

**Untersuchungen zur
Charakterisierung und Standardisierung
von Allergenextrakten
aus Milbenkulturen**

Vom Fachbereich Erziehungswissenschaft - Psychologie -
Sportwissenschaft der Universität Paderborn
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum medicinalium

- Dr. rer. medic. -

genehmigte Dissertation

von

Ulrich Deppe

in Neuenkirchen

Paderborn, den 8. Februar 2002

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde in den Jahren 1998 bis 2001 am Sportmedizinischen Institut (Leiter: Prof. Dr. med. Heinz Liesen) der Universität Paderborn erarbeitet. Für die Unterstützung und Begleitung während meiner Promotion möchte ich mich an dieser Stelle sehr herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Heinz Liesen danke ich nicht nur für die materielle und moralische Unterstützung der Arbeit, sondern vor allem für die gewährten Freiheiten.

Herrn Prof. Dr. med. Michael Weiß (Sportmedizinisches Institut, Universität Paderborn) danke ich neben der Übernahme des Erstgutachtens für die stete Bereitschaft zur Diskussion.

Herrn Prof. Dr. Dr. med. Henrich Hasko Paradies (Physikalische Technik, MFH Iserlohn) gilt mein besonderer Dank. Das Aufzeigen immer neuer Denkansätze, die engagierte Unterstützung und die lebhaften Diskussionen haben in hohem Maße zum Erfolg beigetragen.

Herrn Dr. med. Horst Müsken und Herrn Prof. Dr. med. Karl Christian Bergmann (Allergie- und Asthma-Klinik, Bad Lippspringe) danke ich herzlich für die spannende Zusammenarbeit, aus der die Fragestellung der vorliegenden Arbeit entstand.

Herrn Dr. Jörg-Thomas Franz schulde ich Dank für die sehr gute und engagierte Zusammenarbeit, auch und besonders unter oft schwierigen Bedingungen.

Bei Herrn PD Dr. Bernhard Westermann und Herrn Prof. Dr.-Ing. Hans Joachim Warnecke möchte ich mich für die Unterstützung bedanken.

Zum Schluß gilt mein Dank dem Team der Sportmedizin. Es war eine klasse Zeit, in der man vor den Scherzen der Kollegen nie sicher war. Vielen Dank dafür!

INHALTSVERZEICHNIS

1	Motivation und Zielsetzung	1
2	Einführung in das Thema	4
2.1	Immunsystem und Allergie.....	4
2.2	Die Entstehung allergischer Erkrankungen	5
2.3	Biologie der Milben	6
2.4	Sensibilisierungen gegenüber Domestic Mites	8
2.5	Biochemie der Allergene	10
2.5.1	Antigene und Allergene.....	10
2.5.2	Nomenklatur der Allergene	11
2.5.3	Was macht ein Allergen zu einem Allergen?.....	11
2.5.3.1	Some allergens are more major than other - wann ist ein Protein ein Major-allergen?	13
2.5.3.2	Epitope, die aktiven Zentren der Allergene	13
2.5.4	Struktur und Allergenität.....	15
2.5.4.1	Polymorphismus und Isoallergene - Variation einzelner Aminosäuren in der Primärsequenz (1D)	15
2.5.4.2	Veränderungen der Sekundärstruktur (2D)	17
2.5.5	Funktion und Allergenität	18
2.5.5.1	Proteaseaktivität.....	18
2.5.5.2	Kreuzallergenität	21
2.6	Klassifizierung und Beschreibung ausgewählter Milbenallergene.....	24
2.7	Allergenextrakte	30
2.7.1	Bedeutung in der Diagnostik	31
2.7.2	Bedeutung in der Therapie	31
2.7.2.1	Peptidtherapie mit Allergoiden	32
2.7.2.2	Unspezifische passive Immuntherapie durch anti-IgE-Antikörper	33
2.7.2.3	Spezifische Immuntherapie (SIT).....	33
2.7.3	Herstellung von Allergenextrakten – eine Übersicht.....	34
2.7.4	Stabilisierung von Allergenextrakten.....	35
2.7.4.1	Polyethylenglykol	40
3	Methoden und Verfahren	42
3.1	Ablauf der Untersuchungen	42
3.2	Probenvorbereitung	43
3.2.1	Verwendete Milbenkulturen	43
3.2.2	Aufschluss der Milbenkulturen	43
3.2.3	Bestimmung der Proteingesamtmasse nach Lowry.....	46
3.2.3.1	DC Protein Assay.....	47
3.2.3.2	Proteinbestimmung nach Lowry (modifiziert)	47
3.2.4	Spezifische Bestimmung von Einzelallergenen mittels Enzym-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA).....	48

3.2.4.1	Bestimmung von Der p 1.....	49
3.2.4.2	Bestimmung von Der p 2.....	50
3.2.5	UV/VIS-Spektroskopie der Allergenextrakte.....	51
3.2.6	Ausschlusschromatographie (SEC).....	52
3.2.7	Diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese (Disk-SDS-PAGE).....	54
3.2.8	Native Elektrophorese.....	58
3.2.9	Isoelektrische Fokussierung (IEF).....	60
3.2.10	Färbung, Dokumentation und Auswertung von Elektrophoresegelele.....	62
3.2.10.1	Kolloidale Coomassie-Färbung [190].....	62
3.2.10.2	Silberanfärbung [191].....	62
3.2.10.3	Trocknen der Gele.....	63
3.2.10.4	Dokumentation und Auswertung der gefärbten Proteinspektren.....	64
3.2.11	Immunoblotting.....	64
3.2.11.1	Chromogene Immunedektion mit BCIP/NBT.....	67
3.2.11.2	Immunoblotting mit Chemilumineszenz (CSPD)-Detektion.....	69
3.2.12	Patientenseren.....	70
3.2.13	Zymogramm.....	71
4	Ergebnisse und Diskussion	74
4.1	UV/VIS-Spektroskopie.....	74
4.2	Spezifische Bestimmung der Majorallergene Der p 1 und Der p 2.....	76
4.3	Ausschlusschromatographie (SEC).....	78
4.4	SDS-PAGE.....	82
4.4.1	Verwendung dissozierender Reagenzien am Beispiel Dithiotreitol (DTT).....	84
4.4.2	Unregelmäßigkeiten der Standardallergene.....	86
4.5	native Elektrophorese.....	88
4.6	Isoelektrische Fokussierung (IEF).....	90
4.7	Immunoblotting.....	93
4.8	Beurteilung der proteolytischen Aktivität mittels Zymogramm.....	101
4.9	MALDI-TOF-MS.....	104
4.10	Exkurs: Diffuse Klein- und Weitwinkel-Röntgenstreuung.....	111
4.11	Abschliessende Diskussion der Ergebnisse.....	114
4.11.1	Empfehlung für eine zukünftige Abfolge.....	117
5	Zusammenfassung und Ausblick	121
5.1	Zusammenfassung der Einzelergebnisse.....	121
5.2	Ausblick.....	123
6	Literatur	125
7	Akürzungsverzeichnis	134

1 MOTIVATION UND ZIELSETZUNG

Allergenextrakte zur Diagnostik und Therapie werden im deutschen Arzneimittelgesetz vom 1. Februar 2001 als Arzneimittel klassifiziert und unterliegen somit den entsprechenden Qualitätskriterien (§ 4 Abs. 15):

„Qualität ist die Beschaffenheit eines Arzneimittels, die nach Identität, Gehalt, Reinheit, sonstigen chemischen, physikalischen, biologischen Eigenschaften oder durch das Herstellungsverfahren bestimmt wird.“

Allgemeingültige Methoden zur Extrakterstellung und zur Standardisierung fehlen bis auf wenige Ausnahmen [1]. Bei Arzneizubereitungen mit und ohne wirksamkeitsbestimmenden Substanzen (Chemische Verbindungen, Naturstoffe mit definierter pharmakologischer Wirkung) ist der gesamte Anteil des „Extraktes“ maßgebend und auch qualitätsbestimmend, d.h. eine Normierung auf nur einen Inhaltsstoff kann somit nicht erfolgen. Die Standardisierung ergibt sich aus der Spezifikation der Extraktzubereitung des so beschriebenen Standards, der reproduzierbar erreicht werden muss. Das Verhältnis von nativem Extrakt zu technischen Hilfsmitteln muss bei allen Chargen konstant sein und bleiben (Stabilität, Lagerungsfähigkeit, zwei Jahresfrist und Stresstest). Da das allergisch wirksame Protein oder Proteingemisch als der wirksamkeitsbestimmende Inhaltsstoff angesehen werden kann, muss hier pharmakologisch von einer Normierung und nicht von einer Standardisierung gesprochen werden.

Das Fehlen nationaler und internationaler Standards bedingt große Qualitätsunterschiede zwischen den Präparaten verschiedener Hersteller [2] und erfordert so eine komplexe und aufwendige Qualitätssicherung. Diese wird mit einem ganzen Arsenal analytischer Verfahren mit höchst unterschiedlicher Aussagekraft betrieben, die zudem vom Anwender aufgrund fehlender Vorgaben individuell zusammengestellt werden. Qualität ist bei der Herstellung von Allergenextrakten kein wohl definierter, allgemein anerkannter und geprüfter Zustand, sondern eine individuelle Interpretation des Herstellers. Ein Vergleich mit anderen Herstellern ist nicht vorgeschrieben und führt in der Regel zu großen qualitativen Unterschieden [2]. Die Schwankungsbreiten der Aktivitätsbestimmungen industriell hergestellter Extrakte liegen zwischen 12 und 30 % [3], womit sich die Unternehmen aber immer noch im Rahmen der von der Europäischen Kommission vorgegebenen Varianz von 50 bis zu 200 % bewegen [4].

Als einzige Vorgabe zur Qualitätssicherung und -erreichung wurde daher gefordert, dass Herstellungs- und Kontrollmethoden nach dem jeweiligen „Stand der

wissenschaftlichen Erkenntnis“ angewandt werden müssen. Eine *in-vivo* Hauttestung zur biologischen Aktivität ist nur bei der erstmaligen Zulassung des Präparates vorgeschrieben, die nachfolgende Chargenkontrolle erfolgt *in-vitro*.

In Ermangelung verbindlicher nationaler und/oder internationaler Vorgaben zur Allergenstandardisierung und Qualitätskontrolle werden Extrakte hinsichtlich ihrer globalen Aktivität

- auf biologischer Basis (Histaminäquivalent im Pricktest), und
- durch eine *in-vitro*-Methodik (z.B. EAST¹-Inhibition oder Histamiliberation) eingeschätzt.

Flankierend werden Untersuchungen zur Zusammensetzung durch SDS-PAGE², IEF³ und andere unspezifische Fraktionierungen durchgeführt. Eine Allergenidentifizierung durch Immunoblotting sowie eine Bestimmung weniger Majorallergene runden die Charakterisierung ab [5].

Die Standardisierung der Allergenstandards anhand biologischer Einheiten ist sinnvoll, da sie die Summe aller individuellen Aktivitäten repräsentieren. Allerdings sind keinerlei Rückschlüsse auf individuelle Allergenkonzentrationen möglich, so dass eine hohe Aktivität u.U. auch ohne Majorallergene zustande kommen kann. Des weiteren ist eine biologische Standardisierung nur möglich, wenn die Anamnese genauestens bekannt ist. Ansonsten kann es zu einer erheblichen Diskrepanz zwischen den Hauttestergebnissen und der IgE- basierten *in vitro* Diagnostik kommen [6].

Betrachtet man hingegen die allergene Aktivität eines Allergenextraktes als die Summe einzelner Komponenten, wobei jede Komponente bzw. jedes Allergen einen individuellen Beitrag liefert, so bekommt die Bestimmung von Einzelallergenen und die Zuordnung individueller spezifischer Aktivitäten eine neue Bedeutung. Das Zukunftsszenario eines solchen modularen „Baukastens“ mit Allergenen als „Bauklötzen“, die frei zu patientenspezifischen Extrakten für Diagnostik und zur Therapie kombiniert werden können, erscheint als ein reizvolles Ziel.

In der vorliegenden Arbeit wurden zu diesem Zweck u.a. Untersuchungen

1. zum schonenden Aufschluss von Milbenkulturen,
2. zur physikalisch-chemischen Charakterisierung,
3. zur funktionellen Aktivität des Extraktes sowie

¹ Enzyme Allergo Sorbent Assay

² Sodium Dodecyl Sulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

³ Isoelektrische Fokussierung

4. zur Fragmentierung und Struktur der allergenen Komponenten unternommen.

Objekt der Untersuchungen waren Kulturen der Hausstaubmilbe *Dermatophagoides pteronyssinus* verschiedener Hersteller und eine Kultur der Vorratsmilbe *Lepidoglyphus destructor*.

2 EINFÜHRUNG IN DAS THEMA

2.1 IMMUNSYSTEM UND ALLERGIE

Das Immunsystem besteht aus funktionell ausdifferenzierten Leukozyten, die im Blut und in den Lymphgefäßen auf der Suche nach fremden Antigenen zirkulieren.

Die Immunabwehr setzt sich aus zwei unterschiedlichen Komponenten zusammen, dem angeborenen und adaptiven Immunsystem. Das angeborene System besteht aus Makrophagen, Neutrophilen, Mastzellen, Granulozyten und NK-Zellen⁴, alle ohne spezifische Antigen-Rezeptoren. Die Reaktion dieses Teils des Immunsystems erfolgt in allen Individuen gleich [7].

Das adaptive Immunsystem proliferiert nach dem Erstkontakt mit einem körperfremden Antigen spezifische Zellen identischer Ausprägung und Rezeptoreigenschaften. Diese B- und T-Zellen besitzen Antigen-spezifische Rezeptoren. B-Zellrezeptoren bestehen aus spezifischen Immunglobulin-(Ig)-funktionen, während T-Zellen eigene Rezeptoren (TcR) auf ihrer Oberfläche besitzen. Diese existieren im Gegensatz zu den Immunglobulinen nicht in freier Form, sondern nur zellgebunden. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass B-Zellen Antigene direkt erkennen (hauptsächlich konformationelle Epitope) [8], T-Zellrezeptoren hingegen an peptidartige, lineare Antigenbruchstücke binden (sequenzielle Epitope), die in Kombination mit dem Major Histokompatibilitäts Komplex (MHC) auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen (APC) den T-Zellen präsentiert werden. Als APC kann jede Zelle bezeichnet werden, die MHC an ihrer Oberfläche exponiert, wodurch Peptide gebunden werden. Besonders B-Zellen, Dendritische Zellen und Monozyten bzw. Makrophagen fungieren als APC, aber auch Endothelzellen und Fibroblasten sind hierzu in der Lage [9]. APC nehmen bevorzugt aggregierte oder partikuläre Antigene auf. Je größer und je komplexer ein Protein ist und je weniger es mit körpereigenen verwandt ist, um so größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass es Peptidfragmente enthält, die an MHC-II-Moleküle binden und sich von körpereigenen Peptiden unterscheiden [10]. Die MHC Moleküle werden in zwei Klassen, MHC I und MHC II, eingeteilt und besitzen den höchsten bekannten Grad an allelen Polymorphismen. B- und T-Zellen bilden einen wichti-

⁴ Natural Killer Zellen

gen Teil des immunologischen Gedächtnisses, da es sich um sehr langlebige Zellen handelt [11].

2.2 DIE ENTSTEHUNG ALLERGISCHER ERKRANKUNGEN

Allergische Erkrankungen durch Milben sind nach der Einteilung von Coombs und Gell [12] Hypersensibilisierungsreaktionen vom Typ I. Hierbei dringt das Allergen in den Körper ein und wird an der Eintrittsstelle, z.B. den Bronchialschleimhäuten, von den APC aufgenommen, durch Proteasen prozessiert und gebunden an den MHC II-Komplex auf der Oberfläche als Peptidbruchstücke präsentiert. Die T-Zellrezeptoren erkennen die Kombination MHC II Allergenpeptid. T-Helferzellen (TH) können anhand ihres produzierten Zytokinpektrums in drei Klassen unterteilt werden. TH1-Zellen produzieren hauptsächlich IFN- γ , IL-2 und TNF- α , TH2-Zellen produzieren IL-4, IL-5 und IL-13. TH0-Zellen produzieren das Zytokinpektrum von TH1- und TH2-Zellen [13]. IL-4 und IL-13 stimulieren B-Zellen zur Produktion von allergenspezifischem IgE, das auf der Oberfläche von Mastzellen und Basophilen an den hoch affinen IgE-Rezeptor (Fc ϵ RI) bindet. Nachfolgend exponiertes Allergen wird durch den Fc ϵ RI-IgE-Komplex auf der Mastzelle gebunden (bridging) und führt zur Ausschüttung von Mediatoren (z.B. Histamin, Tryptase, Leukotriene, IL-4, IL-5 und IL-13) [14, 15], was wiederum binnen Minuten die typischen Symptome (Juck- und Niesreiz sowie Nasalblockade) einer allergischen Sofortreaktion auslöst. IL-5 hingegen stimuliert Eosinophile [13], die wiederum für die Spätreaktionen binnen 6-24 Stunden nach der Sofortreaktion verantwortlich sind. IFN- γ unterdrückt den Effekt von IL-4 [14], somit die Entwicklung von TH2, unterstützt aber die TH1-Bildung und die vermehrte Bildung von MHC II. Das Verhältnis IL-5 zu IFN- γ spiegelt wieder, ob die Zellen ein TH1 oder TH2 Zytokinmuster aufweisen [16]. Abbildung 1 veranschaulicht die Entstehung einer allergischen Reaktion.

Die Anzahl allergischer Erkrankungen nimmt seit Jahrzehnten stetig zu [17, 18]. Personen mit einer genetischen Prädisposition besitzen ein erhöhtes Atopierisiko [19], wobei ein Zusammenhang zwischen allergen-spezifischer Immunantwort und HLA -Allelen besteht. Jedes Individuum besitzt einen spezifischen HLA-Typ, wodurch individuelle Epitop-Bindungsmöglichkeiten bestehen [20]. Mit dem Chromosom 11q13 wurde die genetische Region lokalisiert, die den hoch affinen IgE-Rezeptor (Fc ϵ RI) codiert, und damit der erste direkte Zusammenhang zur

Atopie entdeckt [21]. Die Verbindung zu 11q13 und einem weiteren Chromosomabschnitt, 6p21, konnte für *Dermatophagoides pteronyssinus* spezifisches IgE bestätigt werden [22]. Eine weitere und genetisch interessante Region von Interesse ist die des Chromosoms 5q, wo die Informationen für die mit Atopie assoziierten Zytokine (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 und GM-CSF) gespeichert sind [23]. Ausschließlich genetisch bedingte Faktoren für die Zunahme allergischer Erkrankungen in der Bevölkerung verantwortlich zu machen, ist allerdings nicht zulässig. Ein Anstieg nur aufgrund genetischer Modifikation des Erbmaterials bedarf der Abfolge mehrerer Generationen. Polymorphismen des IL-4 Promoters [24] und in der Codierung des IL-13 [25] verstärken die Annahme, dass auch andere Faktoren zur Allergieentstehung und -entwicklung beitragen. Angeführt seien hier vor allem die sich verändernden Lebensverhältnisse und die daraus resultierenden Auswirkungen auf den Menschen. Ein besonderes Augenmerk wird in der Forschung auf die, vor allem im Kindesalter, sinkende Infektionsrate, die Umstellung der Ernährungsgewohnheiten (Nahrungsmittelallergien) sowie der Wohnverhältnisse und der daraus resultierenden mikroklimatischen Veränderungen (pereniale Atopien wie z.B. Milbenallergien) gerichtet [26].

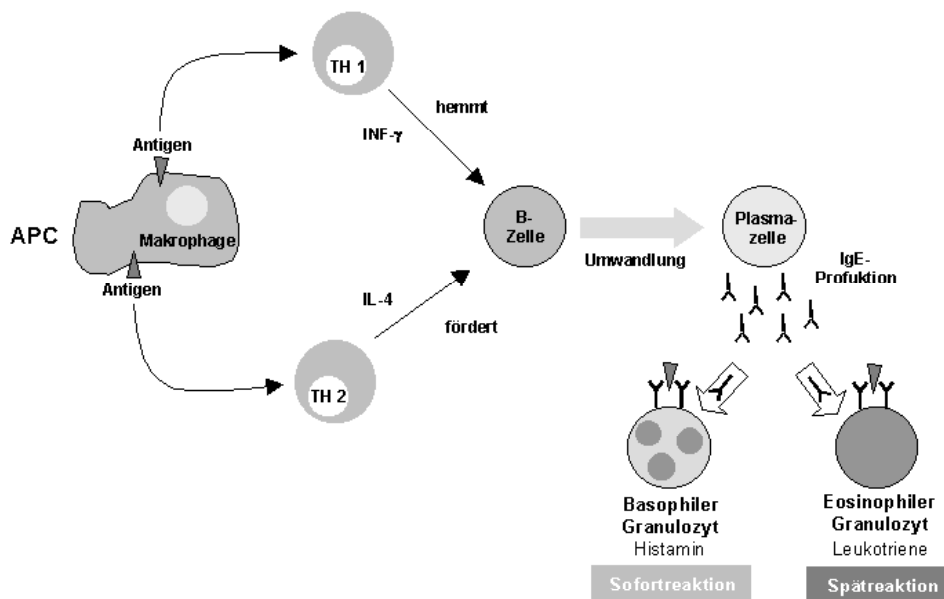


Abbildung 1 – Die Entstehung einer allergischen Reaktion.

2.3 BIOLOGIE DER MILBEN

Milben (*Acari*) gehören innerhalb der Wirbellosen zu den Spinnentieren (*Arachnida: Chelicerata*) und werden in eine Vielzahl von Ordnungen insbesondere unter dem Aspekt der Ausbildung der Atemöffnungen (u.a. *Astigmata* (keine), *Prostigi-*

mata (vorne), *Cryptostigmata* (versteckt), *Mesostigmata* (Mitte), *Metastigmata* (hinten) eingeteilt. Die im wesentlichen für allergische Erkrankungen verantwortlichen Milben gehören zu den astigmatischen Superfamilien *Pyroglyphoidea* und *Acaroidea* [27]. Insgesamt wurden bislang weltweit etwa 150 verschiedene Milbenarten in Häusern nachgewiesen, insgesamt werden bis zu 40.000 verschiedenen Arten vermutet [28]. Eine Übersicht der taxonomischen Verhältnisse liefert Abbildung 2.

Die Einteilung erfolgte in der Vergangenheit in Hausstaubmilben (*Pyroglyphoidea*) und Vorratsmilben (*Acaroidea*), und entsprach dem damaligen Wissenstand über deren Habitate, aber nicht den taxonomischen Gegebenheiten. Die klassischen Hausstaubmilben *Dermatophagoides farinae* und *Dermatophagoides pteronyssinus* wurden bevorzugt im direkten menschlichen Wohnumfeld gefunden, die später entdeckten Vorratsmilbenarten wie z.B. *Acarus siro*, *Tyrophagus putrescentiae*, *Glyciphagus domesticus* und *Lepidoglyphus destructor* konnten vor allem in landwirtschaftlichen Vorratsräumen (Getreidesilo, Stallungen, etc.) lokalisiert werden [29]. Hausstaub- und Vorratsmilben werden seit geraumer Zeit als Domestic Mites bezeichnet, da beide Milbenklassen im häuslichen Umfeld vorkommen und IgE-basierte Sensibilisierungen hervorrufen [27].

Gegenstand dieser Arbeit sind die in Europa allergologisch relevantesten Milben ihrer Klassen, die Hausstaubmilbe *Dermatophagoides pteronyssinus* (Abbildung 3) und die Vorratsmilbe *Lepidoglyphus destructor* (Abbildung 4). Zur besseren Nachvollziehbarkeit werden in der vorliegenden Arbeit weiterhin die alten Bezeichnungen Hausstaubmilbe (HSM) bzw. Vorratsmilbe (VRM) verwendet.

Im menschlichen Wohnumfeld kommen Milben gewöhnlich nicht in direkten Kontakt mit den Menschen vor, aber sie überleben, entwickeln und ernähren sich im Hausstaub. Ein Gramm Hausstaub enthält ca. 700 Millionen Partikel, von denen fünf bis sechs Millionen biologische und biogene Substanzen sind. Hausstaub ist ein heterogenes Substrat, zusammengesetzt aus Synthetik- und Naturfasern, Haaren, Mineralien, Salzen, Asche, Pollen, Pilzsporen und Pilzmycel sowie Insektenfragmenten, wobei jeder Hausstaub in seiner Zusammensetzung variiert.

Menschliche Hautschuppen sind die Hauptnahrung der Hausstaubmilben (HSM). Der Mensch verliert pro Tag 1 bis 1,5 g Hautschuppen, genügend zur Ernährung hunderttausender Milben. Im Magendarmtrakt der Milben wurden darüber hinaus Schimmelpilze, Pollen und Bakterien gefunden. Bevorzugte Habitate der Haus-

staubmilben sind Matratzen, Polstermöbel und Teppiche, in denen sich Hautschuppen ansammeln können [30].

Acaroidea (VRM) bevorzugen Habitate im menschlichen Umfeld, vor allem in der Landwirtschaft, in denen Vorräte wie Getreide, Mehl, Stroh, Heu, Hefe, Käse, Trockenfisch oder Früchte gelagert werden [29]. Vorratsmilben werden zwar bevorzugt in landwirtschaftlichen Betrieben gefunden, aber auch in den Städten kommen sie in relevanter Quantität vor. 82,4 % der gefundenen Milben waren HSM, 17,6% VRM [31]. In einer deutschen Großstadt wurde die Milbenpopulation wie folgt identifiziert: *D. pteronyssinus* (72,8 %), *D. farinae* (10,0 %), *L. destructor*

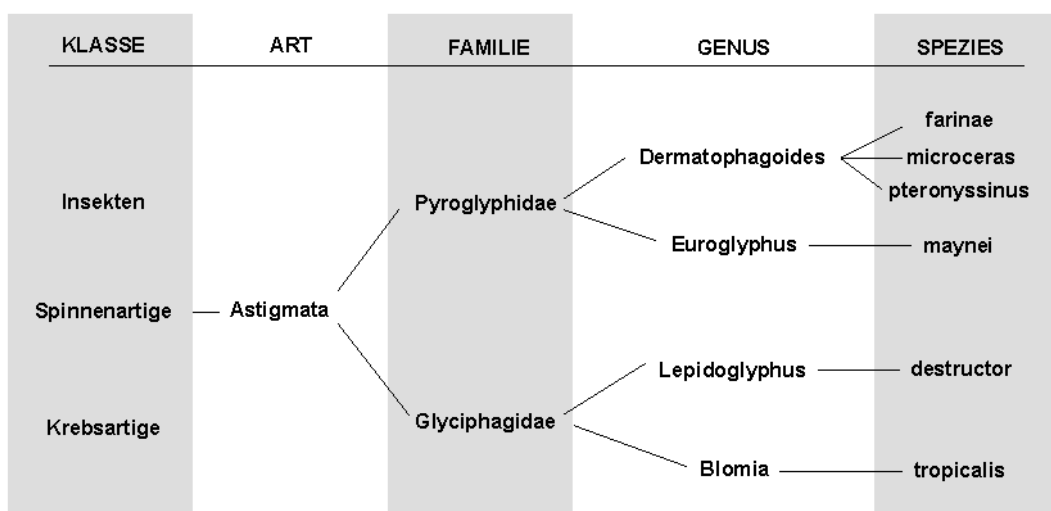


Abbildung 2 – Ausschnittsweise Betrachtung der Taxonomie einiger Milben.

(5,4 %), *T. putrescentiae* (1,4 %), *Euroglyphus maynei* (1,2 %), *G. domesticus* (0,4 %) und *A. siro* (0,2 %) [32]. Im Staub landwirtschaftlicher Betriebe konnten 38 astigmatische und 14 prostigmatische Milbenarten [33], davon 14 mit allergologischer Relevanz [34], identifiziert werden. Jede Milbenart mit mehr als ca. 100-200 Milben pro Gramm Staub wird als potentielle Allergenquelle betrachtet [35].

2.4 SENSIBILISIERUNGEN GEGENÜBER DOMESTIC MITES

Der höchsten Grad der Sensibilisierung im Patientengut wird in Europa durch *D. pteronyssinus* und, im geringeren Umfang, von *D. farinae* verursacht [36, 35]. Schon früh konnten aber auch Vorratsmilben als eigenständige Allergenquelle mit spezies-spezifischem Allergenspektrum identifiziert werden [37, 38, 39].



Abbildung 3 – *Dermatophagoides pteronyssinus*

L. destructor ist in Nordamerika weit verbreitet [40] und scheint in Europa das höchste allergene Potential der Vorratsmilben zu bergen, so dass mit ihr die ersten Ansätze zur Immuntherapie bei Vorratsmilben vollzogen wurden [41]. Eine spanische Studie fand trotz einer um den Faktor 50 erhöhten Proteinmenge aus *T. putrescentiae*, eine geringere Sensibilisierungsrate im Patientengut als gegen *L. destructor* [42]. Eine isländische Studie zeigte eine Sensibilisierungsrate in der Gesamtbevölkerung gegen *L. destructor* von 6,3 % und gegen *D. pteronyssinus* von 10,9 % [43]. Im Norden Deutschlands wurde bei berufsbedingt unter pneumologischen Beschwerden leidenden Landwirten positive RAST-Ergebnisse wie folgt ermittelt: 12 % *L. destructor*, 16 % *D. pteronyssinus* und 14 % *D. farinae* [44]. Neuere Untersuchungen konnten eine „Mono“-Sensibilisierung gegenüber Vorratsmilben von 16,3 % aufzeigen. Das vorrangige Allergierisiko stellen nach wie vor die Hausstaubmilbenarten mit 42,5 % Sensibilisierungen dar. 41,3 % der Patienten zeigten Reaktionen gegenüber beiden „Milbenklassen“ [42].

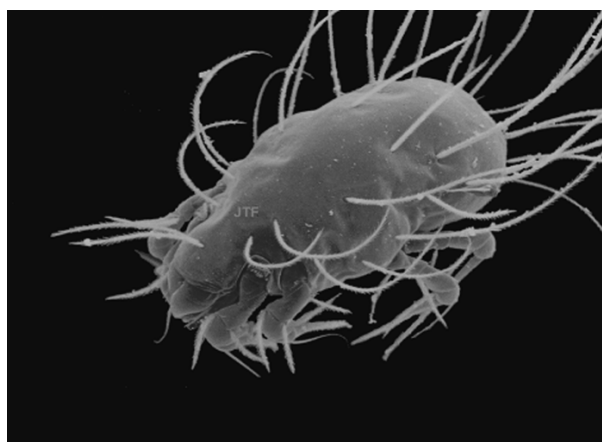


Abbildung 4 – *Lepidoglyphus destructor*

Eine Sensibilisierung gegenüber Hausstaubmilben wird in der Regel durch eine Zweitsensibilisierung gegenüber mindestens einer Vorratsmilbe begleitet [45]. In den Niederlanden sind dies vor allem *G. domesticus* und *T. putrescentiae* und in geringerem Umfang *L. destructor* [46]. In Skandinavien überwiegt *L. destructor* [47]. Eine spanische Untersuchung ergab bei 86 % der gegen Hausstaubmilben sensibilisierten Patienten eine Zweitdisposition gegenüber Vorratsmilben, und hier vor allem gegenüber *L. destructor*. Die meist aus ländlichen Gegenden stammenden Patienten zeigten neben höheren Gesamt-IgE-Werten auch erhöhte Titer an spezifischem IgE gegen Vorrats- und Hausstaubmilben als „nur“ gegen die eine oder andere Milbenklasse sensibilisierte Patienten [48].

Da höhergradige Sensibilisierungen gegenüber Vorratsmilben in der Stadtbevölkerung nachgewiesen werden konnten, ist es nicht zulässig, diese nur auf Sensibilisierungen gegenüber Hausstaubmilben zu testen [49, 50].

2.5 BIOCHEMIE DER ALLERGENE

2.5.1 Antigene und Allergene

Antigene sind Moleküle, die mit Antikörpern reagieren. Ihren Namen verdanken sie der Fähigkeit, in einem Immunsystem Antikörper zu produzieren. Allerdings sind nicht alle Antigene in der Lage, eine Antikörperbildung hervorzurufen, so dass nur die Antigene, die eine Immunantwort hervorrufen können, als komplette Antigene bzw. Immunogene bezeichnet werden. Einige Substanzen sind zu klein, um eine immunogene Wirkung hervorrufen zu können, sie werden als inkomplette Immunogene bezeichnet und können durch Bindung an einen geeigneten Carrier die notwendigen Voraussetzungen, in diesem Fall Größe, zur Aktivierung des Immunsystems erlangen. Diese, auch als Haptene bezeichneten Moleküle, können aus den unterschiedlichsten chemischen Stoffklassen stammen.

Allergene sind eine Gruppe von Antigenen, die eine unmittelbare Hyperreaktion im Menschen mit Wechselwirkung von zellgebundenen spezifischen IgE im Bronchial- und Gastrointestinaltrakt, im Blut, der Haut oder Schleimhäuten hervorrufen. Physikochemische Eigenschaften, nach denen Antigene von Allergenen differenziert werden können, existieren allerdings nicht. Im folgenden soll daher zwischen Antigen und Allergen nicht weiter unterschieden werden.

Allergene besitzen ähnlich den immunogenen Antigenen eine gewisse Größe, wobei sie zwei Funktionen zur Auslösung einer Allergie erfüllen müssen.

1. In der Sensibilisierungsphase, dem Erstkontakt bzw. „priming“, muss die aufgenommene Substanz vom Immunsystem als fremd erkannt werden und zur Produktion von IgE-Antikörpern führen.
2. Bei einem neuerlichen, auch Monate oder Jahre später erfolgten Zweitkontakt mit dem Allergen muss das Allergen Zugang zu IgE-präsentierenden Zellen erlangen, um die IgE-Antikörper auf der Zelloberfläche zu vernetzen. Dies wiederum ist das Signal zur Freisetzung entzündlicher Mediatoren mit der anschließenden allergischen Symptomatik.

2.5.2 Nomenklatur der Allergene

Die allgemein für Allergene gültige Nomenklaturempfehlung des Subkomitees der WHO und der International Union of Immunological Societies soll anhand des Majorallergens der Hausstaubmilbe *D. pteronyssinus*, Der p 1, verdeutlicht werden [51].

Die Gattung, hier Dermatophagoides, wird mit den ersten drei Buchstaben abgekürzt, gefolgt vom Anfangsbuchstaben der Art, hier pteronyssinus, und der Allergennummer. Die Allergennummer wird in der Reihenfolge der Entdeckung des Allergens vergeben; homologe Proteine verwandter Arten erhalten die gleiche Nummer. So erhielt das Majorallergen der Hausstaubmilbe *D. farinae* mit einer Sequenzhomologienität von über 80 % zu Der p 1, die Bezeichnung Der f 1.

Homologe Allergene verwandter Milbenarten werden in Gruppen zusammengefasst. Die schon erwähnten Der p 1 und Der f 1 bilden u.a. mit ihren Homologen der Spezies *D. microceras* und *E. maynei*, Der m 1 und Eur m 1, die Gruppe 1. Aus der beschriebenen Sequenzhomologienität resultieren für Allergene gleicher Gruppenzugehörigkeit sehr große Übereinstimmungen in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften, z.B. Molekulargewicht und Isoelektrischer Punkt, sowie ihrer Funktionalität im Milbenorganismus.

2.5.3 Was macht ein Allergen zu einem Allergen?

Neben einer genetischen Prädisposition des Individuums spielen folgende Eigenschaften von Allergenen eine Rolle, damit das Allergen auch verborgene Bereiche des Immunsystems erreichen kann.

- Eine Mindestgröße von 5-10 kDa sollte gegeben sein. Kleinere Peptide unter 30 Aminosäuren sind nur sehr schwach immunogen und zu hohe Molekulargewichte verhindern den Transport durch Haut- und Schleimhautbarrieren. Die Molekulargewichte der meisten Allergene liegen in der Regel zwischen 10 und 100 kDa, teilweise aber auch erheblich darüber (>250 kDa). Mit ansteigender Größe wächst auch die Wahrscheinlichkeit, dass als fremd erkannte Epitopstrukturen auf der Oberfläche vorhanden sind [10, 52, 53, 54].
- Die Fähigkeit, physikalische Barrieren zu durchdringen, um einen Zugang zum Immunsystem zu erlangen [52].
- Beim Herauslösen der Proteine aus einer komplexen Matrix, wie z.B. aus den Kotpellets oder der Abtrennung von luftgetragenen Partikeln spielt u.U. der hydrophile Charakter, der wiederum in Bezug zum Lösungsverhalten und der kinetischen Verteilung (aktiver oder passiver Transport, Verteilungsvolumen) sowie die Stabilität der Allergene eine entscheidende Rolle [52, 53].
- Damit eine allergische Reaktion hervorgerufen werden kann, ist eine Vernetzung der an Fc_ϵ -Rezeptoren gebundenen IgE-Antikörper an der Oberfläche von Mastzellen und Basophilen notwendig. Hierzu müssen mindestens zwei identische zur Erkennung frei zugängliche Epitope vorliegen. Unterschiedliche Epitope führen nur zu einer Vernetzung, wenn die entsprechenden IgE-Antikörper bivalent ausgebildet sind [10].
- Ein komplexer Strukturaufbau fördert die Immunogenität. Polymerisierte Monoaminosäuren sind nicht immunogen, die Kopplung verschiedener Aminosäuren mit zum Teil großen Unterschieden in ihrem immunogenem Potential ist unabdingbar [28, 52, 54].
- Die immunogene Potenz einer Aminosäure ist abhängig von der jeweiligen Seitenkette. Polare Aminosäuren wie die sauren Glutaminsäure, Asparginsäure, Cystein, und den sehr basischen Lysin und Arginin sowie den Aminosäuren mit „bulky“ (großen, raumerfüllenden) Seitenketten bzw. Ringstrukturen wie Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan sind hier zu nennen [54].
- Eine große chemische Differenz des Immunogens zum immunisierten Individuum, in der Regel durch evolutionäre Differenzierung bedingt, erhöht den körperfremden Charakter und somit die Möglichkeit vom Immunsystem als ‚fremd‘ erkannt zu werden und eine Immunreaktion einleiten zu können [28, 54].

- Umfaltung und Aggregation können die immunogene Potenz erhöhen oder erniedrigen [55, 54].
- Das Immunogen muss von Antigen-präsentierenden Zellen (Monozyten und verwandte Zellen des Immunsystems) zum Teil prozessiert und in Teilstrukturen auf deren Oberfläche präsentiert werden können [11, 53, 54].

2.5.3.1 Some allergens are more major than other - wann ist ein Protein ein Majorallergen?

Aus allergologischer Sicht bindet ein Majorallergen in mehr als 50 % der getesteten Seren von Atopikern spezifisches IgE oder ruft eine Hautreaktion hervor. Wird in weniger als 10 % der Patienten eine Sensibilisierung nachgewiesen, spricht man von Minorallergenen. Intermediärallergene sind in der Lage, zwischen 10 und 50 % Sensibilisierung hervorzurufen [11].

Diese Betrachtung basiert auf der Prävalenz der IgE- oder Haut-Reaktivität in sensibilisierten Individuen gegenüber dem gesamten Extrakt. Diese Betrachtung ist unscharf, da der Einfluss des einzelnen Allergens im Extrakt nicht berücksichtigt wird. Es sollte einen Unterschied ergeben, wenn ein Majorallergen aus dem Extrakt entfernt wird. Ein Majorallergen ist beispielsweise für 20 % der allergenen Reaktivität in 20 % der Individuen verantwortlich. Die Allergenität des Restextraktes sollte untersucht werden, damit die Potenz, vormals durch das Majorallergen „verdeckter“ Allergene, beurteilt werden kann. Hierzu müssen das Majorallergen aus dem Extrakt oder die spezifischen IgE-Antikörper aus dem Serum entfernt werden.

Des Weiteren ist ein Majorallergen nicht synonym als Hauptallergierisiko zu bezeichnen. Patatin ist ein Majorallergen der Kartoffel, aber aufgrund der Exposition und Verbreitung kein Hauptallergierisiko. Milben Gruppe 1 Allergene bedeuten ein höheres Allergierisiko als das Hundemajorallergen Can f 1 [53].

2.5.3.2 Epitope, die aktiven Zentren der Allergene

Die Bindung der IgE und/oder auch IgG-Antikörper an das Allergen erfolgt über antigene Determinanten, den sogenannten Epitopen. Dabei beruht die Bindung auf der sterischen Komplementarität, den Wasserstoffbrücken- und Ionenbindungen, den van-der-Waals-Kräften und hydrophoben Wechselwirkungen [56]. Die Affinität von Antigenen, eine Bindung mit dem entsprechenden Antikörper einzugehen kann daher stark variieren. Homologe Antigene, z.B. spezie-spezifische

Antikörper besitzen die stärkste Affinität. Kreuzreaktive Antigene (heterogene Antigene), haben gewöhnlich eine geringere Passgenauigkeit bzw. Affinität, die mit den ursprünglichen Immunogenen nicht identisch, sondern nur chemisch verwandt sind [54].

Kristallographischen Berechnungen zufolge, ist die bei der Allergen-Antikörperbindung benötigte Oberfläche zwischen 54-89 nm² groß [53]. Ein sphärisches 20 kDa Protein hat eine externe Oberfläche von ca. 500 nm², die für H₂O erreichbare Oberfläche beträgt gar 1000 nm². Die Wechselwirkung mit einem Antikörper würde somit zwischen 5 und 10 % der Oberfläche eines solchen Proteins okkupieren, so dass aus sterischen Gründen nur zwischen fünf und zehn Antikörper binden könnten.

Ein Epitop besteht aus fünf bis acht L-Aminosäuren, die sich in unterschiedlicher Form zu einer Antikörperbindungsstelle formieren können. Grundsätzlich werden zwei Arten der Epitopbildung unterschieden [54].

1. Die sequenzielle oder kontinuierliche Anordnung bedeutet eine unmittelbar benachbarte Position der beteiligten Aminosäuren auf einem Polypeptidstrang.
2. Als eine konformationsbedingte bzw. diskontinuierliche Struktur bezeichnet man die aus nicht unmittelbar aneinandergereihten L-Aminosäuren entsprechend ihrer Primärstruktur (1D) zusammengesetzte dreidimensionale (3D oder Quartärstruktur) Bindungsstelle.

Die Klassifizierung lineares oder konformationelles Epitop wurde linearen Sequenzen sowie Informationen aus der gefalteten Form des Allergens im Immunoblot entnommen. Auskünfte zur 3D Struktur können so aber nicht gewonnen werden. Dass überhaupt positive Immunoblotergebnisse erzielt werden konnten, kann darauf zurück geführt werden, dass viele Proteine sich nach dem Verlust des SDS aus der Elektrophorese wieder in ihre 3D Struktur zurück falten, speziell, wenn die Reoxidation von Disulfiden möglich ist [53]. Lineare Peptide ergaben selbst in der direkten Inkubation mit T-Zelllinien nur sehr geringe Bindungsstärken [57]. Bislang ist mit Par o 1 erst ein lineares Peptid beschrieben worden, das zu einer erheblichen IgE-Bindung geführt hat [58].

Erst durch den Einsatz kristallographischer Verfahren konnte gezeigt werden, dass alle betrachteten Proteinepitope konformationeller Struktur sind [53]. An der Antikörperbindung beteiligte Aminosäuren sind somit über die ganze Sequenzkette verteilt. Diese Ergebnisse konnten auch für Milbenallergene, unter anderem für Gruppe 1 Allergene [59] und Gruppe 2 Allergene [60], schon früh bestätigt

werden. Gleiches gilt für die Gruppe 2 Allergen der Vorratsmilbe *L. destructor* Lep d 2 [61].

Hieraus folgt allerdings, dass durch eine Beschädigung der 3D und 4D Struktur die konformationelle Epitopstruktur nachhaltig zerstört werden kann. Konformationsänderungen (Umfaltung, geringe räumliche Änderungen der Seitenketten der L-Aminosäuren) können zur biologischen Inaktivierung des Epitopes führen. Des Weiteren kann eine Entfaltung durch Disulfidbindungsspaltungen im Zuge einer Extraktion der Allergenquelle oder durch proteolytischen und temperaturbedingten Abbau entstehen. Wird die Epitopstruktur hierbei zerstört, kommt es zu einer entsprechenden Verringerung der allergenen Potenz. Kann ein Epitop durch eine solche Aufspaltung besser von Antikörperparatopen, den Antigenbindungsstellen der Antikörper, erreicht werden, kommt es zu einer Verstärkung der Bindungsaffinität mit Auswirkungen auf den Ablauf der immunologischen Folgereaktion. Die sterische Behinderung kann z.B. durch Seitenkettenwechselwirkungen, Änderungen in der 2D Struktur sowie elektrostatischer und/oder Wasserstoffbrücken-Wechselwirkungen abnehmen. Eine gewisse Grundstabilität konnte aber selbst für konformationelle Allergenepitope nachgewiesen werden [62].

2.5.4 Struktur und Allergenität

Im folgenden Abschnitt sollen Strukturmerkmale in den verschiedenen Proteindimensionen (1D, 2D, 3D und 4D) hinsichtlich ihres Einflusses auf die Allergenität betrachtet werden. Einen ersten Exkurs lieferte bereits die Beschreibung der Epitopstrukturen, die im Bereich der Tertiär- und Quartärstruktur (3D, 4D) anzusiedeln ist.

2.5.4.1 Polymorphismus und Isoallergene - Variation einzelner Aminosäuren in der Primärsequenz (1D)

Als Polymorphismus bezeichnet man das Auftreten von Genomen mit verschiedenen Allelen in einer Population, die sich durch verschiedenen Aminosäuresubstitutionen unterscheiden. Unterschiede der einzelnen Sequenzen bis zu 3 % werden als Varianten klassifiziert [51].

Untersuchungen zum Polymorphismus der Der p 1 Sequenz aus Milbenkulturen unterschiedlicher Herkunft auf DNS-Ebene [63] ergaben, dass der Polymorphismus auf einige wenige Aminosäure-Positionen beschränkt war. Bezogen auf die Herkunft der Milbenkulturen bestanden Unterschiede, die zu einer unterschiedli-

chen Stimulation peripherer T-Zellen führten. Für Der p 2 konnten bezogen auf das Ausmaß als auch die betroffenen Positionen fast identische Polymorphismen festgestellt werden [63, 64]. Die Gruppe 3 weist im Vergleich zu den Gruppen 1 und 2 ein sehr abweichendes Spektrum an Variationen auf.

Auffällig ist, dass vor allem die Majorallergene über einen hohen Grad an Polymorphismus verfügen. Vermutet wird daher, dass diese Art der Variation eine Voraussetzung für die Wirkung eines Antigens als Majorallergen ist, denn hierdurch wird die Anzahl ähnlicher Epitope erhöht, die mit den MHC-Molekülen (Major Histocompatibility Complex) reagieren können, das wiederum die Zahl der potentiellen Reaktanden mit dem Allergen erhöht. In dieses Bild fügt sich, dass die Allergene der Gruppen 1, 2 und 3 in der jeweiligen Spezies durch nur ein Gen codiert werden. Die Variation liegt somit in den Allelen begründet [65].

Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass niedrig affine Wechselwirkungen des Allergens mit den MHC- und T-Zell-Antigen-Rezeptoren vermehrt zu einer TH2-Immunantwort führt und die Exposition gegenüber einer ganzen Bandbreite an Epitopstrukturen eine höhergradige Sensibilisierung hervorrufen kann.

Auch Unterschiede zwischen Allergenen aus gezüchteten Milbenkulturen und aus der Natur entnommenen Kulturen wurden nachgewiesen [65]. Es gibt weitere Hinweise, dass Aminosäuresubstitutionen die Reaktion auf ein Allergen mit beeinflussen können. So wird die T-Zell-Reaktion gegenüber dem Der p 1 Peptidstrang 45-60 durch die Aminosäureposition 50 beeinflusst. Dies geschieht aber nur, wenn die Position 50 durch Tyrosin und nicht Histidin besetzt ist. Tyrosin auf dieser Position wurde nur bei aus der Natur entnommenen Milben gefunden [65].

Als Isoallergene bezeichnet man die Allergene, die sich durch geringe Differenzen in der Primärsequenz des Allergens, wie Polymorphismus und/oder posttranslationale Modifikationen wie z.B. O- oder N-Glykosylierung einzelner Positionen, unterscheiden. Posttranslationale Veränderungen können die Allergenität durch das Induzieren neuer Epitope, die Beeinflussung der Löslichkeit, der Größe, der Stabilität und Empfindlichkeit gegenüber Proteasen, verändern. Die Prozessierung der Allergene durch Antigen Präsentierende Zellen (APC) kann hierzu führen [53]. Zudem sind die meisten Allergene extrazelluläre Proteine. Damit das Protein aus der Zelle wandern kann, ist die Anwesenheit eines N-terminalen Leitpeptides notwendig, um das Protein durch die Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) zu transportieren. Dieses Protein wird durch Proteasen im ER abgetrennt. Dies können, wie z.B. bei der Glykosylierung der Fall, mehrstufige Prozesse sein, in die viele verschiedene Enzyme involviert sind.

Hieraus resultiert häufig eine gewisse Heterogenität der transferierten Proteine. Eine Glykosylierung scheint allerdings kein Hauptgrund für Allergenität zu sein, da einige Majorallergene nicht und andere stark glykosyliert sind [53].

Isoallergene sind demnach definierte Allergene mit unterschiedlichem isoelektrischen Punkt pI und mindestens 67 % Sequenzhomologie [51]. Isoallergene besitzen sowohl spezifische als auch gemeinsame T-Zell-Epitope. Ein gutes Beispiel hierfür ist Der p 1, von dem bis zu zehn verschiedene Isoallergene mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten im pH-Bereich vom 0,7-4,1 publiziert wurden, wobei alle Variationen die für dieses Allergen spezifischen Epitopstrukturen besitzen. Für Der p 3 werden mindestens acht Isoallergene postuliert [66].

2.5.4.2 Veränderungen der Sekundärstruktur (2D)

Als Sekundärstruktur bezeichnet man „regelmäßige, periodisch wiederkehrende räumliche Anordnungen benachbarter Aminosäuren in einer Polypeptidkette. Die wichtigsten Typen von Sekundärstrukturen sind die α -Helix und die β -Faltblattstruktur.“ [56].

In [53] wurden über 40 verschiedene Allergene hinsichtlich ihrer Sekundärstruktur in vier Gruppen eingeteilt. Es konnten keinen allgemeingültigen Zusammenhänge zur Allergenität identifiziert werden.

1. Antiparallele β -Stränge der Immunoglobulinfamilie (Gräserpollen Gruppe 2, Milbe Gruppe 2) [60, 67], Serinproteasen (Milben Gruppen 3, 6, 9) und Sojabohnen Trypsininhibitor (Ole e 1, Gräser-Gruppe 11);
2. Antiparallele β -Faltblattstrukturen mit mindestens einer α -Helix (Baumpollen-Gruppe 1, Lipocalin, Profilin, Aspartatprotease (Kakkerlake-Gruppe 2));
3. α - und β -Strukturen als nicht unmittelbar assoziierte Strukturformen (Milbe-Gruppe 1, Lysozym/Lactalbumin, Wespenallergene);
4. α -Helizes: unspezifische Lipidtransferproteine, Hämoglobin (Insekten), Parvalbumin (Fisch), Kalmodulin (Pollen), Mellitin (Bienengift), Fel d 1-Kette 1, Serumalbumin

Proteine werden zum Teil auch durch das Knüpfen von Disulfidbindungen in ihrer dreidimensionalen Struktur gefestigt. Milben Gruppe 2 Allergene weisen drei Disulfidbindungen auf. Ein Durchtrennen dieser kovalenten Bindungen bewirkt einen Abfall der Allergenität, der mit der Anzahl der gekappten Bindungen zunimmt [68, 62, 69]. Für Lep d 2 wurden ebenfalls drei Disulfidbindungen mit hoher Sequenzhomologie für die Aminosäurepositionen identifiziert (zu Der p 2 - 52 % zur

Der f 1 - 57 %) [70]. Die Disulfidbrücken fixierenden Cysteinpositionen, sind in allen Gruppe 2 Allergenen konserviert [61]. Spezifisches Durchtrennen der Disulfidbindungen bei Der f 2 führte zu einem 10-100 fachen Verlust der Hautreaktivität in Milbenatopikern, aber nicht zu Veränderungen der T-Zellproliferation in vitro [67, 71]. Derart modifizierte Allergene könnten bei deutlich bis nicht vorhandener Allergenität, aber gleichbleibender Immunogenität einen lohnenswerten Therapieansatz darstellen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Allergene heterogen und ohne gemeinsame strukturelle Merkmale sind. Auch die Überprüfung 150 verschiedener Allergene ergab keine gemeinsamen Merkmale. Allerdings wird ein Zusammenhang zwischen der Funktion und der Allergenität postuliert [72]. Die einzige Gemeinsamkeit scheint zu sein, dass sie in der Lage sein müssen, Immun- und Mastzellen zu erreichen und zu stimulieren. Neben Homologien mit humanen Proteinen scheinen spezifische Eigenschaften für die Ausbildung der Allergenität eine entscheidende Rolle zu spielen. Für Nahrungsmittelallergene ist z.B. die Art der Verdauung, für luftgetragene Allergene die Größe und Löslichkeit wichtig [53].

2.5.5 Funktion und Allergenität

Der These, dass die Funktion des Allergens einen Einfluss auf seine Allergenität besitzt, soll anhand der proteolytischen Aktivität einiger Milbenallergene nachgegangen werden.

2.5.5.1 Proteaseaktivität

Allergene, vor allem aus Milben- und Schimmelpilzextrakten, besitzen zum Teil erhebliche proteolytische Enzymaktivität. Diese Eigenschaft führt, verglichen mit Extrakten nicht proteolytischer Allergene, zu einem erweiterten Wirkspektrum [73].

Proteasen sind Enzyme, welche die Hydrolyse von Peptidbindungen katalysieren. Entsprechend ihrem Wirkmechanismus und aktivem Zentrum werden sie in vier Gruppen eingeteilt: Serin-, Cystein-, Aspartat- und Metalloproteasen. Des Weiteren wird zwischen Endo- und Exoproteasen unterschieden. Endoproteasen spalten jeweils an spezifischen internen Aminosäuren, Exoproteasen bauen Proteine vom C- oder N-terminalen Ende ab. [74].

Milbenallergene sind Endoproteasen und gehören zu den Cystein- (Gruppe 1) und Serinproteasen (Gruppe 3, 6 und 9), wobei Trypsin (Gruppe 3) und Chymotrypsin (Gruppe 6) der Milbe die Eigenschaften wie Größe, Aminosäuresequenz, Autolysefähigkeit und Substratspezifität mit Säugetierserinproteasen teilen. Cysteinproteasen der Gruppe 1 sind die Allergene mit der größten klinischen Relevanz und stammen aus dem Gastrointestinaltrakt der Milbe [75].

Der Wirkmechanismus ist bei beiden Proteasetypen vergleichbar. Aufgrund der Nukleophilität der beiden Aminosäuren L-(+)-Serin und L-(+)-Cystein im Übergangszustand, kommt es bei der Hydrolyse der Peptidbindung zur Bildung eines relativ stabilen kovalenten Übergangszustandes. Hierbei spielen pH, Temperatur, Kinetik und das Verhältnis Enzym zu Substrat eine Rolle [54, 76]. Gelagerte Milbenextrakte haben unter Umständen ein anderes Wirkspektrum und eine veränderte Allergenität als die native Milbenkultur.

Neuere Untersuchungsergebnisse lassen den Schluss zu, dass neben der ursprünglichen Allergenität die Proteaseaktivität in erheblichem Maß zur allergenen Potenz beiträgt [77]. Die Bronchialschleimhäute sind der primäre Angriffspunkt. Physikochemische Eigenschaften, welche die Art und Weise des Kontakts mit immunkompetenten Zellen (Dendritische Zellen) unter der Epithelschicht beeinflussen, sind in der Lage, die spezifische IgE-Produktion zu erhöhen. Die proteolytischen Allergene der Milben haben zudem einen direkten Effekt auf das Epithel und dessen Permeabilität [75, 78], können IgE-unabhängige Mastzelldegranulation bewirken [79] und induzieren die Cytokinfreisetzung [80].

Metalloproteaseinhibitoren verhindern die Histaminausschüttung, so dass eine Beteiligung dieser Proteaseklasse bei der Entstehung allergischer Reaktionen vermutet wird [76].

Die Immunisierung von Mäusen mit proteolytischem Der p 1 führte zu einer signifikanten Steigerung der Gesamt-IgE- sowie der Der p 1 spezifischen IgE-Synthese gegenüber Mäusen, die irreversibel mit Cysteinproteaseinhibitor E-64 geblockt wurden [81]. Auch durch sehr geringe *D. pteronyssinus* Extraktkonzentrationen (für Zelltod und Beschädigung der Epithelzellen zu geringe Dosis) kommt es zu Leitfähigkeitssteigerungen in den trachealen Epithelzellen von Ratten. Durch spezifische Inhibierung der Proteaseaktivität des Extraktes mit E-64 wurde dieser Effekt aufgehoben [82].

Die Cysteinproteaseaktivität von Der p 1 kann die allergene Potenz dieses Allergens beeinflussen, und zwar durch Spaltung der Rezeptoren (CD 23, CD 25), durch IgE unabhängige Mastzell-Aktivierung, durch Erhöhung der Epithelzellper-

meabilität und Hemmung endogener Serinproteaseinhibitoren [83]. Des Weiteren wird berichtet, dass die proteolytische Aktivität der Allergene zur Freisetzung von proinflammatorischen Cytokinen in humanen Bronchial-Epithelzellen führt, ein diskreter Einfluss auf den intrazellulären Ca-Spiegel besteht, und dass Proteasen die Fähigkeit besitzen, die Permeabilität der Bronchialschleimhäute und der Gefäße zu verändern [80]. Der p 1 z.B. besitzt eine gemischte Cystein-Serin-Proteaseaktivität, da verschiedene Peptidbindungen, abhängig von der Reaktionsklasse des angebotenen Inhibitors, gespalten werden [77].

Der Vergleich des Der p 1 Sequenzabschnitts Leu147-Gln160 mit den entsprechenden Bereichen von Cysteinproteasen anderer Milben, Pflanzen, Menschen und Parasiten ergab, dass alle Strukturen einen zentralen Tyrosinrest besitzen [84]. Zur fundierten Bewertung der Kreuzallergenitäten bedarf es allerdings Informationen zur 3D-Struktur der Epitope, die aus einem einfachen Sequenzvergleich nicht zu gewinnen sind.

Untersuchungen mittels Elektrophorese und Immunoblotting ergaben bei Hausstaubmilbenextrakten Proteaseaktivitäten im Molekulargewichtsbereich von 45-66 kDa und schwache Aktivitäten bei 32 kDa. Ein pH-Optimum wurde bei pH 6 gefunden, ein Verlust der Aktivität ab pH 3,5 und 8,5 beobachtet. Die Immunreaktion auf polyklonales HSM-Serum ergab Präzipitate bei 200, 110, 65, 60, 43 kDa, wobei die Proteinbande bei 200 kDa die höchste Antigenität aufwies [85].

Das erst in letzter Zeit aus *D. farinae* entdeckte M177 ist ein proteasesensitives Allergen. Die Fragmente von M177 besitzen eine höhere allergene Potenz als das intakte Allergen. [55].

Eine Studie zur Proteaseaktivität von Vorratsmilben berichtet, dass sowohl Serin- als auch Cysteinproteasen in *L. destructor* Extrakten vorhanden sind. Die Serinproteaseaktivität ist bei vergleichbarer Cysteinproteaseaktivität gegenüber den *Dermatophagoides spp* um den Faktor zwei erhöht. VRM-Extrakte enthalten Trypsin, Chymotrypsin, Esterasen, Lipasen, Glykosidasen, Cellulasen, Amylasen, Lysozyme und Chitinasen in unterschiedlicher quantitativer und qualitativer Zusammensetzung [86].

Sollte sich herausstellen, dass die Proteaseaktivität einen Einfluss auf die Allergenität hat, so ist das Einbringen von spezifischen, noch zu entwickelnden Inhibitoren vielleicht ein sinnvoller Therapieansatz.

Die meisten Allergene besitzen keine Proteaseaktivität, so dass die entsprechenden Milbenallergene einen IgE-fördernden Effekt besitzen. Da die Prävalenz an Milbenallergien in Gegenden mit niedrigerer Milbendichte nicht unbedingt gerin-

ger ist [53], sollte der Zusammenhang zwischen Enzymaktivität und Allergenität näher untersucht werden.

N-Glykane

Immunisierung von Tieren mit Pflanzen- oder Insektenallergenen münden oft in hoch kreuzreaktiven Antikörpern. Ein Grund hierfür können sehr immunogene und ubiquitär vorhandene N-verknüpfte Zuckerdeterminanten, die N-Glykane, sein. Sie sind sehr immunogen, da sie mehrere Monosaccharide mit dem Grundgerüst in einer Art verknüpft, die bei Säugern unbekannt sind. Antikörper gegen diese Struktur zeigen ein breites Spektrum an Kreuzallergenität [87, 88, 89].

2.5.5.2 Kreuzallergenität

Kreuzallergenität bedeutet eine gleichzeitige Sensibilisierung gegenüber biologisch oder chemisch verwandten Substanzen mit einer Teilidentität der allergenen Strukturen, wodurch es schon beim Erstkontakt zu einer allergischen Reaktion kommen kann [90]. Die Einschätzung der Kreuzallergenität ist wichtig bei der Beurteilung der klinischen Relevanz einer Allergenspezies, zur sicheren Diagnostik und zur Einleitung der richtigen Therapie.

Wie kommt es zu Kreuzallergenität?

Sollen Antigen bzw. Allergen und Antikörper mit genügender Affinität reagieren, so müssen sie eine strukturelle Komplementarität wie Schlüssel und Schloss oder Abdruck und Matrize aufweisen. Dies bedingt die Spezifität der Bindung. Ursache hierfür ist, dass die für die Bindung verantwortlichen Kräfte äußerst schwach und nur auf sehr kurze Distanz wirksam sind. Eine ausreichende Bindungsstärke wird erst erreicht, wenn genügend große Flächen auf den Oberflächen der Antikörper und der Allergene komplementär sind. Neben diesen strukturellen Gegebenheiten müssen diese Flächen mit einer ausreichenden Anzahl funktioneller, miteinander in Wechselwirkung tretender, Gruppen bestückt sein. Dies erklärt, dass sehr verschiedene Komponenten durch denselben Antikörper gebunden werden können und es fließende Übergänge zwischen einer maximalen Bindung und einer eben noch ausreichenden Affinität gibt [5]. Antikörper reagieren somit auf spezifische Oberflächenmuster, geprägt durch Struktur und Funktionalität.

Angewandt auf die allergieauslösende Reaktion zwischen Allergen und spezifischem IgE und/oder den Rezeptoren auf der Oberfläche der Immunzellen be-

deutet dies, dass im Gegensatz zur Allergenität die Kreuzallergenität stark durch strukturelle Gegebenheiten beeinflusst wird. Allergene sind nur dann kreuzreaktiv, wenn sie strukturelle Gemeinsamkeiten haben [53].

Alle bislang in der Literatur beschriebenen Kreuzallergenitäten besitzen Homologien in der Primär- und Tertiärstruktur und zeigen den gleichen Faltungstyp [53]. Der Umkehrschluss gilt nicht: Eine identische Faltung ist nicht gleichbedeutend mit Kreuzallergenität. Die Faltung hängt nicht so sehr von der Sequenzhomologie ab, da identische Faltungen auch mit weniger als 25 % Sequenzhomologie gefunden wurden. Die Substitution einzelner Aminosäuren führt eher zur Veränderung der Epitopstruktur an der Proteinoberfläche und moduliert so die Allergenität. Kreuzallergenität unterhalb 50 %iger Sequenzhomogenität ist selten, sie liegt meistens bei 70 % und darüber [53]. Der erste Schritt zur Bewertung der Kreuzallergenität ist daher der Vergleich der Proteinfaltung. Ist diese nicht identisch, so ist eine Kreuzallergenität ausgeschlossen.

Grundsätzlich ist anzumerken, dass der Anteil ähnlicher Allergenstrukturen mit dem Grad der taxonomischen Verwandtschaft der Milbenarten untereinander ansteigt. Jede Art besitzt zudem einen spezie-spezifischen Allergenanteil, der zu eigenständigen Sensibilisierungen führen kann [46, 91]. Die hohe Ähnlichkeit der Allergenstrukturen der Hausstaubmilben untereinander ist klar aus dem engen Verwandtschaftsgrad innerhalb der *Dermatophaginae* Subfamilie (*D. farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*) und zur Subfamilie *Pyroglyphinae* (*E. maynei*) zu erklären. Beide gehören zur gleichen Familie (*Pyroglyphidae*) und Superfamilie (*Pyroglyphoidae*) (siehe „Biologie der Milben“).

Neben der hohen Kreuzallergenität zwischen einzelnen Hausstaubmilbenspezies [92, 93] bestehen nur sehr schwache Kreuzreaktivitäten zu den Vorratsmilben [94, 91]. Eine Studie mit isolierten Allergenen bestätigt die nur geringen Überschneidungen [95].

Andere Studien kommen allerdings sehr wohl zu einem hohen Grad an Kreuzallergenität zwischen Vorrats- und Hausstaubmilben [96, 97]. Immunoblotinhibitionen ergaben mindestens eine gemeinsame allergene Komponente zwischen *L. destructor* und *D. pteronyssinus* bei 25 kDa. Um allerdings das Majorallergen von *L. destructor*, Lep d 2 (15 kDa) zu 50 % zu inhibieren, müsste theoretisch die 2000 fache Menge an *D. pteronyssinus* Extrakt zugefügt werden [98]. Hierzu sind zwei Kritikpunkte anzumerken: Seren unterschiedlicher Herkunft und Beschaffenheit führen ebenso zu unterschiedlichen, nicht vergleichbaren Ergebnissen, wie die Verwendung komplexer und schwer zu standardisierender Allerge-

nextrakte [47, 99]. Aufgrund begleitender Bestimmung der Allergenmengen in den Matratzen der Patienten kommt eine spanische Studie zu dem Schluss, dass es sich eher um Mehrfachsensibilisierungen als um Kreuzallergenitäten zu den Hausstaubmilben handelt [48].

Vorratsmilben besitzen in hohem Maße spezies-spezifische Allergene, die stark innerhalb der Vorratsmilben kreuzreagieren [100, 101, 102, 103, 104]. Für *L. destructor* besteht eine besondere Kreuzallergenität zu *G. domesticus*, die ca. um den Faktor 1000 höher ist, als zu *D. pteronyssinus* [105]. Auch die geographisch weit voneinander entfernt vorkommende Milben *Blomia tropicalis* (Amerika) und *L. destructor* (Europa) zeigen einen erstaunlich hohen Grad an Kreuzallergenität. Besonders gilt dies für die 14,5 kDa Fraktion aus *B. tropicalis* mit Lep d 2 [106].

Diese Ergebnisse entsprechen den taxonomischen Gegebenheiten, da Vorratsmilben einer anderen Superfamilie, den *Acaroidea*, als die Hausstaubmilben zugerechnet werden. Dies hat zur Folge, dass Vorratsmilben mit ihrem spezifischen Allergenspektrum gesondert diagnostiziert und therapiert werden müssen.

Studien zur Kreuzallergenität sind sehr schwierig objektiv zu gestalten. Zum einen erschwert die Verwendung von Gesamtextrakten die Beurteilung der Potenz des einzelnen Allergens und zum anderen sind die verwendeten Seren mit einer regionalen Prädisposition gegenüber einer oder mehrerer Milbenspezies belastet. Die vorherrschende Milbenart der Region ist immer in die Überlegungen mit einzubeziehen, monosensibilisierte Patientenserum wären hier notwendig. Eine Alternative ist die Herstellung monoklonaler Antikörper. Hierbei ist darauf zu achten, dass alle auf dem Allergen vorhandenen allergenen Determinanten auch erkannt werden, was das Vorhaben erheblich erschwert. Auch rekombinante Allergene sind hilfreich. Erste erfolgreiche Hauttestungen sind hier bereits erfolgt [107]. Zu einer abschließenden Betrachtung und Einschätzung der Allergenität und Kreuzallergenität ist es notwendig, alle relevanten Allergene in ausreichendem Maße vorrätig zu halten. Nur die Kombination mAK mit isoliertem bzw. rekombinantem Allergen ist erfolgversprechend.

Bei mindestens 20 klinisch relevanten Milbenspezies mit jeweils ca. 15 bis 25 verschiedenen Allergenen, bedarf es hier noch viel Forschungsarbeit, zumal zur Beurteilung der Kreuzallergenität auch die Epitopstruktur bekannt sein sollte.

2.6 KLASSIFIZIERUNG UND BESCHREIBUNG AUSGEWÄHLTER MILBENALLERGENE

Nach der differenzierten Betrachtung der Struktureigenschaften und der Funktionalität Allergenen, soll nun eine gruppenweise Darstellung der Milbenallergene vorgenommen werden. Die Tabelle 1 zeigt eine Zusammenfassung.

Gruppe 1

Die zur Gruppe 1 zusammengefassten Allergene wurden anhand ihrer Aminosäuresequenzen als Cysteinproteasen klassifiziert [108, 63] und weisen eine sehr hohe Homologie in der Sequenz (80 %) und den chemisch-physikalischen Eigenschaften auf [109]. Der p 1 stand als erstes hoch gereinigtes Allergen zur Verfügung und bindet IgE in der Regel in allen getesteten Seren. 50-70 % des gegenüber einem *D. pteronyssinus* Extrakt gebildeten IgE ist Der p 1-spezifisch. Die Anzahl der Aminosäurepositionen, 222 für Der p 1, 223 für Der f 1 und Eur m 1 [63, 109] sowie das gleiche Molekulargewicht von 25 kDa belegen dies [110, 109]. Die isoelektrischen Punkte befinden sich zwischen pH 4,7 und 7,5, ihre IgE-Bindungsfrequenz im Patientengut liegt bei 80 %. Ein Sequenzvergleich ergab 170 in allen drei Allergenen identisch besetzte Aminosäurepositionen. Die Cysteinpositionen und die N-glykosylierte Position ist allen Sequenzen gemein [110], was mit dem gefundenen Kohlenhydratanteil korreliert [75]. Gruppe 1 Allergene sind als Verdauungsenzyme in den Kotpellets angereichert, hitzelabil und werden bei 80° C bzw. pH 2 oder pH 12 inaktiviert [111].

Gruppe 2

Die Gruppe 2 Allergene zeigen eine Sequenzhomogenität (28 %) mit Epidymalenzymen von Wirbellosen und Säugetieren und scheinen bei der Fortpflanzung (Der p 2) [112] und/oder der Verdauung (Lep d 2) [113] eine Rolle zu spielen. Da Der f 2 an der Oberfläche von *E. coli*-Bakterien bindet wird vermutet, dass es Teil des antibakteriellen Abwehrmechanismus der Milbe ist [60]. In ihrer IgE-Bindungsaktivität von ≥80 % gleichen sie den Gruppe 1 Allergenen [110, 75, 114, 115]. Gruppe 2 Allergene sind hitze- [116] und pH-stabile Proteine [111].

Die Aminosäuresequenzen sind vergleichbar: Der f 2 und Der p 2 je 145/129 (cDNS/nativ) Positionen, Eur m 2 145/123 [110] und Lep d 2 141/125 [117]. Die Molekulargewichte betragen 14 kDa (Der p 2/Der f 2/Eur m 2) [110] und 13,3 kDa (Lep d 2) [117]. N-glykosylierte Positionen wurden in keiner, Disulfidbrücken in

allen Sequenzen gefunden. Letztere sind von großer Bedeutung für die Allergenität [68, 62, 69]. Die sechs Cysteinpositionen sind in allen Gruppe 2 Allergenen der Hausstaubmilben konserviert und bilden die Fixationspunkte für die Disulfidbrücken [61, 118].

Die Sequenzhomogenität zwischen Der p 2 und Der f 2 beträgt 88 %. Für Lep d 2 (Der p 2 - 52 %; Der f 1 - 57 %) [70, 119] und Eur m 1 (Der p 2 und Der f 2 – je 84 %) [110] bestehen ebenfalls Überschneidungen zu den beiden Majormilben. Die Homogenität untereinander (Lep d 2 vs. Eur m 2) beträgt 39 %.

Lep d 2, vormals als Lep d 1 bezeichnet, ist bislang als einziges von bis zu 20 Allergenen [120] aus *Lepidoglyphus destructor* umfassend charakterisiert. Die Sequenz ist bekannt [118], genauso wie die Existenz zweier Isoallergene, deren Sequenz 10 % differiert [119]. Lep d 2 reagiert im Pricktest mit 59 % der *L. destructor* Sensibilisierten [107].

Gruppe 3

Die Gruppe 3 Allergene sind Serinproteasen vom Trypsintyp und scheinen Verdauungsenzyme zu sein, da sie nur in den Ausscheidungen und nicht im Körper der Milben gefunden wurden [121, 66]. Das Ausmaß der Sensibilisierungsreaktion gegenüber der Gruppe 3 wird von niedrig (17 %) [122] bis hin zu 100 % der Gruppen 1 und 2 beschrieben [123]. Diese widersprüchlichen Ergebnisse könnten unter anderem in der unterschiedlichen Reinheit der untersuchten Allergene begründet sein. Die Molekulargewichte der Gruppe 3 Allergene bewegen sich zwischen 28 kDa und 34 kDa (SDS-Page), die isoelektrischen Punkte für *D. pteryonissinus* zwischen pH 3,7 und 7,4. Aus *D. farinae* konnten nur zwei Isoformen mit pI 4,2 und 4,4 isoliert werden [66]. Der Einzelvergleich von Der p 3, Der f 3 und Eur m 3 ergab 81 % Sequenzhomogenität, innerhalb der Gruppe 75 % [75].

Gruppe 4

Der p 4 wurde als α -Amylase identifiziert [124] und bindet IgE in 46 % der Erwachsenen und 25 % der Seren atopischer Kinder. Die Molekulargewichte liegen zwischen 56 und 60 kDa, die isoelektrischen Punkte von Der p 4 befinden sich zwischen pH 5 und 7 [75].

Gruppe 5

Für Der p 5 konnte eine aus 132/112 Aminosäuren (cDNS/nativ) bestehende Sequenz und ein Molekulargewicht von 15 kDa (SDS) bestimmt werden, die weder N-glykosylierte Positionen noch Cystein aufweist [125]. Aus kommerziell erhältlichen Milbenkulturen wurden fünf unterschiedliche Der p 5 Klone ermittelt, die im Gegensatz zu den Majorallergenen der Gruppen 1, 2 und 3, nur eine einzige Aminosäurevariation enthielten [75]. Der f 5 und Der p 5 induzieren in über 50 % der Patientenseren eine IgE-Bindung [126]. Das jüngste Allergen dieser Gruppe, Lep d 5 (110 Aminosäuren/ 12,5 kDa), zeigt lediglich 9 % IgE-Bindung. Die für diese Gruppe geringe Bindungsfrequenz liegt vermutlich darin begründet, dass zur Bestimmung ein kloniertes Protein verwendet wurde. Sequenzhomologien von Lep d 5 bestehen mit Blo t 5 (46 %) und Der p 5 (36 %) [127].

Gruppe 6

Die Serinproteasen [75] der Gruppe 6 Allergene wurden mit einem Molekulargewicht von 25 kDa aus *D. pteronyssinus* und *D. farinae* isoliert [128]. Die je 231 Positionen langen Sequenzen weisen eine Chymotrypsin-Substratspezifität bei einem pI von pH 5,2 auf. Sie sind serologisch nicht mit den Gruppe 3 Trypsinen verwandt, was auch in der niedrigen Sequenzhomologienität mit Der p 3 (37 %) zum Ausdruck kommt [129]. Die Allergene der Gruppe 6 reagieren mit ca. 40 % der Patientenseren bei mittlerer Affinität [128, 75].

Gruppe 7

Gruppe 7 Allergene (Der f 7, Der p 7 und Lep d 7) binden in ca. 50-60 % der Patientenseren spezifisches IgE, dessen Titer unter Umständen über dem der Gruppe 2 Allergene liegen kann [130]. Der p 7 besitzt 215/198 (cDNS/natives Protein) Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 22.2 kDa. [131]. Der f 7 besteht aus 213/193 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 22.4 kDa mit 86 % Sequenzhomologie zu Der p 7 [132]. Beide Proteine besitzen keine Cysteinpositionen sowie nur eine isolierte N-glykosylierte Position.

Das native Lep d 7 besteht aus 197 Aminosäuren bei einem Molekulargewicht von 22 kDa, besitzt weder eine Cysteinposition noch, im Gegensatz zu den restlichen Vertretern der Gruppe 7, eine N-glykosylierte Position. Sequenzhomologien bestehen zu Der p 7 (29 %) und Der f 7 (27 %) [133].

Die Besonderheit der Gruppe 7 Allergene sind ihre multiplen Banden in der Immundetektion. So reagieren Antikörper gegen das rekombinante Der p 7 mit Komponenten der Größe 24, 27 und 29 kDa, alle größer als das mature Protein [134]. Mindestens 6 Isoallergene mit pI zwischen pH 5,6 und 6 und Molgewichten um 25, 30 und 31 kDa wurden identifiziert. Es handelt sich vermutlich um glykosylierte Varianten der 22 kDa Allergene [130, 135]. Fragmente existieren bei 11,5, 13 (Der p 7) [132] und 18 kDa (Der f 7) [135].

Gruppe 8

Der p 8 besteht bei einem Molekulargewicht von 26 kDa aus 219 Aminosäuren (cDNS) und reagiert mit ca. 40 % der Patientenseren [136]. Sequenzhomologien, wenn auch nur geringe, zu Glutathion-S-Transferasen aus anderen, nur weitläufig verwandten Allergenquellen wie z.B. dem Bla g 5 der Kakerlake *Blattella germanica*, lassen einen grundsätzlich allergenen Charakter dieser Enzymklasse vermuten [75].

Gruppe 9

Der p 9, eine Serinprotease, bindet ähnlich Der p 3 in 80 % der Patientenseren IgE, aber mit niedrigerer Bindungsaffinität. Die anti-Der p 9 Reaktivität von IgE in Patientenseren korrelierte mit der Reaktivität von Der p 2 und Der p 6, wobei allerdings durch RAST-Inhibierung nur eine sehr geringe Kreuzallergenität festgestellt werden konnte. Ein weiterer Unterschied zu den Gruppen 3 und 6 ist die collagenolytische Aktivität von Der p 9. Das Molekulargewicht von Der p 9 beträgt 24 kDa [137, 75].

Gruppe 10

Für Der f 10 wird eine zu Der f 1 vergleichbare Reaktivität angegeben [138], andere Arbeiten berichten von geringeren Reaktionen (50 %) mit unterschiedlicher Bindungsaffinität [126]. Bei 3 von 31 Personen wurden hohe IgE-Titer gegenüber Der f 10, aber keine Bindung zu Der f 1 und/oder Der f 2 festgestellt. Der p 10 und Der f 10 zeigen 98,5 % Sequenzhomogenität. Der f 10 besteht aus 284 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 33 kDa [75].

Erste Hinweise zu einem Gruppe 10 Allergen aus *L. destructor* (Lep d 10) mit 34-39 kDa [139, 140, 127] und 46,5 % RAST-positiven Patientenseren [141] liegen vor.

Die Allergene der Gruppe 10 gehören zu den Tropomyosinen der Wirbellosen (75 % Sequenzhomologie) [75] und besitzen eine in der Evolution hoch konservierte Aminosäuresequenz, was sich auch in Kreuzreaktionen mit nicht-Milben-Tropomyosinen zeigt [138]. Es wird eine dimere coiled-coil-Struktur für Tropomyosine beschrieben [142].

Gruppe 11

Der f 11 ist ein Paramyosin, ein strukturelles Muskelprotein bei Wirbellosen, mit einem Molekulargewicht von 98 kDa und bindet IgE in ca. 80 % der Patientenserum mit hoher Affinität und Frequenz [143]. Ähnlich den Tropomyosinen (Gruppe 10) besteht Paramyosin aus zwei identischen coiled-coil α -Helizes, wird, anders als Tropomyosin, nur in Insekten gefunden und ist ein bekanntes Immunogen [144].

Gruppe 12

Ein Vertreter der Gruppe 12 ist bislang nur in *Blomia tropicalis* identifiziert worden. Blo t 12 besitzt 144/124 Aminosäuren (cDNS/nativ) und ein Molekulargewicht von 14.2 kDa. Eine N-glykosylierte Position wurde nicht gefunden, die IgE-Bindungsfrequenz wird mit 50 % angegeben [145].

Gruppe 13

Die Gruppe 13 wird durch Allergene aus *B. tropicalis* (Blo t 13), *Acarus siro* (Aca s 13) und *L. destructor* (Lep d 13) vertreten. Bei Blo t 13 handelt es sich um ein 130 Aminosäuren großes Protein mit einem Molekulargewicht von 14.8 kDa und einer IgE-Bindungsfrequenz von 11 % [146]. Hierzu passend besteht Lep d 13 aus 131 Positionen bei einem Molekulargewicht von 14.6 kDa und besitzt weder N-glykosylierte- noch Cysteinpositionen. Isoformen werden nicht vermutet, die IgE-Bindungsfrequenz in *Lepidoglyphus* sensibilisierten Patienten liegt bei 13 %. Homologien der Sequenz bestehen mit Blo t 13 (78 %) und Aca s 13 (60 %) [127].

Gruppe	Allergen	Spezies	Molekulargewicht [kDa]	IgE-Bindungsfrequenz [%]	Aminosäurepositionen	Isoelektrischer Punkte [pH]	Funktion
1	Der p 1	<i>D. pteronyssinus</i>	25	~80	222	4,7–7,5	Cysteinproteasen
	Der f 1	<i>D. farinae</i>	25	~80	223		
2	Der p 2	<i>D. pteronyssinus</i>	14	>80	129	6,6	Fortpflanzung Bakterielle Abwehr Verdauung
	Der f 2	<i>D. farinae</i>	14	>80	129		
	Lep d 2	<i>L. destructor</i>	13,3	~60	125		
3	Der p 3	<i>D. pteronyssinus</i>	28 - 34	17 -	233	3,7–7,4	Serinproteasen vom Trypsintyp
	Der f 3	<i>D. farinae</i>		>80			
4	Der p 4	<i>D. pteronyssinus</i>	56 - 60	25-46		5-7	α-Amylase
	Der f 4	<i>D. farinae</i>					
5	Der p 5	<i>D. pteronyssinus</i>	15	>50	112		
	Der f 5	<i>D. farinae</i>	15		112		
	Lep d 5	<i>L. destructor</i>	12,5	~10	110		
6	Der p 6	<i>D. pteronyssinus</i>	25	~40	231	5,2	Serinproteasen; Chymotrypsin- Substratspezifisch
	Der f 6	<i>D. farinae</i>	25		231		
7	Der p 7	<i>D. pteronyssinus</i>	22	50-60	198	5,6-7	Multiple Banden in Immundetektion (11,5, 13, 24, 27, 29, 30, 31 kDa)
	Der f 7	<i>D. farinae</i>	22		193		
	Lep d 7	<i>L. destructor</i>	22		197		
8	Der p 8	<i>D. pteronyssinus</i>	26	~40	219	4,8; 7,8	Glutathion- Transferase
9	Der p 9	<i>D. pteronyssinus</i>	24	~80	284		Serinproteasen; Col- lagenase
10	Der p 10	<i>D. pteronyssinus</i>	33	50–80	~280		Tropomyosine
	Der f 10	<i>D. farinae</i>	33		284		
	Lep d 10	<i>L. destructor</i>	34 - 39	~50			
11	Der f 11	<i>D. farinae</i>	98	~80			Paramyosin
12	Blo t 12	<i>B. tropicalis</i>	14	~50	124		
13	Blo t 13	<i>B. tropicalis</i>	14,8	~11	130		
	Lep d 13	<i>L. destructor</i>	14,6	~13	131		
14	Der f 14 (M177)	<i>D. farinae</i> + <i>D. pteronyssinus</i>	189 (cDNS)	~65			Apolipoporin ähnlich
14b	MAG ⁵ 1 MAG3	<i>D. farinae</i> + <i>D. pteronyssinus</i>	39				Glutathion- Transferase M177 Fragmente
Keiner Gruppe zugeordnet							
	MAG29	<i>D. farinae</i>	67	~10	145		
	?	<i>L. destructor</i>	79 + 93 Σ 172				

Tabelle 1 – Klassifizierung der Milbenallergene der untersuchten Spezies *D. pteronyssinus* und *L. destructor* sowie einiger anderer wichtiger Milbenarten.

⁵ Mite Antigen Gen

Gruppe 14

Ein zunächst als M177, inzwischen als Der f 14 bezeichnetes Allergen, konnte aus *D. farinae* rief bei ca. 65 % der getesteten Milbenallergiker spezifische IgE-Reaktion hervor [133]. Aufgrund proteolytischen Abbaus konnten in gelagerten Extrakten nur noch geringe Konzentrationen nachgewiesen werden. Zudem war die Allergenität der Fragmente im Vergleich zum „Mutterallergen“ erhöht [55]. Weitergehende Untersuchungen mittels cDNS-Klonierung ergaben ein Polypeptid mit 1.650 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 189,5 kDa [147]. Die bislang als eigenständig geführten Allergene MAG 1 (39 kDa Gluthation-S-Transferase) [148] und MAG3 wurden als M177-Fragmente eingestuft [147]. *E. maynei* und *D. pteronyssinus* exprimieren die homologen Sequenzabschnitte (MAG1, MAG3) und das M177-Äquivalent mit über 80 % Sequenzhomologie [147, 149]. Die Sequenz besitzt große Ähnlichkeit zu den Apolipoproteinen der Insekten, einer hydrophoben Proteinklasse aus den Lipidtransportvesikeln des haemolymphischen Systems („Insektenblut“).

Bislang nicht eindeutig zugeordnete Allergene

MAG 29 wurde als ein 67 kDa Allergen aus *D. farinae* Extrakten (whole mite body) mit 145 Aminosäuren und sehr geringer IgE-Bindungsfrequenz (9,8 %) identifiziert. Es weist Ähnlichkeiten (65,4 %) zu HSP 71 aus der Familie der HSP 70-Proteine auf [138]. Möglicherweise wird es zukünftig als Der f 15 klassifiziert.

Ein hochmolekularer dimerer Proteinkomplex, bestehend aus einem 79 kDa und einem 93 kDa Fragment, wurde aus *L. destructor* identifiziert [140] und konnte im Frontbereich des Exoskeletons der Milbe lokalisiert werden. In den Kotpellets gelang mit monoklonalen Antikörpern kein Nachweis [113]. Eine Klassifizierung wurde noch nicht vorgenommen. Das 93 kDa Fragment passt hinsichtlich des Molekulargewichts in die Gruppe 11, das 79 kDa Fragment kann aufgrund der Größe keiner Gruppe zugeordnet werden. Die Summe von 172 kDa lässt wiederum die Gruppe 14 interessant erscheinen.

2.7 ALLERGENEXTRAKTE

Allergenextrakte (siehe Motivation und Zielsetzung) sind im Gegensatz zu synthetisch hergestellten chemischen und gentechnologischen Arzneimitteln komplexe Mischungen aus Proteinen, Glykoproteinen und anderen potentiell allergie-

auslösenden bzw. irritierenden Komponenten. Sie werden in verschiedenen Bereichen der Diagnostik und Therapie allergischer Erkrankungen eingesetzt. So sind pulverförmige, wenig aufgereinigte oder in Glycerol eingebundenen Allergene zur Kutantestung, hochaufgereinigte, gut charakterisierte und sterilisierte Lösungen zur Prick- und Provokationstestung (nasal und bronchial) bekannt sowie individuell eingestellte Therapielösungen.

2.7.1 Bedeutung in der Diagnostik

Allergenextrakte in der Diagnostik werden *in-vivo* von der Epikutantestung, über subkutane Prick- und Scratchtestung, bis hin zur nasalen und bronchialen Provokationstestung eingesetzt. Ein weiteres Anwendungsgebiet ist die *in-vitro*-Testung in Forschung und Praxis, angefangen von Lösungen zur RAST/EAST-Klassenbestimmung und RAST/EAST-Inhibition zur Bestimmung des allergischen Potentials, bis hin zu einem breiten Spektrum immunologischer Verfahren (Immunoblotting und Elektrophoresen). Idealerweise müssen Extrakte zur Diagnostik vor allem

- verfügbar sein, d.h. die allergene Quelle muss reproduzierbar aufgeschlossen werden und applizierbar sein,
- frei von Fremdallergenen und anderen Komponenten (Schwermetalle, Toxine, Farbstoffen) sein,
- definierte Mengen der einzelnen, klinisch relevanten Allergene (Major- oder Intermediärallergene) in nativer, biologisch aktiver und stabilisierter Form enthalten.

Heutige Testextrakte enthalten Mischungen allergener Komponenten einer Allergenquelle. Extrakte der Hersteller differieren u.a. aufgrund unterschiedlicher Rohkulturen (Milben) und Verarbeitungsprozeduren in ihrer Zusammensetzung (qualitativ und quantitativ). Ergebnisse können so falsch negativ oder falsch positiv erscheinen. Die größten Probleme bereitet es, allergene Proteine in ausreichender Menge zu isolieren, zu stabilisieren und deren biologische Aktivität zu erhalten.

2.7.2 Bedeutung in der Therapie

Derzeit kann weder die genetische Veranlagung therapeutisch gezielt vermindert noch die Allergenexposition wirksam verhindert werden. Mit Hilfe der Immunthe-

rapie können eine Verminderung der Symptome oder eine spezifischen Toleranz gegenüber einem Allergene erzielt werden. In der Therapie existieren drei auf immunologischen Reaktionen basierende Konzepte, welche die Bereitstellung verschiedenster Formen von Allergenextrakten erfordern.

1. Peptidtherapie mit Allergoiden
2. Unspezifische passive Immuntherapie durch anti-IgE-Antikörper
3. Allergen-Antikörper-Reaktion der spezifische Immuntherapie (SIT)

2.7.2.1 Peptidtherapie mit Allergoiden

Allergoide sind an anorganischen Trägern immobilisierte immunogene Allergenfragmente. Diese Peptide sind Produkte des proteolytischen Abbaus der Allergene durch APC und deren Epitope bestehen aus einer linearen Kette von 10 bis 25 Aminosäuren [16]. Sie besitzen nicht mehr die Konformation des nativen Moleküls, sondern sind flexibel, zumal durch die Bindung an die MHC-Klasse II Moleküle eine abweichende räumliche Struktur entsteht [150]. Die Peptide werden in Kombination mit den MHC-Klasse II-Molekülen von den spezifischen T-Zellrezeptoren erkannt. T-Zellepitope sind sequenzabhängige Epitope, B-Zellepitope sind hingegen konformationsabhängige Epitope mit mindestens 16 Aminosäuren [78].

Ziel ist es, zur Modulation der TH-Lymphozytenantwort nur die Anteile der Allergenmoleküle zu präsentieren, die T-Zellepitope tragen. IgE-bedingte Nebenwirkungen bzw. die allergischen Symptome, sind aufgrund der zerstörten oder nicht vorhandenen B-Zellepitope stark reduziert. Allergoide besitzen eine deutlich niedrigere Allergenität, d.h. Bindungsaffinität zu spezifischen IgE, und weisen im Vergleich zu nativen Allergenen im EAST-Hemmtest erst bei 100- bis 1000 fachen Konzentrationen vergleichbare Hemmwerte (50 %) auf [16]. Die Formulierung erfolgt durch Denaturierung, kovalente Kopplung an Formaldehyd, Glutaraldehyd oder synthetische Polymere (PEG, Kopolymere aus D-Glutaminsäure und D-Lysin) [151].

Gravierender Nachteil der Methodik ist, das T-Zellepitope HLA-Typ abhängig sind und jedes Allergen von mehreren T-Zellepitopen erkannt wird. Diese Vielfalt bedingt, dass ein Cocktail aus mehreren Peptidfragmenten verabreicht werden muss [150, 11]. In welchem Ausmaß Allergoide zur Hyposensibilisierung eingesetzt werden können, muss in jedem Einzelfall überprüft werden.

2.7.2.2 Unspezifische passive Immuntherapie durch anti-IgE-Antikörper

Die neuste Therapieentwicklung sind anti-IgE-Antikörper. Diese binden dosisabhängig an alle freien IgE-Antikörper aus der Blutbahn am selben Epitop wie der hoch affine FcεRI-Rezeptor und werden als Immunkomplexe durch die Nieren ausgeschieden. IgE bildet sich in einem Zeitraum von zwei bis drei Wochen im gleichen Umfang zurück, eine erneute Applikation wird hierdurch notwendig. Es wird nur freies IgE und kein zellfixiertes IgE gebunden, so dass die allergene Persistenz erhalten bleibt. Die Minderung der Symptome erfolgt durch eine herabgesetzte Produktion von FcεRI-Rezeptoren auf der Mastzelloberfläche [152].

Die Präparate sind in der klinischen Testung und bewirken dort eine erhebliche Reduzierung in der oralen und inhalativen Gabe von Kortikosteroiden. Aufgrund des kurzen Wirkzeitraums wird vor allem eine Anwendung in der saisonalen Allergie (Pollen) gesehen. Aussagen zu langfristig auftretenden Nebenwirkungen sind noch nicht möglich, systemische klinisch relevante Nebenwirkungen in Zusammenhang mit einer Kurzzeitgabe wurden nicht beobachtet [153]. Zur Zeit bleibt die Methode deshalb auf kurze saisonale Allergieformen bei Patienten mit einem starken Krankheitsbild und Mehrfachsensibilisierungen beschränkt [154].

2.7.2.3 Spezifische Immuntherapie (SIT)

Die klassische Variante der Immuntherapie ist die sog. spezifische Immuntherapie (SIT), auch als Hyposensibilisierung bezeichnet. Durch die Applikation (subkutan oder sublingual) ansteigender Mengen eines definierten Allergenextraktes kommt es zu einem Wechsel der Immunantwort von TH2 zu TH1. TH-Zellen von Allergikern reagieren auf niedrige Allergendosen mit der Produktion eines TH2-Zytokinmusters (IL-5), mit zunehmender Allergenkonzentration erfolgt eine Verschiebung zu einem TH1/TH0-Muster (IFN-γ). Es erfolgt zunächst ein Anstieg und dann ein langsamer Abfall der IgE-Konzentration bei gleichzeitigem Anstieg des spezifischen IgG-Titers [155]. Der Nachteil der SIT ist, dass eine Besserung der allergischen Symptome erst durch die Gabe hoher Allergenmengen, verteilt über einen längeren Zeitraum, eintritt. Der therapeutische Einsatz hoher Allergendosen wird aber durch die IgE-bedingten Nebenwirkungen, von der lokalen Reaktion bis hin zur systemischen und unvorhersehbaren Anaphylaxie, begleitet [156].

2.7.3 Herstellung von Allergenextrakten – eine Übersicht

Aufgrund der Verschiedenartigkeit allergener Komponenten soll im folgenden ein detaillierter Überblick der biochemischen Grundlagen zur Extrakterstellung gegeben werden.

Ausgangsmaterial zur Herstellung von Milbenextrakten sind entweder „Whole Mite Cultures“ (WMC), bestehend aus Milbenkörpern, Kotpellets und Resten des Futtermediums, letzteres in möglichst geringem Ausmaß, oder „Purified Mite Bodies“ (PMB), isolierten Milbenkörpern. Wird eine WMC verwendet, ist die Allergenzusammensetzung des Extraktes von der Wachstumsphase der Entnahmekultur abhängig. Mit ansteigender Kulturzeit wird zunehmend Futtermedium durch eine anwachsende Milbenzahl verstoffwechselt. Dies bedeutet neben dem abnehmenden Futteranteil eine steigende Anzahl an Milben (lebend und tot) sowie Stoffwechselprodukten in Form von Kotpellets [157]. Hierdurch verändert sich die Gewichtung vor allem der Majorallergene der Gruppen 1 und 2 zueinander [158]. Während die Quantität der Gruppe 2 Allergene durch die Anzahl der Tiere begrenzt ist, kumuliert die Menge der in den Ausscheidungen der Milben befindlichen Gruppe 1 Allergene während der gesamten Kulturzeit und erreicht zum Ende ein Maximum.

Auch regionale Unterschiede müssen bedacht werden. So sind in Japan ca. 80 % der Milbenatopiker gegen das Minorallergen Der p 10, einem Skeletonprotein aus der Tropomyosinfamilie sensibilisiert. Pricktestungen werden meistens aus WMC (Milbenkörper und Exkremente) hergestellt. Verwendet man hingegen nur PMC als Rohmaterial, so kann der Der p 10 Wert auf das 1000 fache ansteigen [158] und der im Extrakt enthaltene Anteil der Gruppe 1 Allergene ist im Vergleich zum Gruppe 2 Anteil sehr viel geringer als bei einem WMC Extrakt, da nur die in den Verdauungsorganen der Milben befindlichen Gruppe 1 Allergene zur Verfügung stehen. Vergleichbares gilt für viele Milbenallergene [159].

Die Extraktion findet in wässrigen Medien mit relativ moderaten Salzfrachten zur Pufferung des pH-Wertes statt. Geeignete Puffersysteme sind 0,1 M PBS, pH 7,4, also Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, 0,125 M Ammoniumhydrogencarbonat pH 7,9 oder auch Cocas Lösung (0,1 M NaCl; 0,03 M NaHCO₃ ohne Phenolzusatz) pH 8,2. Es können auch weit geringere Salzfrachten, z.B. 0,01 M, eingesetzt werden [160].

Übliche Extraktionszeiten betragen zwischen 6 und 14 h bei 4° C, wobei ein Optimum aus Ausbeute, Reproduzierbarkeit und Stabilität der Proteine gefunden

werden muss. Allergene beginnen aufgrund ihres hydrophilen Charakters unmittelbar aus der Allergenquelle in das Extraktionsmedium zu wandern. Schon nach 5min wird bis zu 30 %, nach 30 min gar bis zu 50 % der allergenen Gesamtaktivität des Extraktes erreicht. Hierbei wird allerdings nur ein Bruchteil der Gesamtproteinmenge aus der Allergenquelle überführt. Eine quantitative Ausbeute ist je nach Ausgangsmaterial nach 24 bis 48 h erreicht. Reproduzierbare Extrakte, d.h. mehrere Extrakte aus der gleichen Charge mit dem Ziel gleichförmiger Ergebnisse, sollten mindestens vier Stunden andauern [157].

Die Abtrennung der Milbenkörper, Kotpellets und restlichen Futterpartikel erfolgt durch Zentrifugation und Filtration, mit der gleichzeitig eine Sterilisation vorgenommen wird. Eine Abgrenzung zum niederen Molekulargewichtsbereich wird durch eine Dialyse oder Ultrafiltration mit einer Ausschlussgrenze von 500 – 3.000 Da erreicht. Alternativ kann nach der Zentrifugation auch eine Aufreinigung des Extraktes mittels Säulenchromatographie erfolgen. Auch hier ist je nach Zielallergen ein Optimum zu ermitteln.

Die Stabilisierung der aufgereinigten Extrakte kann durch Lyophilisation und anschließender Lagerung bei -20 bis $+4^{\circ}$ C oder alternativ durch Behandlung mit Stickstoffkälte und/oder bei -80° C erreicht werden. Ein Optimum ist auch hier Problembezogen zu ermitteln, da es zu Veränderungen und Schädigungen der allergenen Quartärstruktur kommen kann [111].

2.7.4 Stabilisierung von Allergenextrakten

Unter der Annahme, dass alle biologisch aktiven Proteine im Extrakt zusammen eine „Quartärstruktur“ durch diskrete Assoziation zu größeren biochemisch aktiven Proteinen bzw. Aggregaten aufbauen, oder im Zusammenspiel mit einzelnen Proteinen eine vielfältige biologische Wirkung induzieren, können die Gründe für eine Schädigung dieser „Quartärstruktur“ (4D) und somit der Verlust der biologischen Aktivität unterschiedlicher Natur sein. Danach richten sich die Möglichkeiten, solche „Quartärstrukturen“ zu stabilisieren.

Die native Quartärstruktur eines Proteins ist die biologisch aktive Form. Sie wird durch nicht kovalente Wechselwirkungen wie hydrophobe und ionische Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen gestaltet. Bei einem zusammengesetzten Protein mit gleichen oder verschiedenen Untereinheiten („subunits“), z. B. Strukturen der Form α_2 , $\alpha_2\beta_2$, $(\alpha\beta)_2$ mit definierter Symmetrie, z.B. D_1 , D_2 oder C_n etc., ist die biologisch aktive Form streng an diese Symmetrien gebunden. Diese Strukturen werden im allgemeinen als Quartärstruktur (4D) be-

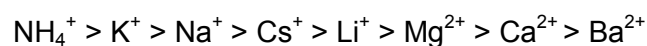
zeichnet. Im Gegensatz zu den anderen, bekannten Proteinstrukturen, welche die aminosäure-spezifische Sequenz (1D), ihre Sekundärstruktur (2D) bzw., die dreidimensionale Faltung (3D) beinhalten, ist die 4D Struktur je nach Ausgestaltung der Berührungsflächen (heterolog vs. homolog) der Untereinheiten durch nicht kovalente Bindungen charakterisiert [56].

Insbesondere aufgrund der verschiedenen Wechselwirkungen, sind die Gründe für eine Schädigung der Quartärstruktur und dem damit verbundenen möglichen Verlust der biologischen Aktivität vielfältig:

- Aggregation und Dissoziation;
- Autolyse;
- Endogene und exogene Proteolyse;
- pH-Extrema;
- Oxidation bzw. Reduktion;
- Temperatureinflüsse;
- Mechanische Beanspruchung;
- Oberflächenaktive Verbindungen, z.B. Detergenzien;
- Organische Lösungsmittel, z.B. unpolare Lösungsmittel, oder DMSO.

Die Protein-Stabilisierung spielt für Allergenextrakte eine entscheidende Rolle. Die Vielzahl der im Extrakt vorkommenden Proteine, die zum Teil sehr ähnlichen Strukturen, Sequenzen und Molekulargewichtsverteilungen, sind von großer Bedeutung hinsichtlich Stabilität, Standardisierung, Haltbarkeit und biologischer Aktivität bzw. als Zulassungskriterien für Behörden.

Durch die Verwendung verschiedener Salze können Proteine in ihrer aktiven Form stabilisiert werden. Eine Unterteilung der Salze erfolgt nach der **Hofmeister-Serie**, wobei Anionen und Kationen auf der linken Seite eine Stabilisierung bewirken.



So kann es unter anderem zu einer Reduzierung der Löslichkeit der hydrophoben Gruppen durch die Erhöhung der Ionenstärke kommen [74]. Es erfolgt die Bildung von H₂O-Clustern an der Oberfläche oder in Taschen des Proteins, was zu einem Verlust an Freier Energie (ΔG) des Systems und einer Entropieabnahme des H₂O führt. Die Reduzierung der Freien Energie (ΔG) bei gleichzeitiger Entropieabnahme (ΔS) des Wassers führt zur Bildung von quasi-kristallinen Wasserstrukturen (Scherkräfte, Hydromechanik, Ultraschall, Schütteln) insbe-

sondere an der externen Oberfläche des Proteins (1. Schicht). Die zweite H₂O-Schicht ist wesentlich mobiler als die erste H₂O-Schicht, so dass es zum Austausch mit dem Wasser des Mediums („bulk water“) kommen kann. Diese Schicht ist besonders empfindlich gegenüber Scherkräften, da sie eine Relaxationszeit besitzt, die in der Nähe der Relaxationszeit des Proteins liegt, daher von der Form, Größe und ersten Hydratation abhängig ist und somit die Kompaktheit des Proteins oder Makromoleküls gewährleistet. Diese zweite Wasserschicht ist daher unter anderem angreifbar gegenüber Alkoholen, z.B. Methanol, Ethanol, Glycerol, oder Aceton, und kann unter Umständen zur irreversiblen Entfaltung des Proteins über die Zeit führen. Deshalb werden zur Stabilisierung bzw. Lagerung von Proteinen, außer Glycerol, Alkohole wenig bis gar nicht eingesetzt.

Anionen und Kationen auf der rechten Seite der Hofmeister-Serie destabilisieren und entfalten die Proteine durch Bindung an geladene Seitenketten der Proteine, z.B. Glutamin- oder Asparaginseitenkettenreste, und verändern das Dipolmoment unter Umständen erheblich, wodurch die Zahl der Wassercluster um die Proteine verringert wird. Ein ansteigender Salzgehalt (Ionenstärke) einer wässrigen oder gepufferten Proteinlösung bewirkt eine Reduzierung der geordneten Wasserhülle und in der Folge werden hydrophobe Bereiche exponiert (Umfaltung). Proteine in wässriger Lösung interagieren bei ansteigendem Salzgehalt über hydrophobe Oberflächenbereiche mit sich selbst, ohne dabei ihre Hydratationshülle zu verlieren, so dass sie schließlich (reversibel) ausfallen (Aussalzeffekt) [161].

Des Weiteren können Salze Pufferfunktionen übernehmen und vermeiden somit extreme pH-Wertänderungen. Niedrige pH-Werte unterhalb des isoelektrischen Punktes des Proteins führen unter Umständen zu einer Entfaltung der Polypeptidkette und somit zur biologischen Inaktivierung. Je nach Art des Proteins kann dieser Vorgang reversibel oder irreversibel sein, wobei im letzteren Fall dann von Denaturierung gesprochen werden kann.

Die Bindung anionischer, kationischer und nicht-ionischer Detergenzien an Proteine ist eine Funktion der freien Detergenzkonzentration, die im Gleichgewicht mit dem Protein steht. Nach Erreichen der kritischen Mizellkonzentration (CMC) erfolgt nur noch eine sehr geringe zusätzliche Detergenzbindung an das Protein. Wird die Monomerkonzentration des Detergenz über die Anzahl der zur Absättigung der Oberflächenbindungsstellen erhöht, so erfolgt eine weitere Bindung an anderer Stelle mit einhergehender Entfaltung des Proteins. Dies ermöglicht die Anlagerung von Detergenzien an zunächst verborgene Bindungsstellen. Durch Hitzeeinwirkung werden die Proteine in Gegenwart von Detergenzien vollständig entfaltet. In der Elektrophorese verwendet man Natriumdodecylsulfat (SDS), um

den Proteinen eine definierte Menge an Detergenz anzulagern (1,4 g SDS/g Protein). Proteine mit dem gleichen Masse/Ladungsverhältnis haben im Gel die gleiche elektrophoretische Mobilität, so dass die Trennung ausschließlich nach dem durchschnittlichen Molekulargewicht erfolgt [162].

Die häufigste Ursache für Inaktivierung ist Wärme. Durch diese wird die kinetische Energie des Proteins, genauer der Faltung, soweit erhöht, dass zunächst verborgene hydrophobe Bereiche dem Lösungsmittel gegenüber exponiert werden. Es kommt mit zunehmender Temperatur zur Aggregation oder Dissoziation bei 4D Strukturen, oder auch zum monomolekularen konformationellen Netzbildung oder „random coil“ Bildung, d.h. einem Verstricken der Polypeptidkette in sich selbst, in der nur „Nahordnungs-Wechselwirkungen“ eine Rolle spielen. Nicht kovalente Bindungen einschließlich der Wasserstoffbrückenbindungen gehen verloren. Bei der Rückkehr zu normalen Temperaturen halten nicht kovalente und andere nicht native Wechselwirkungen das Protein in der netz-ähnlichen oder „random coil“ Struktur, trotzdem die thermodynamische instabilere Form überwiegt.

Gruppe 2 Allergene der Hausstaubmilben sind thermoresistenter als Gruppe 1 Allergene (Cysteinproteasen), die Majorallergene von Katze Fel d 1 (Uteroglobulin) und Hund Can f 1 (Lipocalin) sind demgegenüber noch stabiler [116, 62]. Die Lagerung von Whole Mite Body-Extrakten ist bei 4° C bis zu drei Monaten ohne große Verluste an biologischer Aktivität möglich. Eine Aufbewahrung bei 23° C führte zu partiellen Verlusten im Gesamtproteinspektrum, die Erhöhung auf 36° C zu substantiellen Verlusten [163].

Generell kann es durch Hitzeeinwirkung zur Deamidierung von Asparagin- oder Glutamin- bzw. Gluthationresten kommen, oder zur Hydrolyse von Peptidbindungen und zur Oxidation von Cystein, Methionin sowie zur Zerstörung von Disulfidbindungen.

Ein weiteres Problem ist das Einfrieren und Auftauen von Allergenlösungen. Eine allgemein gültige Lösung gibt es im Augenblick nicht, jede Proteinlösung stellt ein eigenständiges Problem dar, das es zu optimieren gilt. Die Aussage, dass die Lagerfähigkeit eines Proteins ohne Verlust der biologischen Aktivität bis zu niedrigen Temperaturen zunimmt, ist nicht bewiesen. Es gibt viele Ausnahmen, wobei Temperaturen um 5° C oftmals effektiver sind als -40° C [164, 165, 111]. Beim Einfrieren und Auftauen kann es sowohl zu reversibler als auch irreversibler Inaktivierung kommen.

Eine zunächst reversible Denaturierung wird häufig durch auftauen/einfrieren irreversibel. Besonders empfindliche Seitenketten, wie z.B. Methionin, Cystein und Cystin können durch das Einfrieren oxidiert werden, so auch phenolische Seitenketten, z.B. des Tyrosins. Die Konzentration an molekularem Sauerstoff liegt in partiell gefrorenem System bei -3°C um bis zu 1000 fach höher als bei 0°C . Identische Konzentrationsgradienten können durch Dehydratation bzw. Lyophilisation aufgebaut werden und zu irreversibler Inaktivierung führen [164].

Der Grund liegt z.B. in der Lyophilisation von Ammoniumsalzen, die während der Gefriertrocknung aus dem Extrakt entfernt werden ($\text{NH}_3\uparrow$), wodurch es zu erheblichen pH-Wertverschiebungen kommt.

Ein weiteres Problem ist die mechanische Beanspruchung von Proteinlösungen. Schütteln führt zu erhöhten Reaktionen am Gas-Flüssig-Übergang. Proteine entfalten sich, um die maximale Anzahl an hydrophoben Aminosäuren gegenüber der Luft zu exponieren. Es kommt zu Aggregation aufgrund der hohen Anzahl an freigelegten hydrophoben Bindungsstellen. Scherkräfte an Filtern oder Gefäßwänden führen ebenfalls zu Konformationsänderungen mit Freilegung von hydrophoben Bindungsstellen, wobei der Grad der Inaktivierung eine Funktion von Dauer und Stärke der Scherkraft ist [164].

Ionisierende und nicht-ionisierende Strahlung beeinflusst sowohl das Protein selbst als auch die umgebenden Wassermoleküle. Direkter Einfluss ionisierender Strahlung führt zu Veränderungen der kovalenten Primärstruktur in Form von Radikalbildung, Quervernetzung und Zerstörung einzelner Aminosäuren. Das Ergebnis ist ein Verlust an nativer Aktivität oder Aggregation [164, 166].

Direkte UV-Strahlung führt zur Zerstörung von Aminosäuren wie Cystein, Tryptophan und Histidin durch Oxidation [167].

Ultraschallbehandlungen erzeugen Mikrobäschen von schnell entweichenden Gasen. Diese kollabieren, was wiederum zu einer mechanischen und chemischen Reagenzwirkung (Radikalbildung) führt [164].

Glycerol, als bis zu 50 %iger Anteil der Proteinlösung, ist aufgrund von Solvatationseffekten ein guter Gefrierschutz und ist deshalb keine Gefahr für die geordnete Wasserhülle der Proteine. Die Epitopstabilität bleibt bei Gruppe 1 und 2 Allergenen für mindestens ein Jahr bei 4°C gewährleistet [168]. Allerdings kann Glycerol bei Temperaturen unter -20°C und über 4°C den erheblichen Verlust an biologischer Aktivität nicht verhindern. DMSO wirkt ebenfalls durch Solvatationseffekte als Gefrierschutz, ist aber als Arzneimittelzusatz nicht zugelassen [111].

2.7.4.1 Polyethylenglykol

Polyethylenglykol (PEG) kann als „salting-out“-Reagenz wirken, wobei ein sterischer Ausschluss („steric exclusion“) zu einer Stabilisierung der nativen Proteinstruktur in wässriger Lösung führt [169].

PEG hat einen größenabhängigen Einfluss auf die Thermostabilität von Proteinen [170]. Dieser ist abhängig von der Beschaffenheit des Proteins und der Größe des PEG, wobei PEG mit der größeren Hydrophobizität die bessere Wirkung erzielt. Die Hydrophobizität wiederum steigt mit wachsender Molekulargewicht (>400). PEG 1000 interagiert mit den Proteinen bei hohen Temperaturen, wird bei niedrigen Temperaturen aber von der nativen Form ausgeschlossen. PEG ist hydrophob und bindet bevorzugt an die bei der Entfaltung freigelegten hydrophoben Bereiche der Proteine. Dies führt zu einer Stabilisierung des ungefalteten Zustandes bei höheren Temperaturen, also zu einer Herabsenkung der Übergangstemperatur in den entfalteten Zustand. PEG 6000 wird zur Isolierung von Antikörpern (IgG) aus Serum durch Aggregation und Ausfällung verwendet. Die Modifikation von Proteinen mit PEG resultiert in einem Komplex nicht bekannter Immunogenität, erhöhter Lebensdauer und Stabilität und ermöglicht so in vielen Fällen die Proteintherapie. So können Lösungen mit einer für die Hypersensibilisierung notwendigen hohen Proteinkonzentrationen hergestellt werden [171].

Eine weitere Möglichkeit der Proteinstabilisierung mit PEG ist die kovalente Bindung an die Proteinoberfläche (s. Peptidtherapie mit Allergoiden). Sogenanntes mPEG ist ungeladen, linear, hydrophob, flexibel und in einer Vielzahl unterschiedlicher Molekulargewichte erhältlich. Es ist durch die Food and Drug Administration (FDA) der USA für die Verwendung in Pharmazeutika zur oralen, parenteralen und epidermalen Applikation zugelassen. Ausgeschieden wird es hauptsächlich durch die Nieren [171].

Generell ist bei mPEG modifizierten Proteinen die Stabilität und proteolytische Widerstandskraft erhöht. Weitere Vorteile sind keine oder nur sehr geringe Immunogenität, eine reduzierte Allergenität bei gleichzeitigem minimalen Verlust der biologischen Aktivität, eine erhöhte Verweildauer des Proteins im Körper sowie sehr geringe Toxizität. Die Aktivität bleibt auch in organischen Lösungsmitteln (Benzol, Toluol, Ethanol und DMF) erhalten. Die Effekte sind das Resultat einer Formation von PEG-Molekülen um das Protein herum, so dass aus sterischen Gründen keine Reaktion mit TH-Zellen erfolgen kann. Die proteolytische Inaktivierung der Antigene bleibt aus, die Aktivität des Proteins kann im Einzelfall sogar gesteigert werden [171, 172]. Erfolge konnten hier bei Gräserpollen erzielt

werden, wohingegen Milbenallergene scheinbar für diese Anwendung nicht geeignet sind [5].

Zum Ende dieses Abschnitts soll auf die proteolytische Aktivität einiger wichtiger Milbenallergene in Extrakten hingewiesen werden. Hierbei spielen pH, Temperatur, Kinetik und das Verhältnis Enzym zu Substrat eine Rolle [173, 76]. Bei der Herstellung von Allergenextrakten sollte deshalb schnell und bei möglichst niedrigen Temperaturen gearbeitet werden. Die Auswirkungen von Veränderungen des pH sowie der Extraktzusammensetzung auf das allergene Potential sind von Fall zu Fall neu zu prüfen.

Der Zusatz von Proteaseinhibitoren zu Allergenextrakten kann einen Teilverlust der allergenen Potenz des Extraktes bewirken. Zudem scheint der Einsatz klassischer Proteaseinhibitoren keinen oder nur sehr geringen Einfluss auf die Allergenstabilität zu haben. Es wird berichtet, dass Aktivitätsverluste nicht durch Proteasen sondern durch den Verlust an nativen Inhibitoren oder an spezifischer Instabilität des oder der Proteine hervorgerufen wird [111]. Auch eine Lagerung bei 4° C ist einem Abbau durch Proteasen unterlegen. Eine Aufbewahrung als 50 %ige Glycerollösung bei -20° C wird deshalb favorisiert [73].

3 METHODEN UND VERFAHREN

3.1 ABLAUF DER UNTERSUCHUNGEN

Zur Einführung in den experimentellen Teil sollen zunächst die vorgenommenen Methoden und Verfahren anhand eines Ablaufschemas dem Untersuchungsablauf zugeordnet werden (Abbildung 5). Die im Schema aufgeführte „Präparative Isolierung“ (3.1) war nur Gegenstand von Voruntersuchungen und wird im folgenden Abschnitt deshalb nicht thematisiert.

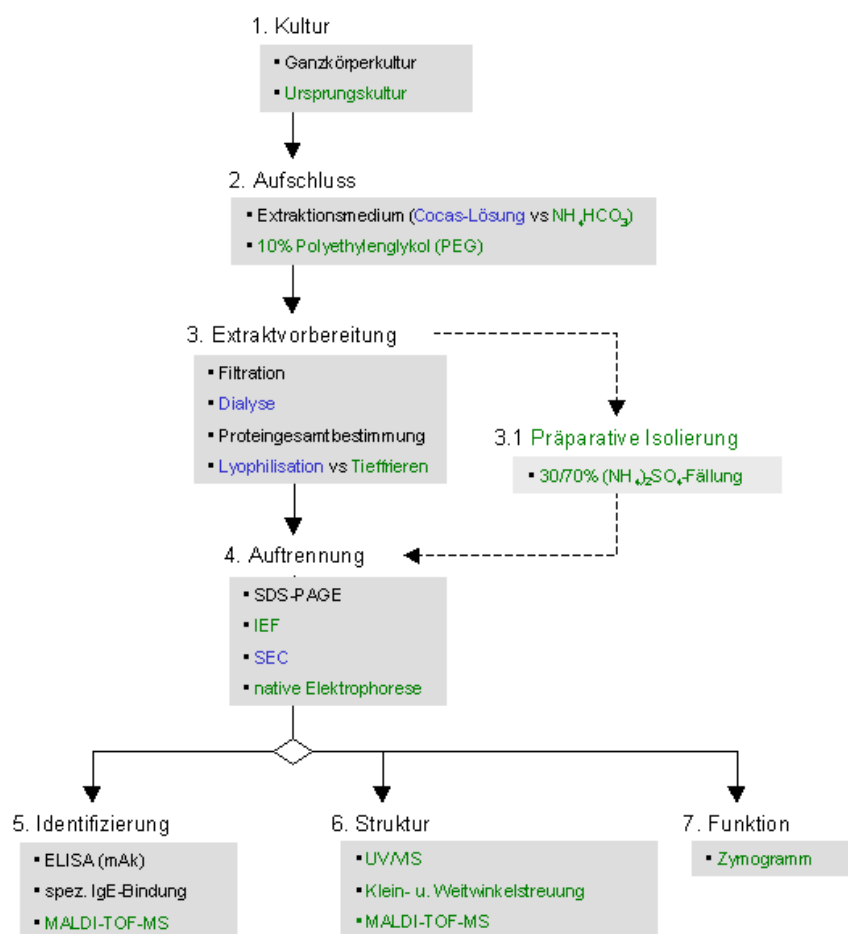


Abbildung 5 – Ablaufschema der durchgeführten Untersuchungen. Blau hervorgehobene Positionen wurden der Vorgehensweise eines Pharmaunternehmens entnommen, grün markierte Positionen entstammen dem eigenen Ablauf. Nicht farblich gekennzeichnete Positionen waren Bestandteil beider Varianten.

3.2 PROBENVORBEREITUNG

3.2.1 Verwendete Milbenkulturen

Es wurden folgende Milbenkulturen zur Extrakterstellung verwendet:

1. „Purified Mite Body-Kultur“ der Hausstaubmilbe *Dermatophagoides pteronyssinus*

Bezugsquelle: a) Allergon, Schweden und b) CSL, Australien

Die Kulturen bestanden laut Zertifikat aus ca. 95 % Milbenkörper und 5 % kleineren Komponenten (Futterreste, Kotpellets), wurden lyophilisiert, 48 h mit Aceton gewaschen und bei 2-8° C gelagert.

2. „Whole Mite-Kultur“ der Vorratsmilbe *Lepidoglyphus destructor*

Bezugsquelle: Dr. J. T. Franz, Universität Paderborn

Die Kultur enthielt mindestens 70 % Milbenkörper (mikroskopische Kontrolle). Der Rest bestand aus Futterresten sowie Rückständen der Milben (Exkreme und Körperteile). Die Kultur wurde lyophilisiert und bei 2-8° C gelagert.

3.2.2 Aufschluss der Milbenkulturen

In dieser Arbeit kamen zwei verschiedene Aufschlusswege zur Anwendung, die sich in folgender Weise unterschieden.

	Variante 1 „Pharmaunternehmen“	Variante 2 „Uni Paderborn“
Extraktionsmedium	modifizierte Cocas'-Lösung	Ammoniumhydrogencarbonat
Abtrennung niedermolekularer Komponenten	Dialyse	-
Überführung in lagerfähigen Zustand	Lyophilisation	Stickstoffkühlung
Lagerung	-20° C	-80° C

Tabelle 2 – Vergleich der Aufschlussverfahren

Variante 1 „Pharmaunternehmen“

Der unter leicht basischen Bedingungen praktizierte Aufschluss entsprach der Vorgehensweise in einem zertifizierten Pharmaunternehmen zur Verarbeitung von Rohkulturen zu Diagnostik- und Therapieprodukten. Niedermolekulare Sub-

stanzen unter 3.500 Da wurden zur Vermeidung von unerwünschten Nebenwirkungen abgetrennt.

- **Aufschluss**
2 % (w/v) Milbenkultur in modifizierter Cocas' Lösung; 4 h; 4° C; Überkopfschüttler.
- **Zentrifugation**
3000 x g; 15 min; 4° C.
- **Filtration**
Der Überstand wird nacheinander durch 0,8, 0,4 und 0,2 µm Spritzenfilter passiert. Die nächst kleinere Porenweite wurde erst nach vollständigem Passieren des Überstandes durch einen Filter gewählt.
- **Bestimmung des pH-Wertes**
- **Dialyse**
Zur Anwendung kam eine Membran⁶ mit einem Größenausschluss von 3500 Da, dialysiert wurde gegen 3 x 1000 mL H₂O_{dd} ü/N bei 4° C.
- **Bestimmung des pH-Wertes**
Aliquotierung zu je 1 mL.
- **Lyophilisation**
Gefriertrocknung der aliquotierten Extrakte für 1,5 h in einer SpeedVac.
- **Lagerung bei -20° C**

Variante 2 „Universität Paderborn“

Diese Aufschlussvariante unter moderat basischen Bedingungen wurde ohne Abtrennung niedermolekularer Bestandteile formuliert, da alle im Extrakt vorhandenen Komponenten einer analytischen Betrachtung unterzogen werden sollten.

- **Aufschluss**
 - 2 % (w/v) Hausstaubmilbenkultur
 - 5 % (w/v) Vorratsmilbenkulturin 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung für 6 h und 4° C bei nur leichter Durchmischung (keine Blasenbildung) auf dem Vertikalmischer.
- **Zentrifugation**
3000 g; 15 min; 4° C.

⁶ Spectraphor 3500

- Filtration
Überstand wird nacheinander durch 0,8, 0,4 und 0,2 µm Spritzenfilter passiert. Die nächst kleinere Porenweite wird erst nach vollständigem Passieren des Überstandes durch einen Filter gewählt.
- Aliquotierung
Schnelles Tiefrieren in flüssigem Stickstoff.
- Lagerung bei –80° C

Modifikation der Variante 2 „Universität Paderborn“

Die Modifikation zur Variante 2 bestand aus einem Zusatz von 10 % (v/v) einer gleichteiligen Polyethylenglykollmischung aus PEG 200⁷ und PEG 400⁸ zum Extraktionsmedium.

In Vorversuchen kam ein 10 %iger Zusatz mit PEG 600⁹ zum Einsatz (Probe 22). Optional wurde 0,5 M β-Mercaptoethanol oder Dithiotreitol (DTT) hinzugegeben (Proben 20, 21, 22).

Cocas-Lösung modifiziert (ohne Phenol); pH 8,2

Natriumchlorid	5 g
Natriumhydrogencarbonat	2,5 g

mit H₂O_{dd} auf 1000 mL auffüllen.

0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung, pH 7,8

Ammoniumhydrogencarbonat	7,906 g
--------------------------	---------

mit H₂O_{dd} auf 1000 mL auffüllen.

⁷ Molmasse 190 – 210 g/mol

⁸ Molmasse 380 – 420 g/mol

⁹ Molmasse 570 – 630 g/mol

Proben-Nr.	Probenbeschreibung <i>Spezies/Hersteller - Einwaage/Volumen Puffer - Zusatz</i>	Variante	Status*
1	<i>D. pteronyssinus</i> (Pharmaunternehmen) Referenzextrakt	1	F
2	<i>D. pteronyssinus</i> (CSL) 0,82 g/41 mL („Stammlyophilisat“)	1	L
3	<i>D. pteronyssinus</i> (Allergon) 1,0 g/50 mL („Stammlyophilisat“)	1	L
4**	<i>D. pteronyssinus</i> (Allergon) 0,2 g/10 mL (10 % PEG)***	2	F
5**	<i>L. destructor</i> (Uni Paderborn) 0,5 g/10 mL	2	F
6**	<i>L. destructor</i> (Uni Paderborn) 0,5 g/10 mL (10 % PEG)	2	F
7**	<i>D. pteronyssinus</i> (Allergon) 0,2 g/10 mL	2	F
8**	Probe 1b (CSL) rekonstituiert 193 µg Protein/2 mL (10 % PEG)	1	L
9**	Probe 1b (CSL) rekonstituiert 193 µg Protein/2 mL	1	L
10**	Probe 1c (Allergon) rekonstituiert 175 µg Protein/2 mL (10 % PEG)	1	L
11**	Probe 1c (Allergon) rekonstituiert 175 µg Protein/2 mL	1	L
12	<i>D. pteronyssinus</i> (Allergon) 0,1 g/5 mL	2	F
13	<i>D. pteronyssinus</i> (Allergon) 0,1 g/5 mL (10 % PEG)	2	F
14	<i>L. destructor</i> (Uni Paderborn) 0,2 g/5 mL	2	F
15	<i>L. destructor</i> (Uni Paderborn) 0,2 g/5 mL (10 % PEG)	2	F
16	Probe 1c (Allergon) rekonstituiert 175 µg Protein/2 mL	1	L
17	Probe 1c (Allergon) rekonstituiert 175 µg Protein/2 mL (10 % PEG)	1	L
18	Probe 1b (CSL) rekonstituiert 193 µg Protein/2 mL	1	L
19	Probe 1b (CSL) rekonstituiert 193 µg Protein/2 mL (10 % PEG)	1	L
20	<i>D. pteronyssinus</i> (Allergon) 0,2 g/10 mL	2	F
21	<i>L. destructor</i> (Uni Paderborn) 0,2 g/10 mL	2	F
22	<i>L. destructor</i> (Uni Paderborn) 0,2 g/10 mL (10 % PEG600)	2	F
23	Probe 1b (CSL) rekonstituiert 193 µg Protein/2 mL Cocas Lösg.	1	L
24	Probe 1b (CSL) rekonstituiert 193 µg Protein/2 mL H ₂ O _{dd}	1	L
25	Probe 1c (Allergon) rekonstituiert 175 µg Protein/2 mL H ₂ O _{dd}	1	L
26	<i>D. pteronyssinus</i> (Allergon) 0,01636 g/0,5 mL	2	F
27	<i>L. destructor</i> (Uni Paderborn) 0,0176 g/0,5 mL	2	F
28	<i>D. pteronyssinus</i> (Allergon) 0,248 g/6,195 mL	2	F
29	<i>L. destructor</i> (Uni Paderborn) 0,29 g/7,25 mL	2	F
*	<i>Erklärungen zum Probenstatus</i>		
F	<i>Frische Proben wurden direkt nach dem Aufschluss analysiert, in flüssigem Stickstoff gefroren und dann bei -20 bzw. -80° C gelagert.</i>		
L	<i>Lyophilisate wurden bis zur Rekonstitution in H₂O_{dd} bei -20° C gelagert.</i>		
**	<i>Proben 2-9 enthielten 0,176 g/mL Ammoniumsulfat</i>		
***	<i>PEG = Mischung aus PEG200 und PEG400 im Verhältnis 1:1.</i>		

Tabelle 3 – Liste, der im Verlauf der Arbeit verwendeten Proben.

3.2.3 Bestimmung der Proteingesamtmasse nach Lowry

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte zur „Normalisierung“ der Proben untereinander und als Ausgangspunkt für weitergehende Untersuchungen. Die Ergebnisse wurden nicht eigenständig interpretiert.

Der Nachweis des hier angewandten Lowry-Assays basiert auf der Reaktion der Proteine mit einer alkalischen Kupferlösung und dem Folin-Reagenz. Zwei aufeinanderfolgende Schritte führen zur Farbentwicklung. Die Reaktion zwischen den Proteinen und der alkalischen Kupferlösung und die folgende Reduktion des

Folin durch den Protein-Kupfer-Komplex. Hauptverantwortlich für die Färbung sind die Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und im schwächeren Ausmaß auch Cystin, Cystein und Histidin. Die Proteine bewirken eine Reduktion des Folin durch den Verlust von ein, zwei oder drei Sauerstoffatomen, wodurch eine charakteristische blaue Färbung mit einem Maximum zwischen 650-750 nm bildete [174]. Es kamen zwei Modifikationen der Lowry-Methodik zur Anwendung:

3.2.3.1 DC Protein Assay

Kommerzieller Kit (BioRad) zur Bestimmung der Proteingesamtmasse in Proben mit Detergenzien. Die Reaktion erreicht 90 % der maximalen Farbentwicklung nach 15 min und benötigt als Mikroassay lediglich 5 µL Probenvolumen. Die Standardreihe ist im gleichen Puffer anzusetzen wie die Probe und enthielt die Konzentrationen 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 und 2,0 µg/mL.

Reagenzienvorbereitung und Versuchsbedingungen nach Herstellerangaben.

3.2.3.2 Proteinbestimmung nach Lowry (modifiziert) [175, 174]

Die Standardreihe wurde mit Humanserumalbumin (HSA) aus den Konzentrationen 1, 2, 5, 10, 15, 20, 40 und 50 µg/mL formuliert.

Probenvorbereitung

Das Probenvolumen ist so zu wählen, dass der zu erwartende Proteinwert im Bereich der Standardkurve zwischen 1–50 µg liegt (Verdünnungen einsetzen). Ist das eingesetzte Probenvolumen kleiner als 1 mL, wird es mit H₂O_{dd} auf 1 mL aufgefüllt. Wird eine Probenvolumen oberhalb 1 mL eingesetzt, so ist Trichloressigsäure im Verhältnis 1:2 zu pipettieren. Liegt eine phenolische Probenlösung vor, so ist die TCA-Fällung einmal zu wiederholen. Standard und Proben werden als Dreifachbestimmung ausgelegt.

1. Zugabe von 10 µL Natriumdesoxycholat-Lösung zu jedem Röhrchen, danach gut durchmischen und 15 min bei RT inkubieren lassen. Wird mehr als 1 mL Probenvolumen eingesetzt, so ist die Zugabe entsprechend zu erweitern.
2. Zugabe von 1 mL 18 %iger TCA (4-8° C), gut durchmischen und bei RT 15 min inkubieren lassen.
3. Zentrifugation: 45 min, 3600 x g, 4-8° C.
4. Überstand mit einer Pasteurpipette absaugen.

5. Niederschläge durch Zugabe von je 1 mL Lösung 3 unter leichtem Mischen lösen und für 10 min bei RT inkubieren.
6. Zugabe von je 100 µL Folin-Lösung, sofort mischen und danach 30 min im Dunkeln bei RT inkubieren.
7. Standards und Proben werden bei >650 nm im Photometer gegen den Blindwert gemessen.
8. Kalkulation der Ergebnisse - Mittelwertbildung mit Standardabweichung (%) aus Dreifachbestimmung und der Standardkurve.

Lösung 1

Natriumcarbonat	20 g
Kalium-Natrium-Tartrat x 4 H ₂ O	0,27 g

In 1000 mL 0,1 N Natronlauge lösen.
Die Lösung ist bei 4° C drei Monate stabil.

Lösung 2

Kupfersulfat x 5H ₂ O	1,56 g
----------------------------------	--------

In 100 mL H₂O_{dd} lösen
Die Lösung ist bei 4° C drei Monate stabil.

Lösung 3

Lösung 1 und Lösung 2 im Verhältnis 100:1 frisch ansetzen.

Folin-Lösung

Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz ¹⁰	1:1 mit H ₂ O _{dd} frisch ansetzen.
--	---

Lösung 1 und Lösung 2 im Verhältnis 100:1 frisch ansetzen.

Natriumdesoxycholat

2 % (w/v) Natriumdesoxycholat in H₂O_{dd} lösen und zu 1 mL aliquotieren.
Die Lösung ist bei -20° C für zwei Jahre stabil.

Trichloressigsäure (TCA)

250 g TCA zu 1389 mL H₂O_{dd} ergibt eine 18 %ige TCA-Lösung.

3.2.4 Spezifische Bestimmung von Einzelallergenen mittels Enzym-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA)

Der einfache und schnelle qualitative und quantitative Nachweis einzelner Majorallergene in komplexen Allergenextrakten ist ein weiterer Schritt hin zu einer verbesserten Standardisierung und reproduzierbaren Extrakterstellung. Es werden Einzelkomponenten bestimmt und nicht over-all-Parameter wie z.B. die allergene Aktivität. Neben den hieraus resultierenden Vorteilen liegen die Nachteile in einer nur eingeschränkten Verfügbarkeit der monoklonalen Antikörper (mAk) für einige

ausgewählte Majorallergene und ihrer Spezifität, wichtige Isoformen werden zum Teil nicht erkannt. Dieses Manko kann durch Verwendung von mehreren mAK vermieden werden, die an unterschiedliche Epitope des Allergens koppeln und zu einem Immunoassay zusammengestellt werden können. In dieser Arbeit ist ein solches System [176], bestehend aus zwei verschiedenen mAK (Indoor Biotechnologies, Charlottesville US) verwendet und auf die Problemstellung optimiert worden.

3.2.4.1 Bestimmung von Der p 1

- Beschichten der Mikrotiterplatte MTP (Immuno Plate C96 Maxisorp, Nunc)

Der Fangantikörper mAk 5H8 (2 mg/mL) gegen Der p 1 wird 1/1000 in Inkubationspuffer verdünnt und 50 µL/Kavität auf die MTP aufgetragen. Die Inkubationszeit beträgt 2 h bei 37° C oder ü.N. bei 4° C.

Mit der Inkubation ü.N. werden die gleichmäßigeren Ergebnisse erzielt.

- Waschen der Platte mit Waschpuffer (3x).
- Absättigen der MTP für 30 min bei RT mit 50 µL/Kavität Blockierungspuffer.
- Waschen der Platte mit Waschpuffer (3x).
- Die Standard-Verdünnungsreihe aus der Der p 1-Stammlösung (2500 ng/mL) wird wie folgt mit Waschpuffer hergestellt:

Standard-Nr.	Zielkonzentration [ng Der p 1/mL Puffer]	Der p 1-Standard [µL]	Zugabe an Puffer [µL]
1	250	100	900
2	125	50	950
3	75	30	970
4	50	20	980
5	25	10	990
6	12,5	5	995
7	5,26	25 von (1)	975
8	2,5	10 von (1)	990
9	1,25	4 von (1)	995
10	0,5	4 von (2)	996

Tabelle 4 - Standard-Verdünnungsreihe von Der p 1.

- Erstellen einer Probenverdünnungsreihe, ausgehend von einer 1:100-1:1000 Verdünnung der Originalprobe, mit je nach Problemstellung 5-10 Einzelverdünnungen (1:2) in Waschpuffer.
- Es werden je 50 µL/Kavität der Proben und der Standards (Doppelbestimmungen) aufgegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

¹⁰ Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz (Merck 109001)

- Waschen der Platte mit Waschpuffer (3x).
- Der biotinylierter mAk 4C1 wird 1/1000 mit Blockierungspuffer verdünnt, 50 μ L/Kavität aufgegeben und 1 h bei RT inkubiert.
- Waschen der Platte mit Waschpuffer (5x).
- Die MTP wird für 30 min bei RT mit 50 μ L/Kavität einer 1/1000-Verdünnung von Streptavidin-Peroxidase inkubiert. Die Verdünnung wird mit 1 % RSA in PBS-T hergestellt.
- Waschen der Platte mit Waschpuffer (5x).
- Zugabe von 50 μ L/Kavität Substratlösung.
- Stoppen der Reaktion nach 20-30 min durch Zugabe von 50 μ L Stopplösung/Kavität.
- Die Mikrotiterplatte wird bei 450 nm vermessen und anhand der sigmoidalen Standardkurve ausgewertet. Es werden nur die Konzentrationen der Extraktlösungen zur Auswertung herangezogen, die im linearen Bereich dieser Kalibrierkurve liegen. Das Endergebnis wird durch Mittelwertbildung aus diesen Verdünnungen gebildet.

3.2.4.2 Bestimmung von Der p 2

Die Durchführung und Auswertung erfolgt identisch zur Quantifizierung von Der p 1. Lediglich Unterschiede der Konzentrationen des Fangantikörpers 1D8, der Der p 2 Standardlösung und des biotinylierten Detektionsantikörpers 7A1 müssen beachtet werden.

Standard-Nr.	Zielkonzentration [ng Der p 2/mL Puffer]	Der p 2-Standard [μ L]	Zugabe an Puffer [μ L]
1	250	50	950
2	125	25	975
3	75	15	985
4	50	10	990
5	25	5	995
6	12,5	50 von (1)	950
7	5,26	25 von (1)	975
8	2,5	10 von (1)	990
9	1,25	5 von (1)	995
10	0,5	4 von (2)	996

Tabelle 5 - Standard-Verdünnungsreihe von Der p 2.

Der Fangantikörper mAk 1D8 lag in einer Konzentration von 10 mg/mL vor und wurde 1/1000 verdünnt zur Inkubation der MTP verwendet. Der biotinylierte mAk 7A1 wird 1/3000 mit 0,1 % RSA in PBS-T verdünnt. Die Der p 2 Standardlösung

hatte eine Konzentration von 5000 ng/mL, woraus das Pipetierschema der Tabelle 5 resultierte.

Inkubationspuffer; pH 9,6

Dinatriumcarbonat	1,59 g
Natriumhydrogencarbonat	2,93 g
Thimerosal ¹¹	0,1 g

in 1000 mL H₂O_{dd} lösen.

Waschpuffer; pH 7,4

Natriumchlorid	8 g
Kaliumdihydrogencarbonat	0,2 g
Dinatriumhydrogencarbonat	1,15 g
Kaliumchlorid	0,2 g
Thimerosal	0,1 g
Tween 20	0,5 mL

in 1000 mL H₂O_{dd} lösen.

Blockierungspuffer

1 % RSA in Waschpuffer

Streptavidin-Peroxidase-Lösung

250 µg Streptavidin-Peroxidase (S 5512, Sigma) in 1 mL H₂O_{dd} lösen und in 25 µL-Portionen bei – 20° C lagern. Für den Gebrauch im Assay wird eine 1/1000-Verdünnung mit Blockierungspuffer hergestellt.

Substratlösung

Je eine OPD¹²-Tablette (Sigma) und 1 Harnstoffperoxidtablette (Sigma) werden nach Herstellerangabe in H₂O_{dd} gelöst.

Stopplösung

1,5 M Schwefelsäure
Schwefelsäure (98 %) und H₂O_{dd} mischen (1:11).

3.2.5 UV/VIS-Spektroskopie der Allergenextrakte

In der UV/VIS-Spektroskopie werden u.a. Valenzelektronen durch Einstrahlung monochromatischen Lichtes im Wellenlängenbereich von 180-400 nm auf ein höheres Energieniveau angeregt. Bei ihrem Rückfall in den vor der Anregung eingenommene Grundzustand wird die Energie wieder abgegeben, und man erhält wellenlängenabhängige Absorptionsspektren spezifischer Wellenlänge [177]. Die Ergebnisse ermöglichen u.a. Aussagen zum aromatischen Charakter, den Seitengruppen und zur Sekundärstruktur der unbekannt Probe [178].

In den vorliegenden Messungen wurde ein scannendes UV/VIS-Spektrometer (DU-65, Beckman) mit einer Scannrate von 750 nm/min im Bereich 200-300 nm eingesetzt. Zum Einsatz kamen Quarzküvetten (1 cm). Die Proben wurden mit

¹¹ Thimerosal kann zur Sterilisierung als Alternative zu Natriumazid eingesetzt werden, da dieses die Enzymdetektion einiger Amplifikatoren (ABTS) stören kann. Natriumazid kann als Stoppreagenz alternativ zu 1,5M Schwefelsäure oder 1M Salzsäure eingesetzt werden.

Puffer und H₂O_{dd} kalibriert. Die UV/VIS-Spektren wurden im Absorptionsmodus vermessen.

Untersucht wurden die folgenden Proben:

1. ***D. pteronyssinus* Lyophilisat (CSL)**; Probe 16 in Cocas-Lösung
 - Verdünnungsreihe 1:2-1:16
 - Zugabe von 1 N Natronlauge zur 1:16 Verdünnung; je 2 x 1 Tropfen bis zu einem pH 8
 - Zugabe von 1 N Natronlauge zur 1:2 Verdünnung
 - Zugabe von 6 N Harnstoff zur 1:2 Verdünnung
2. ***D. pteronyssinus* Lyophilisat (CSL)**; 193 µg/mL H₂O_{dd}
 - Verdünnung 1:4
 - Zugabe von konzentrierter Essigsäure (1:1)
3. ***D. pteronyssinus* Lyophilisat (Allergon)**; 175 µg/mL H₂O_{dd}
 - Verdünnung 1:2

3.2.6 Ausschlusschromatographie (SEC)¹³

Die Ausschlusschromatographie trennt gelöste Moleküle nach ihrer Größe und basiert auf der unterschiedlichen Permeabilität der Analyten in ein poröses Trägermaterial definierter Porengröße. Das Porenmaterial ist durch einen wirksamen Bereich gekennzeichnet. Das hydrodynamische Volumen der Analyten ist hierbei für das Trennverhalten verantwortlich, wobei die kleinsten Substanzen die längste Aufenthaltsdauer in der Gelmatrix haben und als letzte eluiert werden. Die mobile Phase dient nur als Lösungsmittel und hat keinen unmittelbaren Einfluss auf die Trennung. Durch die Auswahl von Trenngel, Elutionspuffer und pH-Wert sowie Probenvolumen bzw. Säulendurchmesser ist die Selektivität vorgegeben. Einzig die Flussrate kann noch variiert werden [179].

Die Ausschlusschromatographie wird bei der Herstellung kommerzieller Allergenextrakte u.a. zur Fraktionierung eingesetzt [180]. Das für jeden Extrakt charakteristische Elutionsprofil wird zudem zur Überprüfung der Gleichförmigkeit von Produktionschargen gegenüber hausinternen Referenzen herangezogen. Das Säulenmaterial beeinflusst die Allergenität und das Allergenmuster nicht entscheidend [181].

¹² o-Phenylendiamin-di-hydrochlorid

¹³ Size Exclusion-Chromatographie

Die Molekulargewichtsbestimmung ist eine weitere wichtige Applikation [182], wobei die optimale Trennleistung eher zweitrangig ist, so dass es teilweise zu ausgeprägtem Tailing und Fronting kommt [183]. Die Probenbestandteile beeinflussen sich zudem gegenseitig, so dass sich die individuellen Retentionszeiten verschieben. Ein Rückschluss von der Retentionszeit der einzelnen Substanz auf die Retentionszeit im Gemisch erlaubt daher nur eine näherungsweise Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung. Externe Standards unterliegen der gleichen Verschiebung der Retentionszeiten und können daher diese Unsicherheit nicht beseitigen.

Aus der großen Anzahl aktiver Oberflächengruppen der Proteine können erhöhte Wechselwirkungen mit dem Trennsystem (Gelmatrix, Eluent) resultieren. Die Stabilität der Allergene während einer chromatographischen Trennung ist verglichen mit der elektrophoretischen Stabilität meistens geringer [183]. Trotz dieser Einschränkungen ist die Ausschlusschromatographie eine schnelle und effektive Methodik zur Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung einer komplexen Proteinprobe, die in Kombination z.B. mit der Massenspektrometrie valide Aussagen zu Fragmentierungsmustern erlaubt.

Methodik

Säulenmaterial:	Pharmacia Superdex 75 ¹⁴ , 3,2 x 300 mm, Bead size 13 µm
Trennbereich:	3-70 kDa
Wellenlänge:	280 nm
Eluent:	0,5 M Ammoniumacetat, pH 6,5
Flussrate:	0,9 mL min ⁻¹

Verwendete Standardproteine in der Reihenfolge ihrer Retentionszeiten:

1. Thyroglobulin	670 kDa	-/-
2. Gammaglobulin	158 kDa	-/-
3. Ovalbulmin	44 kDa	10,92 min
4. Myoglobulin	17 kDa	13,10 min
5. Vitamin B 12	1.35 kDa	19,16 min

Proben

1. Extraktvarianten von *D. pteronyssinus* (Ganzkörperkultur):
 - Lyophilisat der „Hausreferenz“ des Pharmaunternehmens (Probe 1)
 - Lyophilisat von CSL (Probe 2)
 - Lyophilisat von Allergon (Probe 3)
 - Erste Charge Dialysewasser – Allergon
 - Erste Charge Dialysewasser – CSL

¹⁴ Superdex 75 besteht aus hoch vernetzter Agarose, Dextran ist kovalent gebunden .

2. Isolierte Standardallergene,

- Der p 1
- Der p 2

Die mittels Affinitätschromatographie isolierten Standardallergene entstammten dem Referenzpool eines Pharmaunternehmens und wurden dort in der Routinekontrolle eingesetzt. Die Aufgabe der Proben und Standards erfolgte mittels einer Hamilton-Spritze via eines Probenaufgabenventils.

3.2.7 Diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese (Disk-SDS-PAGE)

Die Disk-Page ist eine Variante der diskontinuierlichen Elektrophorese (s. Native Elektrophorese), die zur Verwendung von SDS¹⁵ weiterentwickelt wurde [184]. Durch den SDS-Zusatz wird jedem Protein pro Gramm ca. 1,4 g SDS angelagert. Hierdurch wird die Proteinladung gänzlich durch die starke negativ polarisierte Ladung des SDS überdeckt, so dass für alle Proteine eine negative Nettoladung resultiert. Dies bewirkt eine nur von der Größe abhängige Wanderungsgeschwindigkeit in einer elektrophoretischen Gelmatrix. Gleichzeitig werden ebenfalls mit SDS beladene Markerproteine aufgetrennt, so dass über diese eine Kalkulation des Molekulargewichtes des unbekanntes Proteins möglich wird. In der vorliegenden Arbeit wurde sie zur Bestimmung des Proteinpatterns der Allergenextrakte und der zugehörigen Molekulargewichte, sowie als vorbereitende Trennung für ein nachfolgendes Immunoblotting verwendet.

Es wurden je nach Fragestellung selbst hergestellte Tris¹⁶-Glycin-Gele mit einem Polymerisationsgrad von 10–15 %, einem Kopolymerisationsgrad von 2,7 % und den Gelmaßen 8,3 x 6 cm x 1mm verwandt. Die anschließenden Trennungen erfolgten in einem Mini-Protean II-Tanksystem (BioRad).

Ergänzend kamen 10 %ige Bis¹⁷-Tris-Fertiggele (Invitrogen) in einer XCell II-Mini-Cell (Invitrogen) zum Einsatz. In dieser nach Schaeffer und Jagow [185] weiterentwickelten Variante des Tris-Glycine-Systems wird mit geringeren pH-Werten gearbeitet. Die Gele enthielten kein SDS und sind aufgrund der neutralen pH-Werte des MES¹⁸-Puffers (pH 7,2) besonders gut für anschließende massen-

¹⁵ Sodium Dodecyl Sulfat

¹⁶ Trishydroxymethylaminomethan

¹⁷ N,N-bis(2-Hydroxyethyl)glycin

¹⁸ 3-(N-morpholino)ethansulfonsäure

spektroskopische Analysen oder Verfahren geeignet, die eine möglichst geringe Modifikation der zu untersuchenden Proteine voraussetzen.

Probenvorbereitung

Die Proben wurden in Probenpuffer aufgenommen. Dieser war vierfach (4x) konzentriert und wurde entsprechend der Probenkonstitution, fest (Lyophilisat) oder flüssig (Extrakt) sowie der Proteinzielkonzentration direkt zugesetzt bzw. mit H₂O_{dd} verdünnt. Anschließend wurden die Proben in Reaktionsgefäßen (Eppendorf) für 5 min in einem ca. 80° C heißen Wasserbad erhitzt, aber nicht verkocht. Letzteres, damit nicht durch zu große Energiezufuhr Proteinstrukturen zerstört bzw. fragmentiert wurden.

Herstellen der Polyacrylamidgеле

Der zur Mini Protean II-Kammer gehörende Gießstand mit der Gelkassette wurde auf einem Nivelliertisch unter dem Abzug positioniert. Nach dem Zusammenbau erfolgte stets die Kontrolle auf Dichtigkeit der Gießkassette, indem Wasser zwischen die Glasplatten gegossen wurde. War die Kassette dicht, wurde das Wasser abgegossen und die Gelmischung für das Trenngel konnte mittels einer Pipette zwischen die Glasplatten der Gelkassette bis ca. 2 cm unterhalb der Glasplattenoberkante gegeben werden. Grundsätzlich ist beim Gießen darauf zu achten, dass keine Blasen entstehen. Zur Abdichtung der Geloberfläche gegenüber Luftsauerstoff wurde das Trenngel mit 1 mL n-Butanol überschichtet. Nach ca. 30-45 min war das Trenngel vollständig polymerisiert, das n-Butanol konnte entfernt und die Gelmischung für das Sammelgel bis zur Oberkante der Glasplatte aufgefüllt werden. Unmittelbar im Anschluss wurde der Probenfächer (10 oder 15 Probenfächer) vorsichtig zwischen den Glasplatten in das Sammelgel gedrückt.

Die Ammoniumpersulfatlösung wurde frisch hergestellt (Haltbarkeit nur einige Tage) und zusammen mit TEMED¹⁹ erst unmittelbar vor dem Gelgießen zur Gelmischung zu gegeben.

Die Bis-Tris-Fertiggele wurden den Herstellerangaben entsprechend in der XCell II-Mini-Cell (Invitrogen) Elektrophoresekammer fixiert.

¹⁹ N, N, N', N'- Tetramethylethyldiamin

Probenaufgabe

Nach vollständiger Polymerisation des Sammelgels wurde der Probenkamm vorsichtig entfernt und die innere Kammer der Elektrophorese nach Beschreibung des Herstellers zusammengesetzt. Auch hier erfolgte zunächst eine Prüfung der Dichtigkeit der inneren Kammer, in dem diese halb mit Laufpuffer gefüllt und auf einem Filterpapier platziert wurde, so dass anhand der möglicherweise auslaufenden Pufferlösung ein Leck lokalisiert werden konnte. War dies der Fall, wurde nach erneutem Zusammenbau der Kammer wiederholt die Dichtigkeit geprüft.

War die innere Kammer dicht, so konnten die Probestaschen mit Laufpuffer durchspült und je nach Untersuchungsdesign mittels einer Hamilton-Spritze die Proben und Molekulargewichtsmarker appliziert werden. Die Probenmenge war abhängig von den Nachweisgrenzen der geplanten Visualisierung. Für eine anschließende Coomassie-Färbung sollten 20-30 ng und für eine Silberfärbung 1-5 ng eines Proteins je μL Probenvolumen vorhanden sein.

Anschließend wurde die innere Kammer bis kurz unter den oberen Rand mit Laufpuffer gefüllt und in den äußeren Kammertank eingehängt. Dieser wurde anschließend mit ca. 500 mL Laufpuffer gefüllt und die Kammer mit der Stromspannungsquelle verbunden.

Die Laufbedingungen waren wie folgt:

Spannung	125 V (konstant über die Laufzeit)
Stromstärke	Start: ca. 30-40 mA Ende: 8-12 mA
Laufzeit	90 min

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel vorsichtig aus der Kammer entnommen und entsprechend dem experimentellen Verlauf durch Coomassie- oder Silberfärbung visualisiert bzw. mittels Westernblotting einer anschließenden Immundetektion zugeführt.

Rezepturen für Gele mit verschiedenen Polymerisationsgraden

Der Polymerisationsgrad des Trenngels sollte dem Trennproblem entsprechend gewählt werden. Grundsätzlich gilt, desto kleiner das Zielprotein, desto höher der Polymerisationsgrad. Die Zielproteine dieser Arbeit lagen im Bereich zwischen 10 und 100 kDa. Für diesen Bereich kommen Gele mit einem Polymerisationsgrad zwischen 10 und 15 % in Frage, ein Optimum an Trenneffizienz wurde mit 12 %igen Gelen erreicht. Proteine mit einem mittleren Molekulargewicht von >100 kDa sollten mit Polymerisationsgraden von 10 % und darunter, Proteine unter 10

kDa mit 15 %igen Gelen, aufgetrennt werden. Dient die elektrophoretische Trennung als vorbereitender Schritt zum Westernblotting, sollte der Polymerisationsgrad nicht zu hoch gewählt werden, da mit zunehmendem Vernetzungsgrad die Transfereffektivität für größere Proteine leidet.

	Trenngel				Sammelgel
	7,5 %	10 %	12 %	15 %	4 %
H ₂ O _{dd}	1,96 mL	1,38 mL	0,81 mL	0,23 mL	0,98 mL
1,5 M Tris-HCL, pH 8,8	1,25 mL				
0,5 M Tris-HCL, pH 6,8	-				0,625 mL
10 % (w/v) SDS	50 µL				25 µL
Rotiphorese Gel A*	1,22 mL	1,62 mL	2,03 mL	2,44 mL	0,62 mL
Rotiphorese Gel B*	0,505 mL	0,675 mL	0,85 mL	1,02 mL	0,25 mL
10 % (w/v) APS** ^{zu}	40 µL				20 µL
TEMED**	5 µL				2,5 µL

* Nach Zugabe ca. 5 Minuten im Ultraschallbad entgasen!
 ** Zugabe erst unmittelbar vor der Gelherstellung!

Tabelle 6 - Rezepturen zur Herstellung von Gelen unterschiedlicher Konzentrationen.

1,5 M Tris-HCL, pH 8,8

Tris 90,75 g
 In 400 mL H₂O_{dd} lösen, mit HCL auf pH 8,8 titrieren und mit H₂O_{dd} auf 500 mL auffüllen.

0,5 M Tris-HCL, pH 6,8

Tris 6,05 g
 In 80 mL H₂O_{dd} lösen, mit HCL auf pH 6,8 titrieren und mit H₂O_{dd} auf 100 mL auffüllen.

Rotiphorese Gel A

Stabilisierte, gebrauchsfertige, 30 %ige Acrylamid-Stammlösung (Roth).

Rotiphorese Gel B

Stabilisierte, gebrauchsfertige, 2 %ige Bisacrylamid-Stammlösung (Roth).

Die Fertiggellösungen A und B lassen sich je nach Trennproblematik in einem entsprechenden Verhältnis mischen. Die entsprechenden Volumina für die in Tabelle 6 angegebenen Polymerisationsgrade wurden anhand der vom Hersteller beigefügten Formelvorlagen berechnet. Die Monomere des Acrylamids und des Bisacrylamids sind neurotoxisch, weshalb Handschuhe zu tragen sind.

Probenpuffer; pH 8,45	1 x	4 x
Glycerol	1,09 M	4,0 g
Tris	141 mM	0,682 g
Tris-HCL	106 mM	0,666 g
LDS ²¹	73 mM	0,8 g
EDTA ²²	0,51 mM	0,006 g
Serva Blue G 250 ²³	0,22 mM	0,75 mL einer 1 %igen Lösung
Phenolrot	0,175 mM	0,25 mL einer 1 %igen Lösung
Mit H ₂ O _{dd} auf 10 mL auffüllen.		

Der Puffer wurde als Fertigpuffer NuPage LDS Sample Buffer (Invitrogen) bezogen. Die Lithiumform kam zur Vermeidung von Proteinaggregation anstelle des Natriums als Zentralion zum Einsatz.

²⁰ Ammoniumpersulfat

²¹ Lithium Dodecyl Sulfat

²² Ethylendiamintetraessigsäure

²³ Coomassie Brilliant Blue G-250

Laufpuffer für Tris-Glycine-Gel; pH 8,3

	1x	10x
Tris	25 mM	29 g
Glycin	192 mM	144 g
SDS	0,1 % (w/v)	10 g
Mit H ₂ O _{dd} auf 1000 mL auffüllen.		

Laufpuffer (MES) für Bis-Tris-Fertiggel; pH 7,2

	1x	20x
MES	50 mM	97,6 g
SDS	3,5 mM	10,0 g
EDTA	1 mM	3,0 g
Mit H ₂ O _{dd} auf 500 mL auffüllen.		

Der Puffer wurde als Fertigpuffer NuPage MES SDS Running Buffer (Invitrogen) bezogen.

Molekulargewichtsmarker

1. Low Molecular Weight Calibration Kit (Amersham Pharmacia Biotech)

94, 67, 43, 30, 21,1 und 14,4 kDa

Der Marker war ungefärbt.

2. MultiMark Multi Colored Standard (Invitrogen)

250, 148, 60, 42, 30, 22, 17, 6 und 4 kDa.

Die Proteine des Markers waren unterschiedlich angefärbt, so dass die Auftrennung im Gel und der Transfererfolg nach einem Westernblotting unmittelbar beurteilt werden konnten.

3.2.8 Native Elektrophorese

Die Untersuchung der Zusammensetzung und Struktur nativer Proteine bedingt sowohl den Erhalt der biologischen Aktivität als auch der Konformation. Denaturierende Detergenzien wie z.B. SDS sind zu vermeiden [186, 187].

In dieser Arbeit wurde ein diskontinuierliches Tris-Chlorid/Tris-Glycin-System verwendet [188, 189]. Die Diskontinuität bezog sich auf vier Parameter:

- Gelmatrix (Auftrennung in Sammel- und Trenngel)
- pH-Wert der Puffer
- Ionenstärke der Puffer
- Art der Ionen im Gel und im Elektroden-Puffer

Als Anionen werden im Puffer langsame Folgeionen (Glycin), im Gel ausschließlich schnelle Leitonen (Cl⁻) eingesetzt. Das Glycin ist bei pH 8,8 im Sammelgel nicht geladen. Die Proteine trennen sich nach dem Start in der Reihenfolge ihrer Mobilität auf („tracking“), wobei es zu einer Fokussierung mit erhöhter Bandenschärfe kommt. Aufgrund der Großporigkeit des Sammelgels ist die Mobilität nur von der Ladung abhängig, eine Aggregation wird aufgrund des trackings verhindert. Das Proteingemisch wandert zum Rand des Trenngels und wird dort abgebremst. Das kleine Glycin überholt die Proteine. Die Proteine befinden sich nun in

einem homogenen Puffermilieu, das Proteingemisch löst sich auf und die Proteine trennen sich nach dem zonenelektrophoretischen Prinzip auf. Die Mobilität ist abhängig von der Ladung und der Größe. Der pH Wert steigt auf 9,5 (pK-Wert der basischen Aminogruppe des Glycins), wodurch die Proteine höhere Nettoladungen erhalten und daher schneller wandern.

Der Tris-Glycin Puffer darf nicht mit Salzsäure titriert werden, da in diesem Fall ausschließlich Chloridionen wandern und der Trenneffekt nicht auftritt. Die Folge sind lange Laufzeiten (bis über Nacht) und ungenügend differenzierte Banden. Basische Proteine mit einem Isoelektrischen Punkt oberhalb pH 6,8 wandern im Tris-Glycin-System zur Kathode und gehen verloren [186].

Die Zusammensetzung und Herstellung der Gele sowie die Probenapplikation in der beschriebenen Methodik war, bis auf den Verzicht an SDS, identisch mit der Disk-SDS-PAGE. Um die Diffusion der Ionen vor dem Start zu verhindern, wurde das Sammelgel erst kurz vor der Trennung auf das Trenngel polymerisiert.

Die Laufbedingungen waren wie folgt:

Spannung	125 V (konstant über die Laufzeit)
Stromstärke	Start: ca. 30-40 mA Ende: 8-12 mA
Laufzeit	1,5-4 h

Aufgrund der mit erhöhter Laufzeit einhergehenden Wärmeentwicklung fand die Elektrophorese in einem Kühlschrank statt.

Laufpuffer; pH 8,3

	1x	10x
Tris	25 mM	29 g
Glycin	192 mM	144 g

Mit H₂O_{dd} auf 1000 mL auffüllen und bei 4° C für ein Jahr haltbar.

Probenpuffer; pH 6,8

	1x	5x
Tris-HCl	106 mM	0,666 g
Glycerol	1,09 M	4,0 g
Serva Blue G 250	0,22 mM	0,75 mL einer 1 %igen Lösung

Mit H₂O_{dd} auf 10 mL auffüllen.

Feste Proben (Lyophilisate) wurden in 1x Puffer, bereits gelöste Proben in 5x-Probenpuffer aufgenommen werden. Zielkonzentration war der 1x-Puffer. Die Proben wurden nicht erhitzt, sondern nur in Probenpuffer aufgenommen, durchmischt (Vortex) und umgehend appliziert.

3.2.9 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Ein Protein wandert in einem elektrischen Feld durch einen in einem Gel immobilisierten pH-Gradienten solange, bis seine Nettoladung gleich Null ist. An diesem Punkt, dem isoelektrischen Punkt (pI) ist auch die Wanderungsgeschwindigkeit gleich Null. Trägt man daher an ein Proteingemisch wie z.B. einen Allergenextrakt, an einer Stelle des pH-Gradienten auf, so besitzen die Proteine an diesem Punkt unterschiedliche Nettoladungen. Die Proteine beginnen zu wandern und stoppen erst an ihren spezifischen isoelektrischen Punkten. Diese Fokussierung funktioniert nur bei amphoteren Substanzen wie z.B. Proteinen und Peptiden. Ursache sind die amphoteren Aminosäuren, deren Carboxylgruppen bei niedrigen pH-Werten neutral und bei hohem pH-Wert positiv geladen sind. Hierzu reziprok verhalten sich die Amino-, Imidazol- und Guanidiniumgruppen der Aminosäuren. Durch diese Eigenschaften ihrer Aminosäuren können Proteine in einem pH-Gradienten durch Anlegen eines elektrischen Stroms fokussiert und voneinander differenziert werden. Proteine, die sich nur durch eine Aminosäure unterscheiden, können getrennt werden, so dass ein Einsatz in der Speziesdifferenzierung gute Ergebnisse ergibt. Proteinpattern komplexer Proteingemische sind allerdings noch umfangreicher und schwerer auswertbarer als Molekulargewichtspattern, da Proteine je nach Faltungszustand unterschiedliche pI besitzen können und die pI nicht als einzelne pH-Werte, sondern als pH-Wertebereich angegeben werden müssen. Ein anschließendes Westernblotting mit Immundetektion, kann so unterschiedliche Banden für ein Allergen zeigen und zu schwer differenzier- und auswertbaren Ergebnissen führen. Allergene werden zudem anhand ihrer Molekulargewichte klassifiziert, so dass die Isoelektrische Fokussierung in der Allergenanalytik nur in Kombination mit der SDS-PAGE zur 2D-Elektrophorese von Bedeutung ist. Allerdings ist der pI ein wichtiger und spezifischer physikalischer Parameter eines Proteins [162].

Methodik

In dieser Arbeit sind ausschließlich Fertiggele (5 % Polyacrylamid, 2 % Ampholyte) mit einem pH-Gradienten pH 3-10 und einer Dicke von 1mm (Invitrogen) verwendet worden. Die Trennung erfolgte in der XCell II-Mini Cell (Invitrogen), als Spannungsquelle diente das EPS 3500 (Amersham Pharmacia Biotech).

Die Proben wurden in Probenpuffer (2x) entsprechend ihres Grundzustandes aufgenommen und gut durchgemischt. Nach dem Arretieren des Gels in der Trennkammer wurde der so gebildete innere Tank mit 150 mL Kathodenpuffer, alle

Probentaschen müssen hierbei geflutet sein und der äußere Tank mit 300 mL Anodenpuffer gefüllt. Proben und Marker wurden in der Zielkonzentration entsprechenden Volumina mittels einer Hamilton-Spritze in die Probentaschen appliziert.

Nach Beendigung des Laufs wurden ein spezifischer Fixationsschritt angeschlossen, in dem das Gel für 0,5 h in 100 mL Fixierlösung geschwenkt wurde. Im Anschluss wurde das Gel direkt der entsprechenden Färbung zugeführt, ohne den für diese spezifischen Fixierschritt zu durchlaufen.

Die Laufbedingungen waren wie folgt:

	Spannung (V)	Laufzeit (min)
Stufe 1:	100	60
Stufe 2:	200	60
Stufe 3:	500	30

Kathodenpuffer, pH 3-10

	1x	10x
Arginin	20 mM	3,5 g
Lysin	20 mM	2,9 g

Mit H₂O_{dd} auf 100 mL auffüllen und gut durchmischen.

Dieser Puffer stand als Stammlösung 10x zur Verfügung (Invitrogen).

Anodenpuffer, pH 2,4

	1x	10x
Phosphorsäure, 85 %	7 mM	2,4 mL

Mit H₂O_{dd} auf 1000 mL auffüllen und gut durchmischen.

Dieser Puffer stand als Stammlösung 10x zur Verfügung (Invitrogen).

Fixierlösung

Sulfosalicylsäure	3,46 g
Trichloressigsäure	15,46 g

Mit H₂O_{dd} auf 100 mL auffüllen und gut durchmischen.

Probenpuffer

	1x	2
Arginin	20 mM	2 mL Kathodenpuffer
Lysin	20 mM	2,9 g
Glycerol	15 %	3 mL

Mit H₂O_{dd} auf 10 mL auffüllen und gut durchmischen.

Dieser Puffer stand als Stammlösung 2x zur Verfügung (Invitrogen).

Markerproteine

Broad Calibration Kit, pH 3-10 (Amersham Pharmacia Biotech)

Der Kit enthielt lyophilisierte Proteine mit den folgenden isoelektrischen Punkten: **3,50; 3,75; 4,55; 5,20; 5,85; 6,55; 6,85; 7,35; 8,15; 8,45; 8,65 und 9,30.**

3.2.10 Färbung, Dokumentation und Auswertung von Elektrophoresegelen

Im Anschluss an eine elektrophoretische Trennung wurden die Gele entweder einer Visualisierung durch Anfärbung oder einem Westernblotting mit anschließender Immundetektion zugeführt. Die Visualisierung erfolgte durch eine der beiden im folgenden beschriebenen Färbetechniken.

3.2.10.1 Kolloidale Coomassie-Färbung [190]

- Fixierung der Proteine im Gel in 100 mL Fixierlösung für 60 min.
- Färbung des Gel in 100 mL Färbelösung ü/N.
- Waschen des Gels in 100 mL Waschlösung für 5 min zur Entfernung überschüssiger Farbkomplexe.

Alle Schritte fanden unter ständiger Durchmischung niedriger Intensität auf einem Horizontalschüttler bei Raumtemperatur statt.

Fixierlösung

o-Phosphorsäure (35 %)	1 mL
Methanol	20 mL
H ₂ O _{dd}	79 mL

Färbelösung

Methanol	20 mL
H ₂ O _{dd}	60 mL
Roti-Blue (5x) (Roth)	20 mL

Gut durchmischen.

Waschlösung

Methanol	25 mL
H ₂ O _{dd}	75 mL

3.2.10.2 Silberanfärbung [191]

- Fixierung der Proteine im Gel in 100 mL Fixierlösung für 60 min.
- Waschen des Gels mit 100 mL Waschlösung (3 x 10 min).
- Inkubation in Sensibilisierungslösung für 1 min.
- Waschen des Gel mit 100 mL H₂O_{dd} (3 x 20 sec).
- Imprägnierung des Gels mit 100 mL Imprägnierlösung für 20 min.
- Waschen des Gel mit 100 mL H₂O_{dd} (3 x 20 sec).

- Entwicklung mit 100 mL Entwicklungslösung, bis die Banden ausreichend gefärbt sind. Gel färbt noch nach, so dass vor dem Erreichen des gewünschten Färbegrades die Entwicklung beendet werden muss.
- Waschen und Stoppen der Färbung mit 100 mL H₂O_{dd} (2 x 20s).
- Stoppen der Färbung durch 100 mL Stopplösung (2 x 30 s und 1 x 10 min).
- Waschen des Gel mit 100 mL Waschlösung für 30 min.

Alle Schritte fanden unter geringer ständiger Durchmischung Intensität auf einem Horizontalschüttler bei Raumtemperatur statt.

Entwicklungslösung

Dinatriumcarbonat	60 g/L	20 mL
Natriumthiosulfat x 5 H ₂ O	4 mg/L	1 mL
p-Formaldehyd, 37 % (v/v)	0.5 mL	75 µL

Mit H₂O_{dd} auf 100 mL auffüllen und gut durchmischen.

Fixierlösung

Ethanol	15 mL
Eisessig	12 mL
p-Formaldehyd, 37 % (v/v)	50 µL

Mit H₂O_{dd} auf 100 mL auffüllen und gut durchmischen.

Imprägnierlösung

Silbernitrat	2 g/L	1 mL
p-Formaldehyd, 37 % (v/v)	0.5 mL	75 µL

Mit H₂O_{dd} auf 100 mL auffüllen und gut durchmischen.

Sensibilisierungslösung

Natriumthiosulfat x 5 H ₂ O	0,25 g/L	1 mL
--	----------	------

Mit H₂O_{dd} auf 100 mL auffüllen und gut durchmischen.

Stopplösung

Ethanol	45 mL
Essigsäure	36 mL

Mit H₂O_{dd} auf 300 mL auffüllen und gut durchmischen.

Waschlösung

Ethanol	15 mL
---------	-------

Mit H₂O_{dd} auf 300 mL auffüllen und gut durchmischen.

3.2.10.3 Trocknen der Gele

Die angefärbten Gele wurden im Anschluss gegen Quellen und mechanische Beanspruchung geschützt, sowie durch Trocknen in einen langfristig lagerfähigen Zustand überführt.

- Inkubation der Gele für 30 min unter leichtem Schwenken in 100 mL Trocknerlösung.

- Einschlagen der Gele in Cellophanfolie (Amersham Pharmacia Biotech). Hierzu wurde eine Cellophanfolie in H_2O_{dd} getränkt und auf einer Glasplatte blasenfrei glattgestrichen. Das Gel wurde auf der Mitte der Platte abgelegt und mit H_2O_{dd} gewässert. Zum Abschluss wurde eine zweite gewässerte Folie auf dem Gel platziert und blasenfrei glattgestrichen. Die überstehenden Folienenden wurden an der Unterseite der Glasplatte glattgestrichen.
- Das so fixierte Gel ü/N an der Luft trocknen. Eine schnellere Trocknung kann durch Überleiten eines warmen Luftstroms erzielt werden, wobei es aufgrund unregelmäßiger Trocknung aber zu Gelrissen kommen kann.

Trocknerlösung

Glycerin (99,5 %)	10 mL
Ethanol	20 mL
Mit H_2O_{dd} auf 100 mL auffüllen und gut durchmischen.	

3.2.10.4 Dokumentation und Auswertung der gefärbten Proteinspektren

Die getrockneten Gel- und Blotfolien wurden mittels eines Scanners mit Durchlichteinheit (JX-330, Sharp) und der entsprechenden Software (ScanJX/Win 4.2, Sharp) in ein 8-bit 256-Graustufen-Bild im TIF-Format digitalisiert und mit der 1D-Image-Master-Software (Amersham Pharmacia Biotech) ausgewertet. Hierdurch erfolgte die Zuordnung der Markerbanden und die anschließende Kalkulation der Molekulargewichte bzw. der isoelektrischen Punkte.

3.2.11 Immunoblotting

In einer Polyacrylamidmatrix fokussierte Proteine können durch ein senkrecht angelegtes elektrisches Feld unter Beibehaltung ihrer Auftrennung eluiert und auf eine Membranoberfläche transferiert werden. Die Membran dient hierbei als „Interface“ zur weiteren Analytik der Proteine, wie einer anschließenden Immundetektion oder massenspektroskopische Untersuchung. Die Kombination der elektrophoretischen Trennung komplexer Proteinextrakte und die anschließende Fixierung auf einer Membran ermöglicht die Identifizierung und Charakterisierung der Komponenten, einschließlich der IgE-bindenden Bestandteile.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Immundetektion nach der Inkubation mit Allergikerserum durch ein anti-Human IgE-AP-Konjugat²⁴, die anschließende

²⁴ Immunglobulin E mit Alkalischer Phosphatase als enzymatischer Amplifikator

Farbentwicklung entweder durch ein Chromogen-(BCIP²⁵/NBT²⁶) oder Chemilumineszenz-(CSPD)-Substrat²⁷. Bei letzterem fand die Visualisierung auf einem Röntgenfilm statt. Die Nachweisgrenzen lagen nach Angaben der Hersteller für das BCIP/NBT bei 10-50 ng und für CSPD bei bis zu 10 ng. Ausführliche Beschreibungen zum ElektrobloTTen [186, 162], sowie grundlegenden Arbeiten zur Anwendung des Immunoblotting in die Allergendiagnostik sind in der Literatur zu finden [192, 193].

Nach anfänglichen Vergleichen des Transfers zwischen dem Tank- und Semidry-Verfahren kam ausschließlich das Semidry-Verfahren zum Einsatz. Das Verfahren ist einfacher, ressourcenschonender und benötigt keine Kühlung. Die starke Hitzeentwicklung im Tankblotting kann zur Schädigung der Proteine in ihrer biologischen Aktivität führen, wobei eine Kühlung nur mit sehr hohem Aufwand gleichmäßig zu gestalten ist, unregelmäßige Blottergebnisse sind die Folge. Zudem sind Immunnachweise nach Semidryblotting empfindlicher, da der Transfer schonender ist als der durch Tankblotting [186]. Die Proteine wandern offensichtlich weniger tief in die Membran und bleiben eher auf der Oberfläche haften, wo sie besser detektiert werden können.

Methodik

Gelelektrophorese

1. Auftrennung der Proteinlösungen durch elektrophoretische Verfahren (SDS-PAGE, IEF oder native Elektrophorese).
2. Lösen des Gels aus der Kammer und äquilibrieren im Kathodenpuffer für 5 min.

Das Gel nicht überladen, als Beispiel ca. 10-20 µg einer komplexen Proteinlösung auf einem Minigel (Lanebreite 8 mm, BioRad MiniProtean II).

Vorbereiten der Blotmembran

1. Schneiden der Blotmembran auf die exakten Gelmaße und markieren einer Ecke.
2. Aktivieren der PVDF²⁸-Membran (0,45 µm, Invitrolon PVDF, Invitrogen) für 15 sec in 100 % Methanol.

²⁵ 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-1-phosphatase

²⁶ Nitro-blue-tetrazolium

²⁷ Disodium 3-(4-methoxyxyloxy) {1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo (3.3.1.1 3,7) decan}-4-yl) phenyl phosphate

²⁸ Polyvinylidenfluorid

3. Waschen der Membran in H_2O_{dd} für 2 min.
4. Äquilibrieren in Anodenpuffer II für 5 min.

Semidry-Transfer

1. Sättigen der Graphitelektroden (Anode und Kathode) mit H_2O_{dd} .
2. Wässern zweier Filterpapiere²⁹ (exakt auf Gelgröße schneiden) in Anodenpuffer I und platzieren auf der Anode. Luftblasen durch Walzen des Filterstapels mit einer Pasteurpipette entfernen.
3. Wässern eines Filters (exakt auf Gelgröße schneiden) in Anodenpuffer II und platzieren auf den ersten beiden Filtern. Luftblasen entfernen.
4. Platzieren der vorbereiteten Membran auf dem Filterstapel.
5. Platzieren des Gels auf der Membran und die Zuordnung Markierung Gel und Membran beachten.
6. Wässern dreier Filter (exakt auf Gelgröße schneiden) mit Kathodenpuffer und auf dem Blotstapel platzieren. Luftblasen entfernen.
7. Komplettieren der Bloteinheit durch fixieren der Kathodenelektrode und an den Stromkreis der Kammer anschließen. Beschweren der oberen Elektrode durch Glasplatten oder ein vergleichbares Gewicht, wodurch ein gleichmäßiger Transfer gewährleistet wird.

Die einzuregelnden Stromstärken sind für eine Gelfläche von 50 cm² abhängig von der Zeit:

Stromstärke pro Fläche [mA/cm ²]	Stromstärke (Summe) [mA]	Zeit [min]
0,8	40	60-120
1,2	60	60
2,5	125	30-45
4,0	200	10-30

Mit ansteigender Stromstärke ist zu beachten, dass größere Proteine zwar leichter aus der Gelmatrix wandern, kleine Proteine aber unter Umständen die Membran durchschießen. Die gleichmäßigsten Blotergebnisse wurden bei einer Stromstärke von 0,8 mA/cm² und einer Dauer von 1,5 h erzielt.

8. Nach Beendigung des Transfers die Strom-Spannungsquelle ausschalten und die Verbindung zur Kammer unterbrechen.
9. Vorsichtiges Abheben der oberen Kathode und der auf dem Gel und der Membran liegenden Filter.

Der Bloterfolg kann anhand

²⁹ Filter mit hoher Flüssigkeitskapazität notwendig, „extra dick“ (<1 mm), z.B. GB004 Schleicher & Schüll).

- farbiger Markerproteine auf der Membran und im Gel,
- einer reversiblen Anfärbung der Membran durch Ponceau S und
- der kolloidalen Coomassie-Färbung des Gels verfolgt werden.

Besonders während der Optimierung der Transferbedingungen ist diese Kontrolle unbedingt zu empfehlen.

Verwendet wurde das Semidry-System (NovaBlot) in Verbindung mit Multiphor II-Kammer und der Strom-Spannungsquelle EPS 3500 (Amersham-Pharmacia Biotech).

3.2.11.1 Chromogene Immundetektion mit BCIP/NBT

Für die chromogene Immundetektion hat sich eine Vorgehensweise der Fa. Millipore [194] bewährt, die auf die Problemstellung optimiert wurde.

PVDF-Membrane müssen hierbei nicht notwendigerweise geblockt oder durch ausgedehnte Waschschrte von überschüssigen Reagenzien befreit werden. Trocknen der Membran versetzt sie in den hydrophoben Grundzustand zurück, Antikörper binden so nur spezifisch an bereits membrangebundene Proteine.

1. Blockieren der freien Bindungsstellen der Membran mit Blockierungspuffer für 30 min.
2. Trocknen der Membran entweder bei 37° C oder bei Raumtemperatur für 1 bzw. 2 h. Die Membran muss vor dem nächsten Schritt vollständig trocknen. Auf der Membran verbleibende Wassertropfen verursachen hohe Hintergrundfärbungen.
3. Kennzeichnen der einzelnen Lanes auf der Membran und schneiden der Membran in 4-5 mm breite Streifen.
4. Inkubation der Blotmembran mit verdünnten Patientenserum über Nacht bei RT auf der Wippe in Inkubationstrays (BioRad). Das Serum wird 1:5 in Inkubationspuffer verdünnt.
5. Waschen der Membran in Wasch-Puffer (3 x 10 min).
6. Inkubation für 3-4 h mit dem Alkalische-Phosphatase gekoppelten Detektionssantikörper (mouse anti-human IgE-AP konjugiert, 36413E, Pharmingen) 1:1000 in Inkubationspuffer verdünnt.
7. Waschen der Membran in Wasch-Puffer (3 x 10 min).

8. Zugabe von je 1 mL des chromogenen Substrates (Novex) pro Lane zur Farbentwicklung der alkalischen Phosphatase. Die Entwicklungszeit beträgt je nach Problemstellung und gewünschter Farbtintensität zwischen 20-60 min.
9. Waschen der Membran in Wasch-Puffer (3 x 10 min).
10. Lichtgeschützt trocknen und umgehend dokumentieren.

Es wurde ein diskontinuierliche Puffersystem [162] ohne den vorgeschlagenen 20 %igen Methanolzusatz verwendet, da Methanol die biologische Aktivität der Proteine beeinflusst.

Anodenpuffer I

Tris	0,3 M/L	36,3 g
Natriumazid ³⁰	0,01 %	0,1 g

Mit H₂O_{dd} auf 1000 mL auffüllen und gut durchmischen, pH 6,8.

Anodenpuffer II

Tris	25 mM/L	3,03 g
Natriumazid	0,01 %	0,1 g

Mit H₂O_{dd} auf 1000 mL auffüllen und gut durchmischen, pH 8,6.

Kathodenpuffer

Glycin	39 mM/L	2,93 g
SDS (w/v)	0,01 %	0,1 g
Natriumazid	0,01 %	0,1 g

Mit H₂O_{dd} auf 1000 mL auffüllen und gut durchmischen.

PBS (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)

Kaliumphosphat	10 mM/L	1,74 g
Natriumchlorid	15 mM/L	0,88 g

Mit H₂O_{dd} auf 1000 mL auffüllen und gut durchmischen, pH 7,4.

Inkubationspuffer

PBS mit 0,1 % (w/v) Rinder Serum Albumin (Fraktion V)

Blockierungspuffer

PBS mit 0,05 % Tween 20
5 % (w/v) Magermilchpulver oder 1 % (w/v) Rinder Serum Albumin (Fraktion V)

Waschpuffer

PBS mit 0,05 % Tween 20

Chromogenes Substrat

Mischen des chromogenen Substrates (Novex) mit H₂O_{dd} (3:2)

³⁰ Natriumazid stört einige Enzymdetektionsmethoden.

3.2.11.2 Immunoblotting mit Chemilumineszenz (CSPD)- Detektion

1. Die PVDF-Membran wird für 15 sec in Methanol getränkt und anschließend für 5 min in Waschpuffer getaucht
2. Die Blotmembran in ein Inkubationsrohr (Kroll) überführen und 30 min mit 6 mL Blocking-Reagenz absättigen.
3. Waschen: 5 min mit 6 mL Waschpuffer.
4. Inkubation des Blots ü/N bei RT mit Humanserum-Lösung (Serum:Waschpuffer 1:5)
5. Waschen: 3 x 10 min mit je 6 mL Waschpuffer.
6. Inkubation des Blots mit 6 mL Maus-anti-Human IgE-AP-Konjugat (Allergopharma F-PL-Ka, 1:1000 Fertiglösung) bei RT für 2 h
7. Waschen: 3 x 10 min mit je 6 mL Waschpuffer.
8. Waschen: 2 x 5 min mit je 6 mL Assay-Puffer.
9. Inkubation des Blots mit 6 mL CSPD-Substrat-Lösung
10. Die Blotmembran wird vorsichtig auf eine durchsichtige PE-Folie in einer Röntgenfilm-Kassette gelegt, mit einer weiteren Folie abgedeckt, die mit Tesafilm am Kassettenrand fixiert wird.
11. Licht aus, Infrarot-Lampe an!
12. Für jeweils 10, 20 und 40 min wird ein Röntgenfilm (Kodak X-Omat AR) aufgelegt und entwickelt.

Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS) 10 x

Dinatriumhydrogenphosphat	82,3 g
Natriumdihydrogenphosphat x 4 H ₂ O	23,5 g
Natriumchlorid	40,0 g
Natriumazid	0,5 g

Auf 100 mL mit H₂O_{dd} auffüllen, pH (6,8-7,2). Lagerung bei RT bis zu drei Monate.

Waschpuffer

Tween 20 (v/v)	0,1 %
----------------	-------

100 mL PBS (10x) geben und auf 1000 mL auffüllen.
Lagerung bei RT bis 1 Monat.

Blockinglösung

500 mg Blocking-Reagenz	(Magermilchpulver)
PBS (10x)	25 mL
TWEEN 20 (v/v)	0,05 %

250 mL H₂O_{dd} im Wasserbad bei 40° C lösen.
Bei höheren Temperaturen Gerinnungsgefahr. Lagerung bei 4° C bis zu einem Monat.

Assay-Puffer; pH 10

Diethanolamin 9,6 mL
Magnesiumchlorid x 6 H₂O 250 mg
in ca. 900 mL H₂O_{dd} lösen
mit 1N Salzsäure auf pH 9,9-10,1 einstellen.
mit H₂O_{dd} auf 1000 mL auffüllen.
Lagerung bei 4° C bis zu einem Monat.

CSPD-Substrat-Lösung

CSPD (Serva) 60 µL
Assay-Puffer 6 mL

3.2.12 Patientenseren

Die verwendeten Patientenseren (Tabelle 7) entstammten bis auf das Poolserum des Pharmaunternehmens der Serenbank der Allergie- und Asthma Klinik, Bad Lippspringe und kamen als Einzelerum zum Einsatz. Die Patienten wurden nach positiver Anamnese und Hauttestung auf Hausstaub- und/oder Vorratsmilben vorselektiert und mittels des CAP-Tests (Amersham Pharmacia Biotech) auf ihren Gehalt an spezifischen IgE hin untersucht.

Die folgenden Seren wurden verwendet:

Nr.	d 1	d 2	d 70	d 71	d 72	d 73	d 74	
1	5	4	2	2	2	1	2	
2	6	5	4	5	4			
3	6	6	4	4	4			
4	6	6	3	4	4	2	2	
5	3	3	0	0	0	0	0	
6	5	5	3	3	3		2	
7	5	4	4	4	4	3	4	
8	4	3						
9	3	4	d 1	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>				
10	6	6	d 2	<i>Dermatophagoides farinae</i>				
11	6	6	d 70	<i>Acarus siro</i>				
12	4	4	d 71	<i>Lepidoglyphus destructor</i>				
13	3	3	d 72	<i>Tyrophagus putrescentiae</i>				
14	4	4	d 73	<i>Glycyphagus domesticus</i>				
15	6	5	d 74	<i>Euroglyphus maynei</i>				

Tabelle 7 – Verwendete Patientenseren

Abschließend erfolgte die Einordnung der Ergebnisse in Sensibilisierungsklassen, den RAST-Klassen. Eine Zuordnung der CAP- zur RAST-Klassifizierung zeigt Tabelle 8.

CAP-RAST-Klasse	allergenspezifische IgE-Konzentration [kU/L] ³¹	RAST-Klasse
0	< 0,35	0
1	0,35 - 0,70	1
2	0,70 - 3,5	2
3	3,5 - 17,5	3
4	17,5 – 50	4
5	50 – 100	4
6	> 100	4

Tabelle 8 – CAP-RAST-Klassen im Vergleich zur RAST-Klassen-Einteilung

3.2.13 Zymogramm

Ein Zymogramm ermöglicht die Bestimmung von Metalloproteasen, Collagenasen und weiteren Proteasen, die in der Lage sind, Casein oder auch Gelatin als Substrat umzusetzen. Hierzu wird das entsprechende Substrat in der Polyacrylamidmatrix von Elektrophoresegelele eingebunden und die Probe identisch zu einer SDS-PAGE aufgetrennt. Damit die Umsetzung des Substrates durch die Proteasen vonstatten gehen kann, wird nach Beendigung der Trennung das Gel für eine bestimmte Zeit bei 37° C inkubiert. An den Stellen im aufgetrennten Bandenspektrum des Gels, an dem sich Proteasen befinden, wird das Substrat aus dem Gel umgesetzt. Die anschließende Coomassie-Färbung ergibt an dieser Stelle keine Färbung, wohingegen das Gel an allen Stellen kräftig durchgefärbt wurde, an denen noch Reste des Substrates im Gel verblieben [195]. Die Zuordnung der Proteasen erfolgt über den Vergleich mit Molekulargewichtsmarkern bzw. dem Bandenmuster der „normal“ in einer SDS-PAGE aufgetrennten identischen Probe.

In dieser Arbeit wurden 12 %ige Tris-Glycine-Fertiggele (Invitrogen) mit Casein verwendet. Da sie identisch mit den in der SDS-PAGE verwendeten Gelen waren, konnten bei gleichen elektrophoretischen Bedingungen ein direkter Übertrag der Molekulargewichtsmarker und des Bandenspektrums erfolgen. Die Nachweisgrenze des Gaseingels lag laut Herstellerangabe bei 7×10^{-4} Trypsineinheiten.

Methodik

Die frisch hergestellten bzw. rekonstituierten Proben wurden 1:1 mit dem aus der SDS-PAGE bekannten Probenpuffer versetzt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in der entsprechenden Konzentration in die Proben-

³¹ Kilo Units/Liter

taschen des Gels appliziert. Die Probenkonzentration betrug bei allen Proben zwischen 180 und 200 µg/mL. Die elektrophoretische Trennung wurde in einer XCell II-Mini-Cell (Invitrogen) durchgeführt und entsprach in ihren Bedingungen (Puffer, Spannung und Laufzeit) der in dieser Arbeit verwendeten SDS-PAGE. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel unter leichtem Schwenken für 30 min bei Raumtemperatur in 100 mL Renaturierungslösung inkubiert. Anschließend folgte die Inkubation in 100 mL Entwicklerlösung bei Raumtemperatur. Danach wurde die Entwicklerlösung gewechselt und es erfolgte die abschließende Inkubation bei 37° C. Die Dauer des letzten Schrittes hing von der proteolytischen Aktivität der Proben und dem gewünschten Substratumsetzungsgrad ab und betrug zwischen 1,5 h und 12 h (ü/N). Die Visualisierung erfolgte für 30 min in einer Coomassie-Färbung, die zur Steigerung des Kontrastes gegenüber der üblicherweise verwendeten Rezeptur einen höheren Anteil an Farbpigmenten enthielt. Die Entfärbung erfolgte bis zum gewünschten Kontrast in 100 mL Entfärbungslösung unter leichtem Schwenken.

Die Laufbedingungen waren wie folgt:

Spannung	125 V (konstant über die Laufzeit)
Stromstärke	Start: ca. 30-40 mA Ende: 8-12 mA
Laufzeit	90 min

Probenpuffer; pH 8,45

	1 x	4 x
Glycerol	1,09 M	4,0 g
Tris	141 mM	0,682 g
Tris-HCL	106 mM	0,666 g
LDS	73 mM	0,8 g
EDTA	0,51 mM	0,006 g
Serva Blue G 250	0,22 mM	0,75 mL einer 1 %igen Lösung
Phenolrot	0,175 mM	0,25 mL einer 1 %igen Lösung
Mit H ₂ O _{dd} auf 10 mL auffüllen.		

Der Puffer wurde als Fertigpuffer NuPage LDS Sample Buffer (Invitrogen) bezogen.

Laufpuffer; pH 8,3

	1x	10x
Tris	25 mM	29 g
Glycin	192 mM	144 g
SDS (w/v)	0,1 %	10 g
Mit H ₂ O _{dd} auf 1000 mL auffüllen.		

Renaturierungslösung

	1x	10x
Triton X-100 ³²	2,7 % in H ₂ O _{dd}	135 g
Mit H ₂ O _{dd} auf 500 mL auffüllen.		

³² t- Octylphenoxypolyethoxyethanol

Entwicklerlösung

	1x	10x
Tris	50 mM	30,2 g
Salzsäure (6 N)	40 mM	33 mL
Natriumchlorid	200 mM	58,5 g
Calciumchloriddihydrat	5 mM	3,7 g
Brij 35 ³³ (w/v)	0,2 %	1,0 g

Mit H₂O_{dd} auf 500 mL auffüllen.

Färbelösung

Coomassie Brilliant Blue (w/v)	0,5 %	0,5 g
--------------------------------	-------	-------

Mit Entfärbelösung auf 100 mL auffüllen und gut durchmischen.

Entfärbungslösung

Essigsäure	10 % (v/v)	10 mL
Methanol	30 % (v/v)	30 mL

Mit H₂O_{dd} auf 100 mL auffüllen.

³³ Polyethylen-23-Laurylether

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 UV/VIS-SPEKTROSKOPIE

Es wurden in den Proben 23, 24 und 25 die für Proteine typischen Absorptionsspektren gefunden [178]. Zu einem das stark ausgeprägte Maximum des $n-\pi^*$ -Übergang der Peptidbindungen bei 220 nm und zum anderen das auf entschieden niedrigerem Niveau verlaufende Maximum des $\pi - \pi^*$ -Übergangs der chromophoren Aminosäuren bei 260-280 nm (Abbildung 5, A).

Der molare Extinktionskoeffizient $\epsilon_{L/mol\cdot cm}^{259nm} = 0,513 \times 10^{-3}$ entspricht bei einer Schichtdicke der Küvette von 1cm einem mittleren Molgewicht von 19,5-22 kDa. Der scheinbare Extinktionswert wurde zu $E_{mg/mL}^{1\%(259nm)} = 0,107$ bestimmt. Dies entspricht einer optischen Dichte von $OD^{1\%(259nm)} = 1,0$ für eine Proteinkonzentration von 107 μg .

Mit zunehmender Verdünnung der Probe 23 (Abbildung 6; A-C) nahm die Extinktion bei 260 nm entsprechend dem Lambert-Beerschen-Gesetz³⁴ linear gegen die Konzentration [$\mu\text{g/mL}$] ab. Es kann daraus geschlossen werden, dass mit zunehmender Verdünnung keine bemerkenswerte Dissoziation und/oder Umfaltung eintrat, sondern - wenn überhaupt - der Grad der Aggregation der Moleküle untereinander schwindet [178]. Das Maximum der Peptidbindung sank proportional der Verdünnung, wobei die Verschiebung des Maximums von 225 nm hin zu 205 nm in der 1:8-Verdünnung auf das Abnehmen der Wasserstoffbrückenbindungen bzw. eine Veränderung der Sekundärstruktur hinweisen könnte. Welche Grundstruktur überwiegt, α -, β -Struktur oder random-Coil, lässt sich z.B. mittels optischer Rotationsdispersion (ORD) oder Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie abschließend beurteilen. Die unterschiedlichen Sekundärstrukturen können aufgrund verschiedener Polarisationsrichtungen wellenlängen-abhängig (210-280 nm) voneinander differenziert werden [177].

Die Absorption bei 260 nm erwies sich zudem als pH-abhängig bei konstanter Temperatur und Ionenstärke und Proteinkonzentration. Die Zugabe von Essigsäure zur Probe 24 führte zu einem starken Absinken des chromophoren Ab-

³⁴ $A = \log(I_0/I) = \epsilon \times c \times d$

Bei konstantem molarem Extinktionskoeffizienten ϵ und unveränderter Messbreite (Kuvettendicke) d verhält sich die Absorption A zur Konzentration c linear proportional.

sorptionsanteils bei 260 nm und einer Überlagerung der Peptidbindungen bei 220 nm mit dem Essigsäurespektrum (nicht gezeigt).

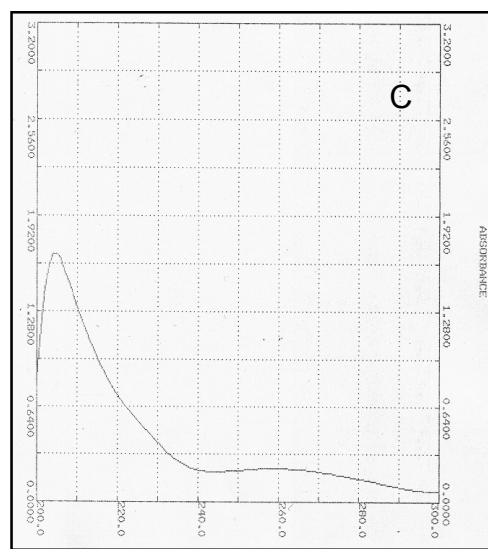
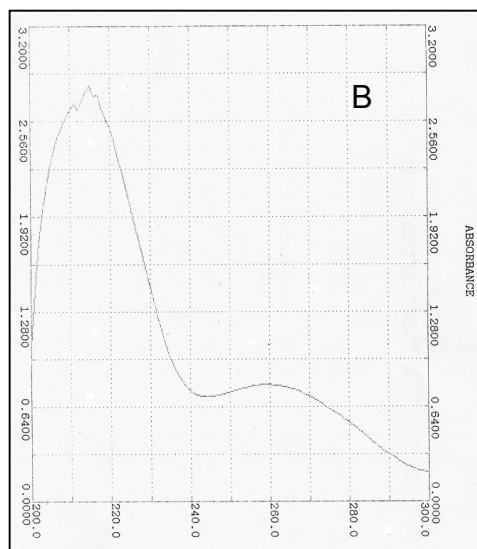
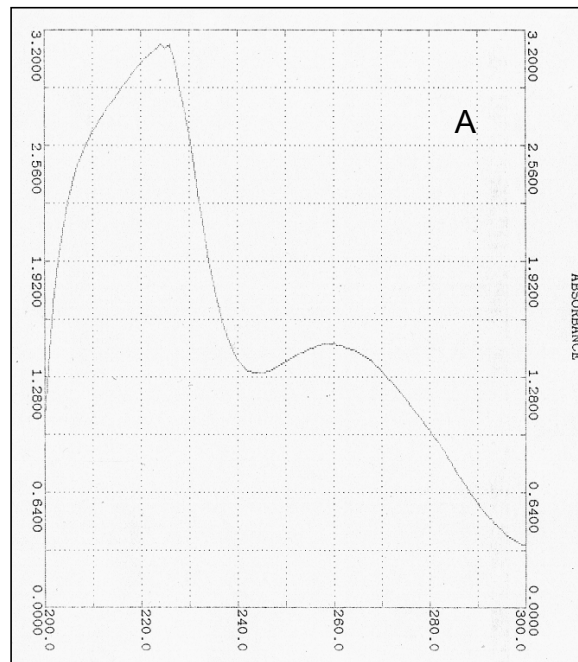


Abbildung 6 – UV-Absorptionsspektren eines *D. pteronyssinus* Extraktes (Lyophilisat Probe 23). A. Originalextrakt; B. 1:2 Verdünnung mit Cocas'-Puffer; C. 1:8 Verdünnung.

Die Zugabe 1 N Natronlauge zur Probe 23 führte zu einem proportionalen Absinken des chromophoren Maximums, aber nicht zu einer Verschiebung zu höheren Wellenlängen (Abbildung 7, D) hin. Hieraus kann gefolgert werden, dass der chromophore Anteil hauptsächlich durch Phenylalanin, dessen spezifisches Maximum bei 257 nm liegt, und nicht durch Tyrosin (275 nm) oder Tryptophan (280 - 291 nm) hervorgerufen wird [178]. Im alkalischen Milieu verändern letztere ihre

chromophoren Systeme, so dass es zur angesprochenen Verschiebung des Maximums kommen würde.

6 N Harnstoff bewirkte in der Probe 23 eine $n-\pi^*$ Verschiebung bei 220 nm um ca. 5 nm (Abbildung 7, E). Das Glätten der Peakspitze zeigte den gleichzeitigen Verlust an Sekundärstruktur und damit eine Verschiebung von einem Struktur- zu einem Bandenspektrum [196]. Im Gegensatz zur Verdünnung mit Pufferlösung, resultierte die Harnstoffzugabe lediglich in einer Abnahme des $n-\pi^*$ -Maximums um ca. 10 %.

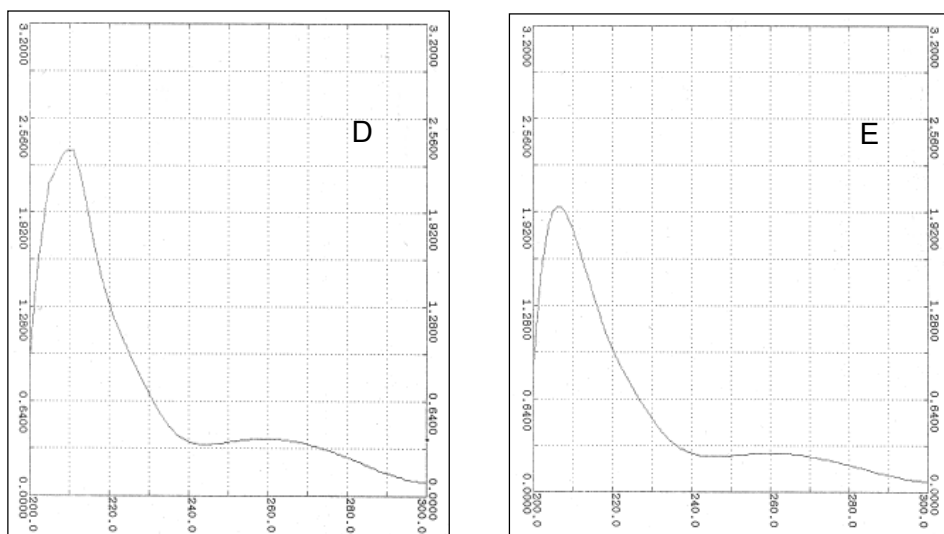


Abbildung 7 – UV-Absorptionsspektren eines *D. pteronyssinus* Extraktes (Lyophilisat). D. 1:2 Verdünnung der Ausgangsprobe (Abb. 6A) mit 600 μ L 6 N Harnstoff; E. 1:2 Verdünnung der Ausgangsprobe mit 600 μ L 1 N Natronlauge.

Ein Vergleich zwischen Extrakten aus Kulturen gleicher Milbenspezies aber unterschiedlichen Ursprungskulturen, Allergon (Probe 25) vs. CSL (Probe 23), ergab anhand des Peakhöhenverhältnis 220 vs. 260 nm einen höheren aromatischen Charakter des CSL-Lyophilisates.

4.2 SPEZIFISCHE BESTIMMUNG DER MAJORALLERGENE DER P 1 UND DER P 2

Verschiedene Extrakte (Proben 1, 12, 16, 18) der Milbe *D. pteronyssinus* wurden ab einem Verdünnungsverhältnis von 1:1000 analysiert. Die Ergebnisse der ELISA-Bestimmungen können der Tabelle 9 entnommen werden. Die gleichzeitige Analyse eines frischen *L. destructor* Extraktes (Probe 14) ergab optische Dichten in der Größenordnung der jeweiligen Leerwerte für den Der p 1- und den Der p 2-

ELISA. Eine Kreuzreaktion der monoklonalen Antikörper gegen die Hausstaubmilbe mit Epitopen der fremden Spezies Vorratsmilbe bestanden demnach nicht.

Probe Nr.	Probenbeschreibung	Der p 1 [ng/mL]	Der p 2 [ng/mL]	Der p 1/Der p 2
1	Referenzextrakt Pharmaunternehmen	48,2	35,0	1:0,73
12	Allergon-Kultur (Frischer Extrakt)	39,3	27,7	1:0,7
16	Allergon-Kultur (Lyophilisat)	25,8	25,0	1:0,96
18	CSL-Kultur (Lyophilisat)	26,6	19,8	1:0,74

Tabelle 9 - Ergebnisse der spezifischen Allergenbestimmung

Der Referenzextrakt (Probe 1) enthielt im Vergleich die höchste Konzentration an Der p 1 und Der p 2 in einem Verhältnis von 1:0,73. Eine genaue Beschreibung des Herstellungsprozesses für den Referenzextrakt des Pharmaunternehmens konnte nicht eingesehen werden. Es wird angenommen, dass die höhere Ausbeute aufgrund einer längeren Extraktionszeit zustande kam, da bei selbst durchgeführten Extraktionen ein vergleichbares Verhältnis von 1:0,7 für einen frischen Extrakt (Probe 12) erzielt werden konnte. Belegt wird diese Annahme durch die ebenfalls erhöhten Ausbeuten des frisch hergestellten Allergon-Extraktes, dessen Extraktionszeit sechs anstatt wie bei den Lyophilisaten vier Stunden andauerte.

Das Verhältnis Der p 1/Der p 2 der lyophilisierten CSL-Probe (Probe 18) stimmte sehr gut mit der Referenz und auch dem frisch hergestellten Extrakt überein. Daher wird vermutet, dass sich die CSL-Kultur entweder grundsätzlich stabiler gegenüber der Gefriertrocknung verhält und/oder die Ausgangskultur der Referenzkultur in ihrer Zusammensetzung sehr nahe kommt. Der fast identische Anteil an Der p 1 und Der p 2 im Allergon-Lyophilisat (Probe 16) deutet auf mögliche Veränderungen durch die Gefriertrocknung hin, da der frische Allergon-Extrakt (Probe 12) der Referenz entspricht. Untersuchungen zur proteolytischen Aktivität zeigten für das Allergon-Lyophilisat (Probe 16) die insgesamt höchste Aktivität. Das CSL-Lyophilisat (Probe 18) entsprach der Referenz und zeigte im Zymogramm die geringste Proteaseaktivität. Ein direkter Zusammenhang zwischen dem Verhältnis der Majorallergene zueinander und der proteolytischen Aktivität ist zukünftig zu prüfen.

Insgesamt lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass alle Kulturen zu einem sehr hohen Grad ausschließlich Milbenkörper enthielten und Kotpellets nahezu vollständig abgetrennt wurden. Wären die Kulturen mit größeren Mengen an Kotpellets verunreinigt, so wäre der Der p 1-Gehalt gegenüber Der p 2 um ein Vielfaches erhöht [158] (siehe „Herstellung von Allergenextrakten–eine Übersicht“).

4.3 AUSSCHLUSSCHROMATOGRAPHIE (SEC)

γ -Globulin (158 kDa) und Thyroglobulin (670 kDa) wurden durch die Säulenmatrix (Ausschlussvolumen \sim 70 kDa) nicht getrennt, so dass nur der scheinbare durchschnittliche Molekulargewichtsbereich (gewichts- und zahlenmäßig) von 1,35 bis 44 kDa zur Molekulargewichtsbestimmung herangezogen werden konnte. Die Analyse der erhaltenen Elutionsprofile einschließlich ihrer Retentionszeiten wurde unter der Annahme durchgeführt, dass sich die Standardproteine in engen hydrodynamischen Grenzen bewegen, d.h. ähnliches partielles spezifisches Volumen und sphärische Form einnehmen sowie unter den Elutionsbedingungen weder dissoziieren noch aggregieren. Die auf diese Art und Weise kalibrierte Säule wurde zur Molgewichtsbestimmung der Proteinanteile im Extrakt herangezogen. Das Methodenprofil konnte nicht variiert werden, da es sich um eine genormte analytische Methode in einem pharmazeutischen Unternehmen handelte und auch dort durchgeführt werden konnte.

Marker [Da]	Allergon (Probe 3)		CSL (Probe 2)		Hausreferenz (Probe 1)	Der p 1	Der p 2
	Lyophilisat	Dialyse- wasser	Lyophilisat	Dialyse- wasser			
670.000							
158.000	151.000		141.554		147.022		
					75.584		
44.000	44.463		43.721		42.810		
		31.348					
17.000	16.459		15.780		15.780		15.452
					8.181	6.382	
1.350	1.797	1.624	1.804	1.812	1.812		
	959	963	928	908	939		
					643		
		534		541			
					200		
		173	168	162			
		105					
	50	46	51	48	52		
	20		20	18	20		

Tabelle 10 - Molekulargewichtsfractionen in Dalton

In der Hausreferenz konnten neun Fraktionen zwischen 200 und 147.000Da bestimmt werden (Abbildung 8). Alle Extrakte zeigten Komponenten in den Bereichen 140-150, 42-43, 15, und 1,8 kDa sowie 95 Da (Tabelle 10). Es wird angenommen, dass sich die Allergene der *D. pteronyssinus* Extrakte aus diesen Komponenten zusammensetzten und größere Proteine aus der Kombination kleinerer Proteine kombiniert werden. Den Molekulargewichtsfractionen ab 900 Da und darunter fehlt aufgrund mangelnder Masse die Funktionalität, sie sollen daher nicht weiter betrachtet werden. Die berechneten Molekulargewichte von

ca. 150 kDa könnten, aufgrund der für diesen Bereich nur sehr eingeschränkt anwendbaren Standardreihe, durchaus im höheren Molekulargewichtsbereich angesiedelt sein. Eigene massenspektroskopische Untersuchungen konnten im Bereich von ca. 170 kDa die größten proteinogenen Extraktbestandteile identifizieren. Für die eng verwandte Hausstaubmilbe *D. farinae* wurde ein Protein mit einem Molekulargewicht von 177 kDa publiziert [55].

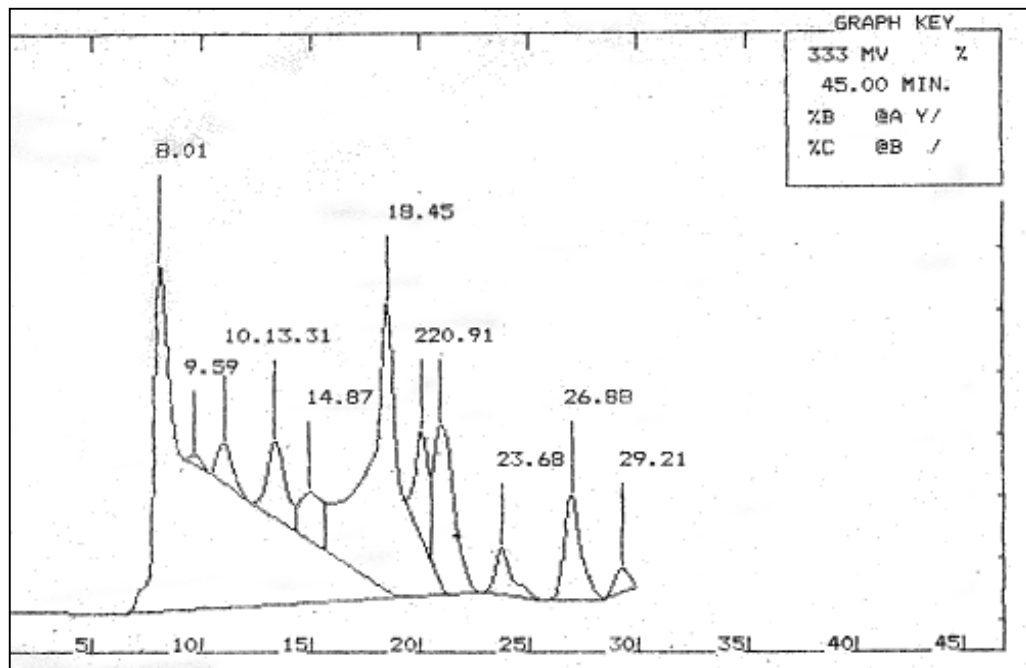


Abbildung 8 – Das Chromatogramm der „Hausreferenz“ des Pharmaunternehmens zeigte das vollständigste Fraktionierungsmuster.

Zusätzlich wurden die Majorallergene Der p 1 und Der p 2 analysiert. Das für Der p 2 berechnete Molekulargewicht von 15,5 kDa ist identisch mit dem durch SDS-PAGE bestimmten Wert von 15,6 kDa (siehe „Unregelmäßigkeiten der Standardallergene“). Der für Der p 1 erzielte Wert von 6,4 kDa stimmte hingegen nicht mit dem Literaturwert von ca. 25 kDa überein. Allerdings wurde bei der SDS-PAGE ein Wert von 24,5 kDa gefunden (siehe „Ergebnisse-SDS-PAGE“); die anschließende Kontrolle durch Immunoblotting ergab ein schwaches, aber eindeutig positives Signal. Eine weitere Komponente mit vergleichbarem Molekulargewicht konnte mit 8,2 kDa nur im Referenzextrakt nachgewiesen werden. Allerdings zeigen alle drei Extrakte (1, 2 und 3) sowohl in der SDS-PAGE als auch im Immunoblotting eindeutige Banden im 25 kDa-Bereich. Es kann daher vermutet werden, dass sich Der p 1 unter den angewandten ionischen Bedingungen der SEC in etwa vier gleich große Untereinheiten aufgespalten hat. Die Summe aus 4 x 6,4 kDa ergibt 25,5 kDa, das dem Ergebnis der SDS-PAGE entsprach.

Zur Massenbilanzierung hinsichtlich der Proteine bei der Dialyse wurde der jeweils erste Pufferwechsel analysiert, wobei ein schwacher Peak (0,25 % Anteil

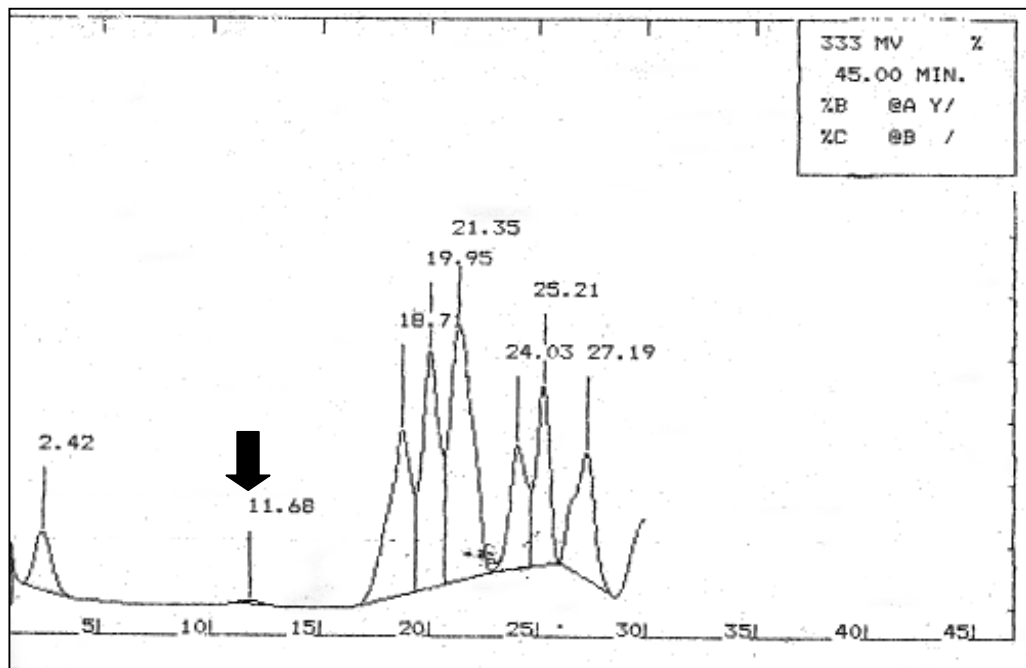


Abbildung 9 – Chromatogramm des ersten Wasserwechsels der Dialyse der Allergon-Kultur. Der Peak bei 11,68 min wurde mit 31.348 Da kalkuliert.

am Gesamtspektrum der Proteine) bei einer Retentionszeit von 11,68 min gefunden wurde, der einem berechneten Molgewicht von 31,4 kDa im Lyophilisat der Allergonprobe entsprechen würde (Abbildung 9). Bei einem Molekulargewichtsausschluss der Dialysemembran von 3,5 kDa liegt der theoretische Radius in Bezug zur Penetration eines Proteins mit Molgewicht von 3,5 kDa unabhängig von der Form bei ca. 10 Å. Durch die Dialyse der hochsalzigen (0,5 M) Allergonextrakte gegen H_2O_{dd} wurde ein hoher osmotischer Druck ($\sim 1,5 \times 10^3$ Pa) aufgebaut, der über den gesamten Dialysezeitraum von >12 h anstand. Da insbesondere native Proteine mit ihrem spezifischen Hydrationsgehalt (normalerweise um die 0.2 - 0.5 g/mL) sowie ihrer Ionenwolke (Debye-Hückel-Länge) auf osmotische Drucke dieser Größenordnung sehr empfindlich reagieren können, kann es unter Umständen zu Umfaltungen oder Änderungen in der Form, welche auch die hydrodynamischen Formfaktoren, z.B. sphärische, frei durchspülte Knäuel oder stäbchenartige Formen, kommen. So ist es durchaus nicht verwunderlich, dass das gefundene Protein mit Molgewicht 31,4 kDa u.U. eine stäbchenförmige und/oder flexible Form angenommen hat und durch die Dialysemembran geschlüpft ist [197]. Ergebnisse aus Röntgen-Kleinwinkel- und Weitwinkelstreuungen (Cu $K_{\alpha 1}$ -Strahlung, $\lambda = 1.541$ Å) stehen nicht unbedingt im Widerspruch zu diesen Annahmen.

Vor diesem Hintergrund macht auch der Einsatz von PEG bei der Extraktion Sinn, da es die polaren Wassermoleküle von der Proteinoberfläche fern hält. Durch den Einsatz von PEG kann es allerdings zu Verschiebungen des Molekulargewichtes zu höheren Molgewichten kommen, da die nicht kovalent gebundenen PEG-Moleküle einen Beitrag zum Molgewicht liefern. Im Gegensatz dazu ist die Aussalzung u.U. bei sehr polaren Proteinen ineffektiv, da diese noch bei hohem Salzgehalt nicht fällbar sind (Einsalzeffekt).

Scheinbare Molekulargewichte [Da]	Hausreferenz	CSL	Allergon
	Probe 1 [%]	Probe 2 [%]	Probe 3 [%]
150.000	49,9	26,9	23,3
75.000	0,3		
43.000	1,5	0,9	0,6
16.000	3,4	1,8	4,5
1.800	2,8	41,7	55,4
900	24	25,5	15,3
600	8		
200	1,8	0,9	
50	4,2	1,5	0,8
20	0,8	0,1	0,2

Tabelle 11 - Anteil einzelner Fraktionen am Gesamtspektrum in Prozent bezogen auf die Peakfläche

Betrachtet man die Anteile der einzelnen Fraktionen an der gesamten Fragmentierung (Tabelle 11), so ist festzustellen, dass durch die Lyophilisation eine erhebliche Verschiebung zu kleineren Fragmenten hin erfolgt. Vor allem der Anteil der 150 kDa Fraktion sinkt konstant in beiden Lyophilisaten um ca. 50 %. Da im Gegenzug der Anteil der 1,8 kDa Fraktion von 2,8 % (Referenz) auf 41,7 % (CSL) bzw. 55,4 % (Allergon) ansteigt, liegt die Vermutung nahe, dass es sich um eine direkte Verschiebung handelt. In der Gewichtung des Allergon-Lyophilisates konnte die Fragmentierung zudem auf einem höheren Molekulargewichtsniveau gehalten werden, da der Anteil der 1,8 kDa Fraktion erheblich (14,3 %) über dem des CSL Lyophilisates lag und diesbezüglich der Anteil der 900 Da Fragmente um 10,2 % verringert war. Nimmt man nun weiter für eine aktive T-Zell-Epitopstruktur eine Sequenzfolge von 8-12 Aminosäuren mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von ~150 Da an, so resultiert ein Fragmentgewicht von 1,2-1,8 kDa. 1.8 kDa ist dementsprechend das kleinste Fragment, dass durch Human-IgE erkannt werden könnte. Der erhöhte Anteil dieser Fraktion im Extrakt müsste zu einer erhöhten Aktivität des Allergon-Extraktes gegenüber dem CSL-Extrakt führen. Für die proteolytische Aktivität konnte dies mittels Zymogramms nachgewiesen werden (siehe „Proteaseaktivität“), eine erhöhte allergische Aktivität kann nur vermutet werden, da hierzu eine EAST-Inhibition und/oder eine Pricktestung durchgeführt werden müsste.

Des Weiteren konnte, mit Ausnahme der Standards, in jedem untersuchten Extrakt, eine Fraktion bei 900 Da aufgetrennt werden. Die Vermutung liegt nahe, dass es sich hierbei um eine „Sollbruchstelle“ handelt. Die nächst kleinere Fraktion bei 500 Da tritt hingegen nur in den Dialysaten auf, so dass es sich um eine spezifische Fragmentierung durch den osmotischen Stress der Dialyse handeln dürfte.

Den Beleg, dass es sich bei den erzielten Molekulargewichten der Ausschlusschromatographie um scheinbare Molekulargewichte handelte, lieferte die MALDI-TOF-MS. Dort konnten weder die Molekulargewichte noch deren Anteil am Gesamtspektrum bestätigt werden. Trotz dieser Einschränkung, lieferte die Ausschlusschromatographie schnell erste Hinweise auf die Fraktionierung und Verteilung der Proteine im Extrakt sowie ein Spektrum, das zur Chargenkontrolle herangezogen werden kann.

4.4 SDS-PAGE

Die Ergebnisse der Molekulargewichtsbestimmung mittels SDS-PAGE ergaben für die untersuchten Extrakte gut differenzierte Bandenmuster im Bereich von 14 bis 150 kDa. In der Tabelle 12 sind die Molekulargewichte der verschiedenen Extrakte aufgeführt, wobei vorhandene Banden durch eine „1“, nicht vorhandene durch ein „leeres Kästchen“ erkennbar sind.

Alle Spektren zeigten mit bzw. ohne 10 %igen PEG-Zusatz zwischen 21 und 25 verschiedene Banden. Das durchschnittliche Molekulargewichte variierte zwischen 45 und 54 kDa.

Der Vergleich frischer Extrakte der Spezies *D. pteronyssinus* (Probe 12) mit *L. destructor* (14) untereinander, ergab kaum Unterschiede in der Bandenzahl (25 vs. 24), das durchschnittliche Molekulargewicht war mit 48,6 kDa vs. 52,2 kDa für *L. destructor* leicht erhöht. Insgesamt wurde eine 59 %ige Übereinstimmung der Bandenmuster (12 vs. 14) festgestellt.

Die Lyophilisate zeigten generell gegenüber nicht lyophilisierten Proben ein um zwei bis fünf Banden ärmeres Spektrum und lagen mit ihren durchschnittlichen Molekulargewichten von 54,3 kDa für Allergon (Probe 14) und 45,0 kDa für CSL (Probe 16) am oberen bzw. unteren Ende der Skala. Dem entsprechend konnte nur eine 70 %ige Übereinstimmung der Lyophilisate festgestellt werden, im Vergleich mit dem frischen Extrakt (Probe 12) wurden mit 76 % für Allergon (Probe

14) und 71 % für CSL (Probe 16) höhere Werte erzielt. Die Resultate des Matchings sind in Tabelle 13 gelistet.

Spezies	Frische Extrakte				Lyophilisierte Extrakte			
	<i>D. pteronyssinus</i>		<i>L. destructor</i>		<i>D. pteronyssinus</i>		<i>D. pteronyssinus</i>	
Hersteller	Allergon		Uni Paderborn		Allergon		CSL	
Proben-Nr.	12	13	14	15	16	17	18	19
[kDa]		PEG		PEG		PEG		PEG
151,1	1	1	1	1	1	1	1	1
131,7	1	1	1		1			
117,0	1	1	1	1	1			
106,3	1			1	1	1	1	1
96,9		1	1	1			1	1
85,8	1	1	1	1	1		1	1
79,1	1	1			1	1		
74,3	1	1	1	1				1
65,3		1	1	1	1	1		1
59,3		1	1	1	1	1		1
56,6	1	1	1	1	1	1	1	
53,1							1	
50,9	1	1	1	1	1	1	1	1
49,0			1	1	1			
43,8	1	1	1	1	1	1		1
39,8		1	1	1	1	1	1	1
38,4							1	1
34,5	1	1	1	1	1		1	1
31,7	1	1					1	
29,5						1	1	
26,8	1					1		
25,7	1	1	1	1	1	1	1	1
24,1	1	1	1	1	1	1	1	
22,1		1	1	1	1			1
21,6	1		1	1				
21,0				1	1	1		1
20,2			1			1		1
19,7	1	1						1
18,4	1	1	1	1	1	1	1	
17,9					1		1	
17,7	1						1	
17,4	1	1	1	1	1	1	1	1
16,7	1	1					1	
16,6	1		1		1	1	1	1
16,5		1		1				1
16,2	1	1	1	1		1		
15,5	1	1				1	1	1
14,9	1	1	1	1	1	1		1
	Statistik							
\overline{MW}	48,6	50,9	52,2	54,4	54,3	42,8	45,0	47,1
Σ Banden	25	26	24	24	23	21	21	22

Tabelle 12 - Molekulargewichte der untersuchten Extrakte. Detektierte Banden sind mit 1 gekennzeichnet.

Der 10 %ige PEG-Zusatz bewirkte bei den frischen Extrakten (Probe 13) und dem CSL-Lyophilisat (Probe 19) nur geringe Schwankungen im durchschnittlichen Molekulargewicht, wobei in den Extrakten mit PEG jeweils um 1-2 kDa erhöhte Werte gefunden wurden. Das durchschnittliche Molekulargewicht des Al-

lergon-Lyophilisates (Probe 17) sackte gegenüber dem nicht mit PEG versetztem Pendant (Probe 16) um 12 kDa ab. Dass aber nicht nur im Allergon-Lyophilisat durch den PEG-Zusatz größere Veränderungen induziert wurden, konnte anhand des Vergleiches der PEG-Extrakte mit ihren Ursprungsproben erhaltenen Werte ersichtlich. Es wurden für alle Extrakte Veränderungen im Umfang von 16-23 % festgestellt.

Proben Nr.	12	13	14	15	16	17	18	19
10	1	0,84	0,59	0,68	0,76	0,74	0,71	0,68
11	0,84	1	0,51	0,56	0,64	0,63	0,64	0,61
12	0,59	0,51	1	0,82	0,63	0,67	0,63	0,5
13	0,68	0,56	0,82	1	0,74	0,72	0,68	0,6
14	0,76	0,64	0,63	0,74	1	0,84	0,76	0,73
15	0,74	0,63	0,67	0,72	0,84	1	0,7	0,67
16	0,71	0,64	0,63	0,68	0,76	0,7	1	0,77
17	0,68	0,61	0,5	0,6	0,73	0,67	0,77	1

Tabelle 13 - Matching der SDS-PAGE-Bandenspektren. Eine 1 bedeutet 100 % Übereinstimmung und erhält man durch Vergleich der Probe mit sich selbst. Den Grad der Übereinstimmung mit den anderen Proben kann man links bzw. rechts neben der Vergleichsprobe in der Waagerechten ablesen. Die Probe 15 ist im Beispiel weiß hinterlegt.

4.4.1 Verwendung dissoziierender Reagenzien am Beispiel

Dithiotreitol (DTT)

Zu Beginn der Untersuchungen wurden einige elektrophoretische Trennungen durch die Zugabe von DTT (25 mM/L) unter sog. dissoziierenden Bedingungen durchgeführt. Erst DTT bewirkt die weitestgehende Streckung der Proteinstränge. Hierdurch werden bestehende Disulfidbindungen gekappt und die entstehenden SH-Gruppen geschützt, wodurch eine Rückfaltung und Aggregation verhindert wird [162]. Entsprechend behandelte Proben lassen durch die erhöhte Fragmentierung vor allem im niedermolekularen ein differenzierteres Spektrum mit erhöhter Bandenanzahl Bereich erwarten.

Die untersuchten Milbenextrakte (Proben 16, 17, 18 und 19) verhalten sich unter den skizzierten Bedingungen konträr. In Abbildung 10 wird je ein Coomassie gefärbtes Bandenmuster für eine Behandlung mit (links) und ohne (rechts) DTT-Zugabe gezeigt. Die Proben A-AD, B-BD, C-CD und D-DD bilden Probenpaare, die sich nur im Zusatz an DTT unterscheiden. Alle anderen Parameter wie Konzentration, Gelkonstitution, Lauf- und Färbebedingungen waren identisch. Die Reihe M zeigt den Molekulargewichtsmarker.

Ohne DTT zeigten die Proben über den gesamten Trennbereich das eindeutig differenzierte und reichhaltigere Bandenspektrum. Die Zugabe von DTT bewirkte hingegen ein „verwischen“ der Banden. Unterhalb von 14,4 kDa und oberhalb 94 kDa fehlen ganze Bereiche des Spektrums. Im Bereich zwischen 14,4 kDa und 94 kDa fehlen Banden komplett bzw. sind nur sehr undeutlich zu erkennen. Die beobachteten Veränderungen sind ein Indiz für vorhandene Disulfidbrücken, zudem ist für DTT eine Cysteinprotease aktivierende Wirkung bekannt.

Das hier in aller Kürze beschriebene Phänomen ist aus der Literatur bekannt [198, 193] und bislang nur für Milbenextrakte beobachtet worden. Normalerweise

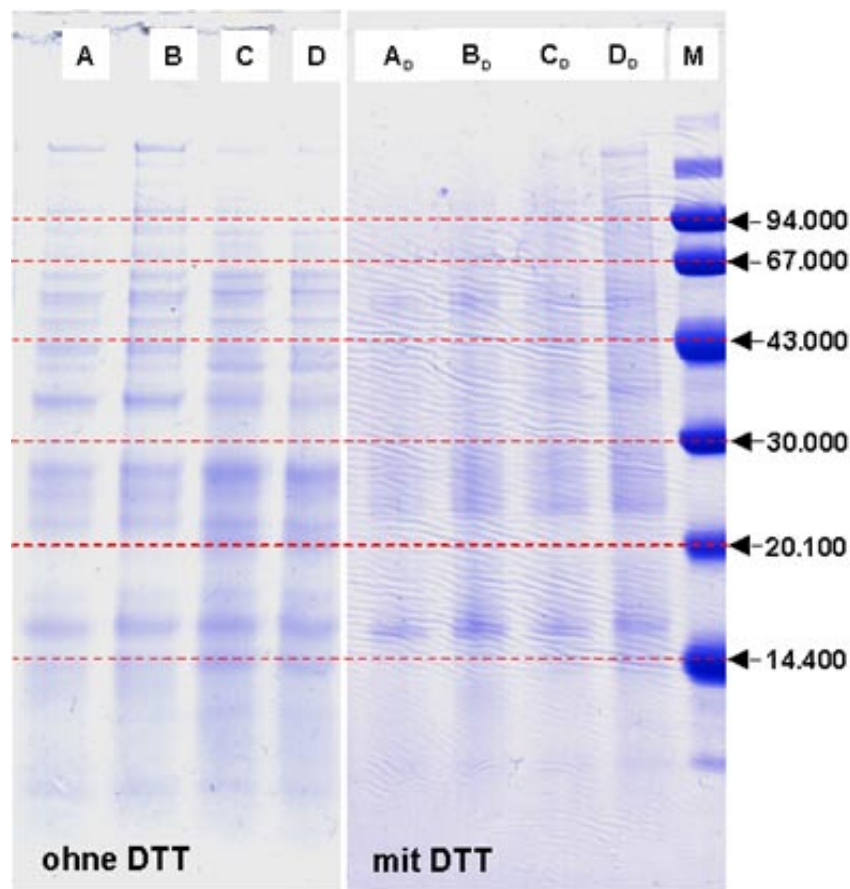


Abbildung 10 – Die Verwendung dissozierender Reagenzien am Beispiel Dithiotreitol (DTT). Die Proben (Lyophilisate) wurden auf der linken Seite ohne und auf der rechten Seite mit DTT aufgetrennt. A. Allergon (16), B. Allergon + 10 % PEG (17), C. CSL (18), D. CSL + 10 % PEG (19), M. Low Molecular Marker.

werden Allergenextrakte, wie z.B. aus Schimmelpilzen oder Gräsern unter dissoziierenden Bedingungen analysiert [199].

Abschließend ist festzuhalten, dass auch die Solubilisierung durch SDS Veränderungen in der Probe hervorruft, wie z.B. hochmolekulare Fragmente, allerdings nicht in dem Umfang, wie durch den DTT-Zusatz. Sind nach der elektrophoretischen Trennung Untersuchungen beabsichtigt, die biologisch aktive Proteine benötigen, so ist eine Native Elektrophorese zu bevorzugen.

4.4.2 Unregelmäßigkeiten der Standardallergene

Die in dieser Arbeit in der SDS-PAGE und im Immunoblot verwendeten Standardallergene Der p 1 und Der p 2 kamen als Routinestandards in der Chromatographie, der Elektrophorese und in immunologischen Verfahren, wie z.B. ELISA, im Pharmaunternehmen zum Einsatz. Sie wurden affinitätschromatographisch aus Standardextrakten isoliert.

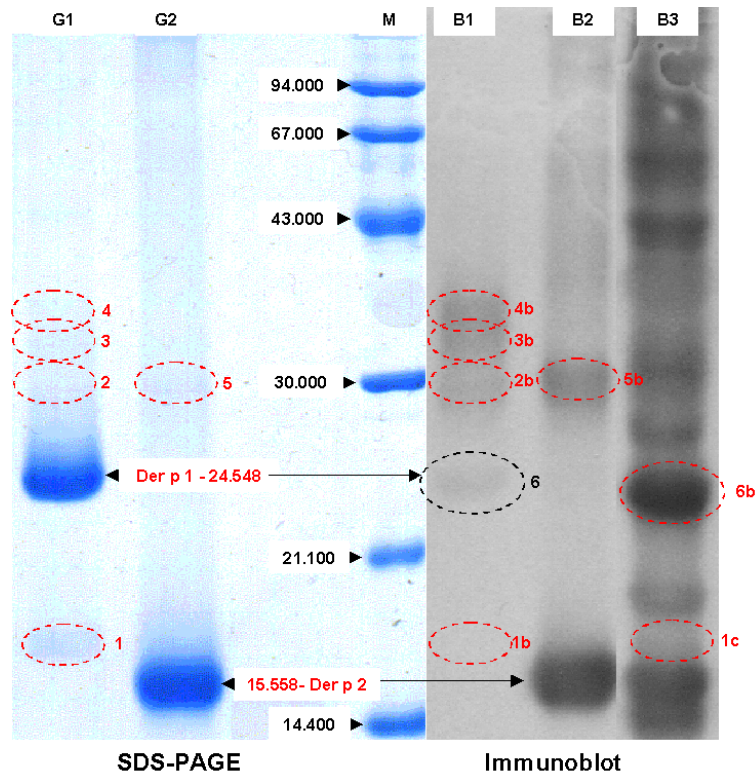


Abbildung 11 - Unregelmäßigkeiten der Standardallergene. Die Reihen G1 und G2 zeigen den SDS-PAGE-Ausschnitt von Der p 1 bzw. Der p 2, die Reihen B1 und B2 die entsprechenden Blotergebnisse. Das Blotergebnis der *D. pteronyssinus* „Hausreferenz“ (Probe 1) zeigt Reihe B3, den Molekulargewichtsmarker Reihe M.

In der Anwendung zeigten sich vor allem für Der p 1 verschiedene Unregelmäßigkeiten (Abbildung 11-Reihe G1). Neben der erwarteten kräftigen Bande bei 24,5 kDa wurden in der SDS-PAGE vier weitere Banden bei 16,5 (Nr. 1), 30 (Nr. 2), 32 (Nr. 3) und 34 kDa (Nr. 4) festgestellt. Allerdings zeigte die 24,5 kDa Bande nur eine sehr schwache Immunreaktion (Abbildung 11-Reihe B1), die weder in Umfang noch Intensität mit der "SDS-PAGE-Bande" vergleichbar war (Nr. 6). Bei 16,5 kDa (Nr. 1b) konnte keine Reaktion festgestellt werden, alle weiteren Banden (Nr. 2b, 3b, 4b) zeigten eine positive Resonanz auf das Poolserum. Es wird angenommen, dass die zusätzlichen Banden bei höherem Molekulargewicht Aggregate aus Fragmenten der 24,5 und der 16,5 kDa Banden bestehen, die auch im Gesamtextrakt nachgewiesen wurden (Abbildung 11-Reihe B3). Aufgrund der

bekannten Proteaseaktivität von Der p 1, könnte die niedermolekulare Bande ein proteolytisches Fragment sein.

Im Gegensatz hierzu, zeigte der Referenzextrakt (Probe 1) eine der SDS-PAGE an Umfang und Anfärbungsgrad vergleichbare Reaktion mit dem bekannten Poolserum (Nr. 6b). Dies lässt vermuten, dass an der starken Reaktion bei 24,5 kDa neben Der p 1 auch andere Allergene beteiligt sein müssen. Aus Tabelle 1 („Klassifizierung der Milbenallergene“) wird ersichtlich, dass im Bereich 22-27 kDa mit den Allergenen Der p 6 (25 kDa), Der p 7 (22 kDa), Der p 8 (26 kDa) und Der p 9 (24 kDa) fünf weitere Allergene aus der Literatur bekannt sind. Diese Annahme wird durch eine Analyse des frischen *D. pteronyssinus* Extraktes (Probe 26) mittels MALDI-TOF-MS belegt, der eine Vielzahl deutlicher Peaks im Bereich 22-27 kDa zeigte (Abbildung 12; Klammer A). Es wird daher angenommen, dass die verschiedenen Banden in der SDS-PAGE als „eine Bande laufen“ und nicht differenziert werden. Des Weiteren ist es denkbar, dass sich die verschiedenen Allergene im Extrakt gegenseitig in ihrer Aktivität beeinflussen. Die für Der p 1 aus der Literatur bekannte Frequenz spezifischer IgE-Bindung von >80 % (Tabelle 1) ist somit in Frage zu stellen. Es handelt sich vielmehr um die Summe der Aktivitäten verschiedener Allergene. Eine Auftrennung und Zuweisung des Anteils einzelner Allergene an der Gesamtaktivität könnte z.B. durch eine 2D-Elektrophorese mit anschließender Immundetektion erfolgen.

Der Gelausschnitt des Der p 2 Standards (Abbildung 11-Reihe G2) zeigte neben der kräftigen Bande bei 15,6 kDa nur eine weitere schwache Bande bei 30 kDa (Nr. 5), wobei es sich um ein Dimer handeln dürfte. Beide Banden wurden in vergleichbaren Intensitäten im Immunoblot nachgewiesen (Abbildung 10-Reihe B2). Im Massenspektrum konnten bei 15 kDa wiederum mehrere intensive Peaks nachgewiesen werden (Abbildung 12; Klammer B). Da aber die Intensitäten in der SDS-PAGE und des Immunoblots übereinstimmen, ist bei affinitätschromatographischer Isolierung des Standards anzunehmen, dass hauptsächlich Der p 2 allein für die Immunreaktion verantwortlich ist.

Abschließend ist festzustellen, dass aufgrund der hier aufgezeigten Ergebnisse die Massenbestimmung mittels MALDI-TOF-MS der durch SDS-PAGE eindeutig überlegen war.

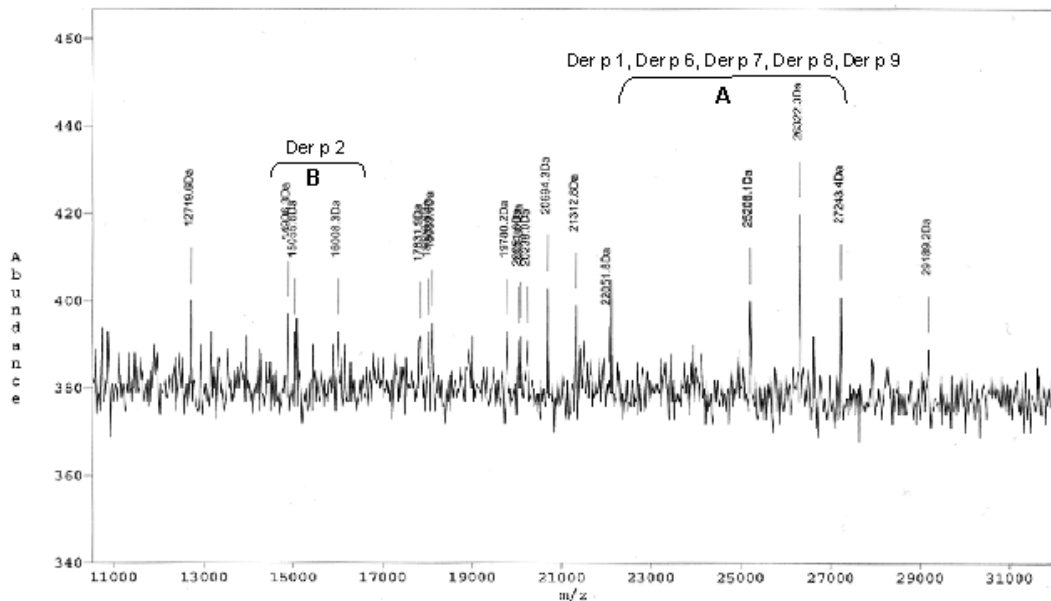


Abbildung 12 - Ausschnitt des MALDI-TOF-Massenspektrum eines frischen *D. pteronyssinus* Extraktes (Laserenergie 0,48 μ J; positive Polarität; Matrix Sinapinsäure). Gekennzeichnet sind die Molekulargewichtsbereiche um die Majorallergene Der p 2 (B) und Der p 1 (A).

4.5 NATIVE ELEKTROPHORESE

Die Native Elektrophorese wurde mit dem Ziel eingesetzt, Fragmentierungsmuster der Extraktproteine in ihrer nativen funktional gefalteten Form, vergleichbar der Ausschlusschromatographie, zu erhalten. Der Verzicht auf SDS sollte ermöglichen, die Proteine ohne Verlust ihrer allergenen Aktivität ihren wahren Molekulargewichten zuzuordnen. Die gewünschten Ergebnisse wurde aber nur in einem sehr geringem Umfang erzielt, da eine zufriedenstellende Auftrennung der Proteine nicht erreicht werden konnte. Abbildung 13 zeigt exemplarisch ein mit Silber gefärbtes Gel nach 185 min Trennzeit. Es waren nur sehr schwache Banden im niedermolekularen (1.0-2.5 kDa) und hochmolekularen Bereich (67-90 kDa) erkennbar. Tabelle 14 zeigt die vollständige Liste der gefundenen Banden, wobei die Anzahl hochmolekularer Banden als ein Indiz für nicht dissoziierte „Mutterallergene“ angesehen wurde.

Aufgrund des fehlenden SDS-Zusatzes besaßen die Proteine ihre ursprüngliche spezifische Oberflächenladung pro Volumen. Daraus resultierende starke Interaktionen der Proteine untereinander und ihre ähnlichen pk-Werte führten zur schlechten Differenzierung, da sich große und kleine Komponenten gegenseitig in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit beeinflussten. Dass es sich hier eher um eine probenspezifische Problematik handelte, wurde anhand des entschieden besser aufgetrennten Standards erkennbar. Der methodenbedingte verminderte

Sieffekt erlaubte allerdings auch für die Standards im Bereich 14,4-43 kDa nur eine unzureichende Differenzierung. Die durchschnittliche Proteinbeladung von ~6 µg je Probe war trotz einer Silberfärbung für diese Problemstellung wahrscheinlich zu gering. Eine proteolytische Aktivität während der langen Trennungszeit muss aufgrund der gut sichtbaren niedermolekularen Banden angenommen werden.

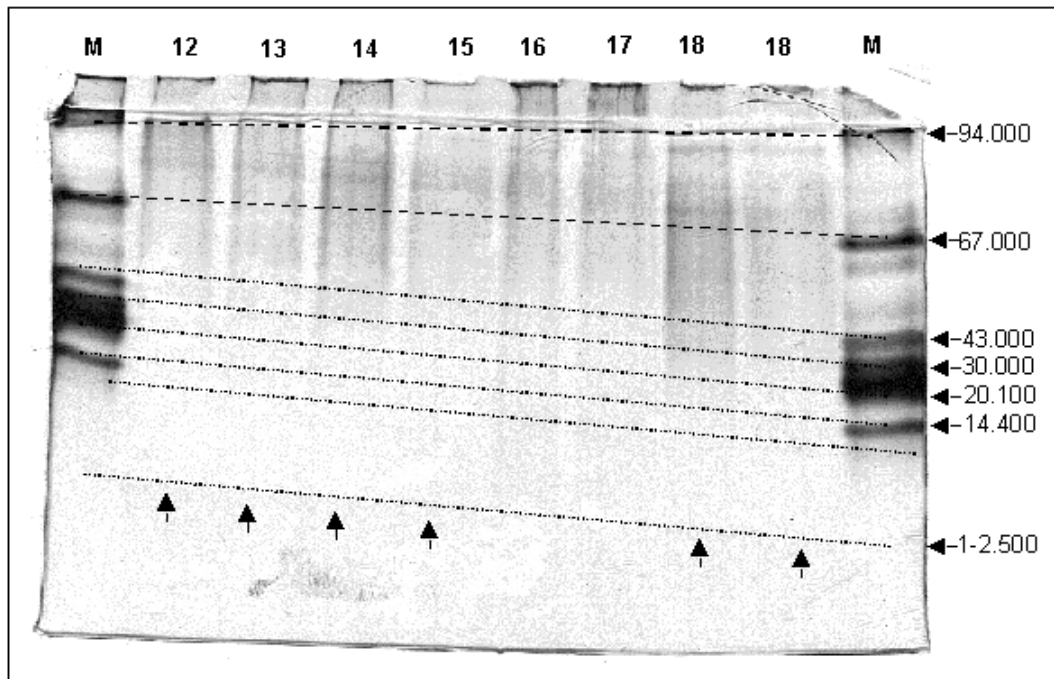


Abbildung 13 – Auftrennung der Extrakte unter nativen Bedingungen. Die Reihe M ist der Molekulargewichtsmarker. Die Ziffern oberhalb des Gels entsprechen den Probennummern der Tabelle 14.

Spezies Hersteller Proben-Nr. [kDa]	Frische Extrakte				Lyophilisierte Extrakte			
	<i>D. pteronyssinus</i>		<i>L. destructor</i>		<i>D. pteronyssinus</i>		<i>D. pteronyssinus</i>	
	Allergon		Uni Paderborn		Allergon		CSL	
	12	13 PEG	14	15 PEG	16	17 PEG	18	19 PEG
90	1			1	1	1		
82,5		1			1	1	1	1
78	1	1	1	1				
67	1		1	1	1	1	1	
59							1	1
38,5							1	1
1-2,5	1	1	1	1			1	

Tabelle 14 - Molekulargewichte aus der nativen Elektrophorese

Da die Ergebnisse mit einer hohen Ungenauigkeit behaftet waren, wurden sie in der weiteren Diskussion nicht berücksichtigt.

4.6 ISOELEKTRISCHE FOKUSSIERUNG (IEF)

Die festgestellten isoelektrischen Punkte der Extrakte bewegten sich im Bereich der Standards von pH 4,55 und 8,65 und sind in Abbildung 14 dargestellt. Die im Markergemisch enthaltenen pI-Marker bei 3,5, 3,75 und 9,3 wanderten im Laufe der isoelektrischen Fokussierung über die Gelbegrenzungen hinaus. Tabelle 15 zeigt das sehr bandenreiche und differenzierte Bandenspektrum. Des weiteren

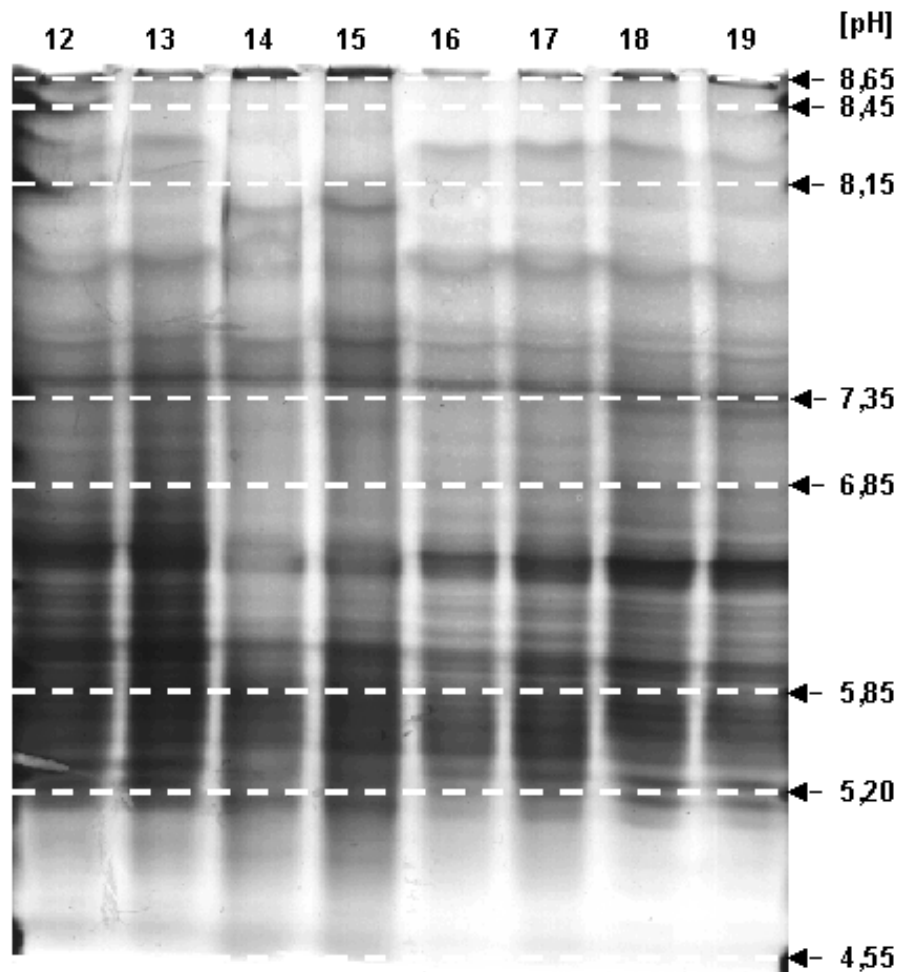


Abbildung 14 – Isoelektrische Fokussierung der Milbenextrakte in einem immobilisierten pH-Gradienten (pH 3-10). Der Unterschied der Vorratsmilbenextrakte (Proben 14, 15) gegenüber den Hausstaubmilben (Proben 12, 13, 16, 17, 18, 19) ist im Bereich von pH 8,15 besonders deutlich zu erkennen.

konnte durch die erzielte Auflösung die beiden Spezies *D. pteronyssinus* und *L. destructor* eindeutig differenziert werden. Außerdem wurden deutliche Unterschiede der Ursprungskulturen innerhalb der Spezies *D. pteronyssinus* anhand der Lyophilisate der Hersteller Allergon und CSL festgestellt (Tabelle 17). Die durch den Extraktionszusatz PEG hervorgerufenen Veränderungen konnten dem Bandenspektrum zugeordnet werden. Die weitaus meisten Proteine der Milbenextrakte lagen im sauren pH-Bereich (~70 %) mit den in allen Extrakten am stärksten ausgeprägten Banden bei pH 6,3, 6,0 und 5,7.

Spezies Hersteller Proben-Nr. pI [pH]	Frische Extrakte				Lyophilisierte Extrakte			
	<i>D. pteronyssinus</i>		<i>L. destructor</i>		<i>D. pteronyssinus</i>		<i>D. pteronyssinus</i>	
	Allergon		Uni Paderborn		Allergon		CSL	
	12	13 PEG	14	15 PEG	16	17 PEG	18	19 PEG
8,65	1					1		
8,46	1							1
8,31		1	1	1			1	1
8,18	1	1					1	
8,07	1		1		1	1		1
7,99					1			
7,81			1	1	1			
7,69	1	1	1	1	1	1	1	1
7,62							4	1
7,39	1	4	1	1	1	4	1	
7,31	1	1	1	1	1	1	1	1
7,26								1
7,13	1	1	1	1	1	1	1	1
7,04	1	1	2				1	1
6,9		1	1	1	1		1	1
6,77			1	1			1	1
6,68	1	1	1	1			1	1
6,57		1	1	1			1	
6,51	1	1					1	1
6,42		1	1				1	1
6,38			1	1		1	1	
6,32	1	1	1	1	1		1	1
6,26					1	1		
6,14	1	1	1	1			1	1
6,1	1	1	1	1	1		1	1
6,06	1	1	1	1	1			1
5,98	1	1	1	1	1	1	1	1
5,87	1	1	1	1	1	1		1
5,83	1	1	1	1	1	1	1	1
5,76	1	1	1	1	1	1	1	1
5,69	1	1	1	1			1	2
5,64	1	1	1	1	1	1	1	1
5,57	1	1	1	1	1	1	1	1
5,48		1	1	1	1	1	1	1
5,37	1	1	1	1		1	1	1
5,34					1	1		1
5,29	1	1	1	1			1	1
5,22			1	1	1	4	1	1
5,1						1		
4,99						1		
4,65	1							
4,57	1	1	1	1				
Statistik der Banden								
\bar{pI}	6,65	6,60	6,53	6,51	6,75	6,32	6,93	6,46
> pH 7	9	7	6	5	7	7	6	9
< pH 7	17	19	21	20	14	14	20	21
Summe	26	26	27	25	21	21	26	30

Tabelle 15 - Bandenspektrum der untersuchten Extrakte – Die IgE-reaktiven pH-Bereiche sind weiß unterlegt, die fett gedruckte Ziffer gibt die Anzahl reaktiver Banden an. Am Ende der Tabelle sind die Gesamtsumme der Banden sowie ihre Verteilung im sauren und alkalischen pH-Bereich dargestellt.

Große visuelle Unterschiede konnten im sauren Bereich weder zwischen den Spezies noch innerhalb der Spezies *D. pteronyssinus*, bzw. zwischen frischen und lyophilisierten Extrakten festgestellt werden. Die auffälligsten Banden im alkalischen Bereich befanden sich für die *D. pteronyssinus* Extrakte (lyophilisiert (Proben 16-19) und frisch hergestellt (Probe 12, 13) bei pH 7,4, 7,7 und 8,3. Ein deutlich zur Hausstaubmilbe differenziertes Bandenspektrum wurde für *L. destructor* (Proben 14, 15) festgestellt. Die auffälligsten Banden der Vorratsmilbe lagen bei pH 7,4 und 7,8. Banden oberhalb pH 8 wurden nicht gefunden. Die durchschnittlichen pI-Werte lagen zwischen 6,5 und 6,9, wobei die Lyophilisate gegenüber den frisch hergestellten Extrakten leicht erhöhte Werte aufwiesen.

Die Inkubation der Extrakte ohne PEG (Proben 12, 14, 16 und 18) mit Patientenserum 10 der höchsten CAP-RAST-Klasse (6) ergab für beide Spezies IgE-reaktive Banden im alkalischen und sauren Bereich, wobei vier von fünf Banden der frischen Extrakte im alkalischen Bereich lagen (Tabelle 16). Die pI-Werte der IgE-aktiven Banden der frischen Extrakte lagen damit um ca. 0,6 Einheiten über dem Summendurchschnitt aller Proteinbanden. Die aktiven Banden der Lyophilisate variierten leicht (Allergon - 0,1; CSL + 0,2) um ihren durchschnittlichen pI-Wert, wobei das Allergon-Lyophilisat durch seinen um ca. 0,6 pH-Einheiten niedrigeren Summen-pI auffiel. In beiden Lyophilisaten (16, 19) konnte eine höhere Bandenanzahl beobachtet werden, als im frisch hergestellten Extrakt (Probe 12).

Proben-Nr	12	14	16	18
pI	8,13 7,72 7,55 7,39 5,45	8,13 7,55 7,21 7,04 5,85	8,13 7,86 7,72 7,39 5,85 5,69 5,45 5,23	8,13 7,86 7,72 7,55 5,86 5,69
\bar{pI}	7,25	7,15	6,65	7,13
Anzahl	5	5	8	6

Tabelle 16 - Auflistung der pI-Werte der IgE-reaktiven Banden

Durch die mit der Lyophilisation einhergehende Fragmentierung könnten Epitope freigelegt worden sein, die bis zu diesem Zeitpunkt im Inneren der Asozialen oder Proteinen verborgen waren. Nach ihrer Freilegung durch das elektrische Feld trugen sie zum erhöhten Bandenspektrum bei. Die hohe IgE-reaktive Bandenanzahl des Allergon-Extraktes (Probe 16) lässt auf eine erhöhte Gesamtreaktivität des Lyophilisates schließen. Untersuchungen zur proteolytischen Aktivität unterstreichen die hohe Potenz gerade des Allergon-Lyophilisates.

Die zum Teil erheblichen Unterschiede der Extrakte konnten durch eine Korrelationsberechnung mit der Auswertesoftware Image Master 1D Elite (Amersham Pharmacia Biotech) nochmals verdeutlicht werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 dargestellt. So wurde zwischen der Hausstaubmilbe *D. pteronyssinus* (Probe 12) und der Vorratsmilbe *L. destructor* (Probe 14) nur eine 68 %ige Übereinstimmung gefunden. Noch geringere Gemeinsamkeiten konnten zu den Lyophilisaten mit 69 % zu CSL (Probe 18) und zur identischen Allergon-Ursprungskultur (Probe 12) lediglich 60 % festgestellt werden. Ergebnisse anderer Untersuchungen in dieser Arbeit (SEC, SDS, MS, Zymogramm) bestätigen die hier festgestellten Veränderungen durch Lyophilisation.

Proben-Nr	12	13	14	15	16	17	18	19
10	1	0,81	0,68	0,67	0,6	0,51	0,69	0,75
11	0,81	1	0,87	0,82	0,68	0,51	0,85	0,86
12	0,68	0,87	1	0,96	0,71	0,63	0,87	0,81
13	0,67	0,82	0,96	1	0,7	0,61	0,82	0,76
14	0,6	0,68	0,71	0,7	1	0,76	0,55	0,67
15	0,51	0,51	0,63	0,61	0,76	1	0,51	0,51
16	0,69	0,85	0,87	0,82	0,55	0,51	1	0,82
17	0,75	0,86	0,81	0,76	0,67	0,51	0,82	1

Tabelle 17 - Korrelation der Extrakte - Gezeigt wird eine typische Korrelationsmatrix. Da der Extrakt mit sich selbst zu 100 % korreliert, wurde er mit 1 bewertet. Die Übereinstimmung der anderen Extrakte mit Ausgangsextrakt kann in den Spalten links und rechts abgelesen werden.

Die Lyophilisate der Spezies *D. pteronyssinus* unterschiedlicher Hersteller (Allergon, Schweden und CSL, Australien) besaßen nur 51 % Übereinstimmung, ein Indiz für Unterschiede in den Ausgangskulturen und/oder durch die Lyophilisation.

Der Einsatz von PEG bewirkte beim frischen *D. pteronyssinus* Extrakt eine um ca. 20 % verringerte Übereinstimmung der Bandenmuster. Selbst die einfache Zugabe von 10 % PEG zur Rekonstitution der Lyophilisate erzielte eine 20 %ige Veränderung. Lediglich auf den *L. destructor* Extrakt schien PEG mit nur 0,04 % Abweichung keinen Einfluss auszuüben.

4.7 IMMUNOBLOTTING

Frisch hergestellte Extrakte von *D. pteronyssinus* (Probe 26) und *L. destructor* (Probe 27) sowie das Allergon-Lyophilisat von *D. pteronyssinus* (Probe 16) wurden mit verschiedenen Patientenseren inkubiert. Aus den in Abbildung 14 gezeigten Ergebnissen sind die Unterschiede in der spezifischen IgE-Bindung zwischen der Vorratsmilbe *L. destructor* (Reihen 1-7) und den beiden Extrakten der

Hausstaubmilbe (Frischer Extrakt: Reihen 8-15; Lyophilisat: Reihen 16-23) klar ersichtlich. Während das Vorratsmilbenpräparat nur ein sehr eingeschränktes Bandenspektrum im niederen Molekulargewichtsbereich zwischen 15 und 24 kDa zeigte, wurde für beide Hausstaubmilbenextrakte ein Spektrum über den gesamten Molekulargewichtsbereich von 13 bis über 150 kDa gefunden. Die Ergebnisse des Immunoblottings werden in den Tabellen 18-20 gezeigt, wobei aus der Literatur bekannte Allergene durch eine grüne Schrift gekennzeichnet, Allergene anderer Spezies blau unterlegt wurden. Konnten Komponenten der untersuchten Extrakte zugeordnet werden, so wurden diese entsprechend farblich gekennzeichnet. Besonders auffällige Banden sind fett gedruckt, besonders schwache Banden unterstrichen.

Immunreaktionen gegenüber *L. destructor* (Tabelle 18) wurden bei 14 und 22 kDa lokalisiert. Die 22 kDa Reaktion korreliert mit Lep d 7, die Reaktion bei 14 kDa kann den Allergenen Lep d 2, Lep d 5 und Lep d 13 zugeschrieben werden. Eine Aussage über den individuellen Anteil an der Gesamtaktivität war nicht möglich. Wie in Tabelle 1 ausgeführt, besteht für Lep d 2 mit ~60 % gegenüber je ~10 % für Lep d 5 und Lep d 13 die höchste IgE-Bindungsfrequenz. Auffällig war, dass neben dem CAP-RAST-negativen Serum Nr. 5 (Tabelle 18-Reihe 1) auch

L. destructor – frischer Extrakt							
Reihe	1	2	3	4	5	6	7
Lep d 7 (22)		<u>22</u>	22	21-23	22		
Lep d 13 (14,6)				<u>18</u>			
Lep d 2 (13,3)			14	14	14		
Lep d 5 (12,5)						<u>14</u>	
RAST-Klasse	0	2	5	4	4	3	4
Serum-Nr.	5	1	2	3	4	6	7

Tabelle 18 - IgE-Reaktionen gegenüber einem frischen *L. destructor* Extrakt (Probe 27) in kDa. Auffällige Banden sind fett unterlegt, schwache Reaktionen sind unterstrichen. Grün markierte Molekulargewichte konnten bekannten Allergenen zugeordnet werden. Bereiche hohen Allergenvorkommens, in denen die Zuordnung aufgrund der Anzahl schwierig war, wurden durch Klammern symbolisiert. Am unteren Ende der Tabelle erfolgte die Zuordnung der Patientenserum mit dem entsprechenden Sensibilisierungsgrad.

das CAP-RAST-4-positive Serum 7 keine Reaktion zeigte, obwohl die anderen CAP-RAST-4 bzw. 5-positiven Seren Reaktionen bei 14 und 22 kDa zeigten. Hier lag entweder ein falsch positives CAP-RAST-Ergebnis und/oder eine Schädigung des Serums vor. CAP-RAST-3-positive Seren reagierten entsprechend des verminderten Sensibilisierungsgrades in geringerem Umfang, wobei Serum 2 (Abbildung 14-Reihe 2) bei 22 kDa und Serum 6 (Abbildung 14-Reihe 5) bei 14 kDa auch individuelle Unterschiede zeigten. Die schwache Färbung bei 18 kDa wurde nur durch Serum 4 (Abbildung 14-Reihe 4) detektiert und konnte keinem be-

kannten Allergen zugeordnet werden. Ob es sich um ein neues Allergen handelt, muss zukünftig untersucht werden.

Die in dieser Arbeit verwendete Kultur von *L. destructor* beinhaltete bis zu 30 % Rückstände des Kulturmediums. Im Rahmen einer Pricktestung während einer früheren Untersuchung zur klinischen Relevanz konnte für die zur Anwendung gekommenen Futterbestandteile keine positive Reaktion ermittelt werden [34].

Die IgE-Reaktionen gegenüber dem frischen *D. pteronyssinus* Extrakt entsprachen in ihrer Breite der Literatur [200] und werden in Tabelle 19 veranschaulicht. Auch hier ergaben die Seren mit den höchsten Sensibilisierungsgraden die umfangreichsten Reaktionen. Auffällig war, dass nur die CAP-RAST-6-positiven Seren Immunreaktionen im Molekulargewichtsbereich ab 70 kDa erzeugten und sich so vom CAP-RAST-5-positiven Serum 1 (Abbildung 14-Reihe 17) erheblich unterschieden. Die Erweiterung der „alten“ vier RAST-Klassen auf sechs CAP-RAST-Klassen macht vor diesem Hintergrund Sinn.

Aus der Literatur ist bekannt, dass eine hohe CAP-RAST-Klasse nicht gleichbedeutend mit einer hohen Reaktivität im Immunoblotting ist [2]. Dies konnte anhand von Serum 8 (Reihe 10) bestätigt werden, das lediglich eine schwache 15 kDa Bande aufwies. Die CAP-RAST-3-positiven Seren 5, 9 und 13 (Reihen 8, 15 und 13) zeigten entweder mehr (Serum 9) oder kräftig ausgebildete Banden (Seren 5 und 13).

Die in Serum 10 (Reihe 14) erhaltene Färbung bei 42 kDa könnte zu dem aus *D. farinae* identifizierten MAG 1 homologe Komponente sein. Im gleichen Serum wurde eine kräftige Komponente bei 44 kDa erhalten, die in keinem anderen Serum nachgewiesen und bekannten Allergenen nicht zugeordnet werden konnte. Alle RAST-6-positiven Seren (15, 11 und 10) zeigten ein 95 kDa Allergen, welche dem aus *D. farinae* bekannten Gruppe 11 Allergen entsprachen und bislang für *D. pteronyssinus* noch nicht beschrieben wurden. Eine Zuordnung der schwachen ~100 kDa Bande des Serums 15 (Reihe 11) konnte nicht erfolgen. Die ebenfalls nur in den CAP-RAST-6-positiven Seren gefundenen ~150 kDa Komponenten könnten dem Gruppe 14 Allergen (189 kDa) aus *D. farinae* entsprechen, da die 150 kDa Bande aufgrund des Fehlers der Molekulargewichtsbestimmung mittels SDS-PAGE bei hohen Werten durchaus höher liegen könnten.

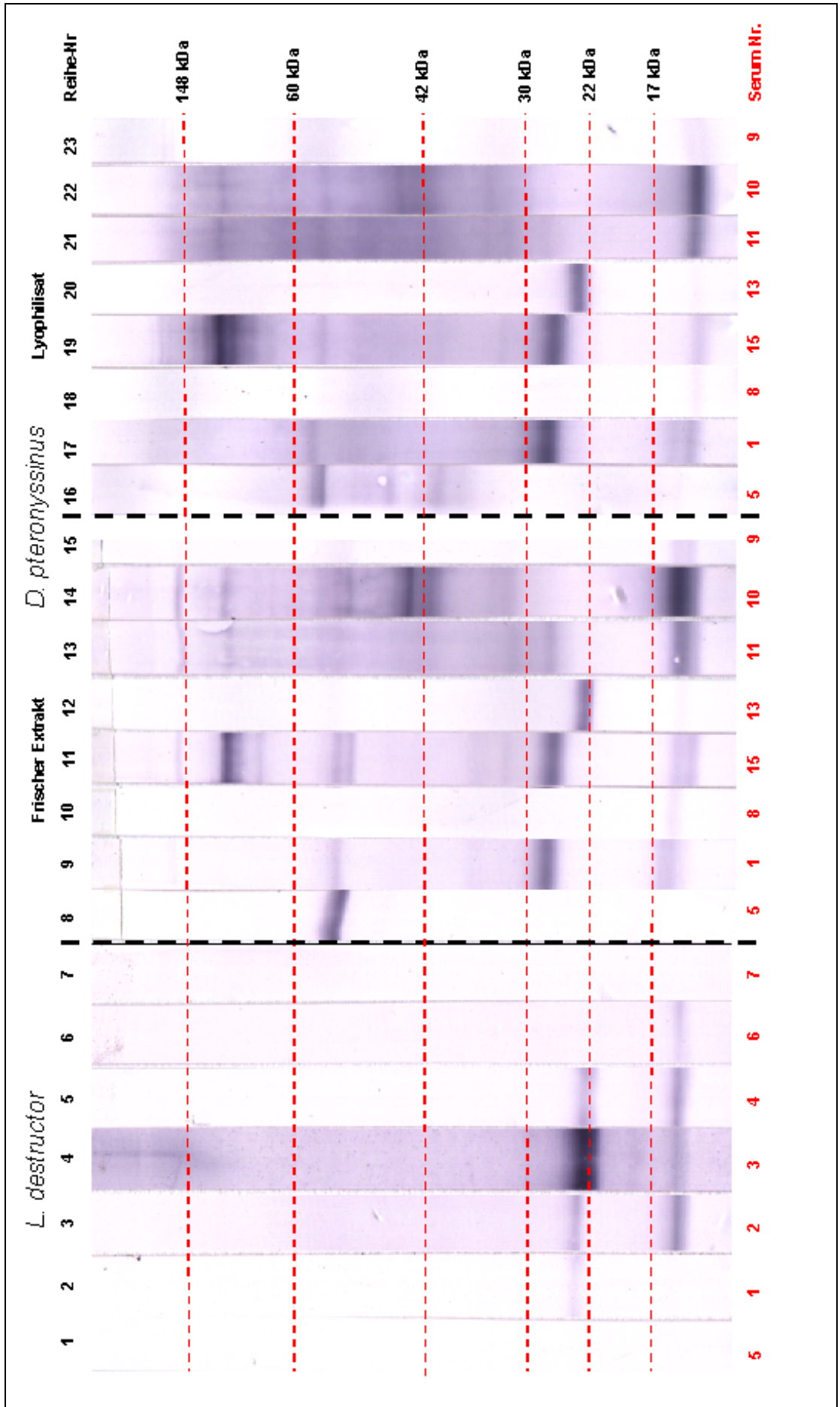


Abbildung 15 – (Seite 96) Immunoblots der Probe 27 – *L. destructor* (Reihen 1-7), der Probe 26 – *D. pteronyssinus* (Reihen 8-15) und der Probe 16 *D. pteronyssinus* Lyophilisat (Reihen 16-23).

Die spezifischen IgE-Reaktionen mit dem *D. pteronyssinus* Lyophilisat (Probe 16) erfolgten mit den aus der Inkubation mit dem frischen Extrakt bekannten Seren in identischer Reihenfolge. Die Ergebnisse sind in Tabelle 20 aufgeführt, wobei sich für die Seren 1, 8 und 13 (Reihen 17, 18 und 20) keine Veränderungen gegenüber dem frischen Extrakt ergaben. Das Serum 5 (Reihe 16) zeigte neben der aus dem frischen Extrakt bekannten 57 kDa Komponente und zwei weitere

D. pteronyssinus – frischer Extrakt								
Reihe	8	9	10	11	12	13	14	15
Gruppe 14 (189)				<u>150</u>		<u>150</u>	<u>150</u>	
				<u>100</u>				
Gruppe 11 (98)				95		95	95	
MAG 29 (67)				70				
				54		<u>54</u>		
Der p 4 (56-60)	53-55	53		52		<u>53</u>	<u>53</u>	53
							44	
MAG 1 (39)							42	
				<u>36</u>				
Der p 10 (33)				<u>32</u>		<u>32</u>	<u>32</u>	
Der p 3 (28-34)								
Der p 8 (26)		25-28						
Der p 6 (25)								
Der p 1 (25)						<u>25</u>		
Der p 9 (24)								
Der p 7 (22)					22-23			
Der p 5 (15)		15-16	<u>15</u>	15				15
Der p 2 (14)				13		14-15	13-15	13
RAST-Klasse	3	5	4	6	3	6	6	3
Serum-Nr.	5	1	8	15	13	11	10	9

Tabelle 19 – IgE-Reaktionen gegenüber einem frischen *D. pteronyssinus* Extrakt (Probe 26) in kDa. Auffällige Banden sind fett unterlegt, schwache Reaktionen sind unterstrichen. Farbige Molekulargewichte konnten bekannten Allergenen (grün für *D. pteronyssinus* und blau für *D. farinae*) zugeordnet werden. Klammern symbolisieren Bereiche hohen Allergenvorkommens, in denen die Zuordnung aufgrund der Anzahl schwierig war. Am unteren Ende der Tabelle erfolgte die Zuordnung der Patientenserum mit dem entsprechenden Sensibilisierungsgrad.

Fragmente bei 33 und 45 kDa. Die Annahme, dass durch die Lyophilisation vermehrt kleinere Fragmente entstehen, wurde durch den Verlust der 150 kDa Komponente in den Seren 10 und 11 (Reihen 22 und 21) bestätigt. Das Spektrum ab 95 kDa zu kleineren Molgewichten blieb bis auf das 25 kDa Fragment des Serum 11 komplett für beide Seren erhalten. Eine erhöhte Fragmentierung zeigte ebenfalls Serum 15 (Reihe 19) durch zusätzliche Reaktionen bei 120 und 25-28 kDa. Gegenüber dem frischen Extrakt fehlten die 36 und 70 kDa Komponenten

und die vormals differenzierten Banden bei 52 und 54 kDa verschmolzen zu einer 55 kDa Bande. Eine ebenfalls durch Serum 15 induzierte Reaktion bei 170 kDa steht im Widerspruch zu der Annahme, das durch eine Lyophilisation eine Fragmentierung großer Proteine in kleinere Untereinheiten forciert wird. Dieses Ergebnis war für Serum 9 (Reihe 15) noch ausgeprägter. Neben dem Verlust der 13 und 53 kDa Banden wurden Reaktionen im Bereich 95 und 150 kDa erhalten, die im frischen Extrakt nicht induziert werden konnten.

D. pteronyssinus - Lyophilisat								
Reihe	16	17	18	19	20	21	22	23
Gruppe 14 (189)				170				
				150				150
				120				
				105				
Gruppe 11 (98)				95		95	95	95
Der p 4 (56-60)	57	57						
				55		54	54	
	45						44	
Der p 10 (33) Der p 3 (28-34)	33			32		32	34	
Der p 8 (26) Der p 6 (25) Der p 1 (25) Der p 9 (24) Der p 7 (22)		28		25-28				
					23-24			
		16						
		15	15	15		15	14-15	15
Der p 5 (15) Der p 2 (14)								
RAST-Klasse	3	5	4	6	3	6	6	3
Serum-Nr.	5	1	8	15	13	11	10	9

Tabelle 20 - IgE-Reaktionen gegenüber einem frisch rekonstituierten *D. pteronyssinus* Lyophilisat (Allergon) in kDa. Auffällige Banden sind fett unterlegt, schwache Reaktionen sind unterstrichen. Farbige Molekulargewichte konnten bekannten Allergenen (grün für *D. pteronyssinus* und blau für *D. farinae*) zugeordnet werden. Klammern symbolisieren Bereiche hohen Allergenvorkommens, in denen die Zuordnung aufgrund der Anzahl schwierig war. Am unteren Ende der Tabelle erfolgte die Zuordnung der Patientenserum mit dem entsprechenden Sensibilisierungsgrad.

Die für das untersuchte Lyophilisat erhaltene spezifische IgE-Reaktivität ist von der Molekulargewichtsverteilung mit dem frischen Extrakt vergleichbar. Ein Hinweis, dass es sich bei den niedermolekularen Allergenen wahrscheinlich um Fragmente größerer Allergenstrukturen handelt, ist die Beobachtung, dass durch die Fragmentierung keine willkürlichen neuen Komponenten entstehen, sondern Untereinheiten mit der Größe bekannter Allergene. Durch die mit der Lyophilisation einhergehende Fragmentierung können zusätzliche Oberflächenepitope für eine IgE-Bindung erschlossen werden, die den Verlust hochmolekularer allergener Bestandteile kompensieren und insgesamt eine für Diagnostik und Therapie ausreichende Reaktivität erhalten wird.

Allgemeine Betrachtung der spezifischen Immundetektion

Für die Vorratsmilbe *L. destructor* wurde das gegenüber der Hausstaubmilbe mit durchschnittlich zwei Immunreaktionen je Serum schwächere Bandenspektrum erhalten. Allerdings standen für die Inkubation gegenüber den *D. pteronyssinus* Extrakten mit CAP-RAST-6-positiven Seren auch hochgradig sensibilisiertes Patientengut zur Verfügung. Vergleichbar sensibilisierte Seren der CAP-RAST-Klassen 3 bis 5 zeigten mit ein bis drei Banden auch ein vergleichbares Reaktionsspektrum. Die für *L. destructor* erhaltenen verschiedenen Verteilungsmuster der IgE-Reaktivität bestätigen, dass gegenüber der Hausstaubmilbe ein eigenständiges Sensibilisierungspotential besteht. Der geringe Verwandtschaftsgrad der Spezies und ein unterschiedliches Expositionsrisiko sorgen für eine weitere

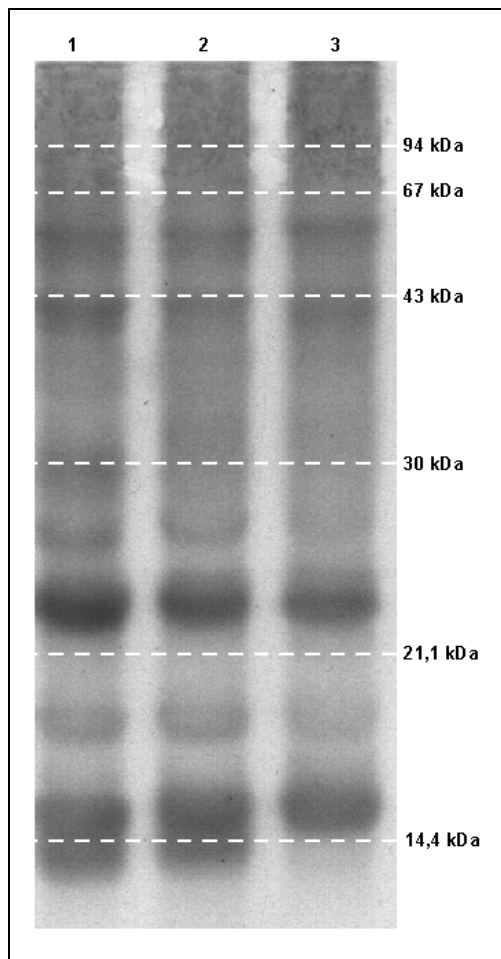


Abbildung 16– Chemilumineszenz Blot.
1. Hausreferenz (Probe 1), 2. CSL-Lyophilisat (2), 3. Allergon-Lyophilisat (3).

Differenzierung. Negative Ergebnisse zur Kreuzreaktivität aus RAST-Inhibitionen zwischen *D. pteronyssinus* und *L. destructor* unterstreichen die Verschiedenartigkeit [201].

Auffällig war, dass die Bindung hochmolekularer Komponenten ≥ 95 kDa ausschließlich durch CAP-RAST-6 positive Seren erfolgte. Grundsätzlich ist die Epitopbindung konzentrationsabhängig und liegt im nanomolaren Bereich. Der Konzentrationsschritt von den Klasse 6-positiven Seren zur Sensibilisierungs-klasse 5 ist hier ausschlaggebend.

Der Befund der Mehrfachsensibilisierung für das Serum 1 aus dem CAP-RAST konnte eindeutig bestätigt werden. Dort war eine Sensibilisierung der Klasse 5 gegenüber *D. pteronyssinus* und der Klasse 2 gegen *L. destructor* festgestellt worden. Diese „klinische Kreuzallergenität“ ist nicht zu verwech-

seln mit einer biochemischen Kreuzallergenität, die Übereinstimmungen in der Epitopstruktur voraussetzt. Das Ergebnis für Serum 5 stimmte mit einem positi-

ven und einem negativen CAP-RAST-Befund für *D. pteronyssinus* bzw. *L. destructor* überein. Das auch für den schwachen Sensibilisierungsgrad 2 ein eindeutiges Ergebnis im Immunoblotting erhalten werden konnte, spricht für die angewandte Methodik.

Eine Einteilung in Major-, Intermediär- und Minorallergene wurde aufgrund der eingeschränkten Serenanzahl nicht durchgeführt. Die bislang in der Literatur angegebenen hohen Bindungsfrequenzen für Der p 1 von ~80 % konnten nicht bestätigt werden. Zusammenfassend mit den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zu verwendeten Standardallergenen wird vermutet, dass es sich bei den Immunreaktionen bei 25 kDa um eine Summenaktivität aus mehreren allergenen Komponenten handelte. Die hohen Bindungsfrequenzen für Der p 2 bei 15 kDa scheinen sich hingegen zu bestätigen, da hier mit Der p 5 nur ein weiteres Allergen aus der Literatur bekannt ist. Die gegenüber Der p 2 geringere Bindungsfrequenz von Der p 1 könnte in einer verminderten Stabilität begründet sein. Die erhöhte Hitzelabilität von Der p 1 ist ein Hinweis hierauf.

<i>D. pteronyssinus</i> – Referenz und Lyophilisate				
Reihe	Referenz	CSL	Allergon	
Gruppe 11 (98)	100	100		
	91			
Der p 4 (56-60)	57	57	57	
MAG 1 (39)	42	42	42	
Der p 10 (33)	<u>29-31</u>			
Der p 3 (28-34)				
Der p 6 (25)				
Der p 9 (24)		25	25	
Der p 1 (25)				
Der p 7 (22)	22	22	22	
	18,5	18,5	18,5	
Der p 5 (15)	15	15	15	
Der p 2 (14)				13
Serum/RAST-Klasse	Standard Poolserum „Pharmaunternehmen“			

Tabelle 21 - IgE-Reaktionen gegenüber der *D. pteronyssinus* Hausreferenz (Reihe 1) und den frisch rekonstituierten Lyophilisaten von CSL (Reihe 2) und Allergon (Reihe 3) in kDa. Inkubiert wurde gegen das Poolserum des Pharmaunternehmens. Auffällige Banden sind fett unterlegt, schwache Reaktionen unterstrichen. Farbige Molekulargewichte konnten bekannten Allergenen (grün für *D. pteronyssinus* und blau für *D. farinae*) zugeordnet werden. Klammern symbolisieren Bereiche hohen Allergenvorkommens, in denen die Zuordnung aufgrund der Anzahl schwierig war.

Vergleicht man die dargestellte Methodik mit der ebenfalls durchgeführten Immunodetektion mit anschließender Chemilumineszenzfärbung (Abbildung 16), so konnte trotz Einsatz eines multivalenten Poolserums durch letztere Methodik nur ein eingeschränktes Spektrum allergener Komponenten nachgewiesen werden (Tabelle 21). Allerdings enthalten Poolseren große Mengen an IgE gegen Majorallergene und wenig gegen Minorallergene. Die IgE gegen Minorallergene schwimmen quasi in einem See von IgE gegen Majorallergene.

4.8 BEURTEILUNG DER PROTEOLYTISCHEN AKTIVITÄT MITTELS ZYMOGRAMM

Zur Einschätzung der Proteaseaktivität wurden neben unmittelbar vor der Bestimmung hergestellte Extrakte aus *D. pteronyssinus* (Probe 26) und *L. destructor* (Probe 27), lyophilisierte *D. pteronyssinus* Extrakte der Hersteller Allergon (Probe 16) und CSL (Probe 18) nach unterschiedlichen Inkubationszeiten durch Casein-Zymogramme untersucht. Die Ergebnisse nach 1,5 und 10 h sind in Abbildung 16 dargestellt. Es zeigten sich erhebliche Unterschiede sowohl zwischen den beiden Spezies als auch innerhalb der Spezies *D. pteronyssinus*, zwischen dem frischen HSM-Extrakt und den beiden Lyophilisaten sowie zwischen den beiden Lyophilisaten.

Die aus der Literatur bekannten Milbenallergene mit Proteaseaktivität sind für *D. pteronyssinus* die der Gruppen 1, 6 und 9 mit je 25 kDa, der Gruppe 3 mit 28 kDa, der Gruppe 4 mit 60 kDa sowie für *L. destructor* der Gruppe 2 mit 14 kDa.

Eine Inkubation von 1,5 h reichte aus, um erste Proteaseaktivitäten bei allen untersuchten Extrakten nachweisen zu können. Die CSL-Probe zeigte schwache Entfärbungen bei ca. 43 kDa und 60 kDa, womit sie lediglich der Gruppe 4 der Literatur entsprach. Für Allergon wurde die stärkste Aktivität aller Proben dieser Kurzzeitinkubation festgestellt. Die identifizierten Banden von 28 bis 43 kDa und 22-25 kDa, sowie einer zusätzlichen schwachen Entfärbung bei ca. 20 kDa entsprachen der Literatur in vollem Umfang. Des Weiteren zeigte sich eine zu höheren Molekulargewichten schwächer werdende, „schweifartige“ Entfärbung. Im frischen HSM-Extrakt konnte lediglich eine gut abgegrenzte Bande bei 43 kDa und leichte Entfärbung bei 60 kDa nachgewiesen werden. Die 43 kDa Bande entsprach nicht der Literatur, wurde aber als Fraktion in der Ausschlusschromatographie gefunden.

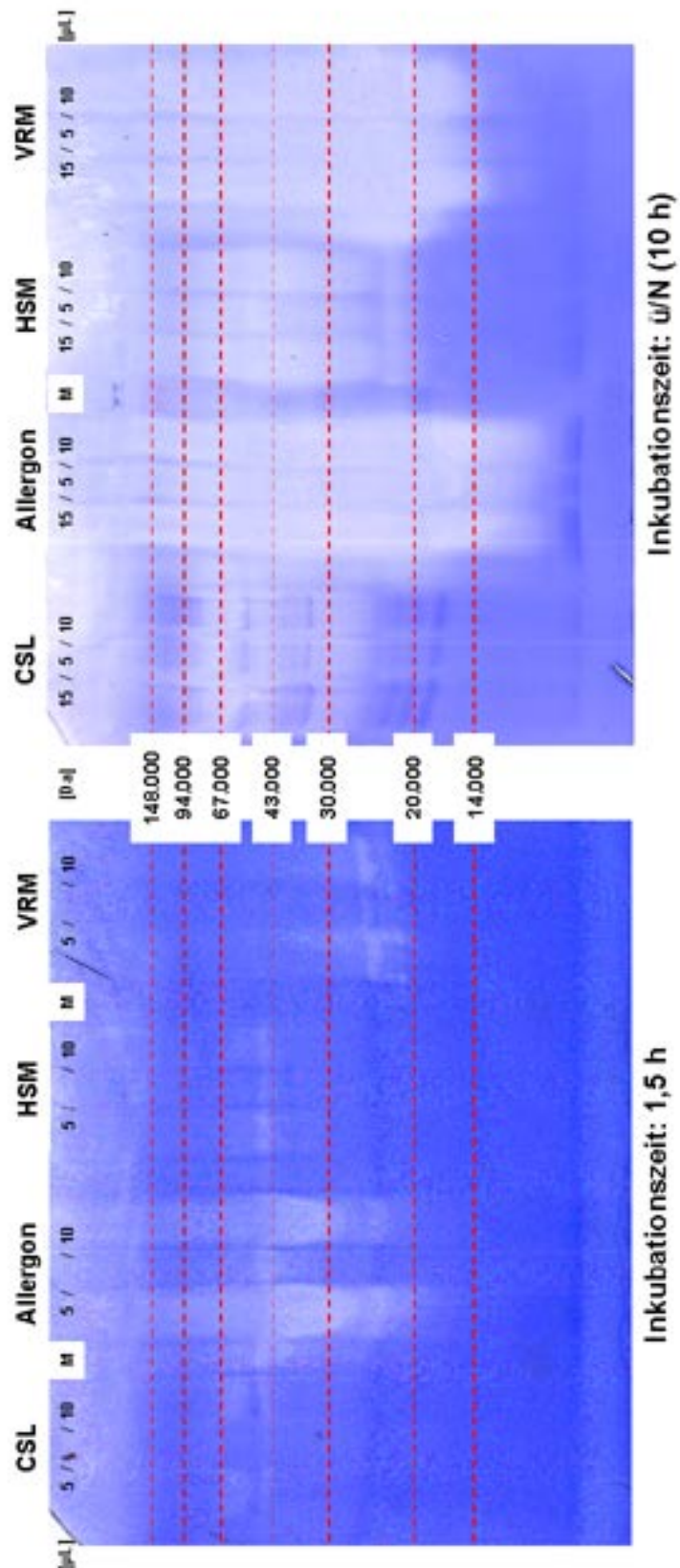


Abbildung 17 – Casein-Zymogramme der Proben 16 (Allergon - *D. pteronyssinus* Lyophilisat), 18 (CSL - *D. pteronyssinus* Lyophilisat), 26 (HSM - *D. pteronyssinus*) und 27 (VRM - *L. destructor*), Probe) nach 1,5 und 10 h Inkubation bei 37 °C.

Die VRM-Probe (*L. destructor*) zeigte eine kontraststarke Bande bei ca. 25 kDa, wodurch sie sich von den anderen Extrakten der Milbe *D. pteronyssinus* unterschied und der Literatur entsprach.

Nach einer Inkubation über Nacht (10 h), entwickelten die Extrakte eine so starke Proteaseaktivität, dass einzelne Probenreihen zum Teil nicht mehr voneinander abgegrenzt werden konnten. Für CSL wurde wieder die schwächste Gesamtaktivität mit den drei Hauptbereichen bei 25-32, 40-50 und ca. 55-75 kDa nachgewiesen und entsprach nun auch der Literatur. Das Allergon-Lyophilisat zeigte eine durchgängige Entfärbung, angefangen von ca. 8 kDa bis zu den Probentaschen. Aufgrund der maximalen Breite der Entfärbung zwischen 20 und 43 kDa, wurde für diesen Bereich die höchste proteolytische Aktivität angenommen. Proteaseaktivitäten unterhalb 25 kDa wurden für Milbenallergene bislang nicht publiziert.

Der frische HSM-Extrakt zeigte, nach der CSL-Probe, die schwächste Gesamtaktivität, die sich neben einer starken Bande bei 22-25 kDa auf die Komponenten zwischen 26 und 75 kDa verteilte. Für den frischen VRM-Extrakt konnte ebenfalls eine durchgängige Entfärbung über den gesamten Bereich oberhalb 14 kDa mit einem Maximum zwischen 20 und 30 kDa ermittelt werden. Kleinere Fragmente <14 kDa wurden nicht gefunden. Die Ergebnisse zeigten, dass *L. destructor* über ein den Hausstaubmilben vergleichbares Spektrum verschiedener Proteasen verfügt, und bekräftigen die bislang einzigen Untersuchungen in Vorratsmilben [86]. Die aktivste Komponente (Entfärbung nach 1,5 h) frischer Extrakte der Hausstaubmilbe *D. pteronyssinus* lag bei ca. 43 kDa und die der Vorratsmilbe bei ca. 25 kDa.

Generell konnten Unterschiede zwischen den verschiedenen Konzentrationen einzelner Extrakte bis auf eine Ausnahme (Allergon nach 1,5 h) nicht festgestellt werden. Für die geringere Probenkonzentration (5 µL) wurde bei der Allergonprobe nach 1,5 h Inkubationszeit eine stärkere Entfärbung beobachtet als für die doppelt so hohe Konzentration (10 µL). Es kann deshalb angenommen werden, dass auch der Einsatz kleinster Konzentrationen zu einer vollständigen Umsetzung des Substrates Casein führte.

Die Gegenüberstellung eines frisch hergestellten Extraktes (HSM) mit seinem lyophilisierten Pendant (Allergon) ergab eine auch nach kurzer Zeit (1,5 h) eindeutig höhere Aktivität für das Lyophilisat. Durch die Gefriertrocknung scheinen Epitope mit proteolytischer Funktion nicht zerstört, sondern aus dem Inneren der Proteine freigelegt zu werden. Sie tragen dann zu einer erhöhten proteolytischen

Gesamtaktivität der Lyophilisate bei. Der grundsätzlich gegenüber frischen Extrakten erhöhte Anteil niedermolekularer Komponenten wurde in der Ausschlusschromatographie eindeutig festgestellt. An den Ergebnissen des Immuno-blottings ist erkennbar, dass eine hohe Proteaseaktivität nicht mit einer hohen immunologischen Aktivität, bzw. Allergenität, gleichzusetzen ist. Hieraus zu folgern, dass Lyophilisate grundsätzlich die höher Proteaseaktivität besitzen, ist falsch und wird eindeutig durch den Vergleich der beiden Lyophilisate CSL und Allergon widerlegt. Die CSL-Probe zeigte die geringste Aktivität bei gleichzeitig am besten differenziertem Bandenmuster aller Extrakte. In der Ausschlusschromatographie zeigte sie die für ein Lyophilisat typische Verschiebung hin zu kleineren Molekulargewichten. Im Vergleich zum Allergon-Lyophilisat fragmentierte die CSL-Probe allerdings in einen 10 % höheren Anteil in 900 Da Komponenten, der Anteil der 1.8 kDa Fraktion war hingegen um 14 % erniedrigt. Bei einem unteren Molekulargewicht von ca. 1.2-1.8 kDa für ein funktionales Epitop könnte der geringere Anteil des 1.8 kDa Fragments ein Grund für die verminderte Proteaseaktivität sein.

Weitere Gründe für die verminderte Aktivität könnten die unterschiedliche Herkunft der Milbenkultur (Allergon, Europa vs. CSL, Australien) [64] und/oder ein anderer Entnahmzeitpunkt der Probe aus der Zuchtkultur des Herstellers sein, wodurch der Proteasegehalt stark variieren könnte [159].

Die eingeschränkten Möglichkeiten und die Ausrichtung dieser Arbeit erlaubten nur einen geringen Einblick in die Problematik. Dass Proteasen eine entscheidende Rolle in der Allergieentstehung spielen, wurde an früherer Stelle dieser Arbeit ausgeführt (siehe „Funktion und Allergenität“).

4.9 MALDI-TOF-MS

Die massenspektroskopische Untersuchungen ergaben sehr gute Ergebnisse, so dass selbst aus direkt applizierten Gelstücken ein aussagefähiges Spektrum erhalten werden konnte. Aufgrund insgesamt zu niedriger Konzentrationen konnten allerdings nur nicht reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden, die an dieser Stelle keiner weiteren Betrachtung unterzogen wurden. Allerdings ist festzuhalten, dass die Polyacrylamidmatrix kein störendes Untergrundsignal mit der vorliegenden Probenkonstellation erzeugte und in zukünftigen Untersuchungen eine aufwendige Probenvorbereitung entfallen kann.

Durch die Massenspektrometrie wurde in kurzer Zeit sehr umfangreiches Informationsmaterial erhalten, so dass im Rahmen dieser Arbeit nur ausgewählte Ergebnisse vorgestellt werden konnten. Oberhalb der gezeigten Molmassenbereiche (>200 kDa) konnten in keinem Spektrum Komponenten lokalisiert werden. Da die kleinste immunreaktive Komponente bei ~14 kDa erhalten wurde, ergab sich eine untere Begrenzung der Spektren bei ~10 kDa.

Den IgE-spezifischen Reaktionen der eigenen Immunoblots konnten ausnahmslos exponierte Peaks in den Massenspektren zugeordnet werden. Die Abbildungen 16, 17 und 18 führen die Ergebnisse des Immunoblotting mit den MALDI-TOF-Untersuchungen für den frischen *L. destructor* Extrakt (Probe 29) und sowie den frischen Extrakt (Probe 28) und das Lyophilisat (Probe 16) aus *D. pteronyssinus* jeweils in einer Grafik zusammen.

Das für *L. destructor* (Abbildung 18) erhaltene Massenspektrum zeigt über die gesamte Breite exponierte Peaks, die in Intensität und Anzahl mit dem *D. pteronyssinus*-Spektrum vergleichbar waren. Trotz der gefundenen hochmolekularen Komponenten, konnten spezifische Immunreaktionen gegenüber *L. destructor* in den zur Verfügung stehenden Patientenseren nur im niedermolekularen Bereich festgestellt werden. Betrachtet man den Massenbereich bei ~15 kDa genauer, so ist aufgrund der Peakintensitäten zu vermuten, dass für die intensive Immunreaktion vor allem Lep d 2 verantwortlich war und Lep d 5 bzw. Lep d 13 nur untergeordnete Beiträge leisteten. Durch die Kombination einer 2D-Elektrophorese mit Immunoblotting und Massenspektrometrie könnte hier endgültige Klärung erzielt werden. Die aus der Literatur bekannten und bislang nicht namentlich klassifizierten Komponenten bei 79 (Lep d ?a) und 93 kDa (Lep d ?b) ergaben keine IgE-spezifische Reaktion, konnten durch die Massenspektrometrie aber im Extrakt lokalisiert werden. Auch der Immunreaktion bei ~18 kDa konnte ein exponierter Massenpeak zugeordnet und somit ein falsch positives Ergebnis im Immunoblot ausgeschlossen werden. Ob es sich hierbei um ein bislang unbekanntes Allergen handelt, muss zukünftig untersucht werden.

Der *D. pteronyssinus* Extrakt (Abbildung 19) zeigte ein Molmassenspektrum entsprechend seiner Reaktionen im Immunoblot bis in den hohen Massenbereich. Alle aus der Literatur für *D. pteronyssinus* bekannten Allergene bis auf Der p 9 (~24 kDa) konnten im eigenen Extrakt zugeordnet werden. Schon im Immunoblotting wurden die bislang nur für *D. farinae* bekannten Allergene MAG 39, MAG 29 sowie das Gruppe 11 Allergen spezifischen Reaktionen zugeordnet. Durch das Massenspektrum konnten auch hier falsch positive Reaktionen aus dem Immunoblotting ausgeschlossen werden.

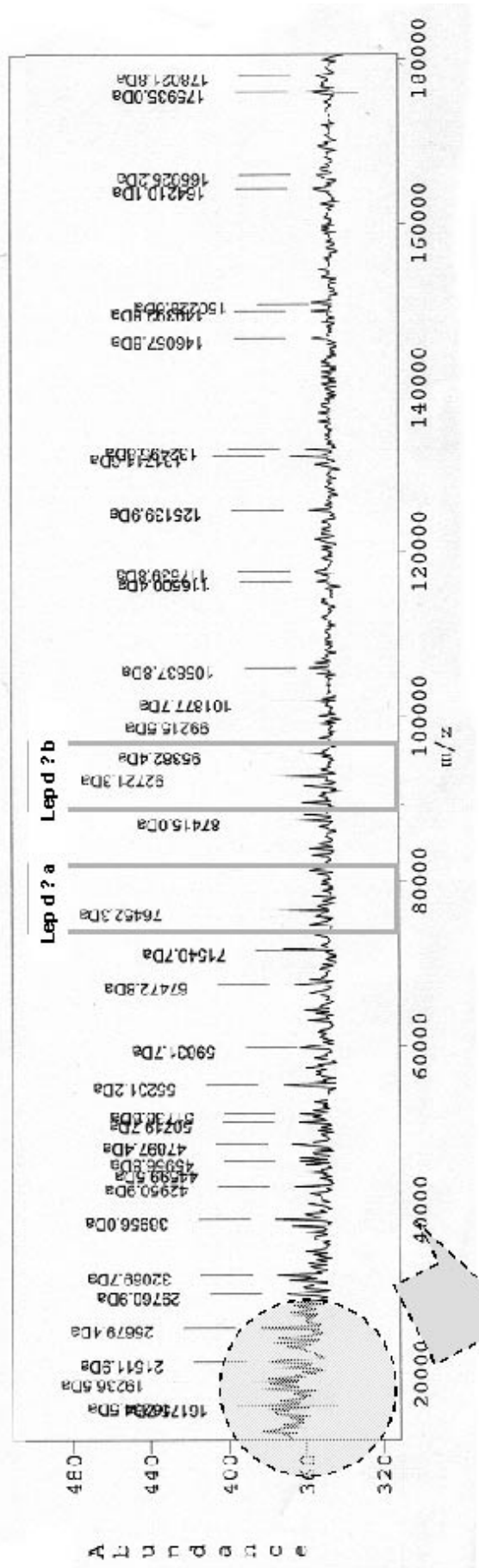
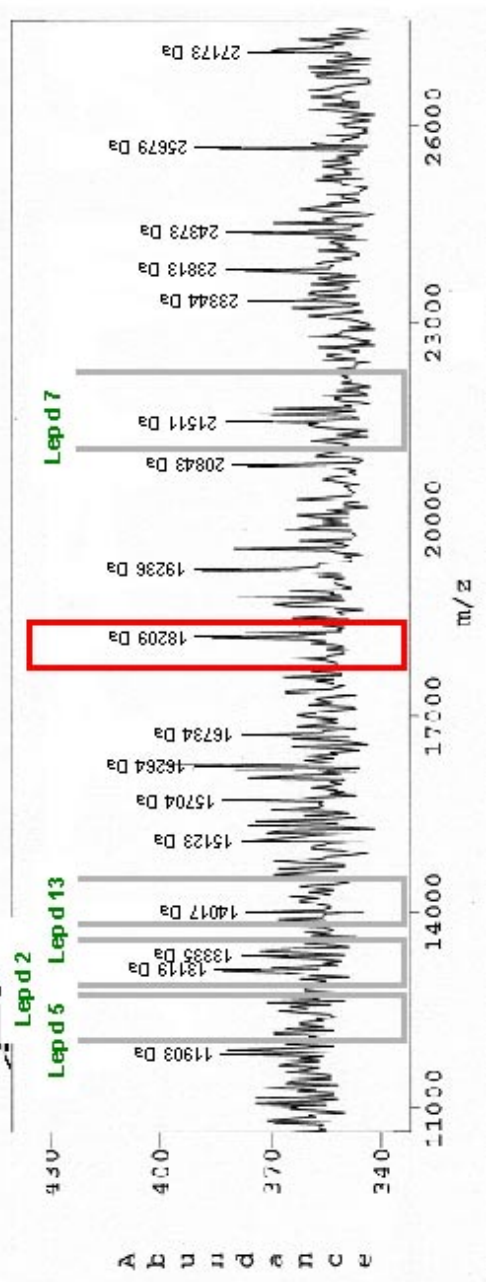


Abbildung 18



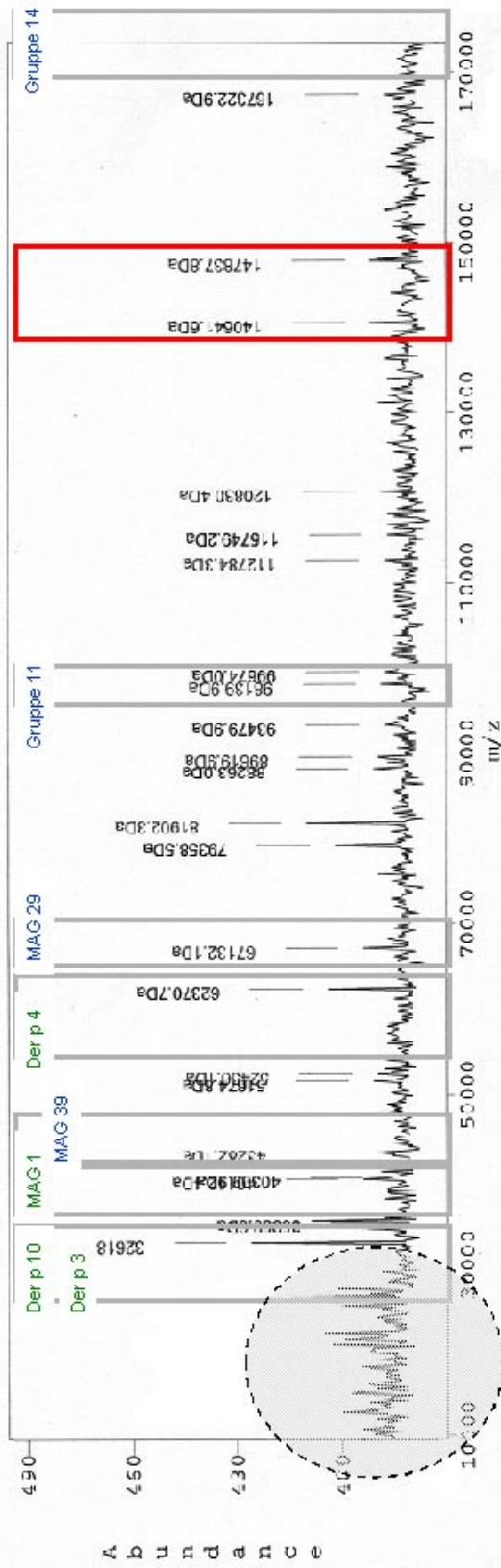


Abbildung 19

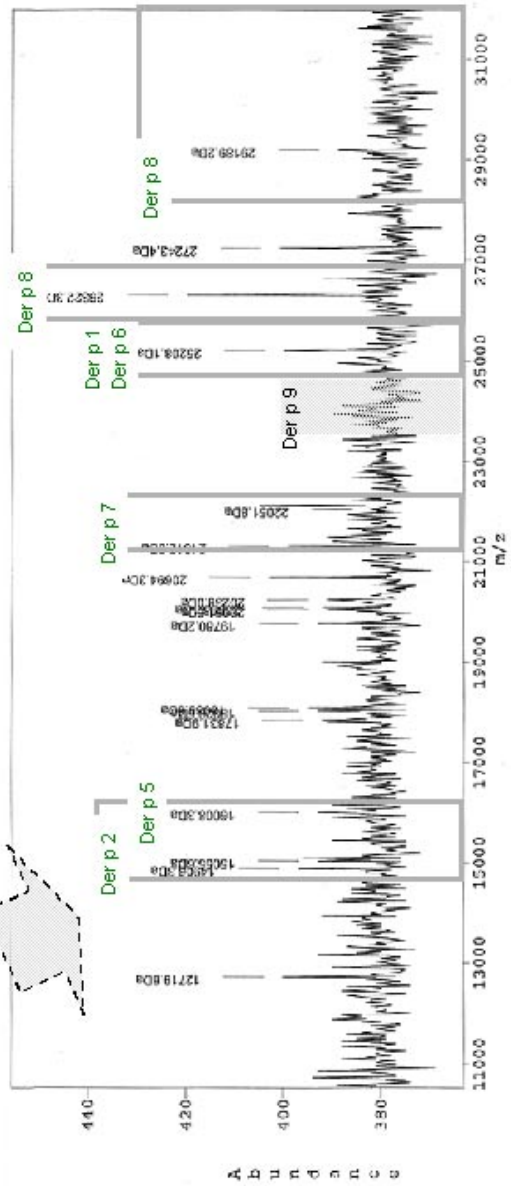


Abbildung 18 – (Seite 106) MALDI-TOF Spektrum (negative Polarität) des frischen *L. destructor* Extraktes. Matrix: Sinapinsäure; Laserenergie 0,59 µJ. Die Molekularbereiche der aus der Literatur bekannten Allergene sind grau hinterlegt. Die Farbauswahl der Kennung verdeutlicht das Blotergebnis: positiv (grün), negativ (schwarz). Der rot unterlegte Bereich zeigte ein positives Blotergebnis, für das kein Allergen aus der Literatur bekannt war. Ob der Massenpeak 167.322,9 Da das Gruppe 14-Homolog (177 kDa, 189 kDa cDNS) zu *D. farinae* war, lies sich nur vermuten. Der Immunreaktion bei ~150 kDa konnten zwei exponierte Peaks zugeordnet werden, wobei hier zu klären ist, ob es sich um neue Allergene handelte.

Abbildung 19 – (Seite 107) Das Spektrum des Allergon-Lyophilisates von *D. pteronyssinus* zeigte im direkten Vergleich mit dem frischen Extrakt Peaks geringerer Intensität. Die in der Immunreaktion zusätzlich gezeigte Reaktion bei ~170 kDa konnte eindeutig zugeordnet werden. Der frische Extrakt zeigte in dem Bereich nur einen schwachen Massenpeak bei 167 kDa, so dass die dort fehlende Reaktion erklärt werden konnte. Sowohl das Lyophilisat als auch der frische Extrakt zeigten Massenpeaks bei 120 kDa. Allerdings zeigte nur das Lyophilisat ein eindeutiges Immunsignal. Die geringe Massendifferenz von 1495 Da lässt vermuten, dass durch die Lyophilisation einige Aminosäuren abgespalten wurden, so dass ein Epitop zur spezifischen IgE-Bindung freigelegt oder geschaffen werden konnte. Hierzu passend sind Ergebnisse der Ausschlusschromatographie, die eine Anreicherung mit Fragmenten dieser Größe ergaben.

Die Intensität der Massenpeaks des CSL-Lyophilisates von *D. pteronyssinus* (Abbildung 20, A) war mit der des Allergon-Lyophilisates (Abbildung 20, B) vergleichbar. Waren in der Ausschlusschromatographie noch vergleichbare Verteilungsmuster erhalten worden, so ergaben sich deutliche Unterschiede in der Verteilung der Massen. Insgesamt und besonders im hochmolekularen Bereich zeigte das CSL-Produkt weniger Massenpeaks. Jede Probe zeigte einen individuellen Fingerprint, so dass eine Differenzierung nach Ursprungskultur trotz gleicher Spezies effektiv und sicher möglich war. Zur Veranschaulichung wurden einige Gemeinsamkeiten beider Lyophilisate in der Grafik grün, gravierende Unterschiede rot markiert. Der auffällige Intensitätsanstieg der Massenpeaks unterhalb ~8 kDa ist ein weiteres Indiz für die mit der Lyophilisation einhergehende Fragmentierung.

N-Glykane wurden in keinem der untersuchten Extrakte gefunden. Charakteristische Peaks dieser Stoffklasse bilden ein wiederkehrendes Muster ab 120 kDa aufwärts im Abstand der Masse eines Glykanrestes (~150 Da).

Zum Abschluss sollen die Spektren eines selbst hergestellten *D. pteronyssinus* Extraktes gezeigt werden, der ca. vier Wochen bei 4° C und im Dunkeln gelagert wurde. Das in Abbildung 21 gezeigte Massenspektrum positiver (A) und negativer (B) Polarität veranschaulicht eindrucksvoll das Werk der im Extrakt vorhandenen Proteasen. Es konnten keinerlei Komponenten oberhalb 1200 Da lokalisiert werden.

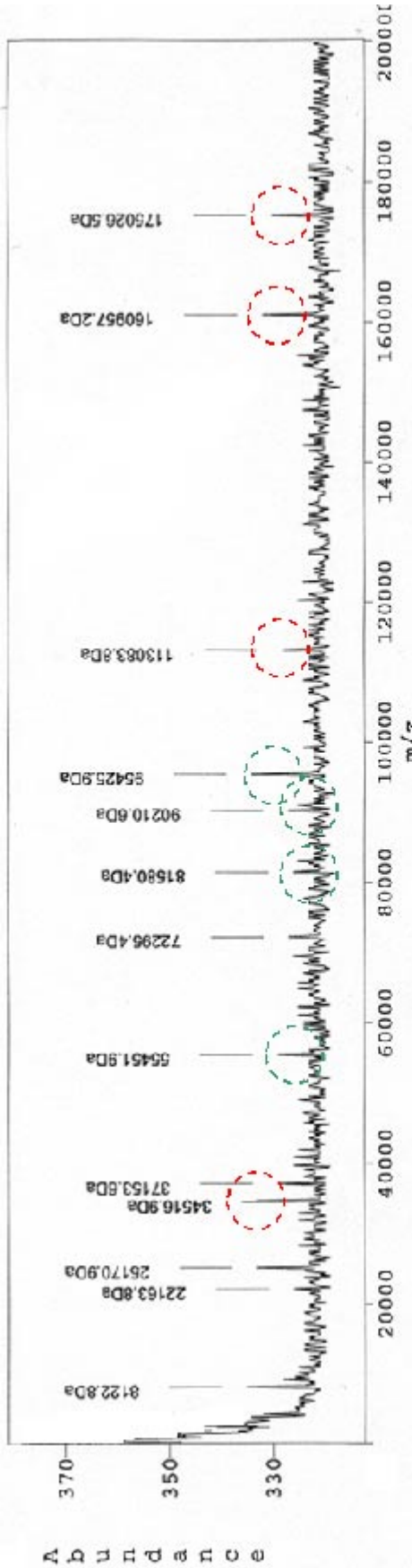


Abbildung 20 A: CSL (Lyophilisat) Probe 18

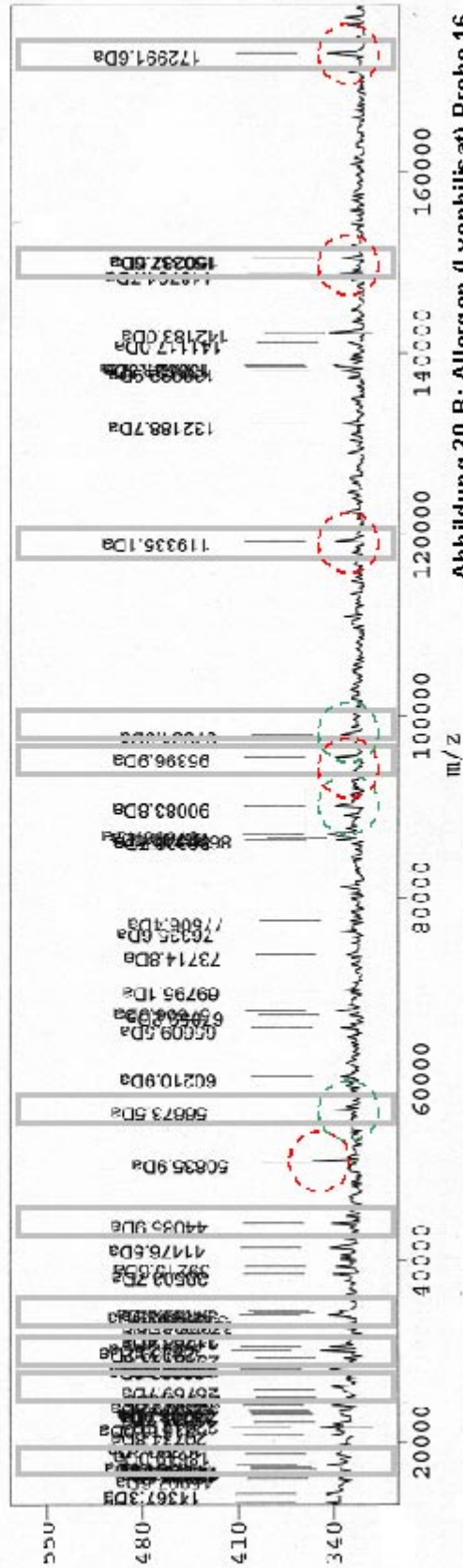


Abbildung 20 B: Allergon (Lyophilisat) Probe 16

Abbildung 20 – (Seite 109) Vergleich der Lyophilisate aus *D. pteronyssinus* unterschiedlicher Ursprungskulturen.

Vor diesem Hintergrund scheint die MALDI-TOF-Massenspektroskopie aufgrund ihrer hohen Effektivität die ideale Analyseverfahren zur Charakterisierung von proteolytischen Milbenextrakten zu sein. Zukünftig wird die aus der Proteomanalyse bekannte Kombination der 2D-Elektrophorese mit der Massenspektrometrie eine viel genauere Charakterisierung von Allergenen ermöglichen. Dies gilt vor allem auch für kleine Fragmente ($m_z < 1000$ Da), die durch die jeweilige Auflösung des Massenspektrometers eindeutig durch die Variation der Matrices, der Energie und der Polarität, sowie nach Auftrennung der Fragmente durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) oder Kapillarelektrophorese sowohl

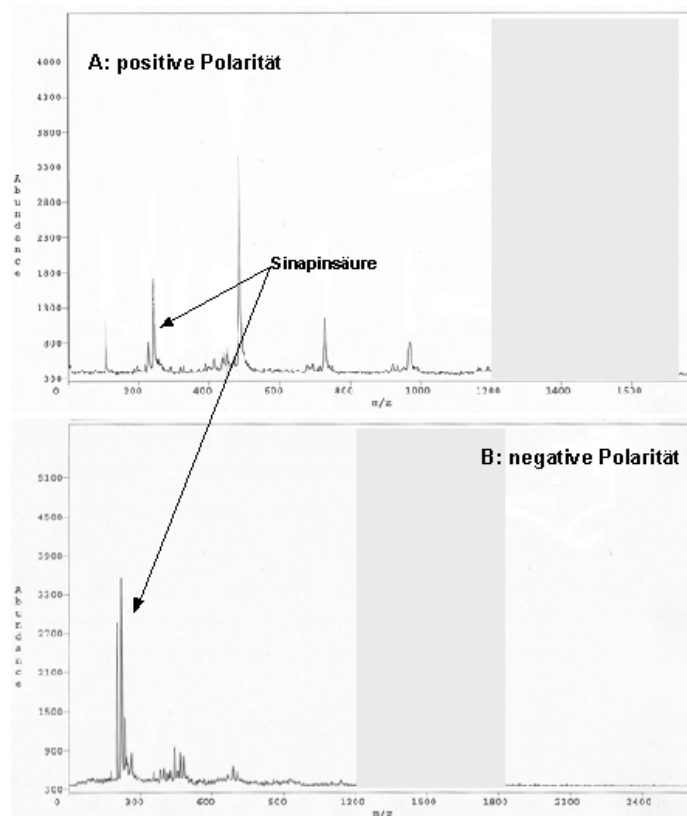


Abbildung 21 - MALDI-TOF-Spektren eines *D. pteronyssinus* Extraktes nach vierwöchigen Lagerung bei 4° C mit positiver (A) und negativer (B) Polarität. Die grau unterlegte Fläche kennzeichnet den Molekulargewichtsbereich zwischen 1.200-1.800 Da, der Mindestgröße eines funktionellen Epitopes. Matrix: Sinapinsäure; Laserenergie: 0,42 μ J

identifiziert, als auch ihrer Sequenz zugeordnet werden können. Unter Einbeziehung von tryptischen und proteolytischen Fragmenten und deren Analyse mit der skizzierten kombinierten Technik, sollte es möglich sein, viele Allergenepitomuster zu charakterisieren. Hierdurch könnte eine Differenzierung der klinischen von der biochemischen Kreuzallergenität erfolgen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nur ein erster Einblick gegeben werden.

4.10 EXKURS: DIFFUSE KLEIN- UND WEITWINKEL-RÖNTGENSTREUUNG

Trotz der erheblichen proteolytischen Aktivitäten in den Extrakten, konnten Röntgen-Streuungs-Messungen durchgeführt werden, insbesondere durch die kurzen Belichtungszeiten während der Verwendung von Synchrotronstrahlung. Beispielfähig sind die durchgeführten Messungen der Probe 7³⁵ am Synchrotron in Daresbury, U.K., an der BeamLine A-11, operiert von der University of Salford, Department of Physics, Joule Physics Laboratory, Center of Materials Research Science, Manchester, ergaben erste Hinweise zur Struktur der Mischung. Die Messungen wurden im Kleinwinkelbereich von $0,3162 \leq Q^{36} \leq 0,8 \text{ nm}^{-1}$ und bei $\lambda = 0,15412 \text{ nm}$ durchgeführt ($T = 17^\circ \text{ C}$) und ergaben folgende charakteristische Parameter:

1. den durchschnittlichen elektronischen Massenradius, $\overline{R_g}$ [nm]
2. das durchschnittliche gewichtsmäßiges Molgewicht, $\overline{M_w}$ [Da]
3. die spezifische Oberfläche, S/V [nm^{-1}].³⁷

Nach Auftragung von $\log I/C^{38}$ vs. Q^2 nach Guinier [202] wurde ein durchschnittlicher elektronischer Massenradius von $\overline{R_g} = 2,58 \pm 0,04 \text{ nm}$ bestimmt (Abbildung 22, A), wobei $\overline{R_g}$ aus der negativen Steigung des Guinier-Plots³⁹ erhalten werden konnte. Die entsprechende Messung nach 24 h (Abbildung 22, B) ergab ein $\overline{R_g} = 2,03 \pm 0,02 \text{ nm}$ und nach weiteren 24 h nahm der Massenradius auf $\sim 0,97 \text{ nm}$ ab und näherte sich asymptotisch mit der Zeit auf $\sim 0,57 \text{ nm}$. Die Abnahme des Massenradius (R_g) mit der Zeit erklärt sich durch die Selbstauflösung des Proteins („suicide enzyme“) durch im Extrakt anwesende Proteasen. Es fiel auf, dass das Fragment nach 24 h für die Messungen relativ beständig war, d.h. ohne dass die Fehlerquote durch den proteolytischen Angriff zum Tragen kam. Dieses Ergebnis lässt einen metastabilen Zwischenzustand vermuten.

Die Absenkung des pH-Wertes mit 0,01 M Essigsäure auf pH 5,5, (25° C) ergab mit $R_g = 2,05 \pm 0,02 \text{ nm}$ ein zur Proteaseaktivität nach 24 h vergleichbares Er-

³⁵ Unveröffentlichte Ergebnisse der von Prof. Paradies am Central Laboratory of the Research Councils (CLRS) in Daresbury, Warrington, Cheshire durchgeführten Röntgen-Kleinwinkelstreuung.

³⁶ $Q = \text{Streuung} [\text{nm}^{-1}]$

³⁷ $S = \text{spezifische Oberfläche} [\text{nm}^2]; V = \text{Volumen} [\text{nm}^3]$

³⁸ $I = \text{Intensität}; C = \text{Konzentration}$

³⁹ $\ln I(\theta) = \frac{-q^2 R_g^2}{3}$

gebnis, so dass für die Gesamtstabilität des Extraktes eine pH-Wertabhängigkeit festzuhalten war.

Die auf absolute Masseinheiten skalierten gemessenen Intensitäten ergaben für die beiden verschiedenen Proben (A und B) folgende durchschnittliche Molgewichte:

1. $\overline{M_{WA}} = 81.000 \pm 15.000$ bei pH 7,5, und $\overline{R_{gA}} = 2.58 \pm 0.04$ nm,
2. $\overline{M_{WB}} = 62.760 \pm 12.500$ bei pH 5,5, und $\overline{R_{gB}} = 2.03 \pm 0.02$ nm.

Für das partielle spezifische Volumen wurde demnach ein Wert von $V_2 = 0,723$ mL/g angenommen, was einer Dichte der Trockenmasse des Extraktes von 1,3831 g/mL entspricht. Der resultierende Hydratationsgrad von 0,26 g/mL und die entsprechenden hydrodynamischen Radien ergaben unter Einbeziehung einer sphärischen Form (in erster Näherung) 3,331 nm (A) bzw. 2,621 nm (B).

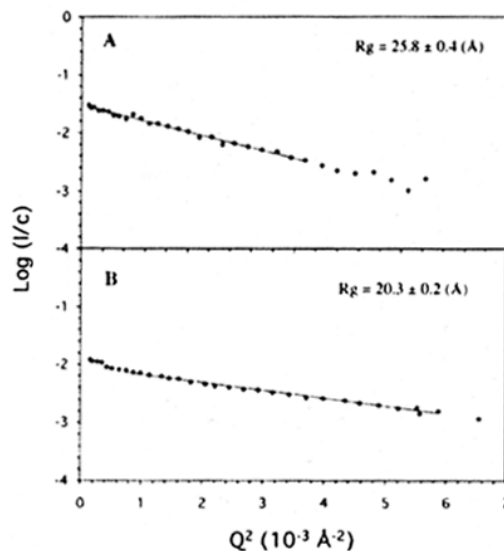


Abbildung 22 - Guinier-Plot eines *D. pteronyssinus* Extraktes (Probe 5). Teilbereich A zeigt einen durchschnittlichen elektronischen Massenradius von $25,8 \pm 0,4 \text{ \AA}$, dies entspricht $2,58 \pm 0,4$ nm. Teilbereich B zeigt mit $2,03 \pm 0,2$ nm das Ergebnis nach 24 h.

Interessant ist, dass die Molldifferenz von 19-20 kDa eine wiederkehrende Einheit im Extrakt zu sein scheint. Die Extrapolation der Minima im Weitwinkelbereich (Abbildung 23), bei $Q_{\text{min}1} = 0,13 \text{ nm}^{-1}$ und $Q_{\text{min}2} = 0,23 \text{ nm}^{-1}$ erzielte ein Verhältnis von $Q_{\text{min}2}/Q_{\text{min}1} = 1,76$. Der theoretische Wert einer Kugleinheit entspricht 1,73 [202]. Unter der Annahme, dass es sich strukturell um identische Untereinheiten ("domains") handeln könnte, ergibt sich ein theoretischer hydrodynamischer Radius von $\sim 7,69$ nm, und damit errechnet sich ein Molgewicht von $\sim 15,8$ kDa für eine mögliche wiederkehrende Untereinheit.

Aus der Literatur und eigenen Untersuchungen (siehe „Unregelmäßigkeiten der Standards“) liegt die Vermutung nahe, dass Der p 2 die wiederkehrende Unter-einheit mit ~15.8 kDa sein könnte. Die höchste Frequenz in der spezifischen IgE-Sensibilisierung sowie die große Anzahl an Proteinpeaks in der Massenspektrometrie in diesem Bereich sprechen für die hohe Aktivität und Präsenz von Komponenten dieser Größe im Extrakt. Im Gegensatz zu Der p 1 stimmte die Intensität in der SDS-PAGE mit der IgE-spezifischen Intensität im Immunoblot überein.

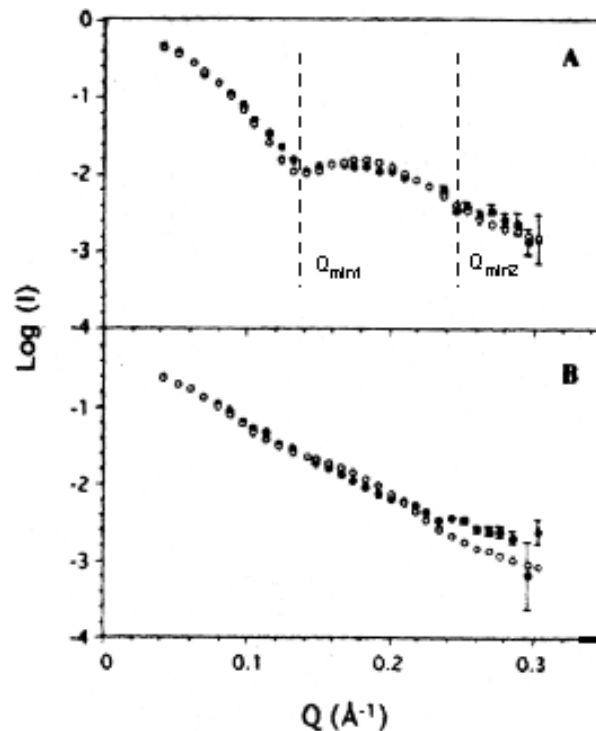


Abbildung 23– Weitwinkelstreuungsmessung der Probe 5 (*D. pteronyssinus* Extrakt). Teil A ist die direkte Messung, Teil B das Ergebnis nach 24 h. Die Extrapolation der Minima im Weitwinkelbereich, bei $Q_{\min1} = 0,13$ und $Q_{\min2} = 0,23 \text{ nm}^{-1}$ erzielte ein Verhältnis von $Q_{\min2}/Q_{\min1} = 1,76$, dem theoretischen Wert einer Kugleinheit.

Hierfür gibt es zwei Erklärungsansätze:

1. Die zur Aufreinigung des Der p 2-Standards verwendeten Antikörper waren nicht monoklonal, so dass mehrere der in diesem Bereich gefundenen Komponenten einen Beitrag zur Gesamtaktivität beitragen.
2. Der p 2 ist eine definierte wiederkehrende Substruktur im Extrakt der Milbe *D. pteronyssinus*.

Gegen Annahme 1 spricht, dass neben Der p 2 weitere Allergene oder Isoformen von Der p 2 im Molekulargewichtsbereich um 15 kDa zu definieren wären. Aus der Literatur ist allein Der p 2 bekannt. Eine endgültige Klärung hätte durch eine MALDI-TOF-MS-Analyse des Standards erbracht werden können, der aber nicht zur Verfügung stand. Für Annahme 2 spricht, dass von allen bekannten Allerge-

nen Der p 2 in der höchsten Frequenz durch IgE spezifisch gebunden wurde. Dies gilt für die Literatur und eigene Untersuchungen.

4.11 ABSCHLIESSENDE DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Abschließend sollen die verschiedenen Wege der Extrakterstellung und charakterisierenden Analytik des Pharmaunternehmens und der eigenen Vorgehensweise diskutiert werden. Die Orientierung erfolgte hierbei entlang des in Abbildung 5 (Seite 42) gezeigten Ablaufschemas.

Kultur

Es standen reine Milbenkörperkulturen von *D. pteronyssinus* der Hersteller Allergon und CSL sowie eine Urprungkultur von *L. destructor* zur Verfügung. Letztere enthielt neben den Milbenkörpern 20-30 % Rückstände des Kulturmediums und Exkremente der Tiere. Im Verlauf der Untersuchungen zeigte jedoch auch die „verunreinigte“ *L. destructor* Kultur der Literatur entsprechende spezifische IgE-Reaktionen und eine der Hausstaubmilbe entsprechende Molmassenverteilungen. Unterschiedliche Kulturen gleicher Spezies (CSL vs. Allergon) konnten anhand der Massenspektren eindeutig differenziert werden.

Aufschluss

Der Aufschluss der Kulturen ergab für beide Extraktionsmedien vergleichbare Proteinspektren. Argumente für oder gegen eine Methode wurden nicht identifiziert. Der 10 %ige Zusatz von PEG zur Ammoniumsulfatlösung führte zu erheblichen Veränderungen der SDS-PAGE- und IEF-Bandenspektren. Durch die Applikation von PEG kam es während der Extraktion zur Phasenseparation in eine

1. wässrige Extraktionsphase;
2. PEG-Phase;
3. Phase mit hochmolekularen Bestandteilen des Extraktes wie Milbenkörper, Kotpellets und Fremdstoffe (Farbstoffe, etc.).

Interessant war die Bildung einer trüben Proteinschicht zwischen der wässrigen und der PEG-Phase. Die Interpretation dieser Ergebnisse bedarf weiterer Untersuchungen, wie z.B. der Variation des PEG-Anteils sowie der eingesetzten Molmassen des Polymers.

Extraktvorbereitung

Die Variante „Pharmaunternehmen“ sah zur Abtrennung niedermolekularer Komponenten einen Dialyseschritt vor. Dialysierte Extrakte zeigten in eigenen Voruntersuchungen einen erheblichen proteolytischen Abbau (Ergebnisse nicht gezeigt), so dass im weiteren Verlauf der Untersuchungen auf eine Dialyse verzichtet wurde.

Die in der Variante „Pharmaunternehmen“ durchgeführte Bestimmung des Proteingehaltes mit einer vorherigen Fällung der Proteine durch TCA ist aus der Literatur als die genauere Methodik bekannt, war aber durch eine komplizierte Handhabung und hohe Zeiterfordernis dem ungenaueren Fertigkit unterlegen. Der Proteingehalt wurde lediglich zur Normalisierung der Proben vor einem nachfolgenden analytischen Untersuchungsschritt eingesetzt. Eine weitergehende Interpretation der Proteingehaltswerte wurde aufgrund der sehr geringen Probenanzahl nicht durchgeführt.

Die mit der Lyophilisation einhergehende Fragmentierung der Extrakte konnte mit den angewandten Analyseverfahren klar nachgewiesen werden. Trotz eines in der Ausschlusschromatographie klar erkennbaren erheblichen Verlustes an hochmolekularen Komponenten zeigten die Lyophilisate auch bei hohen Molmassen spezifische IgE-Reaktionen, die durch MALDI-TOF-MS alle Massenpeaks zugeordnet werden konnten. Die Lyophilisation scheint in Ermangelung wirkungsvoller Alternativen dem derzeitigen Stand der Technik zur Stabilisierung von Allergenextrakten zur Diagnostik und Therapie zu entsprechen. Sollen die Extrakte einer weitergehenden analytischen Untersuchung zugeführt werden, ist eine Lyophilisation allerdings zu vermeiden.

Die Voruntersuchungen zu einer präparativen Isolierung der Proteine durch Ammoniumsulfatfällungen waren nicht erfolgreich. DNS-Fragmente konnten durch eine eingesetzte 30 %ige Ammoniumsulfatlösung sowie durch eine 1 %ige Streptomycin-Lösung nicht abgetrennt werden. Die weitere Erhöhung des Salzgehaltes auf 70 % konnte ebenfalls keine Fällung der vorhandenen Proteine induzieren, so dass die Isolierung der Proteine mittels dieser sog. Cohnschen-Fraktionierung für die vorhandene Probenmatrix nicht weiter verfolgt wurde. Ein Wechsel von Ammoniumsulfat zu Dinatriumsulfat ist alternativ zu prüfen.

Fraktionierung

Die angewendeten Verfahren waren bis auf die native Elektrophorese zur schnellen Auftrennung komplexer Extrakte geeignet. Allerdings ist die native E-

lektrophorese eine wertvolle Methode, Proteine in ihrer biologisch aktiven Form aufzutrennen. So können reale Molmassenverteilungen erzielt werden und nachfolgende Analyseschritte werden nicht durch einhergehende Veränderungen der Proteine verfälscht. Durch die Ausschlusschromatographie konnte schnell ein recht genaues Fragmentierungsmuster erhalten und die erhöhte Fragmentierung nach der Lyophilisation aufgezeigt werden. Als Nachteil war der nach oben begrenzte Molmassenbereich von 70 kDa zu kritisieren.

Die SDS-PAGE ergab eine schnelle und reproduzierbare Auftrennung des Extraktes. In welchem Umfang es zu Veränderungen durch die Solubilisierung der Proteine mit SDS kam, konnte nicht quantifiziert werden. Die Verwendung von Reduktionsmitteln wie z.B. DTT ist bei Milbenextrakten zu vermeiden.

Als eine Methode von hoher Trenneffizienz erwies sich die isoelektrische Fokussierung. Die Milbenspezies konnten voneinander differenziert und qualitative Unterschiede in der Verwendung von PEG aufgezeigt werden. Aufgrund des sehr bandenreichen Spektrums war eine Interpretation erschwert.

Identifizierung

Die Identifizierung ausgewählter Allergene mittels monoklonalen Antikörpern war Bestandteil aller Charakterisierungen. Grundsätzlich ist die Bestimmung von Majorallergenen durch mAK ein wertvolles Tool zur Standardisierung. Wichtig zur Standardisierung ist das Verhältnis der Majorallergene zueinander. Nachteilig könnte eine zu große Spezifität der Antikörper sein, so dass der Beitrag von Isoformen zur Bindungsaktivität nicht zugeordnet werden kann [158]. Es sei hier auf die widersprüchlichen Ergebnisse der Untersuchungen der Standardallergene Der p 1 und Der p 2 verwiesen.

Die spezifische IgE-Bindung erfolgte ebenfalls in beiden Varianten, wobei sich die eigene Methodik mit einem visualisierenden chromogenen Substrat als eindeutig leistungsfähiger heraus stellte. Dies zeigte sich in einer deutlich verbesserten Differenzierung einzelner Immunkomponenten voneinander als auch in der vereinfachten technischen Handhabung.

Massenspektroskopische Untersuchungen hatten bislang noch keinen Einzug in die Charakterisierung von Allergenextrakten gefunden, so dass komplexe Milbenextrakte im Rahmen dieser Arbeit erstmals massenspektroskopisch untersucht wurden. Die Ergebnisse zeigten die Leistungsfähigkeit der Methodik, die bis zur Einführung in die Routine nur noch geringer Optimierung bedarf.

Struktur

Informationen zur Struktur bzw. Fragmentierung wurden einzig durch die eigene Untersuchungsvariante erhalten. Hierbei konnten durch die UV/VIS-Spektroskopie erste Hinweise zur Sekundärstruktur und Substruktur erhalten werden. Die MALDI-TOF-MS lieferte Informationen zur Fragmentierung und die Klein- bzw. Weitwinkelstreuung zu wiederkehrenden Substrukturen.

Funktion

Eine Einschätzung der proteolytischen Aktivität der Milbenallergene konnte durch ein Zymogramm gewonnen werden. Die Ergebnisse der Klein- bzw. Weitwinkelstreuung lassen zudem erhebliche Zersetzungerscheinungen schon nach 24 h erkennen.

Als Manko beider Untersuchungsabläufe ist allerdings das Fehlen eines begleitenden Aktivitätstests, wie z.B. der EAST/RAST-Inhibition zu monieren.

4.11.1 Empfehlung für eine zukünftige Abfolge

Als ein Ergebnis der Arbeit sollen im folgenden Empfehlungen zu einer zukünftigen Charakterisierung von Milbenkulturen gegeben werden. Es werden lediglich Änderungen zur eigenen Abfolge diskutiert, die in Abbildung 24 in das bekannte Ablaufdiagramm (Abbildung 5 – Seite 42) eingearbeitet wurden.

Milbenkulturen

Eine Grundcharakterisierung kann anhand wenig gereinigter Kulturen, wie z.B. der in dieser Arbeit verwendeten Vorratsmilbenkultur, durchgeführt werden. Mit ansteigendem Anspruch an Reinheit und Reproduzierbarkeit sollten nur noch Ganzkörpermilbenkulturen verwendet werden. Die Entnahme sollte immer im „linearen“ Bereich der exponentiellen Wachstumsphase der Kultur erfolgen und die Ursprungskultur und der Hersteller nicht gewechselt werden.

Aufschluss

Grundsätzlich sollten wässrige Extraktionsmedien mit niedrigen Salzfrachten (0,01-0,1 Mol/L) verwendet und die Extraktionszeiten sollten entsprechend der vorliegenden Arbeit gewählt werden. Der Zusatz von Extraktionshilfen (z.B. PEG) ist jeweils zu prüfen.

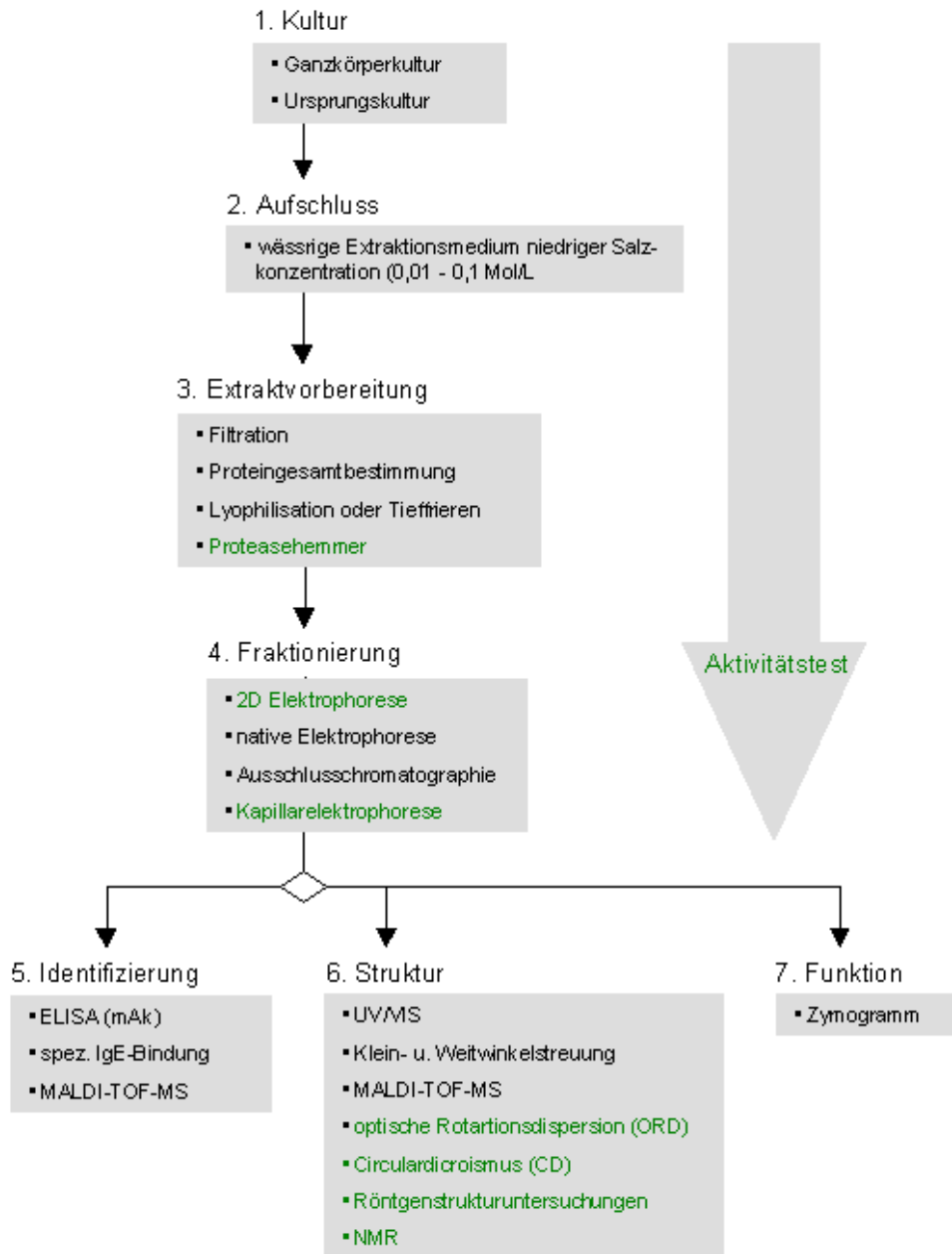


Abbildung 24 – Vorschlag für eine zukünftige Vorgehensweise zur Aufarbeitung von Milbenkulturen. Ergänzende Methoden und Verfahren, die nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit waren, aber in eine zukünftige Vorgehensweise eingebettet werden sollten, wurden grün beschriftet.

Ein **Aktivitätstest** zur Überwachung der spezifischen und gesamten allergenen Aktivität ist an dieser Stelle einzuführen und nach jedem weiteren Schritt im Ablauf anzuwenden, der Veränderungen im Extrakt hervorrufen könnte. Hilfreich ist hier ein EAST-Inhibition, die im Ergebnis aber nur eine Gesamtaktivität ergibt und keine Rückschlüsse auf die individuellen Beiträge der Einzelallergene erlaubt. Minorallergene sowie Unterschiede in der individuellen und/oder der kollektiven regionalen Sensibilisierungssituation im Patientengut werden nicht berücksichtigt. Die Beseitigung einiger Nachteile verspricht die Aktivitätsbestimmung

mung anhand der Mediatorenausschüttung mononosensibilisierter basophiler leukämischer Rattenzellen [203, 204]. Die breite Anwendung in der Routine steht allerdings noch aus.

Extraktvorbereitung

Neben der beschriebenen Filtration sollte eine Abtrennung niedermolekularer Komponenten aus dem Extrakt vermeiden werden. Zur analytischen Betrachtung bzw. Charakterisierung ist das ganze potentielle Allergenspektrum zu erhalten.

Ist beabsichtigt, die Extrakte zur Therapie und Diagnostik einzusetzen, so ist aus Sicherheitsgründen eine Abtrennung der niedermolekularen Komponenten vorzunehmen. Eine Diafiltration sollte alternativ zur Dialyse vorgenommen werden. Begleitend sind Proteingehaltsbestimmungen und UV/VIS-Untersuchungen zu empfehlen.

Lagerfähigkeit ist durch Lyophilisation oder Tiefrieren zu erzielen. Der Einsatz von Stabilisatoren (Salz, PEG) und Proteasehemmern (z.B. Humanserumalbumin im Überschuß als statistischer Schutz) ist situationsabhängig zu prüfen und kann nicht generell empfohlen werden.

Fraktionierung

Die klassischen elektrophoretischen Verfahren, SDS-PAGE und IEF, sollten vermehrt kombiniert als 2D-Elektrophorese zur Anwendung kommen und durch die Kapillarelektrophorese ergänzt werden. Erste Hinweise zur Fragmentierung und Molekulargewichtsverteilung können durch die Ausschlusschromatographie sowie eine native Elektrophorese erhalten werden.

Identifizierung

Eine Zuordnung und Identifizierung allergener Komponenten ist aufbauend auf bzw. in Kombination mit der zur Auftrennung verwendeten Methode durch spezifische IgE-Bindung und MALDI-TOF-MS vorzunehmen. Die qualitative und quantitative Bestimmung durch monoklonale Antikörper ist unabdingbar.

Struktur

Informationen zur 1D-Struktur werden durch eine Aminosäuresequenzierung erhalten und Daten zur Fragmentierung durch die MALDI-TOF-MS. Neben der schon erwähnten UV/VIS-Spektroskopie ergeben optische Rotationsdispersion

(ORD) und Circular dichroismus (CD) weitere Informationen zur 2D-Struktur. Komplexere Untersuchungsmethoden wie Klein- und Weitwinkelstreuungsmessungen, Röntgenstruktur- und Kernresonanz (NMR)-Untersuchungen erlauben die Charakterisierung der 3D und, falls vorhanden, der 4D-Struktur. Diese Informationen sind für die Aufklärung von Struktur-Wirkungsbeziehungen notwendig.

Funktion

Die Funktionsaufklärung wie z.B. Trypsin- und Proteaseaktivität geben Aufschluss über Wirkmechanismen und erlauben die Entwicklung von Stabilisierungsstrategien.

5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde der Ablauf zur Charakterisierung von Allergenextrakten anhand der Milben *Dermatophagoides pteronyssinus* und *Lepidoglyphus destructor* erarbeitet. Die Vorgehensweise eines Pharmaunternehmens diente hierbei als Ausgangspunkt der Untersuchungen. Der Zusatz von Polyethylenglykol (PEG) zum Aufschlussmedium wurde untersucht sowie eine präparative Isolierung durch Aussalzung mit Ammoniumsulfat unternommen. Klassische Verfahren wie die SDS-PAGE, die isoelektrische Fokussierung (IEF), die Ausschlusschromatographie (SEC), sowie spezifische Allergenbestimmungen durch monoklonale Antikörper (ELISA) und Patientenseren (Immunoblotting), wurden durch analytische Verfahren abseits der Routine erweitert. Neben der UV/VIS-Spektroskopie und der nativen Elektrophorese war dies vor allem die MALDI-TOF-Massenspektroskopie. Weitere Informationen zur Struktur und Fragmentierung wurden durch die Klein- und Weitwinkelstreuung, sowie zur Funktion durch zymographische Proteaseaktivitätsbestimmung erhalten.

5.1 ZUSAMMENFASSUNG DER EINZELERGEBNISSE

Milbenkulturen waren sowohl hochaufgereinigt als auch mit Kulturmedien versetzt zur Charakterisierung geeignet. Unterschiede zwischen den verwendeten Aufschlussmedien Cocas'-Lösung und Ammoniumhydrogencarbonat wurden nicht festgestellt. Der Zusatz von Polyethylenglykol führte zu qualitativen Veränderungen im Extrakt, deren Bewertung allerdings noch weiterer Untersuchungen bedarf. Die Dialyse zur Abtrennung niedermolekularer Komponenten ist aufgrund erhöhter Fragmentierung und latenter Proteaseaktivität der Milbenextrakte zu vermeiden. Eine verbesserte Lagerfähigkeit der Extrakte konnte durch eine Lyophilisation erreicht werden. Diese führte zwar zu einer Verschiebung des Fragmentierungsmusters hin zu niedermolekularen Fragmenten, andererseits konnte ein Allergenspektrum über den gesamten Molekulargewichtsbereich in der spezifischen IgE-Bestimmung durch Inkubation mit Patientenseren erhalten werden. Alternativ ist ein Tieffrieren der Extrakte durch flüssigen Stickstoff und die anschließende Lagerung bei -80°C möglich. Gegenüber einer präparativen Isolierung durch Ammoniumsulfatfällung (Cohnsche Fraktionierung) zeigten sich die Extraktproteine stabil und DNS-Fragmente konnten nicht ausgefällt werden. Das erhaltene Verhältnis der Majorallergene Der p 1 und Der p 2 zueinander bestä-

tigte für alle Extrakte aus *D. pteronyssinus* Kulturen den hohen Anteil an Milbenkörpern und somit Klassifizierung als „Purified Body“-Kultur. Die Testung des *L. destructor* Extraktes mit den mAk gegen Der p 1/Der p 2 verlief negativ. Die durchgeführte Ausschlusschromatographie erlaubte eine schnelle Bestimmung der im Extrakt vorhandenen scheinbaren Molekulargewichtsfractionen sowie eine Einschätzung der Veränderungen durch vorhergehende Aufbereitungsschritte wie z.B. eine Dialyse oder die Lyophilisation.

Qualitative Veränderungen im Proteinspektrum konnten durch die SDS-PAGE und die IEF ermittelt werden. Die hier erhaltenen Informationen genügten zu einer groben Einschätzung, nicht aber zu einer differenzierten Charakterisierung. Durch die mit diesen Trennverfahren einhergehenden Veränderungen (z.B. Solubilisierung mit SDS) sowie der Zusatz reduzierender Reagenzien wie z.B. DTT zeigten die Limitierungen dieser Verfahren. Weiterhin unentbehrlich blieben sie als vorgeschaltete Trennverfahren zum Immunoblotting.

Die Reaktionen der Extrakte beider Milbenspezies gegenüber den Patientenseren entsprachen bis auf wenige Ausnahmen der Literatur. Eine aus der Taxonomie heraus erklärbare Verschiedenheit der beiden Milbenspezies konnte im Immunoblot deutlich herausgearbeitet werden. Während die *D. pteronyssinus* ein Spektrum an Immunreaktionen zwischen 14 und >150 kDa zeigte, beschränkte sich das dieses für *L. destructor* auf den Bereich 14-22 kDa. Bisher unbekannte Immunkomponenten konnten für *L. destructor* bei 18 kDa und für bei 44 kDa ermittelt werden. Des weiteren konnten für *D. pteronyssinus* bei 42, 70, 95 und 150 kDa Immunreaktionen in bislang nur für die eng verwandte Spezies *D. farinae* ausgemacht werden. Die in der Literatur aufgezeigte Bindungsfrequenz für Der p 1 in Patientenseren von ~80 % konnte nicht bestätigt werden. Es handelte sich vielmehr um eine Summenaktivität verschiedener im 25 kDa Bereich angesiedelter Allergene.

Die Proteaseaktivitätsbestimmung mittels Casein-Zymogramm deckte trotz recht unspezifischer Methodik Unterschiede in den Molekulargewichtsbereichen als auch in der Gesamtaktivität zwischen den Lyophilisaten unterschiedlicher Ursprungskulturen (Europa vs. Australien) der gleichen Spezies *D. pteronyssinus* auf. Ob es sich hierbei um grundsätzliche in der Ursprungskultur begründete Unterschiede oder um produktionstechnische Effekte wie z.B. durch Gefriertrocknung handelte, konnte nicht zugeordnet werden. Die Molekulargewichtsbereiche mit Proteaseaktivität frisch hergestellter Extrakte beider Spezies entsprachen der Literatur.

Die MALDI-TOF-Massenspektroskopie konnte als hoch effektives Analyseverfahren erstmals auf komplexe Milbenextrakte angewandt werden. Ergebnisse durchgeführter Immunreaktionen sowie chromatographischer und elektro-phoretischer Trennverfahren konnten im Detail bestätigt und zugeordnet werden. Für jede Probe wurde eine individuelle, einem Fingerabdruck vergleichbare, Massenverteilung erhalten, die zur Identifizierung herangezogen werden konnte.

Die Ergebnisse der Klein- und Weitwinkelstreuung ergaben erste Informationen auf eine wiederkehrende Untereinheit im vermessenen *D. pteronyssinus* Extrakt bei ~15.800Da und bestätigten erste Hinweise aus der UV/VIS-Spektroskopie. Der dort erhaltene molare Extinktionskoeffizient $\epsilon_{L/mol\cdot cm}^{259nm} = 0,513 \times 10^{-3}$ ergab bei einer Küvettschichtdicke von 1cm eine mittlere Partikelgröße von 19,5-22 kDa.

Die Analyse der erhaltenen Ergebnisse mündeten in einer Bewertung der in der Routine durchgeführten Produktion von Allergenextrakten. Die größten Nachteile der Vorgehensweise „Pharmaunternehmen“ sind, dass nur scheinbare Molekulargewichte bestimmt, Minorallergene nicht berücksichtigt, nur Allergenfragmente betrachtet und keine Strukturdaten erhalten wurden. Der Fokus liegt eindeutig auf dem Erhalt der Chargengleichförmigkeit. Zudem konnten Unregelmäßigkeiten der in der Routine verwendeten Standardallergene aufgezeigt werden.

Die zusammenfassende Betrachtung der Verfahrens- und Analyseschritte in Kombination mit den Empfehlungen zur Vorgehensweise bilden die Grundlage einer zukünftig durchgeführten Charakterisierung unbekannter Milbenkulturen hinsichtlich ihres allergenen Potentials und die Produktion von Extrakten zur Diagnostik und Therapie.

5.2 AUSBLICK

Basierend auf der vorliegenden Arbeit werden die im folgenden skizzierten Untersuchungen als notwendig erachtet:

- Einführung eines Aktivitätstestes.
- Testung von Zusätzen zur Stabilisierung (z.B. PEG, Aminoalkohole, Suchrose, Na₂SO₄) und Proteaseinhibitoren zur Stabilisierung der Allergenextrakte aus Milben.
- Untersuchungen der Extrakte hinsichtlich ihrer Fragmentierung nach definierten proteolytischen Mustern sowie der Bestätigung der erhaltenen Substruktur(en). Hierbei ist zu klären, ob die Allergene Fragmente eines

Ursprungsallergenes oder unterschiedlicher Herkunft sind. Dies ist wichtig zur Identifizierung von „Mutterallergenen“, die, einmal identifiziert, Informationen über Struktur-Wirkungsbeziehungen von Allergenen liefern können.

- Zur Zielerreichung ist der Einsatz kombinierter analytischer Verfahren vielversprechend. Hervorzuheben sind hier die 2D-Elektrophorese in Kombination mit einer spezifischen IgE-Bestimmung und anschließender MALDI-TOF-Massenspektroskopie, sowie die Kopplung der Kapillarelektrophorese mit der MALDI-TOF-MS. Letztere Kombination erlaubt durch das hohe Automatisierungspotential einen Routineeinsatz.

Das Ziel der Bestimmung aller Einzelallergene mit der Zuordnung ihrer individuellen allergenen Aktivität, wird entscheidend von der weiteren Entwicklung spezifischer analytischer Möglichkeiten, wie z.B. der Herstellung von rekombinaten monoklonalen Antikörpern und Standardallergenen oder der Erschließung monosensibilisierter Zelllinien für den Routineeinsatz, abhängen. Weitergehende Informationen zur Struktur-Wirkungsbeziehung können nur durch hochkomplexe, physikalische Analyseverfahren erhalten werden. Die beschriebenen weißen Flecken auf der „Allergenlandkarte“ sind aufgrund ihrer Komplexität nur durch fachübergreifende Forschung zu lösen. Hier lag für den Kandidaten auch die Motivation für diese Arbeit, die im Verlauf stetig stieg.

6 LITERATUR

- [1] **Maasch HJ, Wahl R & Fuchs T** (1987). Application of the First International Standard of *Dermatophagoides pteronyssinus* (house dust mite) in the evaluation of allergens extracts produced from two different source materials. *Int Archs Allergy appl Immun* (84) 363-372.
- [2] **Stratmann T, Hölzt G & Haustein D** (1995). Ein Vergleich von Milbenallergenextrakten verschiedener Hersteller im Inhibitions-RAST und im Western Blot. *Allergologie* (18) 5; 179-184.
- [3] **Wahl R & Paap A** (1990). Untersuchungen zur reproduzierbaren Herstellung von Milben- (*Dermatophagoides pteronyssinus*) Allergenextrakten. *Allergologie* (13) 10; 376-380.
- [4] **Council of Europe** (1997). *European Pharmacopeia*; Third Edition. Strasbourg
- [5] **Jäger L.** (1989). *Klinische Immunologie und Allergologie*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- [6] **Casas R et al.** (1999). Biologic activity of *Dermatophagoides siboney* and *Blomia tropicalis* allergens in exposed and unexposed mite-allergic individuals. Effect of patient selection on the biologic standardization of mite extracts. *Allergy* (54) 392-396.
- [7] **Howard J, Rothenberg E & Streilein J** (1995). Grundbegriffe der Immunologie; in Janeway C & Travers P (Hrsg.) *Immunologie* (1-43): Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- [8] **Liebers V et al.** (1996). Overview on denominated allergens. *Clin Experim Allerg* (26) 494-516.
- [9] **Bieber T** (1996). Fc epsilon RI on antigen-presenting cells. *Curr Opin Immunol* (8) 6; 773-7.
- [10] **Murphy D** (1995). Auslösen, Messen und Beeinflussen der Immunantwort; in Janeway C & Travers P (Hrsg.) *Immunologie* (45-112). Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- [11] **Geha R et al.** (1995). Immunreaktion in Abwesenheit einer Infektion; in Janeway C & Travers P (Hrsg.) *Immunologie* (489-538). Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- [12] **Coombs R & Gell P** (1975). Classification of allergic reactions for clinical hypersensitivity and disease; in Gell P, Coombs R & Lachmann P (Hrsg.) *Clin Aspects Immunology* (761-781): Blackwell Scientific, Oxford.
- [13] **Romagnani S** (2000). The role of lymphocytes in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* (105) 3; 399-408.
- [14] **Pene J et al.** (1988). IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferons gamma and alpha and prostaglandin E2. *Proc Natl Acad Sci USA* (85) 18; 6880-4.
- [15] **Del Prete G et al.** (1988). IL-4 is an essential factor for the IgE synthesis induced in vitro by human T cell clones and their supernatants. *J Immunol* (140) 12; 4193-8.
- [16] **Fiebig H** (1997). Allergenextrakte - Allergoide - Peptide. *Allergologie* (20) 11; 599-606.
- [17] **UCB** (1997). *Allergy - European White Paper*. Braine-L'Alleud, Aviso, Belgien.
- [18] **Ring J & Wenning J** (2000). *Weißbuch Allergie in Deutschland 2000*.
- [19] **Ruffilli A & Bonini S** (1997). Susceptibility genes for allergy and asthma. *Allergy* (52) 256-273.
- [20] **Borish L** (1999). Genetics of allergy and asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* (82) 413-426.
- [21] **Cookson WO et al.** (1989). Linkage between immunoglobulin E responses underlying asthma and rhinitis and chromosome 11q. *Lancet* (1) 865; 1292-5.
- [22] **Hizawa N et al.** (1998). Linkage analysis of *Dermatophagoides pteronyssinus*-specific IgE responsiveness with polymorphic markers on chromosome 6p21 (HLA-D region) in Caucasian families by the transmission/disequilibrium test Collaborative Study on the Genetics of Asthma (CSGA). *J Allergy Clin Immunol* (102) 3; 443-8.
- [23] **Cookson WO & Moffatt MF** (2000). Genetics of asthma and allergic disease. *Hum Mol Genet* (9) 16; 2359-64.
- [24] **Song Z et al.** (1996). Polymorphic nucleotides within the human IL-4 promoter that mediate overexpression of the gene. *J Immunol* (156) 2; 424-429.
- [25] **Gould HJ, Beavil RL & Vercelli D** (2000). IgE isotype determination: Epsilon-germline gene transcription, DNS recombination and B-cell differentiation. *Br Med Bull* (56) 4; 908-24.

- [26] **Platts-Mills TAE et al.** (1997). The role of domestic allergens; *Ciba Found Symp* (206) 173-185.
- [27] **Spieksma F** (1997). Domestic mites from an acarologic perspective. *Allergy* (52) 4; 360-368.
- [28] **Nathanson M** (1969). Arthropods and allergy. *J Asthma Res* (7) 2; 55-63.
- [29] **van Hage-Hamsten M & Johansson SGO** (1992). Storage mites. *Exp Appl Acarol* (16) 117-128.
- [30] **Franz J** (2000). *Biologie und Ökologie der Domestic Mites - Habitate*. <http://chemie.uni-paderborn.de/arbeitskreise/biologie/WWW/Forschung/JTFd/index-10.html>.
- [31] **Franz J et al.** (1997). Erweiterte Untersuchungen zur Domestic Mite-Fauna im rein städtischen Milieu. *Allergo J* (6) SA 14-15.
- [32] **Keil H** (1983). Ökofaunistische Untersuchungen der Hausstaubmilben in Hamburg. *Entomologische Mitteilungen Zoologisches Museum Hamburg* (7) 118; 343-386.
- [33] **Franz JT et al.** (1997). Mite fauna of German farms. *Allergy* (52) 1233-1237.
- [34] **Müsken H et al.** (2000). Sensitization to different mite spezie in German farmers: Clinical aspects. *J Allergy Clin Immunol* (10) 6; 346-351.
- [35] **Fernández-Caldas E** (1997). Mite species of allergologic importance in Europe. *Allergy* (52) 383-387.
- [36] **Aalberse R** (1998). Allergens from mites: Implications of cross-reactivity between invertebrate antigens. *Allergy* (53) 47-48.
- [37] **Spieksma F & Voorhorst R** (1969). Comparison of skin reactions to extracts of house dust, mites, and human skin scales. *Acta Allergol* (24) 2; 124-146.
- [38] **Angrisano A et al.** (1990). *Dermatophagoides* and storage mites: statistical analysis of RAST results. *Ann Allergy* (64) 358-361.
- [39] **Müsken H et al.** (1996). Häufigkeit von Sensibilisierungen gegen die Raubmilbe *Cheyletus eruditus* und Vorratsmilben bei Patienten mit Hausstaubmilben-Sensibilisierung. *Allergologie* (19) 1; 29-34.
- [40] **Campbell A et al.** (1989). Aeroallergens in dairy barns near Cooperstown, New York and Rochester, Minnesota. *Am Rev Respir Dis* (140) 2; 317-320.
- [41] **Armentina-Medina A et al.** (1995). Immunotherapy with the storage mite *Lepidoglyphus destructor*. *Allergol Immunopathol* (223) 5; 211-223.
- [42] **Boquete M et al.** (2000). Factors influencing the clinical picture and the differential sensitization to house dust mites and storage mites. *J Invest Allerg Clin Immunol* (10) 4; 229-234.
- [43] **Gislason D & Gislason T** (1999). IgE-mediated allergy to *Lepidoglyphus destructor* in an urban population - an epidemiologic study. *Allergy* (54) 876-883.
- [44] **Radon K et al.** (2000). Distribution of dust-mite allergens (Lep d 2, Der p 1; Der 2) in pig-farming environments and sensitization of the respective farmers. *Allergy* (55) 219-225.
- [45] **Müsken H et al.** (2001). Sensitization to other mite species in *Tyrophagus putrescentiae*, *Lepidoglyphus destructor* and *Acarus siro* skin test positive patients in Germany. *J Invest Allergol Clin Immunol* (10) 346-51.
- [46] **van der Heide S et al.** (1998). Prevalence of sensitization to the storage mite *Acarus siro*, *Tyrophagus putrescentiae*, and *Lepidoglyphus destructor* in allergic patients with different degrees of sensitization to the house dust mite *Dermatophagoides*. *Allergy* (53) 426-430.
- [47] **van Hage-Hamsten M et al.** (1990). Comparison of clinical significance and allergenic cross-reactivity of storage mites *Blomia kulagini* and *Lepidoglyphus destructor* in Sweden and Brazil. *Allergy* (45) 409-417.
- [48] **Vidal C et al.** (1997). Sensitization to *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae*, and *Acarus siro* in patients to house dust mites (*Dermatophagoides* spp). *J Allergy Clin Immunol* (100) 5; 716-718.
- [49] **Ebner C et al.** (1994). Sensitization to storage mites in house dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) allergic patients. Comparison of a rural and an urban population. *Clin Exp Allergy* (24) 347-352.
- [50] **Müsken H et al** (2000). Sensitization to different mite spezie in German farmers: Clinical aspects. *J Allerg Clin Immunol* (10) 6; 346-351.

- [51] **King TP et al.** (1995). Allergen nomenclature. *Allergy* (50) 765-774.
- [52] **Thompson J & Stewart G** (1996). Allergene; in Holgate ST; Church MK; Kapp A (Hrsg.) *Allergologie* (1-15). Ullstein Mosby, Berlin.
- [53] **Aalberse R** (2000). Structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol* (106) 2; 228-238.
- [54] **Lottspeich F & Zorbas H** (1995). Proteinanalytik - Immunologische Techniken; in Lottspeich F & Zorbas H (Hrsg.) *Bioanalytik* (67-102). Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- [55] **Fujikawa A et al.** (1998). Altered antigenicity of M-177, a 177-kDa allergen from the house dust mite *Dermatophagoides farinae*, in stored extracts. *Clin Exp Allergy* (28) 1549-1558.
- [56] **Lehninger A, Nelson D & Cox M** (1994). Die dreidimensionale Struktur von Proteinen; *Prinzipien der Biochemie* (177-223). Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- [57] **van Neerven RJJ et al.** (1993). T Cell Epitopes of house dust mite major allergen Der p II. *J Immunol* (151) 4; 2326-2335.
- [58] **Scotto d'Abusco A et al.** (1996). Characterization of a dominant antigenic determinant of Par o I encoded by recombinant DNS. *Clin Exp Allergy* (26) 2; 223-231.
- [59] **Collins SP et al.** (1996). Absence of continuous epitopes in the house dust mite major allergens Der p I from *Dermatophagoides pteronyssinus* and Der f I from *Dermatophagoides farinae*. *Clin Exp Allergy* (26) 36-42.
- [60] **Ichikawa S et al.** (1998). Solution structure of Der f 2, the major mite allergen for atopic diseases. *J Biol Chem* (273) 1; 356-360.
- [61] **Eriksson T et al.** (1998). Cloning and characterization of a group II-allergen from the dust mite *Tyrophagus putrescentiae*. *European J Biochem* (251) 443-447.
- [62] **Lombardero M et al.** (1990). Conformational stability of B cell epitopes on group I and group II *Dermatophagoides spp.* allergens. *J Immunol* (144) 4; 1353-1360.
- [63] **Chua KY et al.** (1988). Sequence analysis of cDNS coding for a major house dust mite allergen, Der p 1. *J Exp Med* (167) 175-182.
- [64] **Thomas WR et al.** (1997). Functional effects of polymorphism of house dust mite allergen. *Int Arch Allergy Immunol* (113) 96-98.
- [65] **Thomas WR, Smith W & Hales BJ** (1998). House dust mite allergen characterisation: Implications for T-cell responses and immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol* (115) 9-14.
- [66] **Stewart GA et al.** (1992). The group III allergen from the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* is a trypsin-like enzyme. *Immunology* (75) 29-35.
- [67] **Mueller GA.; Benjamin D & Rule G** (1998). Tertiary structure of the major house dust mite allergen Der p 2: sequential and structural homologies. *Biochemistry* (37) 37; 12707-12714.
- [68] **Nishiyama C et al.** (1993). Determination of three disulfide bonds in a major house dust mite allergen, Der f II. *Int Arch Allergy Immunol* (101) 159-166.
- [69] **Lind P** (1985). Purification and partial characterization of two major allergens from the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. *J Allergy Clin Immunol* (76) 5; 753-761.
- [70] **Olsson S, van Hage-Hamsten M & Whitley P** (1998). Contribution of disulfide bonds to antigenicity of Lep d 2, the major allergen of the dust mite *Lepidoglyphus destructor*. *Mol Immunol* (35) 1017-1023.
- [71] **Takai T et al.** (2000). Unlocking the allergenic structure of the major house dust mite allergen Der f 2 by elimination of key intramolecular interactions. *FEBS Letters* (484) 102-107.
- [72] **Musu T et al.** (1997). The relationship between the biochemical properties of allergens and their immunogenicity. *Clin Exp Allergy* (15) 485-499.
- [73] **Esch RE** (1991). Role of proteases on the stability of allergenic extracts. in Kurth R & Hausstein D (Hrsg.) - *8th International Paul Ehrlich Seminar. Arbeiten aus dem Paul-Ehrlich-Institut*, 171-179.
- [74] **Lottspeich F** (1998). Proteinreinigung; in Lottspeich F & Zorbas H (Hrsg.) *Bioanalytik* (9-33). Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- [75] **Stewart GA & Thompson PJ** (1996). The biochemistry of common aeroallergens. *Clin Exp Allergy* (26) 1020-1044.
- [76] **Nduwimana J et al.** (1995). Proteases. *Ann Biol Clin* (53) 251-264.

- [77] **Hewitt C et al.** (1997). Heterogeneous proteolytic specificity and activity of the house dust mite proteinase allergen Der p 1. *Clin Exp Allergy* (27) 2; 201-207.
- [78] **Robinson C et al.** (1997). On the potential significance of the enzymatic activity of mite allergens to immunogenicity. Clues to structure and function revealed by molecular characterization. *Clin Exp Allergy* (27) 10-21.
- [79] **Stewart G et al.** (1994). Immunobiology of the serine protease allergens from house dust mites. *Am J Ind Med* (25) 11; 105-107.
- [80] **King C et al.** (1998). Dust mite proteolytic allergens induce cytokine release from cultured airway epithelium. *J Immunol* (161) 7; 3645-51.
- [81] **Gough L et al.** (1999). The cysteine protease activity of the major dust mite allergen Der p 1 selectively enhances the immunoglobulin E antibody response. *J Exp Med* (190) 12; 1897-1902.
- [82] **Roche N et al.** (2000). *Dermatophagoides pteronyssinus* and bioelectric properties of airway epithelium: Role of cysteine proteases. *Eur Respir J* (16) 2; 09-315.
- [83] **John R et al.** (2000). Functional effects of the inhibition of the cysteine protease activity of the major house dust mite allergen Der p 1 by a novel peptide-based inhibitor. *Clin Exp Allergy* (30) 6; 784-793.
- [84] **Furmonaviciene R, Sewell H & Shakib F** (2000). Comparative molecular modelling identifies a common putative IgE epitope on cysteine protease allergens of diverse sources. *Clin Exp Allergy* (30) 9; 1307-1313.
- [85] **Iraneta S et al.** (1999). Proteinase and gelatinolytic activities of house dust mite and cockroach extracts. *J Inv Allerg Clin Immunol* (9) 4; 235-240.
- [86] **Stewart GA et al.** (1998). An enzymatic analysis of the storage mite *Lepidoglyphus destructor*. *Com Biochem Physiol* (119B) 2; 341-347.
- [87] **Tretter V et al.** (1993). Fructose alpha 1,3-linked to the core region of glycoprotein N-glycans creates an important epitopes for IgE from honeybee venom allergic individuals. *Int Arch Allergy Immunol* (102) 3; 259-66.
- [88] **Kristensen A, Schou C & Roepstorff P** (1997). Determination of isoforms, N-linked glycan structure and disulfide linkages of the major cat allergen Fel d 1 by mass spectrometric approach. *Biol Chem* (378) 8; 899-908.
- [89] **Fotisch K et al.** (1999). Involvement of carbohydrate epitopes in the IgE response of celery-allergic patients. *Int Arch Allergy Immunol* (120) 1; 30-42.
- [90] **De Gruyter Verlag** (2001). *Pschyrembel - Klinisches Wörterbuch*. De Gruyter, Berlin.
- [91] **van Hage-Hamsten M & Johansson E** (1998). Clinical and immunological aspects of storage mite allergy. *Allergy* (53) 49-53.
- [92] **Arlian L et al.** (1987). Investigations of culture medium-free house dust mites. IV. Cross antigenicity and allergenicity between the house dust mites, *Dermatophagoides farinae* and *D. pteronyssinus*. *J Allergy Clin Immunol* (79) 3; 467-476.
- [93] **Arlian L, Rapp C & Fernandez-Caldas E** (1993). Allergenicity of *Euroglyphus maynei* and its crossreactivity with *Dermatophagoides* species. *J Allergy Clin Immunol* (91) 5; 1051-1058.
- [94] **Griffin P et al.** (1989). Allergenic and antigenic relationship between three species of storage mite and the house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus*. *J Allergy Clin Immunol* (84) 1; 108-117.
- [95] **Gafvelin G et al.** (2001). Crossreactivity studies of a new group 2 allergen from the dust mite *Glycyphagus domesticus*, Gly d 2, and group 2 allergens from *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Lepidoglyphus destructor*, and *Tyrophagus putrescentiae* with recombinant allergens. *J Allergy Clin Immunol* (107) 3; 511-518.
- [96] **Luczynska CM et al.** (1990). Prevalence of specific IgE to storage mites (*A. siro*, *L. destructor* and *T. longior*) in an urban population and crossreactivity with the house dust mite (*D. pteronyssinus*). *Clin Exp Allergy* (20) 4; 403-406.
- [97] **Puerta Llerena L et al.** (1991). Sensitization to *Blomia tropicalis* and *Lepidoglyphus destructor* in *Dermatophagoides spp.*-allergic individuals. *J Allergy Clin Immunol* (88) 6; 943-949.

- [98] **Johansson E et al.** (1991). Immunoblot multi-allergen inhibition studies of allergenic cross-reactivity of the dust mites *Lepidoglyphus destructor* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Clin Exp Allergy* (21) 511-518.
- [99] **Shen HD et al.** (1997). Molecular cloning and expression of a *Penicillium citrinum* allergen with sequence homology and antigenic crossreactivity to a hsp 70 human heat shock protein. *Clin Exp Allergy* (27) 6; 682-690.
- [100] **van Hage-Hamsten M et al.** (1987). Lack of allergenic crossreactivity between storage mites and *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Clin Allergy* (17) 1; 23-31.
- [101] **Arlan LG, Vyszanski-Moher DL & Fernandez-Caldas E** (1993). Allergenicity of the mite, *Blomia tropicalis*. *J Allergy Clin Immunol* (91) 5; 1042-1050.
- [102] **Ferrández R, Casas R & Dreborg S** (1998). Crossreactivity between *Dermatophagoides siboney* and other domestic mites. II. Analysis of individual cross-reacting allergens after SDS-PAGE and western blotting inhibition. *Int Arch Allergy Clin Immunol* (116) 116; 206-214.
- [103] **Johansson E, Johansson SGO & van Hage-Hamsten M** (1994). Allergenic characterization of *Acarus siro* and *Tyrophagus putrescentiae* and their crossreactivity with *Lepidoglyphus destructor* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Clin Exp Allergy* (24) 743-751.
- [104] **Simpson A, Arruda K & Chapman M** (1997). Antigenic interrelationship among mite allergens (*Blomia* and *Dermatophagoides* spp). *Clin Rev Allergy Immunol* (15) 461-469.
- [105] **Harfast B et al.** (1992). Monoclonal antibodies to *Lepidoglyphus destructor*: Delineation of crossreactivity between storage mites and house dust mites. *Clin Exp Allergy* (22) 11; 1032-1037.
- [106] **Johansson E et al.** (1997). Allergenic crossreactivity between *Lepidoglyphus destructor* and *Blomia tropicalis*. *Clin Exp Allergy* (27) 691-699.
- [107] **Kronquist M et al.** (2000). Skin prick test and serological analysis with recombinant group 2 allergens of the house dust mites *L. destructor* and *T. putrescentiae*. *Clin Exp Allergy* (30) 670-676.
- [108] **Chambers L et al.** (1997). Is the dust mite allergen Der p1 cysteine proteinase? *Biochem Soc Trans* (25).85 S
- [109] **Dilworth RJ, Chua KY & Thomas WR** (1991). Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, Der f I. *Clin Exp Allergy* (21) 25-32.
- [110] **Smith W et al.** (1999). Molecular Analysis of the Group 1 and 2 Allergens from the house dust mite, *Euroglyphus maynei*. *Int Arch Allergy Immunol* (118) 15-22.
- [111] **Soldatova LN et al.** (2000). The stability of house dust mite allergens in glycerinated. *J Allergy Clin Immunol* (105) 3; 482-488.
- [112] **Thomas W & Chua K** (1995). The major mite allergen Der p 2 - a secretion of the male mite reproductive tract? *Clin Exp Allergy* (25) 667-669.
- [113] **van Hage-Hamsten M et al.** (1995). Localization of major allergens in the dust mite *Lepidoglyphus destructor* with confocal laser scanning microscopy. *Clin Exp Allergy* (25) 536-542.
- [114] **Johansson E et al.** (1999). Evaluation of specific IgE to the recombinant group 2 mite allergens Lep d 2 and Tyr p 2 in the Pharmacia CAP system. *Int Arch Allergy Immunol* (120) 1; 43-49.
- [115] **Ventas P, Careira J & Polo F** (1991). Identification of IgE-binding proteins from *Lepidoglyphus destructor* and production of monoclonal antibodies to a major allergen. *Immunol Lett* (29) 3; 229-234.
- [116] **Cain G et al.** (1998). The effect of dry heat on mite, cat, and dog allergens. *Allergy* (53) 12; 1213-5.
- [117] **Ventas P, Carreira J & Polo F** (1992). Purification and characterization of Lep d I, a major allergen from the mite *Lepidoglyphus destructor*. *Clin Exp Allergy* (22) 454-460.
- [118] **Varela J et al.** (1994). Primary structure of Lep d I, the main *Lepidoglyphus destructor* allergen. *Eur J Biochem* (225) 93-98.
- [119] **Schmidt M et al.** (1995). cDNA analysis of the mite allergen Lep d 1 identifies two different isoallergens and variants. *FBES* (370) 11-14.

- [120] **Johansson E, van: Hage-Hamsten M & Johansson SG** (1988). Demonstration of allergen components in the storage mite *Lepidoglyphus destructor* by an immunoblotting technique. *Int Arch Allergy Appl Immunol* (85) 1; 8-13.
- [121] **Ando T et al.** (1993). Trypsin-like protease of mites: purification and characterization of trypsin-like protease from mite faecal extract *Dermatophagoides farinae*. Relationship between trypsin-like protease and Der f III. *Clin Exp Allergy* (23) 777-784.
- [122] **Heymann P et al.** (1989). Antigenic and structural analysis of group II allergens (Der f II and Der p II) from house dust mites (*Dermatophagoides* spp). *J Allergy Clin Immunol* (83) 6; 1055-1067.
- [123] **Thomas WR, Chua K- & Smith W-** (1992). Molecular polymorphism of house dust mite allergens. *Exp Appl Acarol* (16) 153-164.
- [124] **Lake FR et al.** (1991). House dust mite-derived amylase: Allergenicity and physicochemical characterization. *J Allergy Clin Immunol* (87) 6; 1035-1042.
- [125] **Tovey ER et al.** (1989). Cloning and sequencing of a cDNA expressing a recombinant house dust mite protein that binds human IgE and corresponds to an important low molecular weight allergen. *J Exp Med* (170) 4; 1457-1462.
- [126] **Thomas WR & Smith W** (1998). House dust mite allergens. *Allergy* (53) 821-832.
- [127] **Eriksson TLJ et al.** (2001). Cloning of three new allergens from the dust mite *Lepidoglyphus destructor* using phage surface display technology. *Eur J Biochem* (268) 287-294.
- [128] **Yasueda H et al.** (1989). Comparative analysis of physicochemical and immunochemical properties of the two major allergens from *Dermatophagoides pteronyssinus* and the corresponding allergens from *Dermatophagoides farinae*. *Int Arch Allergy Appl Immunol* (88) 402-407.
- [129] **Bennett BJ & Thomas WR** (1996). Cloning and sequencing of the group 6 allergen of *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Clin Exp Allergy* (26) 1150-1154.
- [130] **Shen HD et al.** (1995). Characterization of the house dust mite allergen Der p 7 by monoclonal antibodies. *Clin Exp Allergy* (25) 5; 416-422.
- [131] **Shen H et al.** (1993). Molecular cloning of a house dust mite allergen with common antibody binding specificities with multiple components in mite extracts. *Clin Exp Allergy* (11) 934-940.
- [132] **Shen H et al.** (1996). Molecular cloning and immunological characterization of the group 7 allergens of house dust mites. *Adv Exp Med Biol* (409) 241-242.
- [133] **Eriksson T** (2001). Dust mite allergens: Cloning, Characterisation and T-cell epitopes. Dissertation, Karolinska Institut, Schweden
- [134] **Shen HD et al.** (1996). IgE and monoclonal antibody binding by the mite allergen Der p 7. *Clin Exp Allergy* (26) 3; 308-315.
- [135] **Shen HD et al.** (1997). Characterization of the allergen Der f 7 from house dust mite extracts by species-specific and crossreactivity monoclonal antibodies. *Clin Exp Allergy* (27) 7; 824-832.
- [136] **O'Neill GM et al.** (1995). Glutathione S-transferase a major allergen of the house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Immunol Lett* (48) 103-107.
- [137] **O'Neill G, Donovan G & Baldo B** (1994). Sequence of the native form of a major house dust mite allergen and its nascent polypeptide. *Mol Immunol* (31) 18; 1447-1448.
- [138] **Aki T et al.** (1994). Cloning and expression of cDNA coding for a new allergen from the house dust mite, *Dermatophagoides farinae*: Homology with human heat shock cognate proteins in the heat shock protein family. *J Biochem* (115) 435-440.
- [139] **Ansotegui I et al.** (1991). Identification of a new major allergen of 39 kilodaltons of the storage mite *Lepidoglyphus destructor*. *Immunol Lett* (27) 2; 127-130.
- [140] **Olsson S et al.** (1994). Detection of at least one high-molecular-mass, IgE-binding component of the dust mite *Lepidoglyphus destructor*. *Allergy* (49) 8; 620-625.
- [141] **van Hage-Hamsten M et al.** (1993). Occurrence of IgE antibodies against the 39-kDa allergen components of the mite *Lepidoglyphus destructor* in urban and rural subjects. *Allergy* (48) 3; 209-211.
- [142] **Reese G, Ayuso R & Lehrer S** (1999). Tropomyosin: an invertebrate pan-allergen. *Int Arch Allergy Immunol* (114) 4; 247-258.

- [143] **Tsai L et al.** (1998). Isolation and characterization of a novel 98-kd *Dermatophagoides farinae* mite allergen. *J Allergy Clin Immunol* (102) 2; 295-303.
- [144] **Tsai L et al.** (2000). Protein sequence analysis and mapping of IgE and IgG epitopes of an allergenic 98-kDa *Dermatophagoides farinae* paramyosin, Der f 11. *Allergy* (55) 141-147.
- [145] **Puerta L et al.** (1996). Nucleotide sequence analysis of a complementary DNS coding for a *Blomia tropicalis* allergen. *J Allergy Clin Immunol* (98) 5; 932-937.
- [146] **Caraballo L et al.** (1997). Cloning and IgE binding of a recombinant allergen from the mite *Blomia tropicalis*, homologous with fatty acid-binding proteins. *Int Arch Allergy Immunol* (112) 4; 341-347.
- [147] **Epton MJ et al.** (1999). High-molecular-weight-allergens of the house dust mite: An apolipoprotein-like cDNS Has sequence identity with the major M-177 allergen and the IgE-binding peptide fragments Mad 1 and Mag 3. *Int Arch Allergy Clin Immunol* (120) 185-191.
- [148] **Fujii S et al.** (1997). Identification of T-cell epitope sequences on an important mite antigen. *Clin Exp Allergy* (27) 1086-1094.
- [149] **Fujikawa A et al.** (1996). Cloning and characterization of a new allergen, Mag 3 from the house dust mite *Dermatophagoides farinae*: Crossreactivity with high-molecular weight allergen. *Mol Immunol* (33) 3; 311-319.
- [150] **Lehrer SB, Horner WE & Reese G** (1996). Why are some proteins allergenic? Implications for biotechnology. *Crit Rev Food Sci Nutr* (36) 6; 553-564.
- [151] **Maasch H** (1982). Herstellung und Kontrolle von Allergoiden; in *Allergopharma* Joachim Ganzer (Hrsg.) 7. *Allergopharma-Symposium* 15, (23-31).
- [152] **Milgrom H et al.** (2001). Treatment of childhood asthma with anti-immunoglobulin E antibody (omalizumab). *Pediatrics* (108) 2; E36.
- [153] **Rohane P** (2000). Anti-IgE (rhuMAB-E25) Therapy; in Kurth R & Hausteil D (Hrsg.) *9th International Paul-Ehrlich-Seminar, 9-11 September 1999* 93, (253-256). GIT, Darmstadt.
- [154] **Pichler W** (2001). Specific and nonspecific (anti-IgE) immunotherapy of allergic disease. *Therapeutische Umschau* (58) 5; 329-36.
- [155] **Norman P** (1997). Responses to T cell tolerogenic peptides; in Kurth R & Hausteil D (Hrsg.) *8th International Paul Ehrlich Seminar, 11-13 März 1996* 91, (40-44). Gustav Fischer, Stuttgart.
- [156] **Schopf R** (1997). *Allergologie systematisch*. Uni-Med Verlag, Bremen
- [157] **Maasch HJ, Maass J & Geissler W** (1983). Untersuchungen zum Einfluß der Extraktionszeit auf den Gehalt von Inhaltsstoffen von *Dermatophagoides pteronyssinus* Extrakt. *Allergologie* (6) 2; 52-54.
- [158] **van Ree R** (1997). Analytical aspects of the standardization of allergenic extracts. *Allergy* (52) 795-805.
- [159] **Martinez J et al.** (1999). Enzymatic analyses of house dust mite extracts from *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae* (Acari: Pyroglyphidae) during different phases of culture growth. *J Med Entomol* (36) 3; 370-375.
- [160] **Lehrer S & Reese G** (1997). Natural allergen extracts: Is there a future in allergy diagnosis and therapy?; in Kurth R & Hausteil D (Hrsg.) *8th International Paul Ehrlich Seminar* 91, (73-78). Gustav Fischer, Stuttgart.
- [161] **Timasheff SN & Arakawa T** (1989). Stabilization of protein structure by solvents; in Creighton T (Hrsg.) *Protein structure* (331-345). IRL Press, Oxford.
- [162] **Westermeier R** (1990). *Elektrophorese Praktikum*. VCH Chemie, Weinheim.
- [163] **Ackland J SG** (1984). Quantitation and thermal stability of the mite allergen DPT 12 in whole mite extracts. *J Allergy Clin Immunol* (74) 6; 848-854.
- [164] **Volkin DB & Klibanov AM** (1989). Minimizing protein inactivation; in Creighton TE (Hrsg.) *Protein function* (1-22). IRL Press, Oxford.
- [165] **Bergemeyer H et al.** (1974). in Bergemeyer H (Hrsg.) *Methods of Enzymatic Analysis* 1, (166ff). Academic Press, New York.
- [166] **Florkin M & Stolz E** (1967). *Comparative Biochemistry and Physiology* (27)
- [167] **Ford SA, Tovey ER & Baldo BA** (1989). Effect of reduction and heat on the detection of house dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) allergen Der p I protein blotting. *Int Arch Allergy Appl Immunol* (89) 2-3; 318-320.

- [168] **Liu T & Lin Y** (1998). The epitope stability of group 1 and group 2 allergens in mite extracts. *Ann Allergy Asthma Immunol* (80) 2; 177-183.
- [169] **Arakawa T & Timasheff SN** (1985). Mechanism of poly (ethylene glycol) interaction with proteins. *Biochemistry* (24) 24; 6756-6762.
- [170] **Lee LLY & Lee JC** (1987). Thermal stability of proteins in the presence of poly (ethylene glycols). *Biochemistry* (26) 24; 7813-7819.
- [171] **Nucci ML, Shoor R & Abuckowski A** (1991). The therapeutic value of poly(ethylene glycol)-modified proteins. *Adv Drug Del Rev* 6; 133-151.
- [172] **Dreborg S & Akerblom E** (1990). Immunotherapy with monoethoxypolyethylene glycol modified allergens. *CRC Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* (6) 4; 315-365.
- [173] **Lottspeich F & Zorbas H** (1998). Proteinanalytik - Spaltung von Proteinen; in Lottspeich F & Zorbas H (Hrsg.) *Bioanalytik* (179-194). Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- [174] **Lowry O et al.** (1951). Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *J Biol Chem* (193) 265-275.
- [175] **Wahl R, Geissler W; Maasch & Maasch H** (1985). Comparison of classical Lowry, modified Lowry and a dye-binding assay for the estimation of protein in allergen extracts and the influence of different parameters on the modified Lowry assay. *Biol Chem* (10) 979-984.
- [176] **Luczynska CM et al.** (1989). A two-site monoclonal antibody ELISA for the quantification of the major *Dermatophagoides spp.* allergens, Der p I and Der f I. *J Immunol Methods* (118) 227-235.
- [177] **Mäntele W** (1998). Spektroskopie; in Lottspeich F & Zorbas H (Hrsg.) *Bioanalytik* (131-178). Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- [178] **Paradies H** (2000). Absorption and Emission of Radiation; *Basic Physical Chemistry in Biochemistry* (167-179). Iserlohn
- [179] **Kellner R** (1998). Chromatographische Trennmethode; in Lottspeich F & Zorbas H (Hrsg.) *Bioanalytik* (195-215). Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- [180] **Rubio N, Brieva A & Alcazar B** (1987). Purification of allergens by high-performance liquid chromatography; IV. Purification of the allergen of olive pollen (*Olea europea*). *J Chromatogr* (403) 312-318.
- [181] **Wahl R, Maasch HJ & Geissler W** (1986). High-Performance liquid chromatography molecular weight determination of allergen extracts; Examination of the influence of the column material on allergenic activity and allergen patterns. *J Chromatogr* (351) 39-46.
- [182] **Wahl R & Maasch HJ** (1987). HPCL a useful tool in allergen extract research and control. *International Analysts*
- [183] **Pacáková V, Stutlík K & Tichá M** (1997). High-performance separations in isolation and characterization of allergens. *J Chromatogr B* (699) 403-418.
- [184] **Lämmli U** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (227) 680-685.
- [185] **Schaeffer H & von Jagow G** (1987). Tricine-sodium-dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* (166) 368-379.
- [186] **Görg A & Westermeier R** (1998). Elektrophoretische Verfahren; in Lottspeich F & Zorbas H (Hrsg.) *Bioanalytik* (217-252). Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- [187] **Kleinert T** (1990). *Elektrophoretische Methoden in der Proteinanalytik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- [188] **Ornstein L** (1964). Disc Electrophoresis, 1, Background and Theory. *Annals New York Academy of Sciences* (121) 321-349.
- [189] **Davis B** (1964). Disc Electrophoresis. 2, Method and application to human serum proteins. *Annals New York Academy of Sciences* (121) 404-427.
- [190] **Diezel W, Kopperschlager G & Hofmann E** (1972). An improved procedure for protein staining in polyacrylamide gels with a new type of Coomassie Brilliant Blue. *Anal Biochem* (48) 617-620.
- [191] **Blum H, Beier H & Gross H** (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* (8) 93-99.
- [192] **Baldo BA** (1983). Standardization of allergens. *Allergy* (38) 535-546.

- [193] **Tovey ER & Baldo BA** (1987). Characterisation of allergens by protein blotting. *Electrophoresis* (8) 452-463.
- [194] **Mansfield A & McDonald C** (2000). *Rapid immunodetection of blotted proteins without blocking*. www.millipore.com:
- [195] **Paech C** (1993). Zymogram of proteases made with developed film from nondenaturing polyacrylamide gels after electrophoresis. *Anal Biochem* (208) 2; 249-254.
- [196] **Paradies H** (2000). Circular dichroism and optical rotatory dispersion; *Bas Phys Chem Biochem* (202-238).
- [197] **Paradies H.H.; Franz A.** (1976). Geometry of the protein S4 from *Escherichia coli* ribosomes. *Eur J Biochem* (67) 1; 23-29.
- [198] **de la Hoz F & Carreira J** (1986). Identification of main allergens from *Dermatophagoides farinae* and their properties under native and dissociating conditions. *Int Archs Allergy appl Immun* (79) 238-245.
- [199] **Weber B, Fiebig H & Cromwell O** (1998). Die Quantifizierung von Hauptallergenen als Teil der Qualitätsprüfung industriell hergestellter Allergenpräparate. *Allergologie* (21) 3; 116-124.
- [200] **Tovey ER & Baldo BA** (1987). Comparison by electroblotting of IgE-binding components in extracts of house dust mite bodies and spent mite cultures. *J Allergy Clin Immunol* (79) 1; 93-102.
- [201] **Garcia-Robaina JC et al.** (1998). Extracts from various mite species contain crossreactive IgE epitopes. A RAST inhibition study. *J Invest Allerg Clin Immunol* (8) 5; 285-289.
- [202] **Guinier A** (1955). *Small Angle Scattering of X-Rays*. Wiley, New York.
- [203] **Hoffmann A et al.** (1997). Potency determination of allergenic extracts using mediator release of rat basophil leukemia cells; in Kurth R & Hausteil D (Hrsg.) *Arbeiten aus dem Paul Ehrlich Institut - 8th International Paul Ehrlich Seminar* (203-208). Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- [204] **Hoffmann A, Vieths S & Hausteil D** (1997). Biologic allergen assay for in vivo test allergens with an in vitro model of the murine type I reaction. *J Allergy Clin Immunol* (99) 2; 227-232.

7 AKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Auswahl wichtiger Abkürzungen, die Kapitelübergreifend verwendet wurden.

APC	Antigenpräsentierende Zellen
CAP-RAST	RAST-System der Fa. Amersham Pharmacia Biotech
Da	Dalton
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
EAST	Enzyme Allergo Sorbent Assay
ELISA	Enzym Linked Immuno Sorbent Assay
H ₂ O _{dd}	zweifach destilliertes Wasser
HSM	Hausstaubmilbe
IgE	Immunglobulin E
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IL	Interleukin
IFN- γ	Interferon-Gamma
kDa	Kilodalton
MAG	Mite Antigen Gen
MAk	monoklonale Antikörper
MALDI-TOF-MS	Matrix unterstützte Laser Desorption Ionisation Massenspektroskopie
MHC	Major Histokompatibilitäts Komplex
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Kernresonanz)
OD	Optische Dichte
PEG	Polyethylenglykol
pI	Isoelektrischer Punkt
PMB	Purified Mite Bodys
RAST	Radio Allergo Sorbent Assay
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
TH1, TH2, TH0	T-Helferzellen verschiedener Ausprägung
VRM	Vorratsmilbe
WMC	Whole Mite Cultures
SEC	Ausschlusschromatographie
RSA	Rinderserumalbumin
UV/VIS	Ultraviolett/Visibel-Spektroskopie