachtung, dass Sensibilisierungen auf Früchte der *Rosaceae*- Gewächse (z.B. Pfirsich, Aprikose, Kirschen usw.) unabhängig von einer Pollensensibilisierung auftreten, geht man heute – zumindest bei einem Teil der Patienten – von einer direkten Sensibilisierung gegen nsLTP über den Gastrointestinaltrakt aus. Die klinische Bedeutung der nsLTP ergibt sich aus ihrer ausgeprägten Resistenz gegenüber Hitze, Säure und proteolytischem Verdau. Aufgrund der Untersuchungen zur nsLTP- Sensibilisierung wurde zum ersten Mal gezeigt, dass Sensibilisierungen auf Lebensmittelallergene einem gewissen geographischen Muster entsprechen. Gleichmaßen waren in einer anderen Studie nur gerade 3 % von 101 deutschen Kirschenallergikern gegen Kirschen- nsLTP sensibilisiert (Scheurer et al., 2001a). Auch in einer Multicenterstudie, die in Kopenhagen, Zürich und Milano durchgeführt wurde und 65 Patienten mit Haselnussallergie einschloss, wurde nsLTP nur von Patienten aus Italien, nicht aber aus Dänemark oder der Schweiz erkannt (Pastorello et al., 2002). Besonders wichtig war die Beobachtung, dass eine Sensibilisierung gegen nsLTP mit schwereren Allergiesymptomen assoziiert ist (Asero et al., 2000; Ballmer-Weber et al., 2002; Pastorello et al., 2002). Patienten mit einer *Rosaceae*- Allergie, die auf einer Sensibilisierung gegen nsLTP beruht, weisen gehäuft auch eine Anamnese allergischer Reaktionen gegen Lebensmittel außerhalb der *Rosaceae*- Familie auf. Der heutige Wissensstand deutet darauf, dass nsLTPs klinisch relevante Panallergene sind und entsprechend zu Kreuzreaktionen zwischen phylogenetisch nicht verwandten Lebensmitteln führen können (Asero et al., 2002).

Tomatenallergene scheinen weiterhin eine wichtige Rolle beim „Latex- Frucht- Syndrom“ zu spielen (Garcia Ortiz *et al.*, 1998; Reche *et al.*, 2001). Dieses Syndrom stellt eine weitere Form einer durch Inhalationsallergie vermittelten Lebensmittelallergie dar, die während der letzten Jahre zunehmend an Bedeutung gewonnen hat (Blanco *et al.*, 1994). Risikogruppen, die eine Latexallergie erwerben, umschließen v.a. medizinisches Personal, Arbeiter in Latexfabriken und Kinder mit multiplen operativen Eingriffen (Poley & Slater, 2000). Die Latexallergie äußert sich meistens in Form einer Kontakturtikaria, d.h. Rötung, Juckreiz und Schwellung im Bereich des Kontaktareales (z.B. Hände beim Tragen von Latexhandschuhen) oder mit Atembeschwerden bei Einatmung von latexbeladenen Staubpartikeln. Dabei reagierten 50 – 70 % der Latexallergiker kreuz auf Nahrungsmittelallergene aus der Banane, Avocado, Kiwi, Papaya, Pfirsich, Aprikose, Weintrauben, Ananas, Kartoffeln und Tomaten (Blanco *et al.*, 1999; Diaz-Perales *et al.*, 1999; Sanchez-Monge *et al.*, 1999a; Wagner *et al.*, 2004). In einer Studie an 137 Patienten mit einer gut dokumentierten Latexallergie wurden die Seren nach spezifischen IgE-Antikörper gegen Früchte untersucht. Als kreuzreagierendes Protein konnte dabei ein Chitin- bindendes Protein mit einer Hauptkomponente von 31 kDa isoliert und aufgrund der N- terminalen Sequenzanalyse als Endochitinase vom Typ I identifiziert werden. Kürzlich wurde Latexprofilin, Hev b 8, rekombinant hergestellt (Ganglberger *et al.*, 2001), und damit eine weitere mögliche Kreuzreaktivität zwischen Pollen, Latex und pflanzlichen Lebensmitteln (Grob *et al.*, 2002) aufgezeigt. In der Tomate wird ebenfalls eine Chitinase als Allergen vermutet (Wagner & Breiteneder, 2002).

Weiterhin wird die Tomatenallergie häufig mit inhalativen Allergenen, wie z.B. Gräser-, Birken und Beifußpollen, in Zusammenhang gebracht (siehe Tabelle 2) (De Martino *et al.*, 1988; Foetisch *et al.*, 2003; Hannuksela *et al.*, 1977; Vieths *et al.*, 2002; Westphal *et al.*, 2004b). Vom Lyc e 1– Profilin- Allergen der Tomate ist bekannt das es in der pollenassozierten Nahrungsmittelallergie eine große Rolle spielt. Profileine finden sich in fast allen eukaryotischen Zellen. Diese sind evolutionär stark konservierte Allergene mit ausgeprägter Kreuzreaktivität. Patienten mit einer Profilin- Sensibilisierung zeigen typischerweise eine polyvalente Pollensensibilisierung und reagieren im Hauttest mit einer sehr großen Zahl an Nahrungsmitteln.

Ferner wurden Untersuchungen der Kreuzreaktivität zur Überprüfung des oralen Allergiesyndroms auf verschiedene Nahrungsmittel durchgeführt. In einer

Studie von Asero et al. wurden mittels Hauttestung (SPT) 298 Patienten, die eine Sensibilisierung gegenüber *Rosaceae* (n= 237) und/ oder gegen Nüssen (n= 161) aufweisen, auf 15 Gemüseextrakte untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass Patienten, die ausschließlich eine Graspollen- Allergie und gegenüber Walnussextrakt eine IgE- Reaktivität aufweisen, zu 88% mit Erdnuss und zu 75% mit Tomate kreuzreagieren (Asero, 1999). In einer Untersuchung von Martino et al. wurden 102 Kinder, die gegen Graspollen monosensibilisiert sind auf 32 Nahrungsmittelallergene untersucht. Dabei konnte die höchste IgE- Reaktivität gegenüber Tomate (39.2 %) und Erdnuss (22.5 %) gemessen werden (De Martino et al., 1988). Allerdings scheinen Profilin- Sensibilisierungen nur bei einem kleinen Teil der Sensibilisierten und nur gegenüber einer limitierten Zahl von Nahrungsmitteln klinisch relevant zu sein. Die genaue Ursache für diese limitierte Reaktivität ist jedoch unklar. Profiline könnten eine besonders häufige Ursache für mäßig schwere orale Reaktionen auf Tomate, Paprika, Banane und Melonen sein (Asero *et al.*, 2003; Radauer *et al.*, 2006; Westphal *et al.*, 2004a). Dieses Pollen- Nuss- Obst- Syndrom (Jacquenot S, 2007; Ortolani *et al.*, 1998; Ortolani *et al.*, 1989) könnte somit auf vorhandene Profilin- Allergene oder auf bisher unbekannte Allergene zurückzuführen sein. Da Tomaten Legumin und Vicilin eine sehr hohe Sequenz- und Strukturhomologie zu Nuss- Allergenen aufweist, könnte dies durch eine Kreuzreaktion ausgelöst worden sein (siehe Tabelle 5, Seite 55). Es ist bekannt, dass Nüsse, Samen und Kerne aufgrund von Strukturverwandtschaft mit Pollen häufig zu allergischen Reaktionen führen (Senti, 2000). Dazu können leider keine konkreten Aussagen getroffen werden, da die in dieser Arbeit verwendeten Seren nicht auf Nussextrakt im CAP- Test untersucht wurden. Jedoch ist bei allen Patienten eine Gräser- Sensibilisierung vorhanden.

7 Ausblick/ Zusammenfassung

Die Nahrungsmittelallergie ist gekennzeichnet durch eine spezifische Überempfindlichkeit gegenüber Stoffen, die in der Nahrung enthalten sind und mit ihr aufgenommen werden. Daraufhin werden im Organismus Antikörper (hauptsächlich der Klasse IgE) gegen das Fremdprotein produziert.

Die Prävalenz einer Tomatenallergie tritt in 1.5 % (Wüthrich, 1993) bis 20.6 % (Ortolani et al., 1988) der Nahrungsmittelallergiker in verschiedenen Populationen auf (Diaz-Perales et al., 1999). Bisher sind folgende Allergene der Tomate bekannt: ein Profilin (14 kDa), eine Polygalacturonase (46 kDa), eine β -Fruktofuranosidase (50 kDa), eine Superoxid Dismutase (18 kDa) sowie eine Pektinesterase (14 kDa) (Kondo et al., 2001). Um neue IgE-reaktive Tomatenproteine zu identifizieren, wurde in dieser Arbeit eine multidimensionale Proteinfractionierungstechnik mit anschließender LC-MS/MS angewendet. IgE-reaktive Tomatenproteine konnten mittels Immunoblot-Technik detektiert werden. Dazu wurden 18 verschiedene Tomaten-sensibilisierte Patientenserum verwendet, die mittels Hauttestung und spezifischer IgE-Messungen bestimmt wurden. Durch diese Untersuchungsmethode konnten zwei bisher unbekannte IgE-reaktive Proteine – ein Legumin (30 und 17 kDa) und ein Vicilin (65 kDa) detektiert werden.

Weiterhin wurde die vollständige Nukleotidsequenz des Tomatenvicilins mittels EST-Alignierung und LC-MS/MS-Peptidzuordnung identifiziert. Diese Tomatenproteine weisen eine signifikante Sequenzhomologie zu bereits bekannten Allergenen auf. Zur näheren Charakterisierung der beiden Tomatenproteine wurden dreidimensionale Modelle erzeugt und diese mit bereits bekannten Allergenen der jeweiligen Proteine dieser Klasse verglichen. Zur putativen Epitopuntersuchung der IgE-reaktiven Tomatenproteine dienten Strukturalignierungen zu bekannten Allergenen-Epitopen.

Die Proteine Legumin und Vicilin der Tomatenfrucht wurden bisher nicht mit einer Nahrungsmittelallergie in Zusammenhang gebracht, jedoch sind Proteine dieser Klasse aus anderen Organismen bekannt. Um diese Proteine genauer auf eine eventuell vorhandene Allergenizität zu untersuchen, wurde die Methode der computergestützten Proteinmodellierung verwendet. Dadurch konnte gezeigt werden, dass durchaus eine Strukturhomologie zu bekannten Allergenen dieser Proteinklasse

vorliegt. Weiterhin konnten auch Vermutungen über die Lokalisation von Epitopen mit dieser Methode getroffen werden.

Da die Zahl der Allergierkrankungen eine steigende Tendenz aufweist (Ring, 2006; Steinke *et al.*, 2007), ist es unabdingbar in Zukunft die Funktions- und Entstehungsweise von Nahrungsmittelallergien besser zu verstehen. Dabei spielt die Kreuzreaktivität eine große Rolle. Dass bestimmte Proteine miteinander kreuzreagieren ist seit längerem bekannt (siehe Tabelle 2, Seite 11). Die Entstehungsweise einer Kreuzreaktion ist jedoch bis jetzt nicht vollständig geklärt. Hinsichtlich der Kreuzreaktivität der Tomate könnten beispielsweise weitere Untersuchungen mit rekombinanten Legumin- und Vicilinproteinen durchgeführt werden, um die Relevanz dieser putativen Allergene genauer bewerten zu können.

Allgemein kann man sagen, dass der Erkenntnisstand in Hinblick auf die Bestimmung von Allergietypen aufgrund von verbesserten und neuen Technologien zunimmt, die Prävention von Allergien jedoch noch unmöglich ist. Somit ist es notwendig neue Technologien zur Früherkennung und Vermeidung solcher Allergien zu entwickeln. Eine detaillierte Identifizierung von Allergenen ist jedoch dafür die Voraussetzung.

Mit dieser Arbeit wurde die Frage aufgeworfen, inwieweit ähnliche Proteine zur Ausbildung einer Nahrungsmittelallergie beitragen. Um die hier erbrachten Ergebnisse zu untermauern sind weitere zuverlässige Methoden notwendig. Eine zuverlässigere Methode könnte beispielsweise die Testung isolierter Proteine in geringen Konzentrationen direkt am Patienten sein. In dieser Studie konnte die Testung von angereicherten, jedoch nicht vollständig isolierten Tomatenproteinen, an Tomatenallergikerblut und an Serum von Tomatenallergikern durchgeführt werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden geben erste Hinweise auf das Vorhandensein eines allergenen Potenzials bestimmter Proteine.

Da bekannt ist, dass das Samenspeicherprotein Vicilin im Gegensatz zum Legumin glycolysiert vorliegt, könnten in diesem Bereich weitere Test durchgeführt werden. Um die Apparenz potentiell vorhandener Kohlenhydratdeterminanten zu verifizieren, kann eine Deglycosylierung des Proteins mit nachfolgender immunochemischer Detektion durchgeführt werden, wie sie bereits von Besler *et al.* am Ovomuroid gezeigt wurde (Besler M, 1997). Diese Methode würde es zudem ermöglichen, die erhaltenen Fragmente hinsichtlich ihrer MG mittels Massenspektrometrie zu

bestimmen und dadurch eine Aussage über den Kohlenhydratanteil des Proteins zu machen, welche vermutlich eine große Rolle bei der Ausbildung einer Allergie spielen.

Summary

With a food allergy, the body reacts as if a particular food product is harmful. As a result, the body's immune system creates Immunglobulin (basically IgE) to fight the food allergen, the substance that triggers the allergy. The prevalence of adverse reactions to tomato in combination with sensitization ranges from 1.5 % (Wüthrich, 1993) to up to 20.6 % (Ortolani et al., 1988) among patient populations with food allergy (Diaz-Perales et al., 1999), indicating that tomato is a relevant allergenic food. Profilin (14 kDa), Polygalacturonase (46 kDa), β -fructofuranosidase (50 kDa), superoxid dismutase (18 kDa) and pectinesterase (14kDa) were demonstrated to be the IgE binding allergenic proteins in tomato (Kondo et al., 2001). For the detection of novel tomato IgE- reactive proteins a multidimensional protein fractionation strategy and LC- MS/ MS was used. IgE- reactive tomato proteins were detected by IgE- immunoblotting using sera from 18 adult tomato sensitised patients selected based on a positive history skin prick test and specific IgE- levels. Two hitherto unknown legumin (30 and 17 kDa) and vicilin (65 kDa) proteins were identified as IgE- reactive tomato proteins showing a significant sequence homology to other previously reported food allergens. Expressed sequence tag- alignments combined with tryptic peptide coverage analysis revealed the full length of the vicilin protein in tomato with high homology to a walnut allergen. For a better inside of both tomato proteins and there allergic potential a structural 3D- modelling was performed in comparison to known allergens to get information about putative homolog epitope sites.

8 Anhang

8.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Tab. 1: Absorptionswerte zur Proteinkonzentrationsberechnung nach Bradford

BSA- Konzentration	1	0.5	0.25	0.125	0.075	Blank
Absorptionswerte [A]	0.324	0.262	0.247	0.195	0.18	0.114
	0.318	0.267	0.262	0.218	0.184	0.114
[Mittelwert]-[Blank]	0.207	0.1505	0.1405	0.0925	0.068	0.114

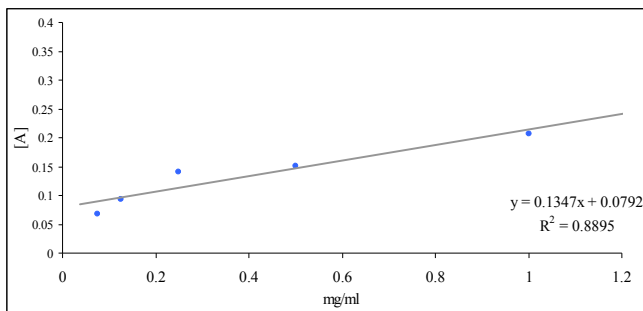


Abb. 1: Proteinstandardreihe zur Proteinkonzentrationsberechnung der Tomatenextrakte

Tab. 2: Proteinextraktion- Berechnung der Tomatenextrakte

Tomatenbestandteil	Absorption [A]	Mittelwert [A]	Proteinkonzentration [mg/ ml]	Eingesetztes Volumen [µl] entsprechen 100 µg Protein
Fruchtfleisch	0.323	0.1465	1	100
	0.283			
Plazenta	0.227	0.0715	0.45	220
	0.229			
Pulpa	0.472	0.292	2	50
	0.425			
Schale	0.232	0.076	0,5	200
	0.233			
Samen	0.367	0.214	1.5	65
	0.374			
Blank	0.155	0.1565		
	0.158			

Tab. 3: Proteinberechnung der CF- Fraktionen

Fraktion	Absorption [A]	Mittelwert [A]	Proteinkonzentration [mg/ ml]
1	0.623	0.4994	0.28
	0.6758		
2	0.547	0.521	0.328
	0.494		
3	0.4108	0.4371	0.172
	0.463		
4	0.453	0.4264	0.152
	0.4		
5	0.406	0.4318	0.162
	0.458		
6	0.392	0.4179	0.136
	0.444		
7	0.437	0.4104	0.122
	0.383		
8	0.434	0.4072	0.116
	0.38		
9	0.497	0.4607	0.216
	0.424		
10	0.49	0.51577	0.319
	0.531		
11	0.621	0.5933	0.464
	0.563		
12	0.572	0.5463	0.376
	0.52		
13	0.436	0.4093	0.12
	0.381		
14	0.45	0.4264	0.152
	0.42		
15	0.388	0.4147	0.13
	0.441		
16	0.384	0.4104	0.122
	0.435		
17	0.382	0.35527	0.019
	0.327		
18	0.471	0.4446	0.186
	0.418		
19	0.453	0.4264	0.152
	0.411		
20	0.675	0.499	0.568
	0.623		
Blank	0.1545	0.15	
	0.159		

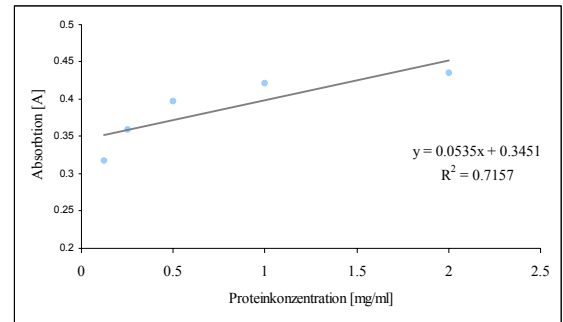


Abb. 2: Proteinstandardreihe zur Proteinkonzentrationsberechnung der CF-Fraktionen

8.2 Charakterisierung verwendeter Patientenserum

Tab. 4: Einteilung der EAST-Klassen

EAST- Klasse	IgE- Gehalt [ku/ l]
EAST Klasse 0	0 – 0.35
EAST Klasse 1	0.35 – 0.70
EAST Klasse 2	0.70 – 3.50
EAST Klasse 3	3.50 – 17.50
EAST Klasse 4	>17.50

Tab. 5: Verwendete Patientenserum

Serum- nummer	Alter	Geschlech	Gesamt IgE [kU/l]	Gräser IgE [kU/l]	Beifuss IgE [kU/l]	Birke IgE [kU/l]	Karot- te IgE [kU/l]	EAST- Klasse Tomate IgE [kU/l]	Tomate Skin Prick
1	40	M	114	20.9	11.7	30.4	1.61	2 - 2.02	Positiv
2	41	M	184	43.6	0	29.3	0	n.b.	Positiv
3	43	M	51.1	4	1.82	24.3	0	n.b.	Positiv
4	38	M	167	14	0	41	1.57	n.b.	Positiv
5	18	F	383	69.7	0.48	37.1	3.51	2 - 0.82	Positiv
6	18	F	234	n.b.	0.57	n.b.	n.b.	n.b.	Positiv
7	38	F	167	14	0	41	1.57	1 - 0.4	Positiv
8	36	F	405	2.71	0.43	100	0.96	2 - 1.57	Positiv
9	31	F	114	0	0	0	0	1 – 0.35	Negativ
10	36	F	521	n.b.	n.b.	n.b.	20.3	3 - 17.3	n.b.
11	56	F	57.7	n.b.	n.b.	n.b.	5.82	3 - 6.87	n.b.
12	26	M	334	88	0.5	0	0	n.b	Positiv
13	40	M	79.4	13.3	0	0	0	n.b	Positiv
14	58	F	57.2	3.22	0	1.42	0	n.b	Positiv
15	43	F	328	52.5	0	0	n.b.	n.b	Positiv
16	28	F	271	n.b.	n.b.	n.b.	3.56	2 - 2.83	n.b.
17	33	M	65.9	n.b.	n.b.	n.b.	0.35	0.35	n.b.
18	36	F	255	2.04	3.21	2.97	1.15	n.b.	Positiv
K	26	F	15.5	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	Negativ

8.3 LC- MS/ MS- Proteomics Ergebnisse

Tab. 6: LC-MS/ MS- Analyse verschiedenen Tomatenproteinextrakte

Accession Nummer	Proteinbezeichnung	Peptidsequenz	Ladung	Xcorr	Peptid Nr.
Fruchtfleisch					
TC154181	ähnlich zu UP Q9MB49 (Q9MB49) DIP-1	YVQNNPPDLIPEEDR	2	4.9125	2
		GNLIVEYPGTDPK	2	3.6889	
TC154577	Suberization-associated anionic peroxidase 2	NSATKISLSVK	2	2.4056	1
TC162057	Pectinesterase 1	LIQGGSWLR	2	2.7357	1
TC153570	similar to guanine nucleotide dissociation stimulator (Homo sapiens;)	LDETQGIGQYVEK	2	4.7654	1
TC161916	homolog zu UP Q7Y1A0, 25 kD protein dehydrin	K.VNVSEEVK.E	2	4.0018	1
TC162694	Pathogenesis-related protein	LDTNGLGYQR	2	3.4301	1
TC162738	Profilin 1	YMVIQGEFVIR	2	3.0263	1
TC154544	endosperm-specific protein-like protein	YDLAVSTEGDQVTLDTGVDSSR	2	3.0263	1
Plazenta					
TC153771	meloidogyne-induced giant cell protein	EGGGGGYGGGGYGGGR	2	3.8522	2
		EGGGGGYGGGGYGGGR	2	3.607	
AW621709	no description	VRNNIWEEEQER	2	2.0678	2
		VRNNIWEEEQER	3	3.3985	
TC162023	All induced protein	LFGVRVSELDK	2	2.7936	1
TC153761	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog	VPQIFVLPPK	2	3.6244	2
		QFFEQDNEVK	2	2.5049	
TC153795	UP ADH2_LYCES (P28032) Alcohol dehydrogenase 2 , complete	THPLNFLNER	2	2.4594	2
		GTFFGNYKPR	2	2.4426	
TC162185	Fruit-specific protein	EKTDQYGLTYR	2	3.5564	3
		TDQYGLTYR	1	2.209	
		TDQYGLTYR	2	3.1098	
Pulpa					
TC153771	meloidogyne-induced giant cell protein mRNA	EGGGGGYGGGGYGGGR	2	3.895	2
		EGGGGGYGGGGYGGGR	2	3.3212	
TC161907	Acid beta-Fruktofuranosidase precursor	GNPVLVPPPGIGVK	2	2.5131	4
		TNGLDTSYNGPGVK	2	4.3512	
		NWMNDPNGPLYHK	2	4.0142	
		QVDLQPGSIELLR	2	3.7232	
TC158002	homologue to UP Q8LSK6 (Q8LSK6) Ascorbate peroxidase, complete	IMQKLM*QSATLVLNLIR.	2	2.6128	1
TC155052	similar to UP Q9LQT4, partial (68%)	VNLIDVHRITFLVK	3	3.4777	1
TC154624	Polygalacturonase inhibitor protein precursor	TSQVIDLSR	2	3.1337	2
		IFGSLPPGLK	2	2.6108	
TC153761	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	GLVDSGITK	2	2.3851	2
		QFFEQDNEVK	2	2.3391	
Schale					
TC162185	Fruit-specific protein	TDQYGLTYR	1	2.3435	3
		TDQYGLTYR	2	3.3933	
		EKTDQYGLTYR	2	3.0945	
TC166252	Plastidic cysteine synthase 2	QPQDTLNVSCILGLAGLSNCR	2	2.9576	1
TC154066	Wound-induced proteinase inhibitor I precursor	LIDNILVVVQIPR	2	2.5522	1
TC153553	Pathogenesis-related protein PR-1	QVGVGPMWTDNR	2	3.07	1
TC164904	UP IER1_LYCES (P20076) Ethylene-responsive proteinase inhibitor I precursor, complete	LFVNLDDIVVQTPK	2	5.2147	1
TC161909	Basic beta-1,3-glucanase	WFTDPIVGFLR	2	3.2247	2
		HFGMFSNPK	2	2.7375	

Accession Nummer	Proteinbezeichnung	Peptidsequenz	Ladung	Xcorr	Peptid Nr.
Samen					
TC164469	Vicilin	IVFGFVDAENNK	2	4.3596	4
		IVFGFVDAENNK	1	2.7993	
		SNNPYLFESQR	2	3.4303	
		EQEQEQEEGDVHYQK	2	4.8224	
AI772558	no description	LKIVDVNQKLM*GDLR	2	2.6498	1
BG126832	similar to GP 15450599[gb], partial (20%)	SQRLVQKNVILIK	2	3.352	1
AW930142	Late embryogenesis abundant protein D-7 (LEA D-7),	HGDEVVVEQQISK	2	4.3845	1
TC154201	UP P93787 (P93787) 14-3-3 protein, complete	LVIGSGSSELVEER	2	2.8723	1
TC168085	transferase family protein, partial (60%)	VFNLKPFPPKQK	2	2.9372	1
TC156005	Legumin-like protein, partial (64%)	SNQLDQNFRR	2	2.4939	1
TC153878	Pathogenesis-related protein STH-2, complete	NVETEGDGSIK	2	2.7815	1
TC169589	11S globulin, partial (33%)	KTIKLVVWNLTK	2	3.1088	1

Tab. 7: LC- MS/ MS- Analyse der IgE- reaktiven und nicht reaktiven Banden nach einer CF- Fraktionierung

Accession Nummer	Proteinbezeichnung	Peptidsequenz	Ladung	Xcorr	Peptid Nr.
65kD band					
TC164469	weakly similar to UP Q9ZWI3 (Q9ZWI3) PV100	IVFGFVDAENKKK	2	2.7573	2
		QDQSYFVAGPEHR	2	2.7343	
		GNLNVGDVLPVAGHPITFVATGNSNLR	2	3.3943	
BE458586	Vicilin GC72-A precursor (Alpha-globulin A)	SNNPYLFESQR	2	2.7648	3
		LFAGSNVYLLNK	2	2.928	
		SVNAPGNLQEYFSAGGQNPESFYR	2	3.8037	
TC161869	Elongation factor 1-alpha (EF-1-alpha)	LPLQDVYK	2	2.4024	3
		IGGIGTVPVGR	2	3.5341	
		VETGVIKPGMVVTFGPTGLTTEVK	3	4.9154	
TC162433	heat shock protein (Type I)	SSSMFDPFSIDVDFPFR	2	4.8091	2
		ASMENGLTVTVPK	2	2.2462	
TC164140	expressed protein	DYFICTGPASMLVPLVINPGEEWR	2	2.9859	2
		DYFICTGPASMLVPLVINPGEEWR	3	3.9934	
17kD band					
TC156005	Legumin-like protein	HVNSQNFPILR	2	3.119	7
		AGQNGFEFAVFR	2	3.2199	
		AGQNGFEFAVFR	2	3.4129	
		VNQGEMFVVPQYYASTVK	2	2.8054	
		GDAQVQVVDHTGQQVMNDR	2	3.4333	
		AMPIEVLTNAYQISPNEAQR	2	3.731	
		AMPIEVLTNAYQISPNEAQR	3	4.3222	
		ISTVNSNSLPLVNLWQLSAER	3	4.785	
		ISTVNSNSLPLVNLWQLSAER	2	3.8364	
		TNDNAMISPLAGR	2	4.2642	
TC169589	11S globulin, partial	SVFDDQVR	2	2.1251	8
		KAGEQGLDYIAFK	1	1.8844	
		KAGEQGLDYIAFK	2	3.5704	
		FNRDELSVFGPGAR	2	3.6754	
		FNRDELSVFGPGAR	3	3.4429	

Accession Nummer	Proteinbezeichnung	Peptidsequenz	Ladung	Xcorr	Peptid Nr.
TC168461	11S globulin	GTGQIQVVGDTGNSVFDDEV	2	5.3313	8
		TNDEAITSALAGR	2	4.3359	
		QMIVVPQNFAIMK	2	2.0694	
		AMPEEVLMSYQISR	1	1.9815	
		KAGDQGLEYIAFK	2	4.1223	
		KAGDQGLEYIAFK	3	3.5156	
		AGDQGLEYIAFK.	1	2.4887	
		AGDQGLEYIAFK.T	2	2.1674	
TC153878	Pathogenesis-related protein STH-2	KINFVEGGPIK	2	1.9378	3
		ALVIDGDNLIPK	2	3.3208	
		INFVEGGPIKYLK	2	1.9483	
30kD band					
TC156005	Legumin-like protein	SNQLDQNF	2	2.0199	2
		LVYIEQGR	2	2.035	
TC158893	Seed storage protein Lec2SA1 large chain	VVQEEQTGKVQGR	2	1.93	2
		VVQEEQTGKVQGR	3	2.6185	
TC164188	ypersensitive response assisting protein	FKTPIQYFNR	3	1.7004	2
		VQNIIVPR	2	2.9069	
AW930142	Late embryogenesis abundant protein D-7 (LEA D-7)	ITDTASGTGQYVAGNLK	2	2.6132	2
		DKITDTASGTGQYVAGNLK	3	3.449	

Tab. 8: LC- MS/ MS- Analyse der IgE- reaktiven Banden nach einer zweidimensionalen Fraktionierung

Accession Nummer	Protein	Peptidsequenz	Ladung	Xcorr	Peptid Nr.
65kD band					
AM932874	Vicilin	GRTQGGPFNLM*K	2	2.1926	10
		SNNPYLFESQR	2	2.7999	
		GGGVINIAEQDNK	2	3.4311	
		IVGFGVDAENKK	2	3.6676	
		QDQSYFVAGPEHR	2	2.8716	
		QDQSYFVAGPEHR	3	3.5279	
		LFVYVLAK	2	2.2196	
		LVMVIEGNAR	2	2.711	
		EVEEIFQR	2	2.6038	
		NSFNLQKGDVIR	2	2.814	
30kD band					
TC156005	Legumin-like protein (α -chain)	AFYLAGGVQETSGR	2	2.6927	11
		LVYIEQGR	1	1.9012	
		LVYIEQGR	2	1.5452	
		SNQLDQNF	2	2.9054	
		LTGSQPSQR	2	1.8133	
		NVIRQNSLSLPNFHPM*PR	3	4.4289	
		QNSLSLPNFHPM*PR	2	2.7236	
		QNSLSLPNFHPM*PR	3	3.0206	
		QSTQKFQNI	3	2.6102	
		FQNI	2	2.0641	
		QEEQNERGLIVNVR	3	3.4864	
17kD band					
TC156005	Legumin-like protein (β -chain)	GGESFLLSPQR	2	3.4553	5
		HVNSQNFPI	2	3.6679	
		IKHVNSQNFPI	3	3.5734	
		AMPIEVLTNAYQISPNEAQR	2	2.2502	
		TSSQPMNSQLAGYTSVIR	2	1.7107	
		AGQNGFEFAVFR	2	2.9657	

Tab. 9: Verwendete RP- Fraktionen und deren Retentionszeiten

Fraktion	Retentionszeit	Anzahl der vereinigten Fraktionen
1	23 – 24,6	2
2	24,6 – 27,8	4
3	27,8 – 30,2	3
4	30,2 – 31,8	2
5	31,8 – 32,6	1
6	32,6 – 34,2	2
7	34,2 – 36,6	3
8	36,6 – 37,4	1
9	37,4 – 39	2
10	39 – 39,8	1
11	39,8 – 41,4	2
12	41,4 – 43	2
13	43 – 43,8	1

8.4 Basophilen Test

Tab. 10: FACS- Werte zur CD203c Stimulierung

Konzentration des Stimuli	100ng/ml	10ng/ml	1ng/ml	Stimulierung der CD203c Expression [%]
Fraktion				
Fraktion 1	32.53	3.56	1.54	
Fraktion 2	48.01	24.36	4.37	
Fraktion 8	18.37	3.58	2.59	
Fraktion 9	12.03	1.52	1.65	
Ausgangsfraktion	72.40	59.38	58.98	
Unstimulierte Mastzellen				2.04
Stimulierte Mastzellen				44.4

8.5 Peptid- Epitop- Daten

1 SLAMAVSTRVLLA	47 RMAGEERCERRGN	93 RADEEEEFEGRS	139 KAGNGGFEFAVFR	1 SFSLTMAIFTKPK	48 QWEQEKSNPVL	95 GGQNPSPYRAPS	142 HLRGRRQSPWSRG
2 MAVSTRVLLALLF	48 GERGERRGNDQH	94 EEEEFEGRGRGQ	140 QNGFEFAVTRSS	2 LTMAITFKPLLF	49 OQEKSNPYLEFS	96 NPESFYRFPSSDI	143 RQSGPMSRGGGR
3 STRVLLALLFSFAF	49 RGERRGNDQKRV	95 EFEBGRGQRQKRV	141 FFPAVTRSSQPM	3 AIFKPLIFLTF	50 KNNPYLEFSQRF	97 SFRFASDILLES	144 QSPMSRGGGRQRE
4 VLLALLFSFAFLS	50 RKNVQKQVHRI	96 RGRSGRQGWAE	142 AVETTSQPMQDV	4 TKPLIFLIFLIL	51 NPYLFSQRFRSR	98 RAFSSDILLSAFN	145 WSRGQRQREREQ
5 ALLFSALLSAAN	51 NDKQKQVHRTKQ	97 SQRGRWAEVTC	143 RQSGRQMWLAG	5 KLLIFLILSLIV	52 LFSQFRFRFRFA	99 SSILLESANPFR	146 QGRQREREQE
6 FSALLSAANAYR	52 KQVHRTKQDVV	98 QRWAPVTCNGL	144 SQPMNQLAGTYS	6 FIFLILSLIVLV	53 SQRFRFRFRASGH	100 ILESANPFRDL	147 FEQRQREREQE
7 FLSAANAYRQVP	53 VHRTRQDVAIP	99 WVAEYTGNGLERN	145 MNSQLAGYSVIR	7 FLLSLIVLVSVQY	54 FRSFRASHGFR	101 SANFNPKLLEL	148 FEQRQREREQE
8 SAANAYRQVFPQ	54 IRQGVVAIPAGA	100 EYTGNGLEENICT	146 QLAGYSVIRAMP	8 LSILVLSVQYDQ	55 FRASHGDFRILE	102 NNPKLELRLEFG	149 QGRQREREQE
9 NAYRQVFPQGGQ	55 GVVVAIPAGAAH	101 NGLEENICTMKI	147 GYTSIRAMPVTF	9 VLVSVQYDQPMRQ	56 ASHGDFRILEFEN	103 RDLKLRIFGGHRE	150 EGQGVHVVQVIR
10 RQVFPQGGQGR	56 VAIPAGAAHWYCN	102 LEENICTMKIRTN	148 SVIRAMPVLEVTN	10 SVLVSVQYDQPMRQ	57 GOFRLLERPNQRS	104 LEALFGHGGEGII	151 EGQGVHVVQVIR
11 FQGGQGRQIP	57 PAGAHAHCINDGE	103 NICTMKIRTNMPT	149 RAMPILVITNAVYQ	11 VDNQNGRQDPTQE	58 RLLERNRQNGQLL	105 LFQGRHGGIIRA	152 VHYQKTRNGNAVQ
12 QGGRQGRSLPTO	58 AHWYCNHGEEEL	104 TMIKIRTNMPTQR	150 FIVITNAVYQISE	12 NPGYDQDQPKLR	59 ERFNRQSLLEGI	106 QKEGIIKASEE	153 QRIGKLNVOVLP
13 HGRSLPLTAQAU	59 WCNVNGEELAV	105 IRTNMPTQRADI	151 VLTNAVYQISNEA	13 GVDPQDKRLRQC	60 NRQSLLKGIERY	107 EGIIKASEEQR	154 RGNLNVGVVLP
14 RSLPLTAQQRCL	60 NDBEELAVAVSIN	106 NMDTQRADYISYR	152 NAYQISNEAQR	14 DQKRLRQCQR	61 SQLKGIERYVVA	108 TKASEEQRITAT	155 LNVOVLPVPMQ
15 PLTAQQRCLRQL	61 EELAVAVSINDH	107 TQRADYISYQAG	153 QISNEAQRKRM	15 EQLKGIERYVVALE	62 LKGIERYVVALE	109 ASEQRITRAISEA	156 GDVLPVPMQITVA
16 QQRCLRLTQTS	62 LVAVSINDHNS	108 RADIYQAGKRLK	154 FNEAQRKRMNNG	16 RECQRCRQCPG	63 IERYVVALELEP	110 EQRITRAISEHAS	157 LVPVPMQITVA
17 QRLRLTQTSQPS	63 VINDHNSRNL	109 IYQAGKRLKHN	155 AQLKRMNNGESE	17 QRCRQCPQKQK	64 YVVALELEPQSF	111 RAISEHASRSTQ	158 PMPVPMQITVA
18 LRQLTQTSQRTR	64 NDHNSRNLQDN	110 RQAGKRLKHNNS	156 LKRMNNGESL	18 RQCPQKQKQKQ	65 ALLEPQSFVLP	112 SEHASRSTQTFG	159 HPTVPMQITVA
19 LQTSQRTRISE	65 HNSRNLQDNFRA	111 GRLKHNNSQFFI	157 NGESLFLSPQR	19 QKQKQKQKQRQ	66 ELERQSFVLP	113 ASRSTQTRTQ	160 TVATGNSNLRV
20 SQRTRISEGGV	66 SNLQDNFRAFYL	112 HNSQFFILND	158 GDSLSPQRASE	20 QKQKQKQKQRQ	67 QSFVLPVLP	114 STQTRTQTFG	161 ATGNSNLRVQ
21 QRTRISEGGYTV	67 LDNQDNFRAV	113 NSQFFILNDM	159 FLQDQDQDQ	21 NQLKQKQKQK	68 FVLPVLPVLP	115 QTRTQTFGPNM	162 NSLRVQVDVA
22 ISRTRISEGVD	68 NFRVYLAGQVQR	114 NQFFILNDMS	160 SQRDQDQDQ	22 RQKQKQKQKQ	69 PHHCQVIAKQ	116 GRQDQDQDQ	163 LRVLVQVDVA
23 RQYTRISEVDNE	69 AFYLAGVQVETG	115 ILNDMSASQET	161 RSPQDQDQ	23 RQKQKQKQKQ	70 CDGAIYVVKQ	117 QGFNLKMPFV	164 VGFVDQDQ
24 YTRISEVDNEEQ	70 LAGVQVETSGROI	116 MDSASQETLVP	162 PQDQDQDQ	24 QVYVVKQVNTA	71 EAIYVVKQVNT	118 MKRPFVETQ	165 VDMRKNKFLA
25 VNEEQVQCVG	71 GVQVETSGRQIVG	117 MSASQETLVPAL	163 FVSHIYRQVNT	25 YVYVVKQVNTA	72 VYVVKQVNTA	119 RPFVETQVETQ	166 AWHNSNLQAG
26 ENEEQVQCVGVP	72 ETSGRQIVGQKS	118 SGTLVPALMSP	164 SHLGIYVQVNS	26 QKQVGGTGEDD	73 QGVNTIARQDK	120 RPFVETQVETQ	167 NKFLAGQKQ
27 EQVQCVGVPVRN	73 GRIQVGGTQCVG	119 TLPALMSPHNS	165 GTRVVOVSSLP	27 QHGQRTDQDQ	74 QGVNTIARQDK	121 FSRQGFVEARP	168 NLQKQKQKQ
28 QCVGVPVRNVIR	74 IGVGGTQCVRFQ	120 PALMSPHNSVHS	166 LVQVSSLPFAM	28 GEDDQDQDQ	75 INIARQDKNS	122 RQGFVEARPE	169 AKQNTNRNTD
29 GVPVRNVIRQNS	75 QGQTRQVFI	121 MSPHNSVHSV	167 QVSSLPFAMKQ	29 SEDDQDQDQ	76 RQDKNSFLKQ	123 QFVEARPEVQ	170 QNTRNTDRE
30 VPRNVIRQNSL	76 STQTRQVFI	122 PHSVHSVLYV	168 SLCFAMKQKRLV	30 GQDQDQDQ	77 DNKNSFLKQD	124 EARPVEVQRLD	171 WRNIDREKLSF
31 VIKNSLRLVHNS	77 KQVFI	123 SVHSVLYVQRC	169 FAKQKRLVFRS	31 NRQDQDQDQ	78 NSFVLQKQVIRL	125 PERYLQDRLDAA	172 IDREKLSFEMP
32 NSLRLVHNSLHNS	78 NFAVFI	124 GHSVLYVQRCG	170 MKQKRLVFRS	32 DQDQDQDQ	79 NLQKQVIRLQAG	126 YEQLDLDAVNGI	173 EKLQKLSFEMP
33 SLRHLVHNSLHNS	79 RNFVFI	125 VYVQRCGQVQ	171 ERLVFRKNESS	33 RQDQDQDQ	80 KQVIRLQAGD	127 RLDLDAVNGI	174 ELRQKLSFEMP
34 LHVHNSLHNSLHNS	80 NTLMAFVIV	126 VQRCGQVQVVDH	172 VFRKNESSCL	34 RQDQDQDQ	81 VRLQAGDQVLL	128 LDAVNGINING	175 FMPGVEEFQ
35 RHLVHNSLHNSLHNS	81 LMRNFVIV	127 GQVQVVDHTQ	173 SKNESSCLVFP	35 RQDQDQDQ	82 LFAGSVYLKND	129 AVGNINIQGVW	176 PGRVEELQRCQ
36 MRLVHNSLHNSLHNS	82 EAFNFI	128 QVQVVDHTQGVW	174 NESSCLVFPKSH	36 RQDQDQDQ	83 GNVYLLKNDNE	130 PGNINIQGVW	177 EVELIQRCQD
37 LVHNSLHNSLHNSLHNS	83 NIFVFI	129 VDHITQGVWVND	175 SCLVFPKSHPC	37 RQDQDQDQ	84 VYLLKNDNEKFL	131 INQGVWLYYNT	178 EIFQRCQDQV
38 FQVHNSLHNSLHNSLHNS	84 VEVFRQVQVQ	130 HQVQVNDVQ	176 VFPKSHPCSP	38 RQDQDQDQ	85 LKNDNEKFLVY	132 QNVYLYYNTK	179 QRQDQVQV
39 GHLVHNSLHNSLHNSLHNS	85 VRQVQVQVQV	131 QVNDVQVQV	177 RQKSHPCSP	39 RQDQDQDQ	86 DNKFLVYVQV	133 VLYYNTKST	180 DQVYVQVQ
40 LSVHNSLHNSLHNSLHNS	86 MQEQRHSLV	132 MNDVQVQV	178 HPCSPKSH	40 RQDQDQDQ	87 KFLVYVQVQV	134 VYNTKSTLVM	181 VYVQVQVQ
41 VNFHNSLHNSLHNSLHNS	87 EONERGLVNVRE	133 RVNQVQVQV	179 CSFSLKIBEST	41 RQDQDQDQ	88 VVYVQVQVQ	135 TKSTLVMTEGN	182 ACPHQRQVQ
42 FCAETQVQVQ	88 ERGLVNVREMS	134 GEMFVQVYAS	180 STCHIBESTGR	42 RQDQDQDQ	89 VLKSVNAPQV	136 TKLVNTEGNAR	183 EHRQREGEGR
43 ETQVQVQVQ	89 LVNVREMSVIR	135 VVQVYASVTK	181 KIBESTGRVYVW	43 RQDQDQDQ	90 KSVNAPQVQV	137 VVIVNTEGNAR	184 QRREGEGRQ
44 FQVQVQVQ	90 NVREMSVIRADE	136 VQVYASVTKAG	182 ESTGRVYVX	44 RQDQDQDQ	91 NQVQVQVQV	138 EGNARTEGNAR	185 ERREGEGRQ
45 QVQVQVQ	91 EGMVIRADEE	137 YASVTKAGQV	183 GYVYVXKINO	45 RQDQDQDQ	92 QVYVQVQVQ	139 NARTEGNARCP	186 ERQDQVYLS
46 QVQVQVQ	92 SMIRADEE	138 SVTKAGQVGEFA	184 YVXKINQVNSG	46 RQDQDQDQ	93 VYVQVQVQV	140 FEMACHLQVQ	187 RQDQVYLSL
				47 VVQVQVQVQ	94 FSAGQVPEFYR	141 ACHLQVQVQV	188 QVYLSLQV

A

B

Abb. 3: Verwendete Peptide der Proteine Legumin (A) und Vicilin (B)

8.6 Proteinquantifizierung mittels LC- MS/ MS

Tab. 11: Verwendete synthetische Peptide.

Name	Peptidname	Synthetisches Peptid (markierte AS gekennzeichnet)	Synthetisiertes Peptid [mg]	Volumen [μ l] – zur Herstellung einer 1mM Lösung
TC156005	Le2	AGQNGFEFAVFR	0.4	296
	Le4	GGESFLLSPQR	1	836
AM932874	Vi2	SNNPYLFESQR	0,7	514
	Vi3	NSFNLQKGDVIR	0,7	501

Tab. 12: Peptid- Peakflächen Bestimmung [AA] zur absoluten Proteinquantifizierung, Ausgangsmaterial pro Messung 50ml Tomatensauce

	Peptid- name	Messung1				Messung2				Messung1 Messung2		Mittelwert Proteinmenge bezogen auf das jeweilige Peptid [pg]	Mittelwert Proteinmenge [pg]	Gesamtgehalt Proteinmenge [pg]
		Peakfläche markiert [AA]	Peakfläche unmarkiert [AA]	Verhältnis [unm/ma]	Verhältnis [unmarkiert/ markiert A]	Peakfläche markiert [AA]	Peakfläche unmarkiert [AA]	Verhältnis [unmarkiert/ markiert A]	Verhältnis [unmarkiert/ markiert A]	auf Molmasse normiert	auf Molmasse normiert			
		Proteinmenge [pg]	Proteinmenge [pg]	Mittelwert [pmol]	Mittelwert [pmol]	Proteinmenge [pg]	Proteinmenge [pg]	Mittelwert [pmol]	Mittelwert [pmol]	Proteinmenge [pg]	Proteinmenge [pg]			
Legumin														
5pmol	Le2	2.086E+09	232310	0.000111	1.973E+09	207857	0.000105	0.000557	0.000527	0.000542	32.51	14.0533		
	Le4	781935684	173390	0.000222	1.032E+09	197406	0.000191	0.001109	0.000956	0.001032	61.95	32.3333		
1.25pmol	Le2	832354200	140941	0.000169	845060521	45789	5.42E-05	0.000212	6.77E-05	0.00014	8.38			
	Le4	828985274	321852	0.000388	755964515	186636	0.000247	0.000485	0.000309	0.000397	23.82			
625fmol	Le2	551364895	12044	2.18E-05	419911183	19258	4.59E-05	1.37E-05	2.87E-05	2.12E-05	1.27			
	Le4	496779736	99145	0.0002	423440669	169130	0.000399	0.000125	0.00025	0.000187	11.23			
Vicilin														
5pmol	V/2	925335381	177302	0.000192	1.088E+09	139558	0.000128	0.000958	0.000641	0.0008	51.97	23.9433		
	V/3	44969559	126596	0.002815	53358856	152154	0.002852	0.000658	0.000865	0.000762	49.5	21.4167		
1.25pmol	V/2	1.255E+09	280334	0.000179	1.328E+09	224682	0.000169	0.000279	0.000211	0.000245	15.95			
	V/3	30258742	198515	0.006561	33248543	205846	0.006191	0.000231	0.000125	0.000178	11.57			
625fmol	V/2	676533572	65077	9.62E-05	77225572	78025	0.00101	6.01E-05	0.000631	0.000346	3.91			
	V/3	31916212	46522	0.001458	29884156	65855	0.002204	5.21E-05	4.58E-05	4.9E-05	3.18			
														0.00000756

8.7 Sequenzuntersuchungen

>Fag e 1 Allergen

MSTKLILSFSLCLMVLSCSAQLLPWRKGQRSRPHRGHQFHHQCDVQRLTASEPSRRVRSEAGVTEI
WDNDTPEFRFCAGFVAVRVVIQPGGLLLPSYSNAPYITFVEQGRGVQGVVPGCPETFQSESEFEYYPQ
SQRDQRSRQSESEESSRGDQRTRQSESEEFSSRGDQRTRQSESEEFSSRGDQRTRQSESEEFSSRGD
QRTRQSESEEFSSRGDQHQKIFRIRDGDVIPSPAGVVQWTHNDGDNDLISITLYDANSFQNQLDGNVR
NFFLAGQSKQSREDRRSQRQTRREEGSDRQSRESDDDEALLEANILTGFDQDEILQEIFRNVDQETISKL
RGDNDQRGFIVQARDLKLRVPEEYEEELQRERGDQRKRGSGRSNGLEQAFCNLKFQNVNRPSRA
DVFNPRAGRINTVNSNNLPILEFIQLSAQHVVLYKNAILGPRWNLNAHSALYVTRGEGRVQVVGDEGR
SVFDDNVQRGQILVVPQGFVAVLKAGREGLEWVELKNDDNAITSPIAGKTSVLRAIPVEVLANSYDIST
KEAFRLKNGRQEVEVFLPFQSRDEKERERF

Abb. 4: Aminosäuresequenz des Fag e 1- Allergens (Legumin β - Einheit)

contig dC164489	1	A T C G G C C G A A T T G A T C A T C A C T A A A A T A C A A T A T A A A G T T T T T C A C T C A C T A T G G C A A T T T T C A C A A A A C C A A A G G T T T
EST413878	1
EST278357	1
gi12422276	1
contig dC164489	31	T C T C T T T T G T G C C T T G T A T C T C A A T G C T A T G A T C A A A A C C C T A G G G T T A C C A A G A C C C T C A G G A G A A A C T A A G A G A G T G
EST413878	1
EST278357	1
gi12422276	1
contig dC164489	31	A C A A C C A G G A C A C A G A A A C A G T T G T G C A A A C A A C G T T G T G A A C A A C A G T A T A G G A A A G A G C A A C A A C A A C A A C A T G G A
EST413878	1
EST278357	1
gi12422276	1
contig dC164489	31	C T A G G C A A T C G T G G G C C T G A T A A G A G C T A C A A A A G A T T G C A A G A A T G C C A A C G T A G G T G C C G G A G T G A A C A A C A G G G C C
EST413878	1 A C A A A A G A T T G C A A G A A T G C C A A C G T A G G T G C C G G A G T G A A C A A C A G G G C C
EST278357	1
gi12422276	1
contig dC164489	31	A A C G T T G T C A A C A A G A G T A C C A A A G A G A A A A G G A C A A C A C C A A G G T G A A A C T A A C C C A C A G T G G G A C A A C A A G A A A A
EST413878	73	A A C G T T G T C A A C A A G A G T A C C A A A G A G A A A A G G A C A A C A C C A A G G T G A A A C T A A C C C A C A G T G G G A C A A C A A G A A A A
EST278357	1
gi12422276	1
contig dC164489	31	C G A G T C T C A G C G A T T C A G G T C T G A T T C A G A G C T A G T C A T G G T G A T T T C G A A T C C T C G A G A T T C A A T C A A A G A T C T
EST413878	73	C G A G T C T C A G C G A T T C A G G T C T G A T T C A G A G C T A G T C A T G G T G A T T T C G A A T C C T C G A G A T T C A A T C A A A G A T C T
EST278357	1
gi12422276	1
contig dC164489	31	A A A T A C C G T G T G C C A T C C T C G A A T T G G A A C C T C A G T C T T T G T G T T G C C T C A T C A C T G T G A T G G T G A A G C C A T T T A T G
EST413878	23	A A A T A C C G T G T G C C A T C C T C G A A T T G G A A C C T C A G T C T T T G T G T T G C C T C A T C A C T G T G A T G G T G A A G C C A T T T A T G
EST278357	1
gi12422276	1
contig dC164489	71	T A A T T A A T A T A G C A G A A C A A G A T A A C A A A A A C T C C T T C A A C T T G C A G A A G G A G A T O T A A T C A G A T T G T T G C T G G T T C
EST413878	33	T A A T T A A T A T A G C A G A A C A A G A T A A C A A A A A C T C C T T C A A C T T G C A G A A G G A G A T O T A A T C A G A T T G T T G C T G G T T C
EST278357	1
gi12422276	1
contig dC164489	31	A G A T A C A A C G A A A A G C T C T T T G T T A C G T G C T G C T A A G T C C G T C A A T G C C C C T G G A A A T T T G C A G G A A T A C T T T A G T
EST413878	43	A G A T A C A A C G A A A A G C T C T T T G T T A C G T G C T G C T A A G T C C G T C A A T G C C C C T G G A A A T T T G C A G G A A T A C T T T A G T
EST278357	1
gi12422276	1
contig dC164489	31	T C C T T C T A C A G A G C A T T C A G C A G C G A T A T C C T G G A G T C T G C T T T C A A T A A C C A A A G G G A T A A G T T A G A G A G G C T A T T T G
EST413878	53	T C C T T C T A C A G A G C A T T C A G C A G C G A T A T C C T G G A G T C T G C T T T C A A T A A C C A A A G G G A T A A G T T A G A G A G G C T A T T T G
EST278357	1
gi12422276	1
contig dC164489	31	T A A T C A A A G C T A G T G A G G A G C A A A T T C G A G C T A T A A G C G A A C A C G C C T C G C G T C A A C T C A G C A A A C T A G A G G T A G A A C
EST413878	1
EST278357	1
gi12422276	1
contig dC164489	1101	G A A G G A A C G C C C G T A T T C G A A A G T A G A T T T G G A C A G T T C T T T G A A G C A C G T C C G A A A G A T A G A G C A A T T G A G G G A C
EST413878	1 G G G A C
EST278357	1
gi12422276	1
contig dC164489	31	A T G A A C A T T A A C C A A G G T G G A A T G G T A C T A C C A T A C T A C A A C A C G A A A T C T A C A A A A T T G G T T A T G G T C A T A G A A G G G A
EST413878	27	A T G A A C A T T A A C C A A G G T G G A A T G G T A C T A C C A T A C T A C A A A A T T G G T T A T G G T C A T A G A A G G G A
EST278357	1
gi12422276	1
contig dC164489	31	G T C C T C A T C T T G G T A G A C A A A G C C A G A G C C C A T G G T C T C G T G G A C A A G G G A G A G A C A A G A G C G A G A G C A A G A A C A A G A
EST413878	27	G T C C T C A T C T T G G T A G A C A A A G C C A G A G C C C A T G G T C T C G T G G A C A A G G G A G A G A C A A G A G C G A G A G C A A G A A C A A G A
EST278357	1
gi12422276	1
contig dC164489	1401	T T A C C A G A A A A T C C G C G G T A A C C T A A A C G T T G G T A T G T G T T G G T A A T C C C T G C T G C C A T C C A A T T A C C T T T G T A G C A
EST413878	227	T T A C C A G A A A A T C C G C G G T A A C C T A A A C G T T G G T A T G T G T T G G T A A T C C C T G C T G C C A T C C A A T T A C C T T T G T A G C A
EST278357	1
gi12422276	1
contig dC164489	1501	A T C G T T G G T T T C G A G T C G A T G C T G A G A C A A C A A A A G A A C T T C C T T G C A G G T A A C A A A C A T A T G G A G G A A C A T A G
EST413878	327	A T C G T T G G T T T C G A G T C G A T G C T G A G A C A A C A A A A G A A C T T C C T T G C A G G T A A C A A A C A T A T G G A G G A A C A T A G
EST278357	1
gi12422276	1
contig dC164489	1501	C C T T T A G C A T G C C G G G A G G G A G G T A G A A G A G A T A T T C C A G A G G C A A G A C C A G T C C T A C T T T G T G G C T G G A C C G G A G C A
EST413878	427	C C T T T A G C A T G C C G G G A G G G A G G T A G A A G A G A T A T T C C A G A G G C A A G A C C A G T C C T A C T T T G T G G C T G G A C C G G A G C A
EST278357	1 A A G G G A G G T A G A A G A G A T A T T C C A G A G G C A A G A C C A G T C C T A C T T T G T G G C T G G A C C G G A G C A
gi12422276	1
contig dC164489	1701	T O A A G A A G G A A G A A G G G G A C A A G A T C A A T A T T T G T C T T C A A T T T T G G A C T T T G T T T C T A A A A G A G T G T A C G T T A T G C A
EST413878	35	T O A A G A A G G A A G A A G G G G A C A A G A T C A A T A T T T G T C T T C A A T T T T G G A C T T T G T T T C T A A A A G A G T G T A C G T T A T G C A
EST278357	1
gi12422276	1
contig dC164489	1901	C C A A G T G A A A A G A G C T T T T G A G T A A A T A A G A A T A G A G G C T C C A G A G A A T A T G T A C T A C T A A T G T A A C T C C T T A A A
EST413878	135	C C A A G T G A A A A G A G C T T T T G A G T A A A T A A G A A T A G A G G C T C C A G A G A A T A T G T A C T A C T A A T G T A A C T C C T T A A A
EST278357	1
gi12422276	1
contig dC164489	1901	T T T A T A G A G G G T T T T A G A C T C T T T G T A G T A T G T A T G T A T G T T T T G G T G T G C A A T G T A A C T T T T G C A T C A T A A A T A A A
EST413878	235	T T T A T A G A G G G T T T T A G A C T C T T T G T A G T A T G T A T G T A T G T T T T G G T G T G C A A T G T A A C T T T T G C A T C A T A A A T A A A
EST278357	1
gi12422276	1
contig dC164489	35	A A A A A T A 410

Abb. 5: Nukleotidabgleich der 1973nt langen contigTC164489-Sequenz und EST413878, EST278357 und gi12422276(Yamamoto et al., 2005)


```

****+ .*.+*.* *.. ****+. .**+*.* *.*.*.***. ..+**.* .** ****+
Fag e 1 GLEQAFCNLKFRQNVNRPSRADVFNPRAGRINTVDSNNLPILEFIQLSAQHVVLYKNAIL
β-Einheit GLEENICTMKIRTNMDTQRADIIYSRQAGKIKHVNSQNFPIILRDMDMSASKGTLYPNALM

*. *.*.*.***+** **+.***** *..*.*.*.*+..***** +* ..***.*.*
Fag e 1 GPRWNLNAHSALYVTRGEGRVQVVGDEGRSVFDDNVQRGQILVVPQGFVVLKAGREGLE
β-Einheit SPHWSVNGHSVIYVQRGDAQVQVVDHTGQQVMNDRVNQGEEMFVVPQYYASTVKAGQNGFE

.. .+..... ..* ***+***+*+***.*.*.*.*** ** ** ** * .. * *
Fag e 1 WVELKNDNAITSPIAGKTSVLRAIPVEVLANSYDISTKEAFRLKNGR-QEVEVFRP fQS
β-Einheit FAVFRTSSQPMNSQLAGYTSVIRAMPIEVLTNAYQISPNEAQRKMMNRgGESFLLSP-QR

*. . . . + +*
Fag e 1 RD----EKERERFSIV
β-Einheit RSfngfnVSHLGYRLV

```

Abb. 6: Alignment zwischen dem Fag e 1 – Allergen (β-Einheit) und der Tomaten– Legumin β-Einheit (rot – identische Aminosäure)

```

TC156005 SLAMAVSTRVLLALLFSAFLLSAANAYRQYPPFQQCGHQRISIPLTQAQQCRLQRLTGSQP
Ber e 2          MAKLFLLSLGIFLLFHCCLAIEYEQEELYECRIQRLTAQEP

TC156005 SQRIESEGYYTEVWDENEBEQFCVCVAPMRNVI RQNSLSLPNFHMPRLVYIEQGRGLIS
Ber e 2 QYRLEAEACVSEVWDYTDQQFRACAGVAALRNTIRPQGLLLPVYTNAPKLYYVTQGRGILG

TC156005 VINPGCAETTFQSQT-FQAGRMAGEEERERRCNDQHQRVHRI RQCDVVAIPAGAAHWCYND
Ber e 2 VLMPGCPETTFQSMSQFQGSREQEEREC--RFQDQHQRVHHLKKGDIIAIPAGVALWCYND

TC156005 GEEELVAVSINDLNHRSNQLDQNFRAFYLAGCVQETSGRQIC--VGRQSTQKF--QNI FR
Ber e 2 GDEDLVTVLVQHTASDLNQLDQNP RHFFLAGNIQR-SQKQRCERYGLRGGQQILADNVFK

TC156005 AFNTELMAEA--FNIPVRIVRMQE EQNERGLIVNVRE GMSMI RAE EEEEF EGSRQRGQ
Ber e 2 CFNMEALADVLGFGMDTETARKVVRGDDQRGHIVRVEQCLKVI RPPRI REELE--QQEGG

TC156005 RWVAEVTGNGLEENICTMKIRTNMDTQRADIIYSRQAGKIKHVNSQNFPIILRDMDMSASK
Ber e 2 GY-----NGLEETICSATFIQNIDNP AEAD FYNPRAGRLLTVNSLKVPIILTFLQLSAMK

TC156005 GTLYPNALMSPHWSVNGHSVIYVQRGDAQVQVVDHTGQQVMNDRVNQGEEMFVVPQYYAST
Ber e 2 CVLYENAMMAPLWRLNANSVVYAVRGEARVQIVDHRGETVFDNLRRCQMVVVVPQNFVVV

TC156005 VKAGQNGFEFAVVRTSSQPMNSQLAGYTSVIRAMPIEVLTNAYQISPNEAQRKMMNRGGE
Ber e 2 KQAGSRGFEWVVFNTNDNALFSTAAGRTSPLRGIPVGVLANAYRLSQEARRIKLNRD-E

TC156005 SFLLSPQRRSFNGCFNVSHLGYRLVWQVSSLCFAKMKQERLVFRSKCNESSSCLFVPRSHP
Ber e 2 AVLFQPGSRRCGRASA

TC156005 RCSFSLCKISESTGRIYFKHINQIINSQC

```

Abb. 7: Alignment zwischen dem Ber e 2 – Allergen und dem Tomaten – Legumin (TC156005) (rot – identische Aminosäure)

```

AM932874 FSLTMAIFTKPKLLFIFFLILSLVLVSQCYDQNPGRGYQDPQEKLRCCQRCERQQPGQQK
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Jug r 2  QQCQIRCEERLEEDQRSQEERERRRGRDVEDDQNPGR---DPEQRYEQCQQQCERQRRGQEQ

AM932874 QLCKQRCEQQYRKEQQQQHGGTGEDDLGNRGPDKSYKRLQECQRRCC--SEQQGQRLQEC
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Jug r 2  TLCRRRCEQRRQQEERERQGRDRQD-----PQQQYHR---CQRRCCIQQESPERQRQC

AM932874 QQRCCQEQYQREKQHQG-ETNPQWE-----QQEKSNNPYLFESQRFRRSRFRASHGDFRIL
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Jug r 2  QQRCEERQYKEQQGRERGPBASPRRESRGRREEEQQRHNPYYFHSQSIRSRHESEEGEVKYL

AM932874 ERFNQRSQLLKGIEKYRVAILLELEPQSFVLPFHCDGEAIYVVVKGGVINIAEQDNKNSF
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Jug r 2  ERFTERTELLRGIENYRVVILDANPNTSMLPHHKDAESVAVVTRGRATLTLVSQETRESF

AM932874 NLQKGDVIRLFAAGSNVYLLNKNKLFVYVLAQSVNAPGNLQEFYFAGGQNPESFYRA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Jug r 2  NLECGDVIRVPAGATVYVINQDSNERLEMVKLLQPVNPPGQFREYYAAGAKSPDQSYLRV

AM932874 FSSDILESFAFNPRDKLERLFGQH--KEGIIKASEEQIRAISEHASRSTQQTRGR--TQ
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Jug r 2  FSNLILVAALNTPRDRLERFQDQEQREGVIRASQEKLRALSQHAMSAGQRPWGRSSG

AM932874 GPFNLKERPVFESRFGQFFEARPERYEQLRDLDAAVGFMNINQGGMVLFPYNTKSTKLV
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Jug r 2  GPISLKESSPSYSNQFGQFFACPEHRQLQEMDVLVNYAEIKRGAMVPHYNSKATVVV

AM932874 MVEIGNARFEMACPHLGRQSQSPWSRGQGREQEREQEQEEGDVHYQKIRGNLNVGDVL
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Jug r 2  YVVEGTGRYEMACPHVSSQSY----EGQGR---REQEEESTG--RFQKV TARLARGDIF

AM932874 VIPAGHPITFVATGNSNLRIVGFGVDAENKKNFLAGKQNIWRNIDREAKELSF SMPGRE
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Jug r 2  VIPAGHPITAITASQENLRLGFDINGENNQRDFLAGQNNIINQLEREAKELSFNMPREE

AM932874 VEEIFQRQDQSYFVAGPEHRQQREREGEGRGQDQYLSILDFVF
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Jug r 2  IEEIFESQMESYFV--PTERQSR-RGQ----GRDHPLASILDFAFV

```

Abb. 8: Alignment zwischen dem Jug r 2- Allergen und dem Tomaten- Vicilin (AM932874) (rot – identische Aminosäure)

```

TC156005  SLAMAVSTRVLLALLLSAFLLSAANAYRQYPFQGGQHGQRSLPLTQAQQCRLQRLTGSQP
Ana o 2      LSVCFLLILFHGCLASRQEWQQQDECCQIDRLDALEP

TC156005  SQRIESEGGYTEVWDENE EQFQCVGVA PMRNVIRQNSLSLENFHPMPRLVYIEQGRGLIS
Ana o 2      DNRVYEACTVEAWDPNHEQFRCAGVALVRHTIQPNGLLLPQYSNAPQLIYVVQGEQMTG

TC156005  VINPGCAETFSQTFQAGRMAGEBERGERRGNDQHQQVHRI RQGDVVAI PAGAAHWCYNDG
Ana o 2      ISYPGCPETYQAP--QQGRQQQS-G--RFQDRHQKIRRFRRGDI IAI PAGVAHWCYNEG

TC156005  EEELVAVSINDLNHRSNQLDQNFRAFYLGGVQETSGRQIGVGKQSTQKQNI FRAENTE
Ana o 2      NSPVVTVTLLDVSNSQNLDRTPRKFHLAGNPKDVFQQQ----QQHQSRRGNLFSGFDEP

TC156005  LMAEAFNI PVEIVRRMQE EQNERGLIVNVREG-MSMIRAD----E EEEEF EGRSQRQQRW
Ana o 2      LLAEAFQVDERLIKQLKSEDN-RGGIVKVKDDELVRVIRPSRSQSERGSESEEESEDEKRR

TC156005  WAEVT ENG EENICTMKIRTNMDTQRRADIYSRQAGKIKHVNSQNF PILLRDMMSASKGT
Ana o 2      WQQ-RDNGIEETICTMRLKENINDPARADIYTPVGRLLTTLNSLNLPI LKWLQLSVEKGV

TC156005  LYPNALMS PHWSVNGHSVIYVQRGDAQVQVVDHTGQQVMNDRVNQGE MFVVPQYYASTVK
Ana o      LYKNALVLPHWNLNSHSI IYGCKGKGQVQVDNFGNRVFDGEVREGQMLVVPQNF AVVKR

TC156005  AGQNGFEFAVERTSSQPMNSQLAGYTSVIRAMPIEVL TNAYQIS PNEAQLKMNRRGGE SF
Ana o 2      AREERFEWISFKTNDRAMTS PLAGRTSVLGGMP EEVLANAFQIS REDARKI KFNQQTTL

TC156005  LLSPQRRSFENGENVSHLGYRLVVQVSSLCF AKMKQERLVFRSKCNES SCLFVPKSHPRC
Ana o 2      TSGESSHMRDDA

TC156005  SFSLCKISESTGRIYFKHINQIINSQG

```

Abb. 9: Alignment zwischen dem Ana o 2– Allergen (gi25991543) und dem Tomaten– Legumin (TC156005) (rot – identische Aminosäure) und gekennzeichneter NG- Spaltstelle (rot eingekreist)

```

                                Epitop3
TC156005 FSAFLLSAANA YRQYPFQQGQHGRS IPLTQAQQCRLQR LTGSQPSQR IESEGGYTEVWD
: ..... : . : ..... : : .....
Ana o 2 LSVCF LILFHGCLASRQEWQQQDEBCQIDRLDALEPDNRVEYEAGTVEAWD

                                Epitop6
TC156005 ENEEQFCQVGVAPMRNVIRQNSLSLPNFHPMPRLVYIEQGRGLISVINPGCAETFOSQTF
: ..... : : ..... : : ..... : : ..... : : .....
Ana o 2 PNHEQFRCAGVALVRHTIQPNGLLLPQYSNAPQLIYVVQEGGMTGISYPGCPETVQAF--

                                Epitop6
TC156005 QAGRMAGEERGERRGNQHQKVHRIRQGDVVAIPAGAAHWCYNDGEEELVAVSINDLNHR
: : : . . : : : ..... : ..... : .....
Ana o 2 QQGRQQGQS-G--RFQDRHQKIRRFRRGDI IAI PAGVAHWCYNEGNSPVVTVTLDVDNS

                                Epitop11
TC156005 SNQLDQNFRAFYLAGGVQE TSGRQIGVGKQSTQKQFQNI FRAFNTELMAEAFNIPVEIVRR
: ..... : : ..... : : ..... : : ..... : .....
Ana o 2 QNQLDRTPERKFLAGNPKDVFQQQ---QQHQSRGRNIFSGFDTELLAEAFQVDERLIKQ

                                Epitop13 Epitop14 Epitop15
TC156005 MQEEQNERGLIVNVREG-MSMIRAD---EEEEFEGRSQRGQRWVAEVTGNGLREENICT
. : . : : : ..... : ..... : : ..... : : ..... : .....
Ana o 2 LKSEDN-RGGIVKVKDDELVRVIRPSRSQSERGSESEEESEDEKRRWGG-RDN GIEETICT

TC156005 MKIRTNMDTQRRADIYSRQAGKIKHVNSQNFPILRDMDMSASKGTLYPNALMSPHWSVNG
: . . . : . . : : ..... : : ..... : : ..... : : .....
Ana o 2 MRLKENINDPARADIYTPEVGRLLTTLNSLNLPLKWLQLSVEKGVLYKNALVLPHWNLNS

TC156005 HSVIYVQRGDAQVQVVDHTGQQVMNDRVNQGEMFVVPQYYASTVKAGQNGFEFAVFTSS
: : : . : : ..... : ..... : : ..... : : ..... : .....
Ana o 2 HSIIYGCKGKGQVQVVDNFGNRVFDGEVREGQMLVVPQNFAVVKRAREERFEWISFKTND

                                Epitop22
TC156005 QPMNSQLAGYTSVIRAMPIEVL TNAYQISPNEAQRLKMNRGGESFLLSQRRSFNGFNVS
. : : : : : ..... : : ..... : : ..... : : .....
Ana o 2 RAMTSLAGRTSVLGGMPPEEVLANAFQISREDARKIKFNNQQTTLTSGESSHMRDDA

TC1560 HLG YRLVQVSSLCFAKMKQERLVFRSKCNESSSCLFVPKSHPRCSFSLCKISESTGRIY

```

Abb. 10: Alignment zwischen dem Ana o 2– Allergen (grün – Epitope, hellgrün - Überlappung) und dem Tomaten– Legumin (TC156005), putative Epitope von TC156005 sind grau hinterlegt

```

                                Epitop1                Epitop2
AM932874 SFSLTMAIFTKPKLLFIFFLILSLVLSVSCYDQNRGYQDPQEKLRCCQRCEFRQPPGQQ
      : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . .
Ara h 1 MRGRVSLPMLLLGLVLSVLSATHA-KSSFYQKKTENPCAQRCLQSCQ-QEPDDL

                                Epitop3                Epitop4 Epitop5 Epitop6
AM932874 KO-LCKQRCEQ-QYRKE---QQQHGGET-----GE-----DD-----LGN
      : : . . . : . . . : . . . : . . . : . . . : . . . : . . . : . . .
Ara h 1 KQKACE SRCTKLEYDPRCVYTPRGHTGTTNQRSPFGERTRGRQPGDYDDDRRQPRREBGG

                                Epitop7                Epitop8 Epitop9
AM932874 R-GPDKSYKRLQECQRRQSEQQGQRLQECQQRCCQYQREKQHQGETNPQWEQOEKSN
      : : . . . : . . . : . . . : . . . : . . . : . . . : . . . : . . .
Ara h 1 RWGPAGPRE REEEDWR-QEREDWRRPSSHQPRKIRPGE EGBQEWGTPGSHVREETSRN

AM932874 NPYLFESQRFRRFRASHGDFRILERFNQRSQLLKGIEKYRVAILLELEPQSFVLPHHCDG
      : : . . . : . . . : . . . : . . . : . . . : . . . : . . . : . . .
Ara h 1 NPFYFPSRRFSTRYGNQNGRIRVLQRFQDRSRQFQNLQNHRIVQIEAKPNTLVLPKHADA

AM932874 EAIYVVVKGGVINIAEQDNKNSFNLQKGDVIRLFGASNVYLLNKDNNEKLFVYVLAKSV
      . : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . .
Ara h 1 DNILVIQQGQATVTVANGNNRKSFNLDDEGHALRIPSGFTSYIILNRHDNQLNRVAKISMPV

                                Epitop10                Epitop11                Epitop12
AM932874 NAPGNLQEQYFSAAGQNPESFYRAFSSDILESAPNNPRDKLERLF-----GQHK
      : : . . . : . . . : . . . : . . . : . . . : . . . : . . . : . . .
Ara h 1 NTPGQFEDFFEASSRQSSYLQGF SRNILEAAFNAEFNEIRFVLLLEENAGGEQEERGGRR

                                Epitop13                Epitop14
AM932874 -----EGIIIKASEEQIRAI SEHA---SRSTQQTRGRTOGPFNLMKERPVFESRFG
      : : . . . : . . . : . . . : . . . : . . . : . . . : . . . : . . .
Ara h 1 MSTRSSENNEGVIKVSKEHVEELTKHAKSVSKKGSBEEGDTNTPINLREGE PDLsNNFG

                                Epitop14                Epitop15
AM932874 QFFEARPERYE-QLRDLDAVGFMMNINQGGMVLPPYNTKSTKLVMIIEGNARFEMACPHL
      : : . . . : . . . : . . . : . . . : . . . : . . . : . . . : . . .
Ara h 1 KLFEVK PDKKNPQLQDLDMLLTCVEIKEGALMLPHFNSKAMVIVVVKETGNLELVAV--|

                                Epitop16
AM932874 GRQSQSPWSRGQGREQEREQEQEQEEG-DVHYQKIRGNLNVGDVLVI PAGHPITFVATGN
      : : . . . : . . . : . . . : . . . : . . . : . . . : . . . : . . .
Ara h 1 -RKEQQQ----RGRREEEDEDEEEEGSNREVRRYTARLKECDVFIMPAHPVAINAS--

                                Epitop17                Epitop18                Epitop19                Epitop20                Epitop21
AM932874 SNLRIVGFGVDAENNKKNFLAG-KQNIWRNIDREAKELSFSMPGREVEEIFQRQDQSYFV
      : : . . . : . . . : . . . : . . . : . . . : . . . : . . . : . . .
Ara h 1 SFLHLLGFGINAENNRHIFLAGDKDNVLDQIERKQAKDLAFPGSGEQVEKLIKNQKESHFV

                                Epitop22
AM932874 -----AGPEHRQQREREGEGRGQDQYLSSILDFVF
      : : . . . : . . . : . . . : . . . : . . . : . . . : . . . : . . .
Ara h 1 SARPQSQSQSPSSFEKESPEKETQEEENQGGKGPLLSILKAFN

```

Abb. 11: Alignment zwischen dem Ara h 1- Allergen (grün – Epitope, hellgrün - Überlappung) und dem Tomaten- Vicilin (AM932874), putative Epitope von AM932874 sind grau hinterlegt

```

gi6580762    GRDRQDPQQYHRCCQRRCQIQEQSPERQRQCQQQRCERQYKEQQGRERGPBASPRRESKGR
BE458586     .. ::::: . :. . . ::::: . . . . . ::::: . . . . .
              KRLQECQRRCR-SEQQGRLQECQQQRCQQEYQREKGGHQG-ETNFCWE----

gi6580762    EEEQQRHNPFYFHSSQSIKSRHESEEGEVKYLKFAERTELLRGIENYRVVILDANPTFM
BE458586     -QOEKSNPFYLFESQRFRSRFRASHGDFRILERFNQRSQLLKGLKRYVAILELEPQSFV

gi6580762    LPHHKDAESVIVVTRGRATLTLVVSQETRESFNLECGDVIRVPAGATEYVINQDSNERLEM
BE458586     LPHHCDGEAIYVVVKGGVQVINIAEQDNKNSFNLQKGDVIRLFAGSNVYLLNKDNNEKLFV

gi6580762    VKLLQPVNPPGVREYYAAGAKSPDQSYLVFVSNLILVAALNTPRDLERFFDQQEQREG
BE458586     : . : : : . . . . . : . : : : :
              YVLAKSVMNAPGNLQEQYFSAAGGQNEE-SFYRAFSSDIL-----

gi6580762    VIIRASQEKLRALSQHAMSAGQRFWRSSGGPISLKSERFSYSNQFGQFFEACPEHRQ
TC164469     -----

gi6580762    LQEMDVLVNYAEIKRGAMMVPHYNSKATVVVYVVEGTGRYEMACPHVSSQS---FEDQG
TC164469     -EDLDAAVGFMNINQGGMVLPHYNTKSTKLVVMVIEGNARFEMACPHLGRQSQSPWVRGQG

gi6580762    R---REQEESSTG-RFQKVTARLARGDIFVIPAGHPIAITASQENLRLLGFGINGEN
TC164469     : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
              REQEREQEQEQEGDVHYQKIRGNLVGDVIVIPAGHEITPVATGNSNLRIVGFGVDAEN

gi6580762    NQRNFLAGQNSIINQLEREAKELSFNMPREIEIBEIFESQMSYFV--PTERQSR-RGQ
TC164469     : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
              NKKNFLAGKONIWRNIDREAKELSF SMPGREVBEIFQRQDSYFVAGPEHRQQRERGEEEX

```

Abb. 12: Alignment zwischen dem Jug r 2– Allergen und den Tomatenproteinen BE458586 und TC164469

```

gi|29839419 ( 1) gecontainssglobulinseedstorageproteinacidichainsglobulinsee
gi|2317674 ( 1) -----

gi|29839419 ( 61) dstorageproteinbasicchainMSTKLILSFSLCLMVLSCSAQLLPWQKGRSRPHH
gi|2317674 ( 1) -----MSTKLILSFSLCLMVLSCSAQLLPWQKGRSRPHH

gi|29839419 ( 121) GHQQ--FQHQCIDIQLTASEPSRRVRSEAGVTEIWDHDTPFCRAGFVAVRVVIQPGGLL
gi|2317674 ( 36) GRQQHqFQHQCIDIQLTASEPSRRVRSEAGVTEIWDHDTPFCRAGFVAVRVVIQPGGLL

gi|29839419 ( 179) LPSYSNAPYITFVEQGRGVQGVVPGCPETFQSGSEFEPYRSQRDQRSRQESgesergd
gi|2317674 ( 96) LPSYSNAPYITFVEQGRGVQGVVIPGCPETFQSDSEFEYQSQGRGRSRQSE-----

gi|29839419 ( 239) qrsrqSEsEESSRGdqr srqseesefsr gdQHQKIFRIRGDVIPSPAGVVQWTHNNGDN
gi|2317674 ( 148) -----SE-EESSRG-----DQHQKIFRIRREGDVIPSPAGVVQWTHNNGDN

gi|29839419 ( 299) DLISITLYDANSFQQLDENVRNFFLAGqskqredrR5QRQTREEGSDRQRESQDDEA
gi|2317674 ( 187) DLISVTLLDANSYHKQLDENVRFFLAG-----QSQRETRREEGSDRQRESDDDEA

gi|29839419 ( 359) LLEANILSGFEDEILQEIFRNVDQETISKLRGENDQRGFIVQARDLKLKLVPEEYEEELQR
gi|2317674 ( 238) LLGANILSGFQDEILHELFRVDRETISKLRGENDQRGFIVQARDLKLKLVPEEYEEELQR

gi|29839419 ( 419) ERGDRKR--GGSGRNGLEQAF CNLKFRQNVNRP SRADVFNPRAGRINTVDSNNPLILEF
gi|2317674 ( 298) ERGDRRRqgGGSGRNGVEQFCNLKFRRNFNTPNTTYVFNPRAGRINTVNSNSLP LILEF

gi|29839419 ( 477) IQLSAQHVVLYKNAIILGPRWMLNAHSALYVTRGEGRVQVVGDEGRSVFDDNVQRGQILVV
gi|2317674 ( 358) LQLSAQHVVLYKNAIILGPRWMLNAHSALYVTRGEGRVQVVGDEGRSVFDDKVRQGQILVV

gi|29839419 ( 537) PQGF AVVLKAGREGLEWVELKNDNAITSPIAGKTSVLR AIPVEVLANSYD ISTKEAFRL
gi|2317674 ( 418) PQGF AVVLKAGREGLEWVELKNSGNAITSPIIGRSTVLR AIPVEVLANSYD ISTKEAYKL

gi|29839419 ( 597) KNGRQEVVFRPFQSRDEKERERFSIV
gi|2317674 ( 478) KNGRQEVVFRPFQSRDEKERERFSIV

```

Abb. 13: Alignment zwischen den gi29839419 und gi2317674 Legumin Proteinen aus Buchweizen

- Aalberse, R.C. & van Ree, R. (1997) Crossreactive carbohydrate determinants. *Clin Rev Allergy Immunol*, **15**, 375-87.
- Aalberse, R.C. & Van Ree, R. (2000) Monoclonal antibody assays for allergens: pick your antibodies with care! *J Allergy Clin Immunol*, **106**, 625-6.
- Alcala, J.V., J. White, R. van der Hoeven, R.S. Holt, I.E. Liang, F. Hansen, T.S. Craven, M.B. Bowman, C.L. Ronning, C.M. Nierman, W. Fraser, C.M. Martin, G.B. Giovannoni, J.J. Tanksley, S.D. (2000) Generation of ESTs from tomato fruit tissue, immature green Unpublished
- Allergie, a. (2/2005). Allergene in pflanzlichen Lebensmitteln - Neue Erkenntnisse und Datenbanken. In *Umwelt & Gesundheit*.
- Altmann, F. (2007) The role of protein glycosylation in allergy. *Int Arch Allergy Immunol*, **142**, 99-115.
- Anderson, J.A. (1994) Milestones marking the knowledge of adverse reactions to food in the decade of the 1980s. *Ann Allergy*, **72**, 143-54.
- Asero, R. (1999) Detection and clinical characterization of patients with oral allergy syndrome caused by stable allergens in Rosaceae and nuts. *Ann Allergy Asthma Immunol*, **83**, 377-83.
- Asero, R., Amato, S., Alfieri, B., Folloni, S., & Mistrello, G. (2007a) Rice: another potential cause of food allergy in patients sensitized to lipid transfer protein. *Int Arch Allergy Immunol*, **143**, 69-74.
- Asero, R., Mistrello, G., Roncarolo, D., & Amato, S. (2007b) Detection of some safe plant-derived foods for LTP-allergic patients. *Int Arch Allergy Immunol*, **144**, 57-63.
- Asero, R., Mistrello, G., Roncarolo, D., Amato, S., Caldironi, G., Barocci, F., & van Ree, R. (2002) Immunological cross-reactivity between lipid transfer proteins from botanically unrelated plant-derived foods: a clinical study. *Allergy*, **57**, 900-6.
- Asero, R., Mistrello, G., Roncarolo, D., Amato, S., Zanoni, D., Barocci, F., & Caldironi, G. (2003) Detection of clinical markers of sensitization to profilin in patients allergic to plant-derived foods. *J Allergy Clin Immunol*, **112**, 427-32.
- Asero, R., Mistrello, G., Roncarolo, D., de Vries, S.C., Gautier, M.F., Ciurana, C.L., Verbeek, E., Mohammadi, T., Knul-Brettlova, V., Akkerdaas, J.H., Bulder, I., Aalberse, R.C., & van Ree, R. (2000) Lipid transfer protein: a pan-allergen in plant-derived foods that is highly resistant to pepsin digestion. *Int Arch Allergy Immunol*, **122**, 20-32.
- Bahna, S.L. (1994) Blind food challenge testing with wide-open eyes. *Ann Allergy*, **72**, 235-8.
- Ballmer-Weber, B.K., Scheurer, S., Fritsche, P., Enrique, E., Cistero-Bahima, A., Haase, T., & Wuthrich, B. (2002) Component-resolved diagnosis with recombinant allergens in patients with cherry allergy. *J Allergy Clin Immunol*, **110**, 167-73.
- Barre, A., Borges, J.P., & Rouge, P. (2005) Molecular modelling of the major peanut allergen Ara h 1 and other homotrimeric allergens of the cupin superfamily: a structural basis for their IgE-binding cross-reactivity. *Biochimie*, **87**, 499-506.
- Barre, A., Jacquet, G., Sordet, C., Culerrier, R., & Rouge, P. (2007) Homology modelling and conformational analysis of IgE-binding epitopes of Ara h 3 and

- other legumin allergens with a cupin fold from tree nuts. *Mol Immunol*, **44**, 3243-55.
- Barre, A., Sordet, C., Culerrier, R., Rance, F., Didier, A., & Rouge, P. (2008) Vicilin allergens of peanut and tree nuts (walnut, hazelnut and cashew nut) share structurally related IgE-binding epitopes. *Mol Immunol*, **45**, 1231-40.
- Bassuner, R., Hai, N.V., Jung, R., Saalbach, G., & Muntz, K. (1987) The primary structure of the predominating vicilin storage protein subunit from field bean seeds (*Vicia faba* L. var. minor cv. Fribo). *Nucleic Acids Res*, **15**, 9609.
- Becker, W.M. (1997) 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*, **113**, 118-21.
- Beezhold, D.H., Sussman, G.L., Liss, G.M., & Chang, N.S. (1996) Latex allergy can induce clinical reactions to specific foods. *Clin Exp Allergy*, **26**, 416-22.
- Bernhisel-Broadbent, J., Scanlon, S.M., & Sampson, H.A. (1992) Fish hypersensitivity. I. In vitro and oral challenge results in fish-allergic patients. *J Allergy Clin Immunol*, **89**, 730-7.
- Berry, T. & Bewley, J.D. (1992) A Role for the Surrounding Fruit Tissues in Preventing the Germination of Tomato (*Lycopersicon esculentum*) Seeds : A Consideration of the Osmotic Environment and Abscisic Acid. *Plant Physiol*, **100**, 951-957.
- Besler M, S.H., Paschke A (1997) Allergenicity of the hen's egg white proteins: IgE-binding of native and deglycosylated Ovomuroid. *Food Agric Immunol*, **9**.
- Bewly, J. & Black, M. (1994). Seeds. In *2nd edition. Plenum Press. Physiology of Development and Germination.*, New York und London.
- Beyer, K., Bardina, L., Grishina, G., & Sampson, H.A. (2002) Identification of sesame seed allergens by 2-dimensional proteomics and Edman sequencing: seed storage proteins as common food allergens. *J Allergy Clin Immunol*, **110**, 154-9.
- Bhalla, P.L., Swoboda, I., & Singh, M.B. (2001) Reduction in allergenicity of grass pollen by genetic engineering. *Int Arch Allergy Immunol*, **124**, 51-4.
- Bircher, A.J., Van Melle, G., Haller, E., Curty, B., & Frei, P.C. (1994) IgE to food allergens are highly prevalent in patients allergic to pollens, with and without symptoms of food allergy. *Clin Exp Allergy*, **24**, 367-74.
- Blanco, C., Carrillo, T., Castillo, R., Quiralte, J., & Cuevas, M. (1994) Latex allergy: clinical features and cross-reactivity with fruits. *Ann Allergy*, **73**, 309-14.
- Blanco, C., Diaz-Perales, A., Collada, C., Sanchez-Monge, R., Aragoncillo, C., Castillo, R., Ortega, N., Alvarez, M., Carrillo, T., & Salcedo, G. (1999) Class I chitinases as potential panallergens involved in the latex-fruit syndrome. *J Allergy Clin Immunol*, **103**, 507-13.
- Bowles, D.J. (1990) Defense-related proteins in higher plants. *Annu Rev Biochem*, **59**, 873-907.
- Bradford, M.M. (1976) Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
- Brehler, R., Theissen, U., Mohr, C., & Luger, T. (1997) "Latex-fruit syndrome": frequency of cross-reacting IgE antibodies. *Allergy*, **52**, 404-10.
- Breiteneder, H. & Clare Mills, E.N. (2005) Plant food allergens--structural and functional aspects of allergenicity. *Biotechnol Adv*, **23**, 395-9.
- Breiteneder, H. & Ebner, C. (2000) Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *J Allergy Clin Immunol*, **106**, 27-36.

- Breiteneder, H., Hoffmann-Sommergruber, K., Vanek-Krebitz, M., Kraft, D., & Scheiner, O. (1997) Recombinant allergens; basic and practical considerations. *Arb Paul Ehrlich Inst Bundesamt Sera Impfstoffe Frankf A M*, 80-6.
- Breiteneder, H. & Radauer, C. (2004) A classification of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol*, **113**, 821-30; quiz 831.
- Brueckner, C. (2008) Modul "Morphologie und Evolution der Pflanzen". *Humboldt-Universität*.
- Brusic, V., Petrovsky, N., Gendel, S.M., Millot, M., Gigonzac, O., & Stelman, S.J. (2003) Computational tools for the study of allergens. *Allergy*, **58**, 1083-92.
- Budzikiewicz, H. (2007) Selected reviews on mass spectrometric topics CXXX. *Mass Spectrom Rev*, **26**, 724-5.
- Buhring, H.J., Seiffert, M., Giesert, C., Marxer, A., Kanz, L., Valent, P., & Sano, K. (2001) The basophil activation marker defined by antibody 97A6 is identical to the ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3. *Blood*, **97**, 3303-5.
- Buhring, H.J., Simmons, P.J., Pudney, M., Muller, R., Jarrossay, D., van Agthoven, A., Willheim, M., Brugger, W., Valent, P., & Kanz, L. (1999) The monoclonal antibody 97A6 defines a novel surface antigen expressed on human basophils and their multipotent and unipotent progenitors. *Blood*, **94**, 2343-56.
- Buhring, H.J., Streble, A., & Valent, P. (2004) The basophil-specific ectoenzyme E-NPP3 (CD203c) as a marker for cell activation and allergy diagnosis. *Int Arch Allergy Immunol*, **133**, 317-29.
- Burks, A.W., Jr., Brooks, J.R., & Sampson, H.A. (1988) Allergenicity of major component proteins of soybean determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoblotting in children with atopic dermatitis and positive soy challenges. *J Allergy Clin Immunol*, **81**, 1135-42.
- Burks, A.W., Shin, D., Cockrell, G., Stanley, J.S., Helm, R.M., & Bannon, G.A. (1997) Mapping and mutational analysis of the IgE-binding epitopes on Ara h 1, a legume vicilin protein and a major allergen in peanut hypersensitivity. *Eur J Biochem*, **245**, 334-9.
- Castells, M.C., Pascual, C., Esteban, M.M., & Ojeda, J.A. (1986) Allergy to white potato. *J Allergy Clin Immunol*, **78**, 1110-4.
- Chandra, R.K. (1997) Food hypersensitivity and allergic disease: a selective review. *Am J Clin Nutr*, **66**, 526S-529S.
- Chandra, R.K., Gill, B., & Kumari, S. (1993) Food allergy and atopic disease: pathogenesis, diagnosis, prediction of high risk, and prevention. *Ann Allergy*, **71**, 495-502; quiz 502-4.
- Chapman, M.D., Pomes, A., Breiteneder, H., & Ferreira, F. (2007) Nomenclature and structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol*, **119**, 414-20.
- Coombs, R., Gell, PGH (1963) The classification of allergic reactions underlying disease; in: *Clinical aspects of immunology*. *Davis-Philadelphia*, **317**.
- Costa, M.A., Colombo, P., Izzo, V., Kennedy, H., Venturella, S., Cocchiara, R., Mistrello, G., Falagiani, P., & Geraci, D. (1994) cDNA cloning, expression and primary structure of Par j1, a major allergen of *Parietaria judaica* pollen. *FEBS Lett*, **341**, 182-6.
- Costa, M.A., Duro, G., Izzo, V., Colombo, P., Mirisola, M.G., Locorotondo, G., Cocchiara, R., & Geraci, D. (2000) The IgE-binding epitopes of rPar j 2, a major allergen of *Parietaria judaica* pollen, are heterogeneously recognized among allergic subjects. *Allergy*, **55**, 246-50.
- Cramer, R. (1998) Recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens: from the nucleotide sequences to clinical applications. *Int Arch Allergy Immunol*, **115**, 99-114.

- Czaja-Bulsa, G. & Bachorska, J. (1998) [Food allergy in children with pollinosis in the Western sea coast region]. *Pol Merkur Lekarski*, **5**, 338-40.
- Darnowski, D., Valenta, R., Parthasarathy, MV (1996) Identification and distribution of profilin in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) *Planta*, **198**, 158-161.
- Daul, C.B., Morgan, J.E., Hughes, J., & Lehrer, S.B. (1988) Provocation-challenge studies in shrimp-sensitive individuals. *J Allergy Clin Immunol*, **81**, 1180-6.
- De Martino, M., Novembre, E., Cozza, G., de Marco, A., Bonazza, P., & Vierucci, A. (1988) Sensitivity to tomato and peanut allergens in children monosensitized to grass pollen. *Allergy*, **43**, 206-13.
- Diaz-Perales, A., Collada, C., Blanco, C., Sanchez-Monge, R., Carrillo, T., Aragoncillo, C., & Salcedo, G. (1999) Cross-reactions in the latex-fruit syndrome: A relevant role of chitinases but not of complex asparagine-linked glycans. *J Allergy Clin Immunol*, **104**, 681-7.
- Domoney, C., Barker, D., & Casey, R. (1986) The Complete Deduced Amino-Acid-Sequences of Legumin Beta-Polypeptides from Different Genetic-Loci in *Pisum*. *Plant Mol Biol*, **7**, 467-474.
- Dreborg, S. (1994) Importance of standardized allergens in the diagnosis of atopy and atopic diseases. *Arb Paul Ehrlich Inst Bundesamt Sera Impfstoffe Frankf A M*, 181-7; discussion 188-90.
- Dunwell, J. (1998) Cupins: a new superfamily of functionally diverse proteins that include germins and plant storage proteins. *Biotechnol Genet Eng Rev*, **15**, 1-32.
- Dunwell, J.M., Purvis, A., & Khuri, S. (2004) Cupins: the most functionally diverse protein superfamily? *Phytochemistry*, **65**, 7-17.
- Duro, G., Colombo, P., Assunta Costa, M., Izzo, V., Porcasi, R., Di Fiore, R., Locorotondo, G., Cocchiara, R., & Geraci, D. (1997) Isolation and characterization of two cDNA clones coding for isoforms of the *Parietaria judaica* major allergen Par j 1.0101. *Int Arch Allergy Immunol*, **112**, 348-55.
- Ebner, C., Hirschwehr, R., Bauer, L., Breiteneder, H., Valenta, R., Ebner, H., Kraft, D., & Scheiner, O. (1995) Identification of allergens in fruits and vegetables: IgE cross-reactivities with the important birch pollen allergens Bet v 1 and Bet v 2 (birch profilin). *J Allergy Clin Immunol*, **95**, 962-9.
- Eng, J.K., McCormack, A.L., & Yates, J.R. (1994) An Approach to Correlate Tandem Mass-Spectral Data of Peptides with Amino-Acid-Sequences in a Protein Database. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **5**, 976-989.
- Fernandez-Rivas, M. & Cuevas, M. (1999) Peels of Rosaceae fruits have a higher allergenicity than pulps. *Clin Exp Allergy*, **29**, 1239-47.
- Foetisch, K., Westphal, S., Lauer, I., Retzek, M., Altmann, F., Kolarich, D., Scheurer, S., & Vieths, S. (2003) Biological activity of IgE specific for cross-reactive carbohydrate determinants. *J Allergy Clin Immunol*, **111**, 889-96.
- Frank, R. & Overwin, H. (1996) SPOT synthesis. Epitope analysis with arrays of synthetic peptides prepared on cellulose membranes. *Methods Mol Biol*, **66**, 149-69.
- Ganglberger, E., Radauer, C., Wagner, S., Riordain, G., Beezhold, D.H., Brehler, R., Niggemann, B., Scheiner, O., Jensen-Jarolim, E., & Breiteneder, H. (2001) Hev b 8, the *Hevea brasiliensis* latex profilin, is a cross-reactive allergen of latex, plant foods and pollen. *Int Arch Allergy Immunol*, **125**, 216-27.
- Garcia-Casado, G., Sanchez-Monge, R., Chrispeels, M.J., Armentia, A., Salcedo, G., & Gomez, L. (1996) Role of complex asparagine-linked glycans in the allergenicity of plant glycoproteins. *Glycobiology*, **6**, 471-7.

- Garcia Ortiz, J.C., Moyano, J.C., Alvarez, M., & Bellido, J. (1998) Latex allergy in fruit-allergic patients. *Allergy*, **53**, 532-6.
- Geha, R. (1995) *Immunreaktion in Abwesenheit einer Infektion*, in: Janeway C & Travers P Immunologie.
- Ghannadan, M., Hauswirth, A.W., Schernthaner, G.H., Muller, M.R., Klepetko, W., Schatzl, G., Sperr, W.R., Buhning, H.J., & Valent, P. (2002) Detection of novel CD antigens on the surface of human mast cells and basophils. *Int Arch Allergy Immunol*, **127**, 299-307.
- Grob, M., Reindl, J., Vieths, S., Wuthrich, B., & Ballmer-Weber, B.K. (2002) Heterogeneity of banana allergy: characterization of allergens in banana-allergic patients. *Ann Allergy Asthma Immunol*, **89**, 513-6.
- Gubesch, M., Theler, B., Dutta, M., Baumer, B., Mathis, A., Holzhauser, T., Vieths, S., & Ballmer-Weber, B.K. (2007) Strategy for allergenicity assessment of 'natural novel foods': clinical and molecular investigation of exotic vegetables (water spinach, hyacinth bean and Ethiopian eggplant). *Allergy*, **62**, 1243-50.
- Hannuksela, M. & Lahti, A. (1977) Immediate reactions to fruits and vegetables. *Contact Dermatitis*, **3**, 79-84.
- Hansen, T.K., Bindslev-Jensen, C., Skov, P.S., & Poulsen, L.K. (1996) Codfish allergy in adults. Specific tests for IgE and histamine release vs double-blind, placebo-controlled challenges. *Clin Exp Allergy*, **26**, 1276-85.
- Hauswirth, A.W., Natter, S., Ghannadan, M., Majlesi, Y., Schernthaner, G.H., Sperr, W.R., Buhning, H.J., Valenta, R., & Valent, P. (2002) Recombinant allergens promote expression of CD203c on basophils in sensitized individuals. *J Allergy Clin Immunol*, **110**, 102-9.
- Hauswirth, A.W., Sonneck, K., Florian, S., Krauth, M.T., Bohm, A., Sperr, W.R., Valenta, R., Schernthaner, G.H., Printz, D., Fritsch, G., Buhning, H.J., & Valent, P. (2007) Interleukin-3 promotes the expression of E-NPP3/CD203C on human blood basophils in healthy subjects and in patients with birch pollen allergy. *Int J Immunopathol Pharmacol*, **20**, 267-78.
- Hefle, S.L., Nordlee, J.A., & Taylor, S.L. (1996) Allergenic foods. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **36 Suppl**, S69-89.
- Hegenauer R, H.M. (1994) *Chemotaxonomie der Pflanze* BIRKHÄUSER VERLAG, BASEL BOSTON BERLIN.
- Heim, U., Baumlein, H., & Wobus, U. (1994) The legumin gene family: a reconstructed *Vicia faba* legumin gene encoding a high-molecular-weight subunit is related to type B genes. *Plant Mol Biol*, **25**, 131-5.
- Heim, U., Schubert, R., Baumlein, H., & Wobus, U. (1989) The legumin gene family: structure and evolutionary implications of *Vicia faba* B-type genes and pseudogenes. *Plant Mol Biol*, **13**, 653-63.
- Hemmann, S., Menz, G., Ismail, C., Blaser, K., & Cramer, R. (1999) Skin test reactivity to 2 recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens in *A. fumigatus*-sensitized asthmatic subjects allows diagnostic separation of allergic bronchopulmonary aspergillosis from fungal sensitization. *J Allergy Clin Immunol*, **104**, 601-7.
- Henzgen M, V.S., Deutsche Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI) und Ärzteverband Deutscher Allergologen (ÄDA) (2004) Nahrungsmittelallergien durch immunologische Kreuzreaktionen. *Allergo Journal*, **14:48-59**
- Hilpert, K., Winkler, D.F., & Hancock, R.E. (2007) Peptide arrays on cellulose support: SPOT synthesis, a time and cost efficient method for synthesis of large

- numbers of peptides in a parallel and addressable fashion. *Nat Protoc*, **2**, 1333-49.
- Hinz, G., Menze, A., Hohl, I., & Vaux, D. (1997) Isolation of prolegumin from developing pea seeds: Its binding to endomembranes and assembly into prolegumin hexamers in the protein storage vacuole. *J Exp Bot*, **48**, 139-149.
- Horstmann, C., SCHLESIER, B, OTTO, A, KOSTKA, S, MÜNTZ, K (1993) Polymorphism of legumin subunits from field bean (*Vicia faba* L. var. minor) and its relation to the corresponding multigene family. *Theor. Appl. Gen*, **86**.
- Host, A. & Halcken, S. (1990) A prospective study of cow milk allergy in Danish infants during the first 3 years of life. Clinical course in relation to clinical and immunological type of hypersensitivity reaction. *Allergy*, **45**, 587-96.
- Hummel, J., Niemann, M., Wienkoop, S., Schulze, W., Steinhäuser, D., Selbig, J., Walther, D., & Weckwerth, W. (2007) ProMEX: a mass spectral reference database for proteins and protein phosphorylation sites. *BMC Bioinformatics*, **8**, 216.
- IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee list: Ballmer-Weber BK, S.S., Vieths, S (2003) Update: Kreuzreaktivität zwischen Allergenen in Nahrungsmitteln und Birkenpollen. *Allergologie* **26** 463-73 <http://www.allergen.org>.
- Jacquetet S, M.-V.D. (2007) Allergy to peanut and all kinds of nuts. *Rev Fr Allergol Immunol Clin*.
- Jones, S., Stewart, M., Michie, A., Swindells, M.B., Orengo, C., & Thornton, J.M. (1998) Domain assignment for protein structures using a consensus approach: characterization and analysis. *Protein Sci*, **7**, 233-42.
- Jung, R., Scott, M.P., Nam, Y.W., Beaman, T.W., Bassuner, R., Saalbach, I., Muntz, K., & Nielsen, N.C. (1998a) The role of proteolysis in the processing and assembly of 11S seed globulins. *Plant Cell*, **10**, 343-357.
- Jung, R., Scott, M.P., Nam, Y.W., Beaman, T.W., Bassuner, R., Saalbach, I., Muntz, K., & Nielsen, N.C. (1998b) The role of proteolysis in the processing and assembly of 11S seed globulins. *Plant Cell*, **10**, 343-57.
- King, T.P. & Spangfort, M.D. (2000) Structure and biology of stinging insect venom allergens. *Int Arch Allergy Immunol*, **123**, 99-106.
- Kondo, Y., Urisu, A., & Tokuda, R. (2001) Identification and characterization of the allergens in the tomato fruit by immunoblotting. *Int Arch Allergy Immunol*, **126**, 294-9.
- Kondo, Y., Urisu, A., Wada, E., Tsuruta, M., Yasaki, T., Yamada, K., Masuda, S., & Morita, Y. (1993) [Allergen analysis of buckwheat by the immunoblotting method]. *Alerugi*, **42**, 142-8.
- Kraft, D., Ferreira, F., Vrtala, S., Breiteneder, H., Ebner, C., Valenta, R., Susani, M., Breitenbach, M., & Scheiner, O. (1999) The importance of recombinant allergens for diagnosis and therapy of IgE-mediated allergies. *Int Arch Allergy Immunol*, **118**, 171-6.
- Kristensen, A.K., Schou, C., & Roepstorff, P. (1997) Determination of isoforms, N-linked glycan structure and disulfide bond linkages of the major cat allergen Fel d1 by a mass spectrometric approach. *Biol Chem*, **378**, 899-908.
- Kroegel, C. (2002) *Asthma bronchiale* Thieme, Stuttgart, New York.
- Kroegel, C.F., M; Workalemahu, G et al. (2001) *Grundlagen der astmatischen Entzündung* Zärztl Fortbild Qualitätsich.
- Lauer, I., Foetisch, K., Kolarich, D., Ballmer-Weber, B.K., Conti, A., Altmann, F., Vieths, S., & Scheurer, S. (2004) Hazelnut (*Corylus avellana*) vicilin Cor a 11: molecular characterization of a glycoprotein and its allergenic activity. *Biochem J*, **383**, 327-34.

- Lehrer, S.B., Horner, W.E., & Reese, G. (1996) Why are some proteins allergenic? Implications for biotechnology. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **36**, 553-64.
- Lleonart, R., Cistero, A., Carreira, J., Batista, A., & Moscoso del Prado, J. (1992) Food allergy: identification of the major IgE-binding component of peach (*Prunus persica*). *Ann Allergy*, **69**, 128-30.
- Lopez-Torrejón, G., Salcedo, G., Martín-Esteban, M., Díaz-Perales, A., Pascual, C.Y., & Sánchez-Monge, R. (2003) Len c 1, a major allergen and vicilin from lentil seeds: protein isolation and cDNA cloning. *J Allergy Clin Immunol*, **112**, 1208-15.
- Ma, S., Sicherer, S.H., & Nowak-Węgrzyn, A. (2003) A survey on the management of pollen-food allergy syndrome in allergy practices. *J Allergy Clin Immunol*, **112**, 784-8.
- Marti-Renom, M.A., Stuart, A.C., Fiser, A., Sanchez, R., Melo, F., & Sali, A. (2000) Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, **29**, 291-325.
- Maruyama, N., Adachi, M., Takahashi, K., Yagasaki, K., Kohno, M., Takenaka, Y., Okuda, E., Nakagawa, S., Mikami, B., & Utsumi, S. (2001) Crystal structures of recombinant and native soybean beta-conglycinin beta homotrimers. *Eur J Biochem*, **268**, 3595-604.
- Merkel, R., Waack, S (2002) *Bioinformatik interaktiv*. Wiley-VCH.
- Muentz, K. (1996) Proteases and proteolytic cleavage of storage proteins in developing and germinating dicotyledonous seeds. *J. Exp. Bot.*, **47**, 605 - 622.
- Muentz, K., HORSTMANN, C, SCHLESIER, B (1986) Seed proteins and their genetics in *Vicia faba* L. *Biol. Zentralblatt*, **105**.
- Muentz, K., HORSTMANN, C, SCHLESIER, B (1999). *Vicia globulins*. In *Seed Proteins*: pp. 259 - 284. Kluwer Academic Publ., Dordrecht, Niederlande.
- Muntz, K. (1998) Deposition of storage proteins. *Plant Mol Biol*, **38**, 77-99.
- Muntz, K., Belozersky, M.A., Dunaevsky, Y.E., Schlereth, A., & Tiedemann, J. (2001) Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. *J Exp Bot*, **52**, 1741-52.
- Ortolani, C., Bruijnzeel-Koomen, C., Bengtsson, U., Bindslev-Jensen, C., Bjorksten, B., Host, A., Ispano, M., Jarish, R., Madsen, C., Nekam, K., Paganelli, R., Poulsen, L.K., & Wuthrich, B. (1999) Controversial aspects of adverse reactions to food. European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI) Reactions to Food Subcommittee. *Allergy*, **54**, 27-45.
- Ortolani, C., Ispano, M., Ansaloni, R., Rotondo, F., Incorvaia, C., & Pastorello, E.A. (1998) Diagnostic problems due to cross-reactions in food allergy. *Allergy*, **53**, 58-61.
- Ortolani, C., Ispano, M., Pastorello, E., Bigi, A., & Ansaloni, R. (1988) The oral allergy syndrome. *Ann Allergy*, **61**, 47-52.
- Ortolani, C., Ispano, M., Pastorello, E.A., Ansaloni, R., & Magri, G.C. (1989) Comparison of results of skin prick tests (with fresh foods and commercial food extracts) and RAST in 100 patients with oral allergy syndrome. *J Allergy Clin Immunol*, **83**, 683-90.
- Osborne, T.B. (1913) The Nutritive Value of the Proteins of Maize. *Science*, **37**, 185-191.
- Otto, A., Thiede, B., Müller, E.C., Scheler, C., Wittmann-Liebold, B., & Jungblut, P. (1996) Identification of human myocardial proteins separated by two-dimensional electrophoresis using an effective sample preparation for mass spectrometry. *Electrophoresis*, **17**, 1643-1650.

- Pacios, L.F., Tordesillas, L., Cuesta-Herranz, J., Compes, E., Sanchez-Monge, R., Palacin, A., Salcedo, G., & Diaz-Perales, A. (2008) Mimotope mapping as a complementary strategy to define allergen IgE-epitopes: Peach Pru p 3 allergen as a model. *Mol Immunol*.
- Park, J.W., Kang, D.B., Kim, C.W., Koh, S.H., Yum, H.Y., Kim, K.E., Hong, C.S., & Lee, K.Y. (2000) Identification and characterization of the major allergens of buckwheat. *Allergy*, **55**, 1035-41.
- Pastorello, E.A., D'Ambrosio, F.P., Pravettoni, V., Farioli, L., Giuffrida, G., Monza, M., Ansaloni, R., Fortunato, D., Scibola, E., Rivolta, F., Incorvaia, C., Bengtsson, A., Conti, A., & Ortolani, C. (2000) Evidence for a lipid transfer protein as the major allergen of apricot. *J Allergy Clin Immunol*, **105**, 371-7.
- Pastorello, E.A., Farioli, L., Pravettoni, V., Giuffrida, M.G., Ortolani, C., Fortunato, D., Trambaioli, C., Scibola, E., Calamari, A.M., Robino, A.M., & Conti, A. (2001) Characterization of the major allergen of plum as a lipid transfer protein. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, **756**, 95-103.
- Pastorello, E.A., Farioli, L., Pravettoni, V., Ortolani, C., Ispano, M., Monza, M., Baroglio, C., Scibola, E., Ansaloni, R., Incorvaia, C., & Conti, A. (1999a) The major allergen of peach (*Prunus persica*) is a lipid transfer protein. *J Allergy Clin Immunol*, **103**, 520-6.
- Pastorello, E.A., Ortolani, C., Farioli, L., Pravettoni, V., Ispano, M., Borga, A., Bengtsson, A., Incorvaia, C., Berti, C., & Zanussi, C. (1994) Allergenic cross-reactivity among peach, apricot, plum, and cherry in patients with oral allergy syndrome: an in vivo and in vitro study. *J Allergy Clin Immunol*, **94**, 699-707.
- Pastorello, E.A., Pravettoni, V., Farioli, L., Ispano, M., Fortunato, D., Monza, M., Giuffrida, M.G., Rivolta, F., Scibola, E., Ansaloni, R., Incorvaia, C., Conti, A., & Ortolani, C. (1999b) Clinical role of a lipid transfer protein that acts as a new apple-specific allergen. *J Allergy Clin Immunol*, **104**, 1099-106.
- Pastorello, E.A., Vieths, S., Pravettoni, V., Farioli, L., Trambaioli, C., Fortunato, D., Luttkopf, D., Calamari, M., Ansaloni, R., Scibilia, J., Ballmer-Weber, B.K., Poulsen, L.K., Wutrich, B., Hansen, K.S., Robino, A.M., Ortolani, C., & Conti, A. (2002) Identification of hazelnut major allergens in sensitive patients with positive double-blind, placebo-controlled food challenge results. *J Allergy Clin Immunol*, **109**, 563-70.
- Pearson, W.R. & Lipman, D.J. (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 2444-8.
- Peeters, K.N., JA; Penninks, AH; Chen, L; Goodman, RE; Bruijnzeel-Koomen, CA; Hefle, SL; Taylor, SL; Knulst, AC (2007) Lupine allergy: Not simply cross-reactivity with peanut or soy. *J Allergy Clin Immunol*.
- Peng, J.M., Elias, J.E., Thoreen, C.C., Licklider, L.J., & Gygi, S.P. (2003) Evaluation of multidimensional chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC/LC-MS/MS) for large-scale protein analysis: The yeast proteome. *Journal of Proteome Research*, **2**, 43-50.
- Petersen, A., Vieths, S., Aulepp, H., Schlaak, M., & Becker, W.M. (1996) Ubiquitous structures responsible for IgE cross-reactivity between tomato fruit and grass pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol*, **98**, 805-15.
- Peterson, A., Mund, C (2000) Investigations on the carbohydrate moieties of glycoprotein allergens. *J Chromatogr B*, **756**, 141-150.
- Platz, I.J., Binder, M., Marxer, A., Lischka, G., Valent, P., & Bühring, H.J. (2001) Hymenoptera-venom-induced upregulation of the basophil activation marker ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3 in sensitized individuals. *Int Arch Allergy Immunol*, **126**, 335-42.

- Poley, G.E., Jr. & Slater, J.E. (2000) Latex allergy. *J Allergy Clin Immunol*, **105**, 1054-62.
- Pons, L., Palmer, K., & Burks, W. (2005) Towards immunotherapy for peanut allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, **5**, 558-62.
- Radauer, C. & Breiteneder, H. (2007) Evolutionary biology of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol*, **120**, 518-25.
- Radauer, C., Willeroider, M., Fuchs, H., Hoffmann-Sommergruber, K., Thalhamer, J., Ferreira, F., Scheiner, O., & Breiteneder, H. (2006) Cross-reactive and species-specific immunoglobulin E epitopes of plant profilins: an experimental and structure-based analysis. *Clin Exp Allergy*, **36**, 920-9.
- Reche, M., Pascual, C.Y., Vicente, J., Caballero, T., Martin-Munoz, F., Sanchez, S., & Martin-Esteban, M. (2001) Tomato allergy in children and young adults: cross-reactivity with latex and potato. *Allergy*, **56**, 1197-201.
- Reineke, U., Kramer, A., & Schneider-Mergener, J. (1999) Antigen sequence- and library-based mapping of linear and discontinuous protein-protein-interaction sites by spot synthesis. *Curr Top Microbiol Immunol*, **243**, 23-36.
- Renz, H.B., WM; Bufe, A; Kleine-Tebbe, J; Raulf-Heimsoth, M; Saloga, J; Werfel, T; Worm, M (2002) In-vitro-Allergiediagnostik. Positionspapier der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAI). *Allergo J*, **8**.
- Ring, J. (2006) [100 years ago in the MMW: the birth of allergy. An overview from the beginnings to molecular therapy]. *MMW Fortschr Med*, **148**, 23-4.
- Ring, J., Eberlein-Koenig, B., & Behrendt, H. (2001) Environmental pollution and allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol*, **87**, 2-6.
- Ring J, F.T., SCHULTZE-WERNINGHAUS, G (2004) *Weißbuch Allergie in Deutschland (2. aktualisierte Auflage)* Urban & Vogel Medien und Medizin Verlagsgesellschaft mbH & Co KG München.
- Ronchetti, R., Kaczmarek, M.G., Haluszka, J., Jesenak, M., & Villa, M.P. (2007) Food allergies, cross-reactions and agroalimentary biotechnologies. *Adv Med Sci*, **52**, 98-103.
- Rout, M.K. & Chrungoo, N.K. (1996) Partial characterization of the lysine rich 280kD globulin from common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench): its antigenic homology with seed proteins of some other crops. *Biochem Mol Biol Int*, **40**, 587-95.
- Rueckert, D.G. & Schmidt, K. (1990) Lipid transfer proteins. *Chem Phys Lipids*, **56**, 1-20.
- Sampson, H.A. (1991) Food hypersensitivity and atopic dermatitis. *Allergy Proc*, **12**, 327-31.
- Sampson, H.A. (1996) Epidemiology of food allergy. *Pediatr Allergy Immunol*, **7**, 42-50.
- Sampson, H.A. (1999a) Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy Clin Immunol*, **103**, 717-28.
- Sampson, H.A. (1999b) Food allergy. Part 2: diagnosis and management. *J Allergy Clin Immunol*, **103**, 981-9.
- Sampson, H.A. & Metcalfe, D.D. (1992) Food allergies. *Jama*, **268**, 2840-4.
- Sanchez-Monge, R., Blanco, C., Diaz-Perales, A., Collada, C., Carrillo, T., Aragoncillo, C., & Salcedo, G. (1999a) Isolation and characterization of major banana allergens: identification as fruit class I chitinases. *Clin Exp Allergy*, **29**, 673-80.
- Sanchez-Monge, R., Lombardero, M., Garcia-Selles, F.J., Barber, D., & Salcedo, G. (1999b) Lipid-transfer proteins are relevant allergens in fruit allergy. *J Allergy Clin Immunol*, **103**, 514-9.

- Sanchez, R. & Sali, A. (1997) Evaluation of comparative protein structure modeling by MODELLER-3. *Proteins-Structure Function and Genetics*, 50-58.
- Sankian, M., Varasteh, A., Pazouki, N., & Mahmoudi, M. (2005) Sequence homology: a poor predictive value for profilins cross-reactivity. *Clin Mol Allergy*, **3**, 13.
- Scallen, T.J., Pastuszyn, A., Noland, B.J., Chanderbhan, R., Kharroubi, A., & Vahouny, G.V. (1985) Sterol carrier and lipid transfer proteins. *Chem Phys Lipids*, **38**, 239-61.
- Scheurer, S., Pastorello, E.A., Wangorsch, A., Kastner, M., Hausteiner, D., & Vieths, S. (2001a) Recombinant allergens Pru av 1 and Pru av 4 and a newly identified lipid transfer protein in the in vitro diagnosis of cherry allergy. *J Allergy Clin Immunol*, **107**, 724-31.
- Scheurer, S., Son, D.Y., Boehm, M., Karamloo, F., Franke, S., Hoffmann, A., Hausteiner, D., & Vieths, S. (1999) Cross-reactivity and epitope analysis of Pru a 1, the major cherry allergen. *Mol Immunol*, **36**, 155-67.
- Scheurer, S., Wangorsch, A., Nerkamp, J., Skov, P.S., Ballmer-Weber, B., Wüthrich, B., Hausteiner, D., & Vieths, S. (2001b) Cross-reactivity within the profilin panallergen family investigated by comparison of recombinant profilins from pear (Pyr c 4), cherry (Pru av 4) and celery (Api g 4) with birch pollen profilin Bet v 2. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, **756**, 315-25.
- Scott, D.L., Otwinowski, Z., Gelb, M.H., & Sigler, P.B. (1990) Crystal structure of bee-venom phospholipase A2 in a complex with a transition-state analogue. *Science*, **250**, 1563-6.
- Senti, G., Ballmer-Weber, BK, Wüthrich, B (2000) Nüsse, Samen und Kerne aus allergologischer Sicht. *Schweiz Med Wochenschr*, **130**.
- Seppala, U., Alenius, H., Turjanmaa, K., Reunala, T., Palosuo, T., & Kalkkinen, N. (1999) Identification of patatin as a novel allergen for children with positive skin prick test responses to raw potato. *J Allergy Clin Immunol*, **103**, 165-71.
- Sheoran, I.S., Olson, D.J., Ross, A.R., & Sawhney, V.K. (2005) Proteome analysis of embryo and endosperm from germinating tomato seeds. *Proteomics*, **5**, 3752-64.
- Shewry, P.R. (1995) Plant storage proteins. *Biol Rev Camb Philos Soc*, **70**, 375-426.
- Shin, D.S., Compadre, C.M., Maleki, S.J., Kopper, R.A., Sampson, H., Huang, S.K., Burks, A.W., & Bannon, G.A. (1998) Biochemical and structural analysis of the IgE binding sites on ara h1, an abundant and highly allergenic peanut protein. *J Biol Chem*, **273**, 13753-9.
- Sicherer, S., Sampson, HA (2006) 9. Food allergy. *J Allergy Clin Immunol*, **117**, S470-5.
- Slightom, J., Drong, RF, Klassy, RC, Hoffman, LM. (Sep 1985) Nucleotide sequences from phaseolin cDNA clones: the major storage proteins from Phaseolus vulgaris are encoded by two unique gene families. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 6483-98.
- Slightom, J.L., Drong, R.F., Klassy, R.C., & Hoffman, L.M. (1985) Nucleotide sequences from phaseolin cDNA clones: the major storage proteins from Phaseolus vulgaris are encoded by two unique gene families. *Nucleic Acids Res*, **13**, 6483-98.
- Soding, J., Biegert, A., & Lupas, A.N. (2005) The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Res*, **33**, W244-8.
- Stadler, M. (2004) Lösen gentechnisch veränderte Nahrungsmittel Allergien aus? *BioFokus Mitteilungsblatt Nr. 66*.

- Stand (Februar 2006). Directorate-General for Agriculture and Rural Development: Agriculture in the European Union - Statistical and economic information 2005. In *European Union*, Vol. Abschnitt 4.5.1.1. S5
- Stand 2005 Vgl. <http://faostat.fao.org/>.
- Stanley, J.S. & Bannon, G.A. (1999) Biochemistry of food allergens. *Clin Rev Allergy Immunol*, **17**, 279-91.
- Steinke, M., Fiocchi, A., Kirchlechner, V., Ballmer-Weber, B., Brockow, K., Hischenhuber, C., Dutta, M., Ring, J., Urbanek, R., Terracciano, L., & Wezel, R. (2007) Perceived food allergy in children in 10 European nations. A randomised telephone survey. *Int Arch Allergy Immunol*, **143**, 290-5.
- Stott, D.I. (2000) Immunoblotting, dot-blotting, and ELISPOT assays: methods and applications. *J Immunoassay*, **21**, 273-96.
- Tabb, D.L., McDonald, W.H., & Yates, J.R. (2002) DTASelect and contrast: Tools for assembling and comparing protein identifications from shotgun proteomics. *Journal of Proteome Research*, **1**, 21-26.
- Teuber, S.S., Jarvis, K.C., Dandekar, A.M., Peterson, W.R., & Ansari, A.A. (1999) Identification and cloning of a complementary DNA encoding a vicilin-like proprotein, jug r 2, from english walnut kernel (*Juglans regia*), a major food allergen. *J Allergy Clin Immunol*, **104**, 1311-20.
- Teuber, S.S., Sathe, S.K., Peterson, W.R., & Roux, K.H. (2002) Characterization of the soluble allergenic proteins of cashew nut (*Anacardium occidentale* L.). *J Agric Food Chem*, **50**, 6543-9.
- Thanh, V.H. & Shibasaki, K. (1977) Beta-conglycinin from soybean proteins. Isolation and immunological and physicochemical properties of the monomeric forms. *Biochim Biophys Acta*, **490**, 370-84.
- Tretter, V., Altmann, F., Kubelka, V., Marz, L., & Becker, W.M. (1993) Fucose alpha 1,3-linked to the core region of glycoprotein N-glycans creates an important epitope for IgE from honeybee venom allergic individuals. *Int Arch Allergy Immunol*, **102**, 259-66.
- Uhlemann, L., Becker, W.M., & Schlaak, M. (1993) [Food allergy: identifying and characterizing peanut allergens with patient sera and monoclonal antibodies]. *Z Ernährungswiss*, **32**, 139-51.
- Urisu, A., Kondo, Y., Morita, Y (1994) Identification of a major allergen of buckwheat seeds by immunoblotting methods. *Allergy Clin Int*, **6**.
- Valenta, R., Duchene, M., Ebner, C., Valent, P., Sillaber, C., Deviller, P., Ferreira, F., Tejkl, M., Edelmann, H., Kraft, D., & et al. (1992) Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens. *J Exp Med*, **175**, 377-85.
- Valenta, R., Vrtala, S., Laffer, S., Spitzauer, S., & Kraft, D. (1998) Recombinant allergens. *Allergy*, **53**, 552-61.
- Vallier, P., DeChamp, C., Valenta, R., Vial, O., & Deviller, P. (1992) Purification and characterization of an allergen from celery immunochemically related to an allergen present in several other plant species. Identification as a profilin. *Clin Exp Allergy*, **22**, 774-82.
- van Boxtel, E.L., Koppelman, S.J., van den Broek, L.A., & Gruppen, H. (2008) Determination of Pepsin-Susceptible and Pepsin-Resistant Epitopes in Native and Heat-Treated Peanut Allergen Ara h 1. *J Agric Food Chem*.
- van Ree, R., Voitenko, V., van Leeuwen, W.A., & Aalberse, R.C. (1992) Profilin is a cross-reactive allergen in pollen and vegetable foods. *Int Arch Allergy Immunol*, **98**, 97-104.
- Vieths, S. (1996). Characterisation of labile and stable allergens in foods of plant origin. In *Food allergies and intolerances*. Verlag Chemie - Weinheim 130-148.

- Vieths, S., Scheurer, S., & Ballmer-Weber, B. (2002) Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. *Ann N Y Acad Sci*, **964**, 47-68.
- Wagner, S. & Breiteneder, H. (2002) The latex-fruit syndrome. *Biochem Soc Trans*, **30**, 935-40.
- Wagner, S., Radauer, C., Hafner, C., Fuchs, H., Jensen-Jarolim, E., Wuthrich, B., Scheiner, O., & Breiteneder, H. (2004) Characterization of cross-reactive bell pepper allergens involved in the latex-fruit syndrome. *Clin Exp Allergy*, **34**, 1739-46.
- Wal, J.M. (1999) Assessment of allergic potential of (novel) foods. *Nahrung*, **43**, 168-74.
- Wall, D.B., Kachman, M.T., Gong, S., Hinderer, R., Parus, S., Misek, D.E., Hanash, S.M., & Lubman, D.M. (2000) Isoelectric focusing nonporous RP HPLC: a two-dimensional liquid-phase separation method for mapping of cellular proteins with identification using MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Chem*, **72**, 1099-111.
- Wang, F., Robotham, J.M., Teuber, S.S., Sathe, S.K., & Roux, K.H. (2003a) Ana o 2, a major cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut allergen of the legumin family. *Int Arch Allergy Immunol*, **132**, 27-39.
- Wang, F., Robotham, J.M., Teuber, S.S., Sathe, S.K., & Roux, K.H. (2003b) Ana o 2, a major cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut allergen of the legumin family. *Int Arch Allergy Immunol*, **132**, 27-39.
- Wensing, M., Knulst, A.C., Piersma, S., O'Kane, F., Knol, E.F., & Koppelman, S.J. (2003) Patients with anaphylaxis to pea can have peanut allergy caused by cross-reactive IgE to vicilin (*Ara h 1*). *J Allergy Clin Immunol*, **111**, 420-4.
- Westphal, S., Kempf, W., Foetisch, K., Retzek, M., Vieths, S., & Scheurer, S. (2004a) Tomato profilin Lyc e 1: IgE cross-reactivity and allergenic potency. *Allergy*, **59**, 526-32.
- Westphal, S., Kempf, W., Foetisch, K., Retzek, M., Vieths, S., & Scheurer, S. (2004b) Tomato profilin Lyc e 1: IgE cross-reactivity and allergenic potency. *Allergy*, **59**, 526-532.
- Westphal, S., Kolarich, D., Foetisch, K., Lauer, I., Altmann, F., Conti, A., Crespo, J.F., Rodriguez, J., Enrique, E., Vieths, S., & Scheurer, S. (2003) Molecular characterization and allergenic activity of Lyc e 2 (beta-fructofuranosidase), a glycosylated allergen of tomato. *Eur J Biochem*, **270**, 1327-37.
- WHO (2001a) Evaluation of the allergenicity of genetically modified foods. . *Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology 22 - 25 January 2001*.
- WHO (2001b). Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology. In *Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)*.
- Wienkoop, S., Glinski, M., Tanaka, N., Tolstikov, V., Fiehn, O., & Weckwerth, W. (2004) Linking protein fractionation with multidimensional monolithic reversed-phase peptide chromatography/mass spectrometry enhances protein identification from complex mixtures even in the presence of abundant proteins. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **18**, 643-50.
- Wienkoop, S., Larrainzar, E., Niemann, M., Gonzalez, E.M., Lehmann, U., & Weckwerth, W. (2006a) Stable isotope-free quantitative shotgun proteomics combined with sample pattern recognition for rapid diagnostics. *J Sep Sci*, **29**, 2793-801.

- Wienkoop, S. & Weckwerth, W. (2006b) Relative and absolute quantitative shotgun proteomics: targeting low-abundance proteins in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot*, **57**, 1529-35.
- Willeroider, M., Fuchs, H., Ballmer-Weber, B.K., Focke, M., Susani, M., Thalhamer, J., Ferreira, F., Wüthrich, B., Scheiner, O., Breiteneder, H., & Hoffmann-Sommergruber, K. (2003) Cloning and molecular and immunological characterisation of two new food allergens, Cap a 2 and Lyc e 1, profilins from bell pepper (*Capsicum annuum*) and Tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Int Arch Allergy Immunol*, **131**, 245-55.
- Wilson, I.B. & Altmann, F. (1998) Structural analysis of N-glycans from allergenic grass, ragweed and tree pollens: core alpha1,3-linked fucose and xylose present in all pollens examined. *Glycoconj J*, **15**, 1055-70.
- Wobus, U., Baumlein, H., Bassuner, R., Heim, U., Jung, R., Muntz, K., Saalbach, G., & Weschke, W. (1986) Characteristics of 2 Types of Legumin Genes in the Field Bean (*Vicia-Faba L Var Minor*) Genome as Revealed by Cdna Analysis. *FEBS Lett*, **201**, 74-80.
- Wüthrich, B. (1993) *Zur Nahrungsmittelallergie: Häufigkeit der Symptome und er allergieauslösenden Nahrungsmittel bei 402 Patienten* Allergologie; 16:280-287.
- Wüthrich, B. (1996). *Nahrungsmittel und Allergie*. Diagnostik-Häufigkeit der Symptome und der allergieauslösenden Nahrungsmittel bei Erwachsenen, München, Düstri-Verlag.
- Wüthrich, B. & Schmid-Grendelmeier, P. (1995). Nahrungsmittelallergien. In, Vol. 36. Internist.
- Yamamoto, N., Tsugane, T., Watanabe, M., Yano, K., Maeda, F., Kuwata, C., Torki, M., Ban, Y., Nishimura, S., & Shibata, D. (2005) Expressed sequence tags from the laboratory-grown miniature tomato (*Lycopersicon esculentum*) cultivar Micro-Tom and mining for single nucleotide polymorphisms and insertions/deletions in tomato cultivars. *Gene*, **356**, 127-34.
- Yoshioka, H., Ohmoto, T., Urisu, A., Mine, Y., & Adachi, T. (2004) Expression and epitope analysis of the major allergenic protein Fag e 1 from buckwheat. *J Plant Physiol*, **161**, 761-7.

10 Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe, die Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Potsdam, den 07.07.2008

Olivia Bäßler

Vorträge, Poster und Publikation

O. Bäßler

„Tomato allergen proteome analysis using LC-MS/MS“
Poster - HUPO 4th Annual World Congress
München, September 2005

O. Bäßler

„Trennung und Identifizierung IgE- reaktiven Tomatenproteinen mittels PF2D und LC-MS/MS“
Vortrag – 1. PF2D- User Meeting
Krefeld, April 2006

Olivia Bäßler, Stefanie Wienkoop, Christian Scheler, Sabine Feller, Margitta Worm, Eva-Maria Fiedler, and Wolfram Weckwerth

„Allergen identification in tomato fruits using three-dimensional protein fractionation and mass spectrometry“

Poster - 39. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS)
Mainz, März 2006

Olivia Bäßler, Stefanie Wienkoop, Christian Scheler, Sabine Feller, Margitta Worm, Eva-Maria Fiedler, and Wolfram Weckwerth

Poster - HUPO 5th Annual World Congress
Long Beach CA, November 2006

O. Bäßler

„Identification of IgE-reactive tomato seed proteins by multidimensional protein fractionation and LC-ESI-MS/MS“

Vortrag – 2nd KiiM retreat
Stockholm, Oktober 2007

O.Y. Bäßler, Julia Weiss, Stefanie Wienkoop, Karola Lehmann, Christian Scheler, Sabine Dölle, Dietmar Schwarz, Philipp Franken, Eckhard George, Margitta Worm, Wolfram Weckwerth (submitted)

“NOVEL TOMATO ALLERGENS: IgE-REACTIVE LEGUMIN AND VICILIN PROTEINS IDENTIFIED BY MULTIDIMENSIONAL PROTEIN FRACTIONATION AND MASS SPECTROMETRY”, *Journal of Proteome Research*