



Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt
Lehrstuhl für Energie- und Umwelttechnik der Lebensmittelindustrie

Molekulare und klinische Auswirkungen einer Hochdruckbehandlung von allergenen Lebensmitteln

Marcus Scheibenzuber

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor-Ingenieurs

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil. Rudi F. Vogel

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr.- Ing. Roland Meyer-Pittroff
2. Univ.-Prof. Dr.- Ing., Dr.- Ing. habil. Ulrich Kulozik
3. Univ.-Prof. Dr. med., Dr. phil. Johannes Ring

Die Dissertation wurde am 25.09.2002 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 20.01.2003 angenommen.

MEINEN ELTERN GEWIDMET

Die vorliegende Arbeit entstand durch eine enge Zusammenarbeit von Ingenieuren, Medizinern und Biochemikern. Die Plattform für diese Zusammenarbeit hat mein Doktorvater, Herr Prof. Dr.- Ing. Roland Meyer-Pittroff, geschaffen und mir damit die Möglichkeit gegeben, diese Arbeit anzufertigen. Dafür möchte ich mich herzlich bedanken! Herrn Prof. Dr.- Ing. habil. Ulrich Kulozik und Herrn Prof. Dr. med. Dr. phil. Johannes Ring möchte ich für die Übernahme der Koreferate danken sowie Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Rudi Vogel für den Vorsitz der Prüfungskommission.

Frau Prof. Dr. med. Heidrun Behrendt und Herrn Prof. Dr. med. Dr. phil. Johannes Ring gilt meine allerhöchste Wertschätzung, denn sie haben mir in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein und dem Zentrum für Allergie und Umwelt in München fantastische Arbeitsmöglichkeiten geboten. Besonders erwähnen möchte ich Herrn Dr. med. Volker Grimm, der mit mir die Projektarbeit leitete, unermüdlich Patienten rekrutierte und für die Tests gewinnen konnte. Fachlich betreute er den medizinischen Teil dieser Arbeit. Seine Mitarbeit und seine fachliche Versiertheit haben grundlegend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Vielen Dank!

Frau Dipl.-Chem. Melina Haupt und Frau Dr. rer. nat. Angelika Kühlewein vom Institut für Organische Chemie und Biochemie (Lehrstuhl II) der TU München in Garching möchte ich für die Bereitstellung des CD-Spektralpolarimeters und die methodische Unterstützung herzlich danken. Frau Dipl. oec. troph. Mareike Wenning vom Institut für Mikrobiologie am Forschungszentrum für Milch und Lebensmittel der TU München in Weihenstephan danke ich für die Durchführung der IR-Spektroskopie und ihrer Diskussionsbereitschaft bei der Auswertung. Für ihre Diskussionsbereitschaft und die Unterstützung bei den Korrekturen danke ich Frau Dr. med. vet. Andrea Didier herzlich.

Besonderer Dank gilt auch all meinen Kollegen für die gute Zusammenarbeit und das von Freundschaft geprägte Arbeitsklima.

Ein Dankeschön auch an meine Diplomanden und Semestranden für ihre tatkräftige Mitarbeit!

Meinem Freund Markus Kroll danke ich für seine moralische Unterstützung, seine Geduld und die Hilfe beim Korrekturlesen.

Nicht zuletzt geht mein Dank an meine Eltern, die mich während meines Studiums und der Promotion jederzeit ideell und materiell unterstützten und damit diese Arbeit erst ermöglichten.

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abkürzungen, Einheiten, Formelzeichen	V
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Hochdruck – ein neuer Freiheitsgrad	1
1.2 Lebensmittelallergien	2
2 Zielsetzung	3
2.1 Idee	3
2.2 Versuchskonzept	4
3 Grundlagen	5
3.1 Biochemie der Immunreaktionen	5
3.1.1 Immunoglobuline und Antigene	5
3.1.2 Allergene.....	6
3.1.3 Epitopstrukturen.....	6
3.1.4 Lebensmittelallergien	8
3.1.4.1 Birkenpollen assoziierte Allergien	9
3.1.4.2 Allergie gegen Apfel (<i>Malus domestica</i>).....	11
3.2 Mal d 1 – das Hauptallergen des Apfels	12
3.3 Hochdrucktechnologie	17
3.3.1 Thermodynamische Grundlagen.....	18
3.3.1.1 Einfluss hoher hydrostatischer Drücke auf thermodynamische Größen des Wassers	22
3.3.2 Einfluss hoher hydrostatischer Drücke auf Sensorik und Qualität von Lebensmitteln.....	28
3.3.3 Einfluss hoher hydrostatischer Drücke auf Proteine	31
3.3.4 Einfluss hoher hydrostatischer Drücke auf Allergene.....	35
3.4 Untersuchung der Proteinstruktur mit fouriertransformierter Infrarot- und Circular dichroismus-Spektroskopie	36
3.4.1 Circular dichroismus-Spektroskopie von Proteinen	37
3.4.2 Infrarot-Spektroskopie von Proteinen.....	37
3.4.3 Auswertung von CD- und IR-Spektren.....	38
3.4.4 Spektroskopische Untersuchung hochdruckbehandelter Proteine.....	40

4	Material und Methoden	43
4.1	Hochdruckprozessierung	43
4.1.1	Druck- und Temperaturverläufe	43
4.2	Klinisch-experimentelle Untersuchungen.....	44
4.2.1	Patientenkollektiv	44
4.2.2	Pricktest	44
4.2.3	Orale Provokation	46
4.2.4	IgE-Bestimmung	46
4.2.5	Quantitative Bestimmung der Degranulation basophiler Granulozyten.....	47
4.3	Spektralanalytik	50
4.3.1	Messung des Circular dichroismus	50
4.3.2	Messung der Infrarotspektren	50
4.3.3	Rechnergestützte Proteinstrukturvorhersage.....	51
4.4	Probenmaterial	52
4.4.1	Ausgewählte Lebensmittel	52
4.4.2	Mal d 1	52
4.4.2.1	Rückfaltung in die native Konformation	53
4.4.3	Vergleichsproteine in der CD-Spektroskopie	54
4.4.4	Bestimmung der Proteinkonzentration	54
5	Ergebnisse	55
5.1	Klinische Untersuchungen	55
5.1.1	Pricktests mit hochdruckbehandelten Lebensmitteln (300 und 600 MPa)..	59
5.1.1.1	Haselnuss	59
5.1.1.2	Karotte	59
5.1.1.3	Kirsche.....	60
5.1.1.4	Pfirsich	60
5.1.1.5	Sellerie.....	60
5.1.1.6	Apfel.....	61
5.1.2	Pricktests mit Apfel zur Analyse der Inaktivierungskinetik	62
5.1.3	Pricktests mit einer gesunden Kontrollgruppe.....	75
5.1.4	Orale Provokation	77
5.2	<i>In vitro</i> -Diagnostik	78
5.2.1	Degranulation basophiler Granulozyten.....	78
5.3	Rechnergestützte Sekundär- und Tertiärstrukturvorhersage von Mal d 1..	81
5.4	Spektroskopische Untersuchungen von rMal d 1 und Referenzproteinen .	85
5.4.1	Messung des Circular dichroismus	85
5.4.1.1	Spektren von rMal d 1.....	85
5.4.1.2	Spektren von Myoglobin und Poly-L-Lysin.....	90
5.4.2	Infrarotspektroskopie von rMal d 1.....	94

6	Diskussion	96
6.1	Auswirkung der Hochdruckbehandlung auf die Allergenität von Haselnuss, Sellerie, Karotte, Pfirsich und Kirsche	96
6.2	Auswirkung der Hochdruckbehandlung auf die Allergenität des Apfels	100
6.3	Mechanismen der Reduktion des allergenen Potentials von Mal d 1.....	106
6.4	Wahrscheinlichkeit hochdruckinduzierter Neoallergene.....	106
6.5	Abschließende Betrachtung und Ausblick.....	107
7	Zusammenfassung	109
8	Summary	111
9	Literatur	A
10	Anhang	M
10.1	Votum der Ethikkommission	M
10.2	Rohdaten zum Pricktest mit Apfel (Parameteranalyse).....	N

Abkürzungen, Einheiten, Formelzeichen

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AS	Aminosäure
BCA	Bicinchoninic Acid (Bicinchoninsäure)
Bet v 1	Betula verucosa 1, das Hauptallergen in Birkenpollen
BSA	Bovines Serum Albumin
BT	Basotest [®]
CAP	Cellulose Acetat Propionat
CD	Circulardichroismus
c_p	isobare spezifische Wärmekapazität
Da	Dalton
DBPCFC	Double-blind placebo-controlled food challenge
EAST	Enzymallergosorbent-Test
Fab	Fragment antigen binding
Fc	Fragment crystalline
FEIA	Fluorescent Enzym Immunoassay
FTIR	Fouriertransformiertes Infrarotspektrum
GD	Golden Delicious
HD	Hochdruck
Ig	Immunglobulin
K	Kelvin
KCD	kreuzreaktive Carbohydratdeterminante
kU	Kilounits
LTP	Lipidtransferprotein
M	molar(e) oder männlich
(r)Mal d 1	(rekombinant erzeugtes) Malus domestica 1, das Majorallergen des Apfels
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
MPa	Megapascal (1 MPa = 10 bar)
OAS	orales Allergiesyndrom
OPT	oraler Provokationstest
PBS	Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PLL	Poly-L-Lysin
PT	Pricktest
PTP	Prick to Prick Test

RBL	Rat Basophil Leukemia (-Zellen)
RCA	Rhinokonjunktivitis allergica (Heuschnupfen)
PR	pathogenesis related
RAST	Radioallergosorbent-Test
SDS-PAGE	Sodium (Natrium)-Dodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese
W	weiblich
WHO	World Health Organisation

α	thermischer Ausdehnungskoeffizient
$\Delta\varepsilon$	molare Absorptionsdifferenz zwischen links- und rechtszirkular polarisiertem Licht
ρ	Dichte
Θ	molare Elliptizität

20 natürlich vorkommende Aminosäuren und die gebräuchlichen Abkürzungen im Drei- und Einbuchstabencode (Abbildung nach [19]):



Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Versuchskonzept	4
Abbildung 3.1: Struktur eines Immunglobulins [53].....	5
Abbildung 3.2: Epitopstrukturen [53].....	7
Abbildung 3.3: Neoepitop	8
Abbildung 3.4: Mechanismus der IgE-vermittelten allergischen Reaktion [53]	8
Abbildung 3.5: Röntgenkristall- (1) und NMR- (2) Struktur von Bet v 1 [24]	10
Abbildung 3.6: Bindung von Mal d 1-spezifischem IgE an Peptidstücke von Mal d 1 [101]	13
Abbildung 3.7: Prinzip der Druckerzeugung	17
Abbildung 3.8: Volumenreaktionsprofil [99]	20
Abbildung 3.9: Reaktionsgeschwindigkeitsverlauf in Abhängigkeit vom Druck.....	21
Abbildung 3.10: Phasendiagramm von Wasser [9].....	23
Abbildung 3.11: Spezifisches Volumen von Wasser in Abhängigkeit von Druck und Temperatur [75]	24
Abbildung 3.12: Thermischer Ausdehnungskoeffizient α von Wasser in Abhängigkeit von Druck und Temperatur [9]	24
Abbildung 3.13: Spezifische Wärmekapazität c_p von Wasser in Abhängigkeit von Druck und Temperatur [9]	25
Abbildung 3.14: Temperaturerhöhung von Wasser während einer adiabaten Kompression [9]	26
Abbildung 3.15: Temperatur, Wärmeleitfähigkeit und spezifische Wärmekapazität während Hochdruckbehandlung in Abhängigkeit vom Druck [38]	27
Abbildung 3.16: Temperaturverläufe während Hochdruckbehandlung in verschiedenen Autoklaven [38].....	27
Abbildung 3.17: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von nativer (oben) und hochdruckbehandelter (600 MPa, 5 min) Kartoffel (unten).....	29
Abbildung 3.18: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von nativem (oben) und hochdruckbehandeltem (unten) Putenfleisch [87].....	30
Abbildung 3.19: Schematisches p/T -Diagramm der Denaturierungsgrenze eines Proteins [90]	32
Abbildung 3.20: β -Hexosaminidase-Freisetzung von sensibilisierten RBL-Zellen [49]	35
Abbildung 3.21: Theoretische IR-Absorptionsspektren (links) und CD-Spektren (rechts) von Sekundärstrukturen nach [76].....	39
Abbildung 3.22: FTIR-Spektren von Myoglobin (a: nativ, b: hitzedenaturiert bei 90 °C, c: druckdenaturiert 1 GPa <i>in situ</i> , d: nach der Entspannung) [90].....	41

Abbildung 3.23: FTIR-Absorptionsspektren von Ribonuclease A bei Drücken bis 870 MPa [69]	42
Abbildung 4.1: Geräteeinstellungen bei der Durchflusszytometrie [67]	49
Abbildung 4.2: Typische Histogramme: Negativkontrolle (A), Testansatz (B) und Positivkontrolle (C) [67]	49
Abbildung 5.1: PTP-Test-Ergebnisse Patient 15	63
Abbildung 5.2: PTP-Test-Ergebnisse Patient 18	64
Abbildung 5.3: PTP-Test-Ergebnisse Patient 23	65
Abbildung 5.4: PTP-Test-Ergebnisse Patient 24	66
Abbildung 5.5: PTP-Test-Ergebnisse Patient 25	67
Abbildung 5.6: PTP-Test-Ergebnisse Patient 26	68
Abbildung 5.7: PTP-Test-Ergebnisse Patient 27	69
Abbildung 5.8: PTP-Test-Ergebnisse Patient 28	70
Abbildung 5.9: PTP-Test-Ergebnisse Patient 29	71
Abbildung 5.10: PTP-Test-Ergebnisse Patient 30	72
Abbildung 5.11: PTP-Test-Ergebnisse Patient 31	73
Abbildung 5.12: PTP-Test-Ergebnisse Patient 32	74
Abbildung 5.13: Homologiemodell von Mal d 1 (Spektralfarbdarstellung mit AS-Bezeichnung).....	83
Abbildung 5.14: Homologiemodell von Mal d 1 (mit farblicher Kennzeichnung der Sekundärstruktur).....	84
Abbildung 5.15: Homologiemodelle von Mal d 1 aus verschiedenen Perspektiven ..	84
Abbildung 5.16: CD-Spektren von rMal d 1, nativ und hochdruckbehandelt.....	85
Abbildung 5.17: CD-Spektren von rMal d 1, nativ und thermisch behandelt.....	86
Abbildung 5.18: CD-Spektren von rMal d 1, nativ und hochdruckbehandelt (2. Messung).....	87
Abbildung 5.19: CD-Spektren von rMal d 1, Ausschnitt.....	88
Abbildung 5.20: CD-Spektren von rMal d 1, nativ und thermisch behandelt.....	88
Abbildung 5.21: CD-Spektren von Myoglobin, nativ und hochdruckbehandelt	90
Abbildung 5.22: CD-Spektren von Myoglobin, nativ und thermisch behandelt	90
Abbildung 5.23: CD-Spektren von Myoglobin (Ausschnitt)	91
Abbildung 5.24: CD-Spektren von PLL, nativ und hochdruckbehandelt bei pH 11 ...	92
Abbildung 5.25: CD-Spektren von PLL, nativ und hochdruckbehandelt bei pH 7	93
Abbildung 5.26: FTIR-Absorptionsspektren von rMal d 1 (Amid I-Bande)	94
Abbildung 5.27: Zweite Ableitung der FTIR-Spektren.....	95
Abbildung 6.1: Lipidtransferprotein aus Mais (15 NMR Strukturen, gelb: Disulfidbrücken) [26]	97
Abbildung 6.2: Mittlerer Quaddel- und Erythemdurchmesser (n = 31) bei dem orientierenden PTP Test mit Apfel 'Golden Delicious'.....	100

Abbildung 6.3: Durchschnittswerte der intensiven PTP Tests (Konfidenzintervalle mit $1-\alpha = 95\%$).....	101
Abbildung 6.4: Regressionsanalyse der Haltezeitreihen	102
Abbildung 6.5: Molekülstruktur von Mal d 1 (theoretisch) und Bet v 1	103
Abbildung 6.6: Durchschnittlicher Anteil an degranulierten basophilen Granulozyten bei neun Patienten nach Stimulation mit rMal d 1	105
Abbildung 10.1: Kopie des Schreibens der Ethikkommission vom 28.06.2001	M

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Wichtige Spezies, die Birkenpollen assoziierte Allergien hervorrufen [102, 8]	10
Tabelle 3.2 : Primärsequenz von Mal d 1 (Dreibuchstabencode)	12
Tabelle 3.3: IgE-Bindungskapazität von Mal d 1 und Mutanten (EAST) mit Seren von 13 Apfelallergikern [93].....	14
Tabelle 3.4: Mal d 1-Gehalt verschiedener Apfelsorten [93].....	15
Tabelle 3.5: Hochdruckbehandelte Lebensmittelprodukte (verändert nach [97]).....	18
Tabelle 3.6: Reaktionsvolumina ΔV für verschiedene Reaktionen [99, 33].....	22
Tabelle 3.7: Prozentualer α -Helix-Gehalt von drei Proteinen nach Erhitzen, chemischer Behandlung und Hochdruckbehandlung [36]	33
Tabelle 3.8: Sekundärstruktur eines Proteasoms nativ und nach Hochdruckbehandlungen [116].....	33
Tabelle 3.9: Charakteristische Minima und Maxima in CD- und FTIR-Spektren [76].....	39
Tabelle 3.10: Charakteristische FTIR-Bandenpositionen nach PELTON und McLEAN [73] (normaler Satz) und HOLTZHAUER [45] (kursiver Satz)	40
Tabelle 4.1: Produktspezifikation von rMal d 1	52
Tabelle 5.1: Daten der Patienten und Freiwilligen	55
Tabelle 5.2: Ergebnisse des PTP-Tests mit Haselnuss	59
Tabelle 5.3: Ergebnisse des PTP-Tests mit Karotte	59
Tabelle 5.4: Ergebnisse des PTP-Tests mit Kirsche.....	60
Tabelle 5.5: Ergebnisse des PTP-Tests mit Pfirsich.....	60
Tabelle 5.6: Ergebnisse des PTP-Tests mit Sellerie.....	60
Tabelle 5.7: Ergebnisse des PTP-Tests mit Apfel	61
Tabelle 5.8: Patientenkollektiv für die intensiven PTP Tests	62
Tabelle 5.9: PTP-Test-Ergebnisse der gesunden Kontrollgruppe.....	75
Tabelle 5.10: Ergebnisse der oralen Provokationstests mit Apfel.....	77

Tabelle 5.11: Blutspender für die Messung der Basophilendegranulation.....	78
Tabelle 5.12: Ergebnisse der Messung der Basophilendegranulation.....	79
Tabelle 5.13: Berechnete Zusammensetzung der Sekundärstruktur von Mal d 1 ...	81
Tabelle 5.14: Vorhersage der Sekundärstruktur nach verschiedenen Methoden (1-5).....	82
Tabelle 5.15: Auswertung der CD-Spektren von rMal d 1	86
Tabelle 5.16: Auswertung der CD-Spektren mit CONTIN und der Greenfield-Fasman-Formel	89
Tabelle 5.17: Auswertung der CD-Spektren von Myoglobin mit der Least square fit-Methode und der Greenfield-Fasman-Formel.....	91
Tabelle 5.18: Auswertung der CD-Spektren von PLL bei pH11 mit CONTIN und der Greenfield-Fasman-Formel.....	92

1 Einleitung

1.1 Hochdruck – ein neuer Freiheitsgrad

Mit dem Einzug der Hochdrucktechnologie in die Labors der Lebenswissenschaften in den letzten ein bis zwei Jahrzehnten sind die Aufbereitungs- und Behandlungsmöglichkeiten für alle denkbaren Substrate um einen Freiheitsgrad erweitert worden. Die Variation von Druck im Normalbereich, chemischen Faktoren und Temperatur ist Standard, während die Auswirkungen hoher hydrostatischer Drücke (*per definitionem* Drücke >100 MPa) nur sehr punktuell bekannt sind.

Grundsätzlich zeigen hochdruckinduzierte Veränderungen bei Biomolekülen zwar gewisse makroskopische Parallelen mit thermisch induzierten Veränderungen, auf molekularer Ebene sind sie jedoch oft unterschiedlich und neuartig. Die Forschung der letzten Jahre hat bereits viel versprechende Anwendungen dieser Effekte aufgezeigt. Einige Beispiele sind hierfür:

- Für medizinische Anwendungen sehr interessant ist die Möglichkeit, wässriges Material, z.B. Organgewebe, bei Temperaturen bis -20 °C ohne Einfrieren zu verwahren. Wasser bleibt bei Drücken um 200 MPa in diesem Temperaturbereich flüssig, und eine zellzerstörende Eiskristallbildung ist ausgeschlossen [63].
- Druckspezifische Änderungen der Proteinstruktur und die biologische Inaktivierung von Bakterien und Viren eröffnen neue Möglichkeiten bei der Herstellung von Impfstoffen. MEYER et al. [64] konnten zeigen, dass hochdruckinaktivierte SI-Viren bei Affen eine Immunantwort auslösen, die vor einer Infektion schützt.
- Die Hochdruckbehandlung als schonendes Verfahren zur Haltbarmachung von Lebensmitteln hat bereits Anwender in der Industrie gefunden. Verschiedene Produkte sind vor allem in Japan und den USA erhältlich.

Zu den druckempfindlichsten Biomolekülen zählen Proteine [34]. Proteine sind von größter Bedeutung für biologische Reaktionen aller Art. In dieser Arbeit steht der Einfluss hoher Drücke auf die immunologischen Eigenschaften von Lebensmitteln und deren Proteinen im Mittelpunkt. Ob allergieauslösende Lebensmittel durch Druck so beeinflusst werden können, dass die Gefahr einer allergischen Reaktion beim Verzehr gemindert wird, war die zentrale Fragestellung für diese Arbeit.

1.2 Lebensmittelallergien

“An apple a day, keeps the doctor away.”

Diese alte englische Weisheit deutet auf die gesundheitliche Wirkung hin, die Äpfeln schon immer beigemessen wurde. Äpfel haben seit Jahrhunderten einen festen Platz in der Volksheilkunde. Sie wirken verdauungsregulierend, steigern die Abwehr, senken den Cholesterinspiegel und vieles mehr [49, 58]. Konträr dazu stehen die steigende Angst der Bevölkerung vor Allergien und der subjektive Anstieg klinischer Symptomatik. Unter Umständen ist es heute dieser Apfel, der den Arztbesuch erst nötig werden lässt.

In Großbritannien gaben in einer Studie 19,9 % der Befragten an, unter einer Lebensmittelallergie zu leiden. Die Häufigkeit gesicherter Nahrungsmittelallergien liegt in Mitteleuropa mit etwa 1-2 % bei Erwachsenen und 3-4 % bei Kindern deutlich niedriger, stellt allerdings ein erhebliches allgemeines und individuelles Problem dar. Beim Erwachsenen sind pflanzliche Lebensmittel wie z.B. Äpfel, Nüsse und Gewürze, beim Kind Kuhmilch und Hühnerei die häufigsten Ursachen von Lebensmittelallergien [8, 18].

Lebensmittelallergien können sich als Reaktionen des Magen-Darm Kanals (orales Allergiesyndrom, Durchfall, Übelkeit, Bauchschmerz), als Hautreaktionen (Urticaria, Ekzem), als Beschwerden der Atemwege (Asthma, Rhinitis) oder sogar als lebensbedrohliche Reaktionen (anaphylaktischer Schock) äußern [40].

Bei einer allergischen Soforttypreaktion (Typ I nach Coombs und Gell [15]) bindet zellulär gebundenes IgE an das relevante Lebensmittelallergen. Dieser Antikörper-Antigen-Kontakt ist für die Entwicklung der allergischen Reaktion vom Soforttyp nötig [84]. Verändert sich die Antigenstruktur an der IgE-Bindungsstelle in dem Maße, dass keine Bindung im Sinne des Schlüssel-Schloss Prinzips mehr möglich ist, kann es nicht mehr zur allergischen Reaktion vom Typ I kommen. Nicht nur eine Veränderung der Form, auch die Veränderung der Lokalisation der Antikörperbindungsstellen im Protein können eine IgE-vermittelte Degranulation der Mediatorzellen und somit eine allergische Reaktion verhindern.

2 Zielsetzung

2.1 Idee

Strategien zur Senkung allergener Potenziale in Lebensmitteln werden schon seit einiger Zeit diskutiert. Besonders Säuglingsnahrung auf Kuhmilchbasis konnte durch saure Hydrolyse der Milchproteine erfolgreich dahingehend verändert werden [22]. Entsprechende Produkte sind bereits kommerziell erhältlich. Auch die Anwendung von Hochdruckprozessen wurde schon untersucht [53, 7], allerdings sind die Ergebnisse nicht umfassend, vor allem fehlen klinische Untersuchungen.

Der experimentelle Ansatz für diese Arbeit war, Lebensmittel, die allergische Reaktionen hervorrufen können, Hochdruck auszusetzen und diese klinisch experimentell an allergischen Patienten zu testen. Wenn hierbei festgestellt wird, dass eine bessere oder schlechtere Verträglichkeit eintritt, sollte außerdem *in vitro* durch analytische Methoden geklärt werden, warum dies so ist. Hierfür arbeitete eine interdisziplinäre Gruppe zusammen, welche die Gebiete Lebensmitteltechnologie, Medizin und biochemische Analytik mit einander verband.

Ziel dieser Arbeit war, folgende Fragestellungen zu beantworten und zu diskutieren:

- Welche Auswirkungen auf die Allergenität hat die Anwendung hoher Drücke bei der Lebensmittelbehandlung?
- Ist es sinnvoll, die Hochdruckbehandlung als Verfahrensschritt zur Herstellung hypoallergener Lebensmittel zu nutzen?
- Gibt es strukturelle Veränderungen der Allergene, wie würden sich diese auswirken und welcher Art könnten sie sein?
- Welche Empfehlung kann auf Grund dieser Erkenntnisse bei der Zulassung neuer Lebensmittelprodukte gegeben werden?

2.2 Versuchskonzept

Die experimentelle Arbeit gliederte sich in drei Abschnitte. Zunächst wurde eine Auswahl an klinisch relevanten Lebensmitteln getroffen, die dann vorbereitet und hochdruckbehandelt wurden. Die Auswahl richtete sich nach den zur Verfügung stehenden Patienten. In der anschließenden orientierenden Phase zeigten einfache Tests, ob eine veränderte allergische Reaktion erwartet werden konnte.

Eine eingehende Untersuchung eines Lebensmittels und seiner allergenen Faktoren und deren Veränderung durch Hochdruck werden in dieser Arbeit am Beispiel des Apfels gezeigt.

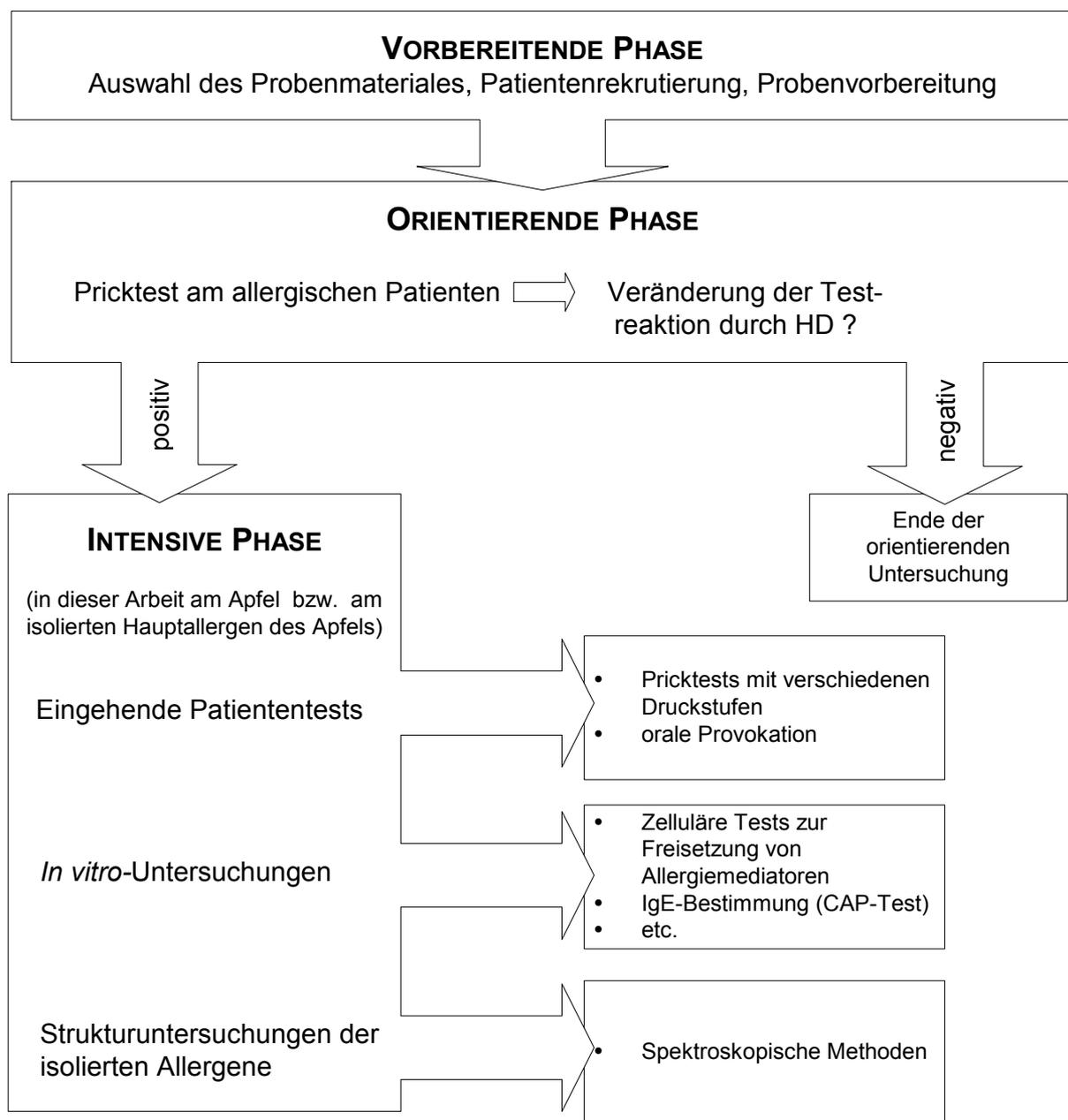


Abbildung 2.1: Versuchskonzept

Beim Menschen kommen fünf Ig-Klassen vor, die sich in der Primärstruktur der schweren Ketten unterscheiden. Es wird unterschieden zwischen IgG, IgA, IgM, IgD und IgE. IgG kommt im menschlichen Blut am häufigsten vor. IgE, das an den allergischen Reaktionen vom Soforttyp beteiligt ist, kommt normalerweise am wenigsten vor.

Antigene sind Substanzen, die geeignet sind, eine zelluläre oder humorale Immunantwort zu induzieren. Hierfür müssen die Antigene von Antikörpern erkannt und gebunden werden. Diese Ag-Ak-Bindung ist hochspezifisch und beruht auf starken, nicht kovalenten Wechselwirkungen. Häufig sind Antigene Proteine oder Glykoproteine [55].

3.1.2 Allergene

Allergene sind Antigene, die eine allergische Reaktion im Organismus auslösen können. Es sind im Allgemeinen höhermolekulare Verbindungen mit Molekularmassen zwischen 5 und 70 kDa. Kleinere Moleküle zeigen keine Immunreaktivität, können aber als sogenannte Haptene an größere Proteinmoleküle (Carrier) konjugiert sein und dann eine Immunantwort auslösen [2].

Natürliche Substanzen, die allergenes Potential besitzen, enthalten meist mehrere Allergene. Als Majorallergene werden solche Allergene bezeichnet, gegen die mehr als 50 % der getesteten (auf ein bestimmtes Agens allergischen) Patienten spezifische IgE-Antikörper aufweisen. Die übrigen Allergene werden entsprechend als Minorallergene bezeichnet [50].

3.1.3 Epitopstrukturen

Stellen oder Bereiche eines Antigens, die von Antikörpern spezifisch erkannt werden und an die der Antikörper bindet, werden Epitope oder antigene Determinanten genannt. Allergene und insbesondere Lebensmittelallergene sind im Allgemeinen Proteine (die auch glykolsiliert sein können), weshalb im Folgenden nur auf die Epitopstrukturen von Proteinen eingegangen wird.

Ein Proteinepitop kann auf zwei verschiedene Arten aufgebaut sein: als sequenzielles (kontinuierliches) oder konformationelles (diskontinuierliches) Epitop. In einem sequentiellen Epitop sind alle beteiligten Aminosäuren Teil einer einzigen Sequenz, während beim konformationellen Epitop die beteiligten Aminosäuren durch die Faltung der Peptidkette zueinander gebracht werden. Abbildung 3.2 zeigt diese beiden Möglichkeiten schematisch auf.

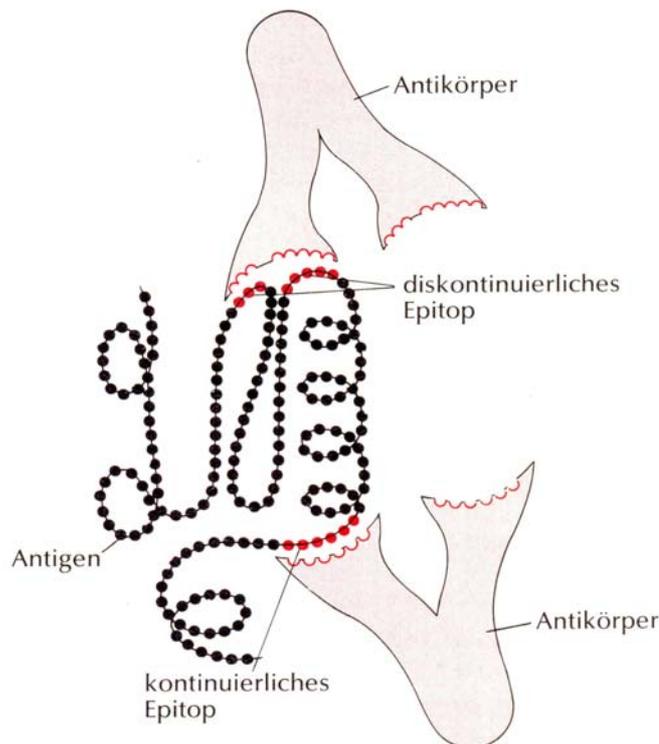


Abbildung 3.2: Epitopstrukturen [55]

Antikörper erkennen Epitope nur, wenn sie auf der Oberfläche des Moleküls lokalisiert sind. Im Inneren versteckte Aminosäuren werden nicht erkannt. Ob eine Region auf der Moleküloberfläche als Bindungsstelle geeignet ist, hängt von mehreren Faktoren ab [55]:

- Die Erreichbarkeit der Region. Generell lässt sich sagen, dass die Bindungsregionen des Fab immer konkav sind, was im Gegensatz bedeutet, dass Epitope konvex sein müssen, also aus dem Molekül herausragen.
- Die segmentale Mobilität. Atome sind in einem Molekül nicht starr verankert, sondern sind je nach Umgebungsbedingungen mehr oder weniger beweglich. Je beweglicher ein Ligand ist, desto einfacher ist es für ihn, sich einer Bindungsstelle anzupassen.
- Der dritte Faktor ist die relative Hydrophilie. Die Theorie besagt, dass Regionen mit einem höheren Anteil hydrophiler Reste besser mit den Antikörperbindungsstellen interagieren können.

Allerdings sind diese Faktoren nicht unumstritten, und in der Realität ist eine Ag-Ak-Bindung von vielen individuellen Faktoren bestimmt.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es wichtig zu erwähnen, dass eine von außen induzierte Veränderung der Proteinstruktur theoretisch neue Epitope (Neoepitope) hervorbringen kann. Auf- oder Umfaltungen der Proteinkette können zu einem Freilegen von potenziell immunogenen Sequenzen oder Konformationen führen, wie in Abbildung 3.3 veranschaulicht.

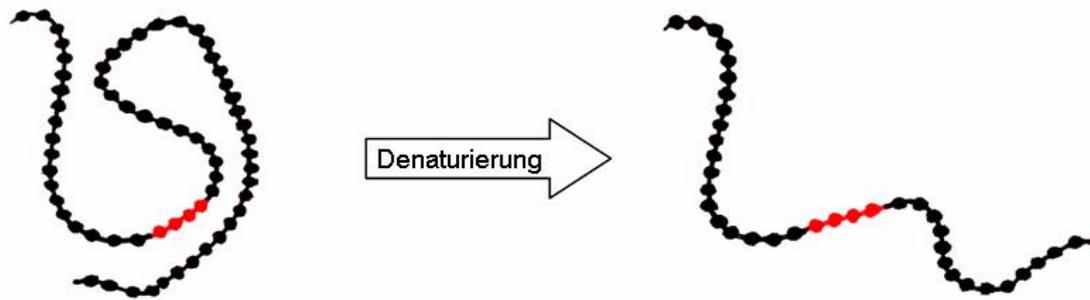


Abbildung 3.3: Neoepitop

Eine zumindest hypothetische Möglichkeit der Bildung neuer Allergene (Neoallergene) ist hierdurch gegeben.

An der Epitopstruktur können auch Carbohydratreste der Glykosilierung beteiligt sein, die kreuzreaktiv in verschiedenen Pflanzen vorkommen. Diese Epitope werden kreuzreaktive Carbohydratdeterminanten (KCD) genannt.

3.1.4 Lebensmittelallergien

Unverträglichkeitsreaktionen durch Lebensmittel stellen ein zunehmendes Problem dar. Neben toxischen oder pseudoallergischen Reaktionen zählen Lebensmittelallergien zu den häufigsten Unverträglichkeiten. Typische Lebensmittelallergien sind IgE-vermittelte Typ I- oder auch Sofortreaktionen [84, 15]. Der Mechanismus einer IgE-vermittelten allergischen Reaktion wird in Abbildung 3.4 dargestellt.

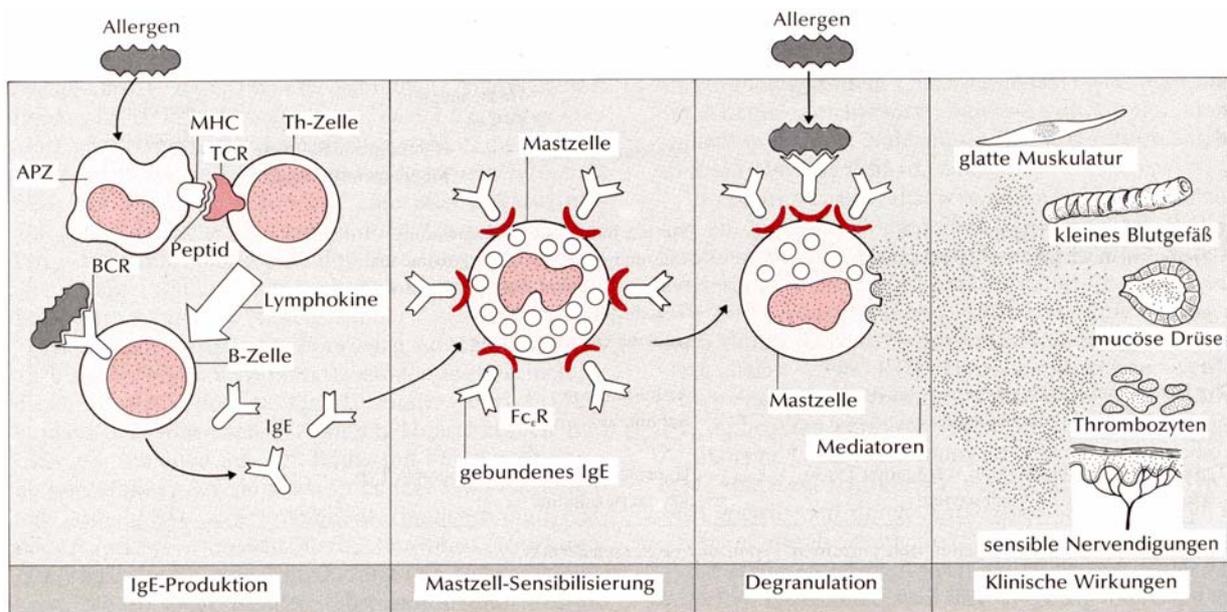


Abbildung 3.4: Mechanismus der IgE-vermittelten allergischen Reaktion [55]

(Abkürzungen: APZ, Antigen präsentierende Zelle; BCR, B-Zell-Rezeptor; Fc_ε R, Fc-Rezeptor für IgE; MHC, Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. Major histocompatibility complex); TCR, T-Zell-Rezeptor)

Der erste Kontakt mit dem Allergen aktiviert T- und B-Lymphozyten, wobei letztere spezifisches IgE freisetzen (in der Abbildung links). Diese IgE binden mit ihrer Fc-Region an die Fc ϵ -Rezeptoren der Mastzellen und Basophilen und sensibilisieren sie dadurch (mitte links). Bei erneutem Kontakt findet zwischen Allergen, Antikörpern und Mastzellen/Basophilen eine vernetzende Reaktion statt, bei der die Fc ϵ -Rezeptoren zusammengelagert („Bridgeing“) und die Zellen zur Degranulation angeregt werden (mitte rechts). Die freigesetzten Mediatoren (z.B. Histamin) bewirken die typischen klinischen Erscheinungen (links).

Ein gewisses Problem stellt die exakte Diagnostik von Lebensmittelallergien dar. *In vitro*-Methoden können zwar einzelne Schritte der Allergiekaskade sehr genau darstellen, korrelieren allerdings nicht immer mit klinisch relevanten Erscheinungen (also dem Auftreten der Typ I-Reaktion). Der allgemeinen Fachmeinung zufolge kann eine LMA nur sicher durch doppelblinde, placebokontrollierte orale Provokation (engl. double-blind, placebo-controlled, food challenge DBPCFC) diagnostiziert werden. In der klinischen Praxis kann sich dies jedoch schwierig gestalten. Allein die Verblindung der Lebensmittel in einem Neutralbrei ist aufgrund von Geruch oder Färbung oft nicht möglich. Die Diagnostik einer Lebensmittelallergie stützt sich auf die Verbindung mehrerer Diagnostika wie Pricktest, Anamnese, orale Provokation und *in vitro*-Methoden.

3.1.4.1 Birkenpollen assoziierte Allergien

Allergene, die über die Luft in Kontakt mit Menschen kommen, nennt man Aero- oder Inhalationsallergene. Aeroallergene können tierischen, pflanzlichen oder chemisch-anthropogenen Ursprungs sein. Epidemiologisch sehr bedeutend sind von Pollen hervorgerufene Allergien (Typ I), die während der entsprechenden Pollenflugzeiten zum Teil erheblichen Leidensdruck für die Betroffenen verursachen. Einige dieser Pollenallergene zeigen mit verschiedenen Lebensmittelallergenen Epitop-ähnlichkeiten, so dass es zu Kreuzreaktionen in der IgE-Antwort kommt [84]. Eine wichtige Gruppe kreuzreagierender Allergene tritt in verschiedenen Pollen und pflanzlichen Lebensmitteln auf. Hierzu gehören u.a. Birkenpollen, Gräserpollen, Apfel, Haselnuss und Sellerie [109]. Als Haupt- oder Leitallergen in dieser Gruppe wird Bet v 1, das Majorallergen in Birkenpollen, angesehen, so dass in diesem Zusammenhang oft von einer Birkenpollen assoziierten Allergie oder Birkenpollinosis gesprochen wird.

Grund für diese Kreuzreaktivität ist eine mehr oder weniger ausgeprägte Homologie der allergenen Proteine in ihrer Sequenz, ihrer räumlichen Struktur und damit der Epitopstrukturen. Diese Homologie der Proteine ist auf eine phylogenetische Verwandtschaft der Ursprungspflanzen zurückzuführen. Die meisten Ursprungspflanzen gehören zur Gattung *Rosaceae* (Rosengewächse) und *Apiaceae*

(Doldenblütler). Des Weiteren zeigen die Proteine dieser „Familie“ auch eine funktionelle Verwandtschaft: Sie gehören zur Gruppe so genannter PR-Proteine (pathogenesis related), deren Expression durch Stressfaktoren (Infektion, Verletzung, Kälte, Hitze etc.) induzierbar ist [8]. Tabelle 3.1 listet die wichtigsten Spezies mit den zugehörigen Majorallergenen auf.

Tabelle 3.1: Wichtige Spezies, die Birkenpollen assoziierte Allergien hervorrufen [106, 8]

Spezies	Gattung	Majorallergen
Betula verucosa (Birke)	Rosaceae	Bet v 1
Malus domestica (Apfel)	Rosaceae	Mal d 1
Prunus avium (Süßkirsche)	Rosaceae	Pru av 1
Apium graveolens (Sellerie)	Apiaceae	Api g 1
Daucus carota (Karotte)	Apiaceae	Dau c 1
Pyrus communis (Birne)	Rosaceae	Pyr c 1
Prunus armeniaca (Aprikose)	Rosaceae	Pru ar 1
Corylus avellana (Haselstrauch)	Corylaceae	Cor a 1

Die räumliche Struktur von Bet v 1 konnte 1996 von GAJHEDE et al. [24] durch Röntgenkristallographie und Nukleomagnetresonanz (NMR) aufgeklärt werden. Abbildung 3.5 zeigt die Struktur mit farblich gekennzeichneten Sekundärstrukturmerkmalen (gelb: β -Faltblatt, rot: α -Helix). Links eine Darstellung der Röntgenkristallanalyse, rechts sind 20 Aufnahmen einer NMR-Spektroskopie übereinander gelagert.

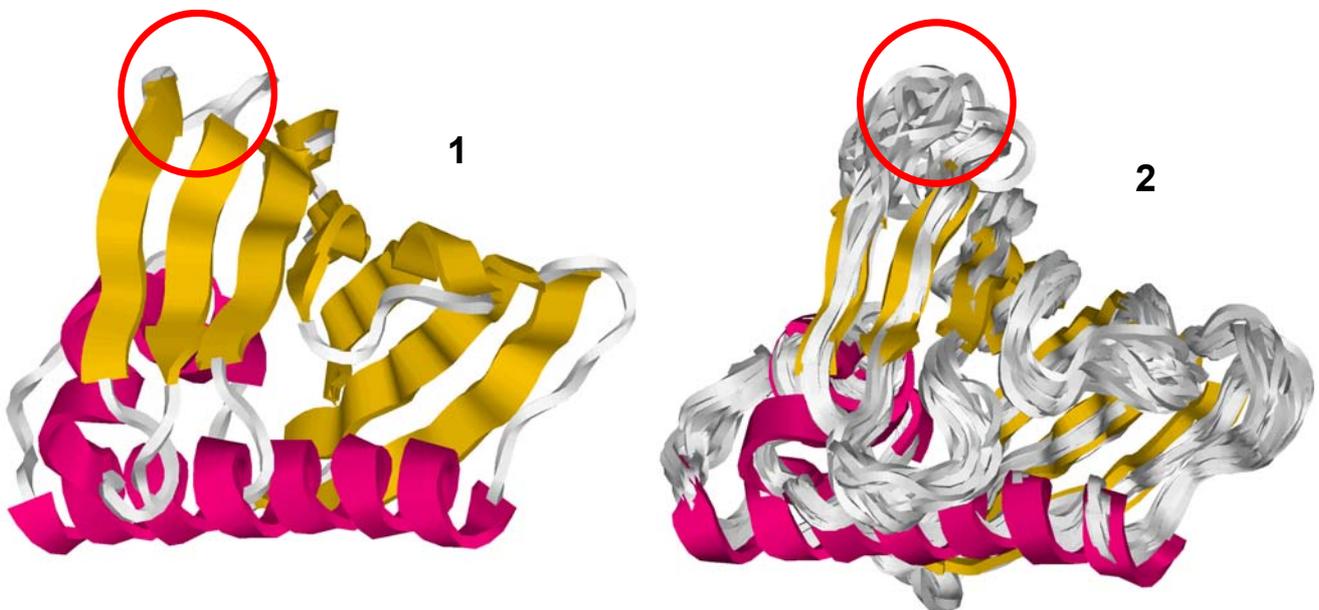


Abbildung 3.5: Röntgenkristall- (1) und NMR- (2) Struktur von Bet v 1 [24]

Bet v 1 ist ein globuläres Protein mit α -Helices, antiparallelen β -Faltblattstrukturen und Zufallsstrukturen. Die Faltblattstrukturen umgeben eine 25 Aminosäuren lange c-terminale, amphipatische α -Helix. Bezüglich Konvexität und segmentaler Mobilität

fällt hier schon die Region um das Prolin 50 (rote Kreise) ins Auge, die von MIRZA et al. [65] als Ig-bindendes Epitop identifiziert werden konnte. Diese Stelle ragt aus der Gesamtstruktur heraus und ist sehr beweglich, was sich in den differenten Einzelaufnahmen an dieser Stelle zeigt. Allerdings handelte es sich hierbei um monoklonales murines IgG, da die Inhomogenität von polyklonalem humanem IgE eine Kristallisation zur Strukturaufklärung verhinderte. Mit großer Wahrscheinlichkeit ist an dieser Stelle auch ein IgE-bindendes Epitop lokalisiert, da das murine IgG die Bindung zu humanem IgE komplett oder teilweise inhibierte.

Andere Birkenpollen assoziierte Allergene, die in verschiedenen Pflanzen vorkommen, sind Profiline [100] und KCD. Profiline sind Proteine mit 12-16 kDa die in vielen eukaryotischen Zellen vorkommen [113]. Pflanzenprofiline zählen aufgrund ihrer hohen strukturellen Verwandtschaft und der damit einhergehenden Kreuzreaktivität zu einer wichtigen Gruppe von pflanzlichen Minorallergenen. KCD sind Carbohydratreste von Glycoproteinen, die eine IgE-Epitop bilden. In Pflanzen wurden α 1,3-Fukose- und β 1,2-Xylose-Reste an asparaginverknüpften, mannosereichen Oligosacchariden als Antigene identifiziert [117].

3.1.4.2 Allergie gegen Apfel (*Malus domestica*)

Der Apfel ist im gemäßigten Klimabereich ein viel verzehrtes Fruchtbst. Er ist die Sammelbalgfrucht des zur Gattung der *Rosaceae* gehörenden Apfelbaums, der durch Züchtung und Kreuzung eine Vielfalt von ca. 20 000 Sorten aufweist. Etwa 30 Sorten haben im Handel Bedeutung. In Deutschland sind 'Jonagold', 'Elstar', 'Golden Delicious', 'Gala', 'Granny Smith', 'Braeburn', 'Cox Orange' und 'Gloster' die meistverzehrten Sorten. Insgesamt werden in Deutschland ca. 1,2 - 1,3 Mio. t/a produziert und importiert.

Eine neuere DBPCFC-Studie mit Apfel von SKAMSTRUP-HANSEN [93] hat ergeben, dass 42,5 % (frisch hergestellter Apfelsaft) bzw. 60 % (gefriergetrocknetes Apfelpulver) der Birkenpollinotiker auch gegen Apfel sensibilisiert sind und typische Symptome zeigen. Typisch ist das orale Allergiesyndrom (OAS), das sich durch Kribbeln und Jucken im Mund- und Rachenraum und Schwellungen der Lippen und Mundschleimhäute bemerkbar macht. Oft wird von Patienten berichtet, dass die OAS-Symptomatik sich während der Pollenflugzeiten verschlimmert [33]. Selten treten auch schwerwiegende systemische Reaktionen auf. Sogar eine Reaktion auf einen Kuss nach vorherigem Apfelverzehr des Partners konnte dokumentiert werden [119]. Verschiedene Allergene wurden identifiziert, das Majorallergen ist Mal d 1, ein 18 kDa Protein [114, 106]. Kreuzreaktive Aeroallergene sind in Pollen vorhanden, vor allem von Birke und in geringerem Maße in Beifuß- und Gräserpollen [20, 45]. Neben Mal d 1 sind verschiedene Minorallergene bekannt:

- Mal d 2, ein thaumatinhomologes Protein mit 31 kDa [47]
- Mal d 3, ein 9 kDa Lipidtransferprotein [74]
- Apfelprofilin mit 14-15 kDa [89]
- Weitere nicht genauer bestimmte Allergene mit 35, 50, 60 und 67 kDa [66].

Die meisten Apfelallergiker berichten Symptomfreiheit beim Verzehr von verarbeiteten Apfelprodukten, wie z.B. Apfelmus oder Apfelkuchen, was auf eine thermische Instabilität eines oder mehrerer Apfelallergene hinweist [7]. Die allergene Potenz steht auch in Zusammenhang mit der Apfelsorte und dem Reifegrad des Apfels. Als besonders Mal d 1-reich erwiesen sich die Sorten 'Golden Delicious' und 'Granny Smith', bei denen VIETHS et al. [110] auch einen Anstieg der Mal d 1-Konzentration mit fortschreitendem Reifegrad dokumentierte.

3.2 Mal d 1 – das Hauptallergen des Apfels

VIETHS, SCHÖNING und PETERSEN [114] wiesen 1994 durch zweidimensionale Gelelektrophorese und Immunoblotting die Existenz eines Proteins im Apfelextrakt nach, das sowohl mit monoklonalen als auch polyklonalen Bet v 1-spezifischen IgE kreuzreagiert. In der Folge gelangen VANEK-KREBITZ et al. [106] die Klonierung, Expression (in *E. coli*) und Sequenzierung dieses Proteins, worauf sie es nach den Richtlinien der WHO für Allergennomenklatur Mal d 1 (GenBank-Eintrag: Z84969) benannten. Mittlerweile sind verschiedene Isoforme mit kleineren Abweichungen in der Primärstruktur bekannt, auf die weiter unten noch eingegangen wird. Tabelle 3.2 gibt die Primärstruktur von Mal d 1 wieder, wie es in vielen Apfelsorten, hauptsächlich in 'Golden Delicious', zu finden ist (GenBank-Eintrag: X83672) [97]. Das Molekulargewicht beträgt 17,7 kDa, und der isoelektrische Punkt liegt bei $pI = 5,5$.

Tabelle 3.2 : Primärsequenz von Mal d 1 (Dreibuchstabencode)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	GLY	VAL	TYR	THR	PHE	GLU	ASN	GLU	PHE	THR
10	SER	GLU	ILE	PRO	PRO	SER	ARG	LEU	PHE	LYS
20	ALA	PHE	VAL	LEU	ASP	ALA	ASP	ASN	LEU	ILE
30	PRO	LYS	ILE	ALA	PRO	GLN	ALA	ILE	LYS	GLN
40	ALA	GLU	ILE	LEU	GLU	GLY	ASN	GLY	GLY	PRO
50	GLY	THR	ILE	LYS	LYS	ILE	THR	PHE	GLY	GLU
60	GLY	SER	GLN	TYR	GLY	TYR	VAL	LYS	HIS	ARG
70	ILE	ASP	SER	ILE	ASP	GLU	ALA	SER	TYR	SER
80	TYR	SER	TYR	THR	LEU	ILE	GLU	GLY	ASP	ALA
90	LEU	THR	ASP	THR	ILE	GLU	LYS	ILE	SER	TYR
100	GLU	THR	LYS	LEU	VAL	ALA	CYS	GLY	SER	GLY
110	SER	THR	ILE	LYS	SER	ILE	SER	HIS	TYR	HIS
120	THR	LYS	GLY	ASN	ILE	GLU	ILE	LYS	GLU	GLU
130	HIS	VAL	LYS	VAL	GLY	LYS	GLU	LYS	ALA	HIS
140	GLY	LEU	PHE	LYS	LEU	ILE	GLU	SER	TYR	LEU
150	LYS	ASP	HIS	PRO	ASP	ALA	TYR	ASN		

Seitdem konnte in verschiedenen Arbeiten die Kreuzreaktivität dieses Proteins bestätigt werden, unklar und teils widersprüchlich beschrieben sind jedoch Art und Lokalisation der Epitope [45, 106]. Ein Epitopmapping durch enzymatischen Verdau mit anschließendem Immunoblotting der Peptide ist nur sehr bedingt geeignet, die Immunreaktivität eines komplex gefalteten Proteins zu erfassen. Künstlich erzeugte punktuelle Mutationen der Primärstruktur können zu einer Veränderung der Reaktivität führen. Allerdings ist es spekulativ, vom Ort der Punktmutation auf den Ort eines Epitops zu schließen, speziell wenn es sich um konformationelle Epitope handelt. Hier sollen die Arbeiten von UEHARA et al. [105] und SON et al. [96, 97] dargestellt werden, die sich dieser Methoden bedienen.

Unter dem Aspekt einer Hyposensibilisierungstherapie mit definierten Allergenbruchstücken (Peptiden) untersuchten UEHARA et al. [105] die Bindungsfähigkeit von Patienten-IgE an Mal d 1-Peptide mit einer Länge von 20 Aminosäuren. Die IgE-Bindungsfähigkeit von Mal d 1 und der Peptide wurde durch die Messung der Radioaktivität von ¹²⁵I-Anti-IgE in Polyacrylamidgel (Mal d 1) und Sepharosegel (Peptide) gemessen. Die gemessene Strahlendosis bei Mal d 1 („Crude“) entspricht hier 100 %. Abbildung 3.6 zeigt die Ergebnisse von drei Patienten (I, W und Y).

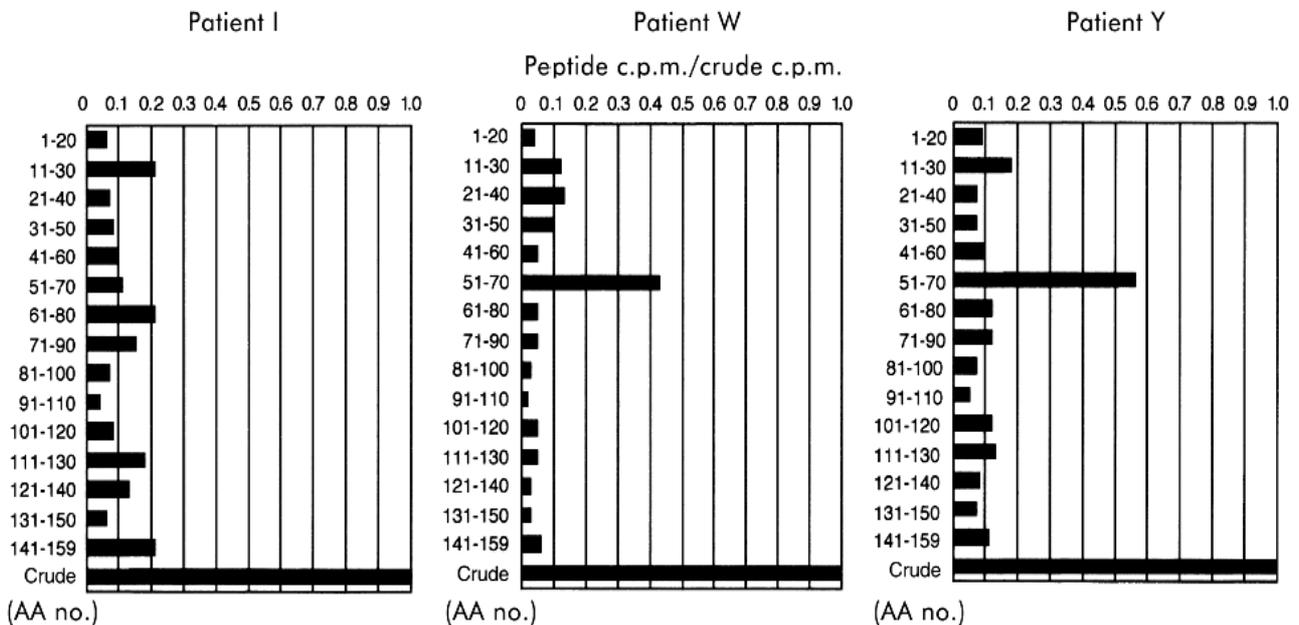


Abbildung 3.6: Bindung von Mal d 1-spezifischem IgE an Peptidstücke von Mal d 1 [105]

IgE der Patienten Y und W reagiert überdurchschnittlich stark mit dem Peptid 51-70. Auch wurde nachgewiesen, dass dieses Peptid die Bindung zu Mal d 1 teilweise inhibiert. Geht man von einer räumlich-strukturellen Ähnlichkeit von Mal d 1 und Bet v 1 aus, passt dieses Ergebnis sehr gut zu der Epitopanalyse von Bet v 1 von MIRZA et al. [65]. Da die Bindungskapazität dieses Peptids nur ca. 50 % erreicht, ist zu vermuten, dass die Sequenz 50-71 nur Teil einer komplexeren Epitopstruktur ist.

Insbesondere bleibt fraglich, ob die Bindung an Mal d 1 in dieser Untersuchung mit einer *in vivo* IgE-Mal d 1-Bindung vergleichbar ist, da das Protein hier nach SDS-PAGE in aufgefaltetem Zustand vorlag.

SON et al. [97] nehmen an, dass die IgE-Reaktivität von Mal d 1 allein durch Konformationsepitope bedingt ist. Proteolytische Fragmente und synthetische Peptide zeigten hier nur schwache IgE-Bindungskapazitäten. Insgesamt 15 Isoforme von Mal d 1 aus sieben Apfelsorten sowie künstliche, punktmutierte Isoforme wurden auf Ihre IgE-Bindungskapazität hin untersucht. Als Methodik wurde SDS PAGE mit anschließendem Immunoblotting und ergänzend der Enzymallergosorbent-Test (EAST) angewandt. Der EAST ist besser geeignet, eine *in vivo*-Reaktion zu beschreiben, da er unter „nativeren“ Bedingungen durchführbar ist. Die Ergebnisse dieses EAST sind in Tabelle 3.3 dargestellt.

Tabelle 3.3: IgE-Bindungskapazität von Mal d 1 und Mutanten (EAST) mit Seren von 13 Apfelallergikern [97]

EAST-Klasse*	Apfel-extrakt	n Mal d 1	Mal d 1c	GD26	GDC	GDP	GS29	GSC	GSP
0	0	0	0	0	1	13	0	2	10
1	0	0	1	1	2	0	1	2	1
2	5	8	5	4	8	0	6	5	2
3	8	5	7	8	2	0	4	4	0

n Mal d 1: natürliches Mal d 1 aus 'Golden Delicious'

Mal d 1 c: rMal d 1 aus 'Golden Delicious'

GD26: rMal d 1 aus 'Golden Delicious'

GDC: Mal d 1-Mutant von GD26 (S111→ C)

GDP : Mal d 1-Mutant von GD26 (S111→ P)

GS29: rMal d 1 aus 'Granny Smith'

GDP : Mal d 1-Mutant von GS29 (S111→ C)

GDP : Mal d 1-Mutant von GS29 (S111→ P)

* EAST-Klasse 0: kein spezifisches IgE im Serum nachweisbar,

EAST-Klasse 3: außerordentlich hoher spezifischer IgE-Spiegel im Serum

Besonders interessant ist, dass die beiden Mal d 1-Mutanten GDP und GSP keine bzw. eine deutlich schwächere IgE-Bindungskapazität zeigen. Bei GDP, einer Mutante von Mal d 1 aus 'Golden Delicious' und GSP, einer Mutante von Mal d 1 aus 'Granny Smith', wurde das Serin an der Position 111 gegen Prolin ausgetauscht. Prolin hat auf Grund seiner Ringstruktur strukturbrechende Eigenschaften, was bei Mal d 1 zu einer Inaktivierung der Epitope führt. SON et al. bezeichnen daher die Stelle 111 als „Hot Spot“ für die Epitopdetermination. Ein Austausch an der Position

111 gegen Cystein (Mutanten GDC und GSC) führt zu einer weniger ausgeprägten Inaktivierung. Nur eines bzw. zwei der Seren zeigten keine Reaktionen mehr.

Bei der Untersuchung der 15 Mal d 1-Isoformen ergab sich, dass zwei Hauptisoforme existieren (Mal d 1a und Mal d 1b nach SON et al. [97]). Allein sechs der Klone waren identisch mit Mal d 1a, das aus der Sorte 'Granny Smith' kloniert wurde. Die sechs identischen Isoforme stammen aus den Sorten aus 'Jamba', 'Golden Delicious', 'Gloster', 'Gala' und 'Jonagold'. Mal d 1b unterscheidet sich in 15 Aminosäuren von Mal d 1a und wurde aus 'Golden Delicious' kloniert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Mal d 1-Isoformen a und b in den Apfelsorten am weitesten verbreitet sind und die Seren gleichspezifisch auf diese Isoformen reagierten. Die unterschiedliche allergene Potenz der Apfelsorten ist daher nicht auf unterschiedliche Allergenisforme zurückzuführen, sondern auf den absoluten Mal d 1-Gehalt eines Apfels. Der Gehalt in sieben viel konsumierten Apfelsorten ist in Tabelle 3.4 zusammengestellt.

Tabelle 3.4: Mal d 1-Gehalt verschiedener Apfelsorten [97]

Apfelsorte	Mal d 1-Gehalt in mg/100g
'Golden Delicious'	4,5
'Granny Smith'	1,6
'Jonagold'	0,7
'Idared'	0,8
'Royal Gala'	1,8
'Jamba'	0,5
'Gloster'	0,4

Aufgrund von Strukturhomologie zu entsprechenden Proteinen anderer Spezies wird Mal d 1 als PR 10-Protein angesehen [21], obwohl sein Pathogenesebezug bisher nicht dokumentiert werden konnte. Viele höhere Pflanzen exprimieren bestimmte Proteine als Antwort auf pathogene Prozesse wie z.B. Infektionen (Pilze, Bakterien, Viren) oder physikalischen Stress. 1994 wurde eine einheitliche Nomenklatur für diese Proteine vorgeschlagen, innerhalb der die PR-Proteine je nach strukturellen oder biologischen Eigenschaften in verschiedene Klassen eingeteilt werden [107, 108]. Die Bet v 1-homologen Proteine bilden eine eigene Klasse mit der Nummer 10. Der Pathogenesebezug von Mal d 1 konnte 2000 von PÜHRINGER et al. [81] auf genetischer Ebene belegt werden. Mal d 1 wird von dem Multigen Ypr10*a codiert, und die Proteinexpression wird durch verschiedene Stressfaktoren induziert.

Folgende abiotische Stimuli wurden getestet:

- **Verwundung**: Es konnte entgegen der Erwartung kein Effekt beobachtet werden.
- Die äußerliche Anwendung von **reduzierendem Glutathion** (oxidativer Stress) führte zu erhöhter Mal d 1-Expression.
- Die äußerliche Anwendung von **Salicylsäure** (ein wichtiger Mediator der Signaltransduktion bei der Pathogenabwehr) führte ebenfalls zur Hochregulierung der Expression.
- Die äußerliche Anwendung von **Abscisinsäure**, einem Mediator bei Stressantworten auf Wasserentzug, osmotischen Stress, Gefrieren und Verwundung, führte zu keiner erhöhten Mal d 1-Expression.
- **Ethephon**, ein Reifungs- und Alterungsprozessbeschleuniger, führte zu keiner erhöhten Mal d 1-Expression.

Folgende biotische Stimuli wurden getestet:

- Eine **virale Infektion** (transgene Tabakpflanzen mit Tabakmosaikvirus) führte zu einer erhöhten Expression, die durch vorangehende Behandlung mit Salicylsäure noch verstärkt werden konnte.
- Eine Provokation mit **fungalen Zellwandbestandteilen** (*Botrytis cinera*) führte zu einer starken Genaktivierung und damit zur Mal d 1-Expression.

Daneben wurde beobachtet, dass die Expression vom **Alter** der Blätter abhängt. Junge Blätter an der Triebspitze des transgenen Tabaks zeigten den niedrigsten Expressionsgrad, alte (noch grüne) Blätter den höchsten.

3.3 Hochdrucktechnologie

Die Technik zur Erzeugung hydrostatischer Drücke im Mega- und Giga Pascal-Bereich bedient sich (meistens) des Prinzips der Druckübersetzung. Mit diesem Prinzip wird Druck (p_1) auf einer größeren Übersetzerfläche (A_1) in Hochdruck (p_2) auf kleiner Übersetzerfläche (A_2) transformiert. Abbildung 3.7 stellt das Prinzip schematisch dar.

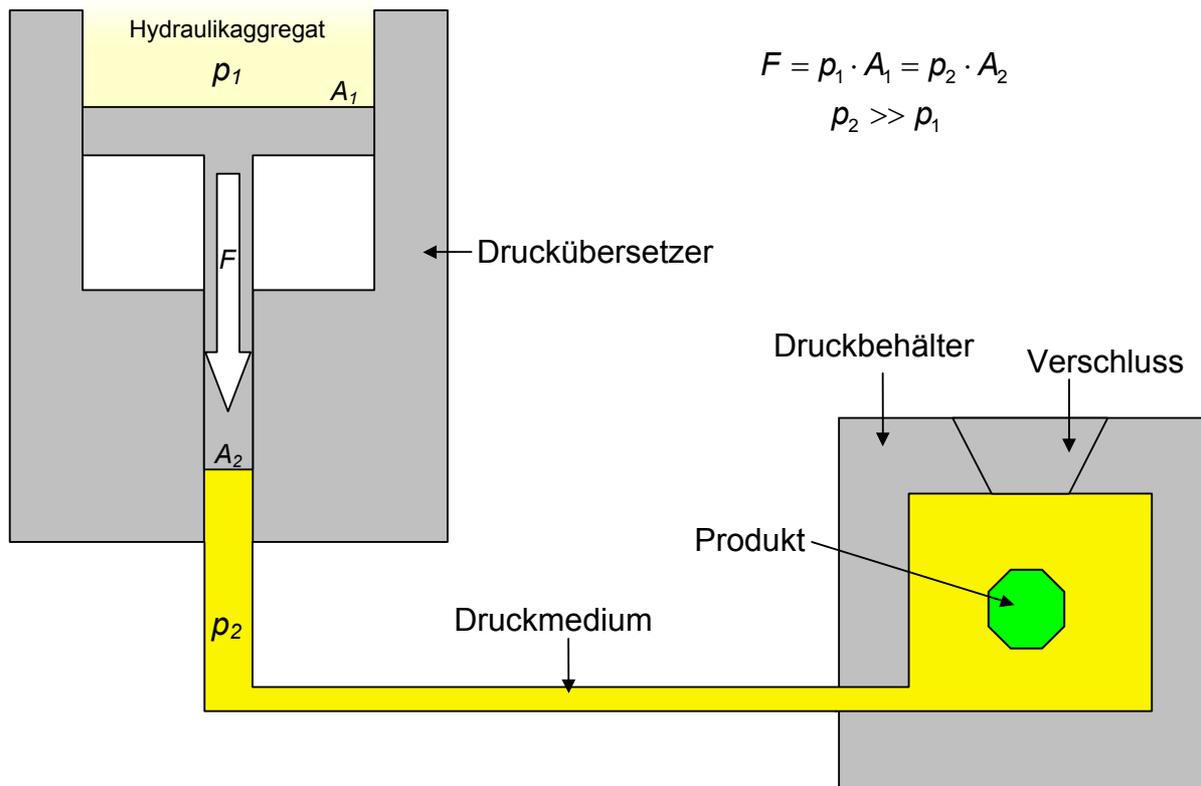


Abbildung 3.7: Prinzip der Druckerzeugung

Aufgrund der hohen Drücke im Autoklaven und in den Leitungen sind die Anforderungen an die Werkstoffe erheblich. Spezielle hochfeste und hochelastische Stähle sowie komplexe Techniken zur Abdichtung der Systeme treiben Investitionskosten für Hochdrucksysteme in der industriellen Anwendung in die Höhe. Dennoch hat sich im letzten Jahrzehnt ein gewisser Markt für hochdruckprozessierte Lebensmittel etabliert. Die Vorteile einer Hochdruckbehandlung (z.B. Frischecharakter und Haltbarkeit) konnten im Premiumbereich erfolgreich vermarktet werden. SUZUKI [101] stellte eine Übersicht der erhältlichen Produkte mit Schwerpunkt Japan zusammen. Einige Beispiele daraus sind in Tabelle 3.5 aufgelistet.

Tabelle 3.5: Hochdruckbehandelte Lebensmittelprodukte (verändert nach [101])

Produkt	Hochdruckprozess	Grund der HD-Behandlung	Verkaufspreis und Land
verschiedene Konfitüren (Apfel, Kiwi, Erdbeere, Heidelbeere)	400 MPa 20 °C 30 min	Pasteurisation, verbesserte Gelbildung	2,5-facher Normalpreis; Japan
Mandarinensaft	300-400 MPa 5 °C 10-15 min	verbessertes Aroma	2-facher Normalpreis; Japan
Vorgekochter Reis	400 MPa 20 °C 10 min	„Hypoallergenität“ (s. KATO et al. [53])	Umsatz: 100 Mio. Yen; Japan
Kochschinken	400 MPa 17 °C 20 min	Haltbarkeit, verbesserte Qualität	Spanien, teilweise andere EU-Länder
Austern	400 MPa 7 °C 10 min	Haltbarkeit, ohne Geschmack und Textur zu verändern (5 Wochen, 2 °C)	USA

Die Echigo Seika Co., Ltd. (Japan) stellte kürzlich ihr Hochdrucksystem mit zwei kommunizierenden Autoklaven vor, welches die Kosten einer Hochdruckbehandlung effektiv senkte [90]. Mit 1,25 US Cent pro 300 ml-Packung Kosten für die Hochdruckbehandlung und einer erfolgreichen Vermarktung unterschiedlicher Produkte bestätigt Echigo Seika Co., Ltd. einen Trend, der vermuten lässt, dass in den nächsten Jahren immer mehr Hochdruck-Produkte auf den Markt kommen werden.

3.3.1 Thermodynamische Grundlagen

Das Prinzip von Le Chatelier besagt, dass Druck eine Reaktion und die Einstellung ihres Gleichgewichts fördert, wenn sich das Volumen der Reaktanden verringert. Die "treibende Kraft" für den Ablauf von chemischen Reaktionen ist die Veränderung der freien Enthalpie G von Edukten und Produkten.

$$\Delta G = G_{\text{Edukt}} - G_{\text{Produkt}} \quad (3.1)$$

Für $\Delta G < 0$ tritt ein spontaner Reaktionsverlauf ein.

Für thermodynamische Reaktionen gilt bezüglich der Einstellung eines chemischen Gleichgewichts der Reaktanden:

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (3.2)$$

R : allgemeine Gaskonstante [8,314 J/(mol K)]

T : Temperatur [K]

ΔG : Änderung der freien Enthalpie [J/mol]

K : chemische Gleichgewichtskonstante

Für die Gleichgewichtskonstante K gilt bei einer einfachen chemischen Reaktion $A + B \rightarrow AB$ nach dem Massenwirkungsgesetz:

$$K = \frac{[AB]}{[A][B]} \quad (3.3)$$

[A] : Konzentration A

[B] : Konzentration B

[AB] : Konzentration AB

Durch Differentiation der Gleichung 3.2 nach dem Druck erhält man für $T = \text{konst.}$:

$$\left(\frac{\partial G}{\partial p} \right)_T = -RT \left(\frac{\partial (\ln K)}{\partial p} \right)_T \quad (3.4)$$

Eine Änderung der freien Enthalpie und des Druckes bewirkt eine Änderung des Volumens ΔV bei konstanter Temperatur:

$$\Delta V = \left(\frac{\partial G}{\partial p} \right)_T \quad (3.5)$$

Aus den Gleichungen 3.4 und 3.5 ergibt sich nach dem 1. Hauptsatz der Thermodynamik eine durch die Reaktion hervorgerufene Volumenänderung ΔV :

$$\Delta V = -RT \left(\frac{\partial (\ln K)}{\partial p} \right)_T \quad (3.6)$$

In druckinduzierten Reaktionen wird ΔV als Reaktionsvolumen bezeichnet. Das Reaktionsvolumen ist die Volumendifferenz zwischen den Anfangs- und Endprodukten der Reaktion. Die Einheit des Reaktionsvolumens ist cm^3/mol :

$$\Delta V = V_{AB} - V_A - V_B \quad (3.7)$$

Im Fall einer Volumenabnahme wird die Reaktion gemäß dem Prinzip von Le Chatelier unter Druck favorisiert. Für die Reaktion $A + B$ lässt sich ein Volumenreaktionsprofil konstruieren, das in der Abbildung 2.2 dargestellt ist [103].

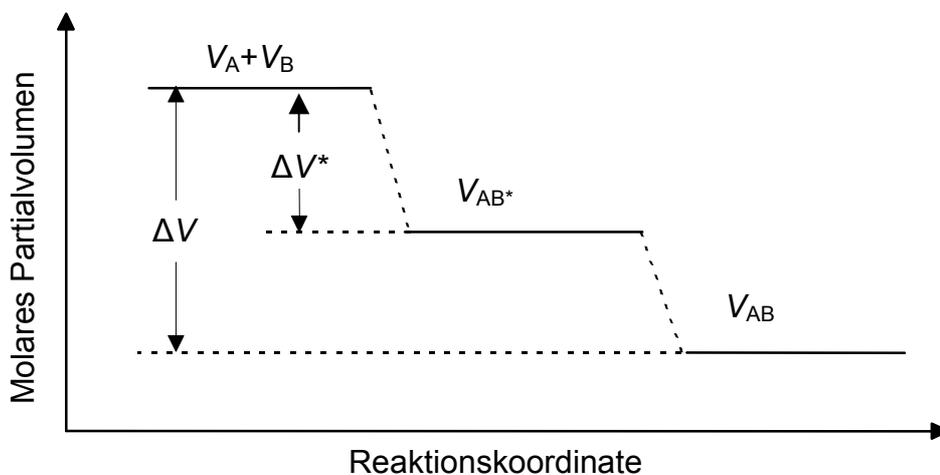


Abbildung 3.8: Volumenreaktionsprofil [103]

Für chemische Reaktionen ist nicht nur die Veränderung des chemischen Gleichgewichts von Bedeutung, entscheidend ist auch, wie schnell sich das Gleichgewicht einstellt. Ausgedrückt wird dies über die Geschwindigkeitskonstante k . Für den Ablauf von Reaktionen ist die Überwindung eines Energieniveaus erforderlich, der so genannten Aktivierungsenergie. Für druckinduzierte Reaktionen wird dies über das Aktivierungsvolumen ΔV^* ausgedrückt. Analog zum Reaktionsvolumen gilt für das Aktivierungsvolumen ΔV^* folgender Zusammenhang:

$$\Delta V^* = -RT \left(\frac{\partial(\ln k)}{\partial p} \right)_T \quad (3.8)$$

Das Aktivierungsvolumen ist demnach die Volumendifferenz der Ausgangsprodukte und des Zwischenzustandes von chemischen Reaktionen:

$$\Delta V^* = V_{AB}^* - V_A - V_B \quad (3.9)$$

Wenn sich bei einer Reaktion das Volumen des Übergangszustands V_{AB^*} bezüglich des Ausgangsvolumens der Stoffe V_A und V_B verringert, wird die Geschwindigkeitskonstante k durch Druckerhöhung größer. Diese Aussage stimmt mit dem Prinzip von Le Chatelier überein, da das Aktivierungsvolumen $\Delta V^* < 0$ wird. Abbildung 3.9 zeigt den Zusammenhang der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit vom Druck [54].

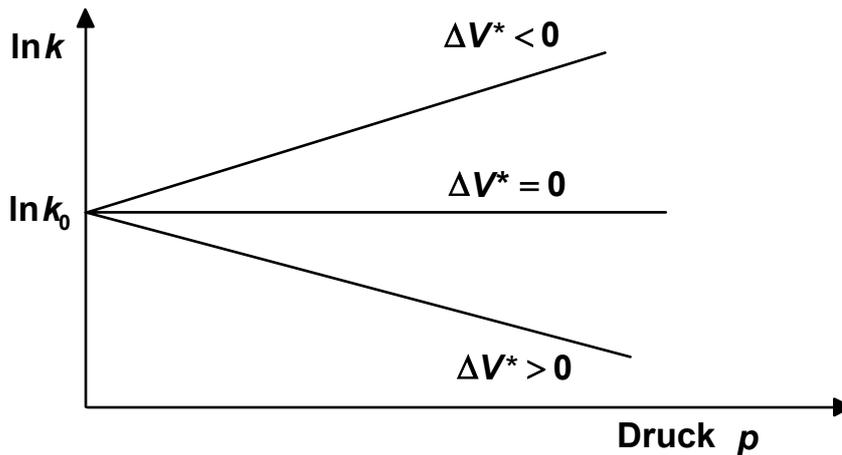


Abbildung 3.9: Reaktionsgeschwindigkeitsverlauf in Abhängigkeit vom Druck

Für eine Reaktion unter Hochdruck ist eine Veränderung der Partialvolumina der beteiligten Stoffe von Bedeutung. Das Reaktionsvolumen ΔV bildet die Summe zweier Volumengrößen. Bestimmt wird ΔV durch einen inneren Strukturanteil ΔV_{intr} und einen Solvatationsanteil ΔV_{solv} . Mit dem inneren Strukturanteil werden Bewegungen der Atome innerhalb des Moleküls beschrieben, d.h. Veränderung der Bindungslängen und Bindungswinkel. Durch den Solvatationsanteil werden Volumenänderungen durch Änderung der Polarität, der Elektrostriktion und der Dipolinteraktion erfasst [103].

$$\Delta V = \Delta V_{\text{intr}} + \Delta V_{\text{solv}} \quad (3.10)$$

Analog dazu gilt für das Aktivierungsvolumen:

$$\Delta V^* = \Delta V_{\text{intr}}^* + \Delta V_{\text{solv}}^* \quad (3.11)$$

Bei geringem Solvatationseinfluss wird ΔV durch ΔV_{intr} bestimmt. Damit wird bei einer Verknüpfung (Verkürzung der Bindungslänge) von kovalenten Bindungen bei Atomen

der innere Strukturanteil negativ und das Aktivierungsvolumen geringer. Eine Bindungsspaltung ist dagegen mit einem positiven inneren Strukturbeitrag charakterisiert. Anders verhält sich die Volumenänderung bei nicht kovalenter Bindungsspaltung. Ionenbildung durch Moleküldissoziation ist mit einer Abnahme des Volumens verbunden, während Ionen unter Volumenzunahme assoziieren [103]. Die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen in biologischen Makromolekülen ist mit einem sehr kleinen Reaktionsvolumen verbunden. Abhängig vom Modellsystem kann es negativ oder positiv sein [34]. Tabelle 3.6 zeigt einige Beispiele für Reaktionsvolumina.

Tabelle 3.6: Reaktionsvolumina ΔV für verschiedene Reaktionen [103, 34]

Reaktion	Beispiel	Reaktionsvolumen ΔV [cm ³ /mol]
Dissoziation	$\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}^+ + \text{OH}^-$	-22,4
	$\text{H}_2\text{PO}_4^- \rightarrow \text{H}^+ + \text{HPO}_4^{2-}$	-26,1
Hydratation von polaren Gruppen	$\text{n-Propanol} \rightarrow (\text{n-Propanol})_{\text{H}_2\text{O}}$	-4,5
Bildung von Wasserstoffbrücken	Poly-L-Lysin (Helix)	-1,0
Proteindenaturierung	Myoglobin bei pH 5; 20 °C	-98

3.3.1.1 Einfluss hoher hydrostatischer Drücke auf thermodynamische Größen des Wassers

Die vereinfachende Annahme, Flüssigkeiten seien inkompressibel, kann im Hochdruckbereich nicht mehr gelten. Da die meisten Lebensmittel einen hohen Wassergehalt haben und Wasser in dieser Arbeit das Lösungsmittel für die Allergene ist, soll hier der Einfluss hoher Drücke auf thermodynamische Größen des Wassers dargestellt werden.

Der Aggregatzustand des Wassers ist nicht nur von der Temperatur, sondern auch vom Druck abhängig. Insbesondere im Hochdruckbereich verhält sich die fest/flüssig-Grenze erstaunlich. Bereits im Jahr 1911 untersuchte BRIDGMAN [9] den Aggregatzustand von Wasser in Abhängigkeit von Druck und Temperatur. Abbildung 3.10 zeigt das Phasendiagramm von Wasser.

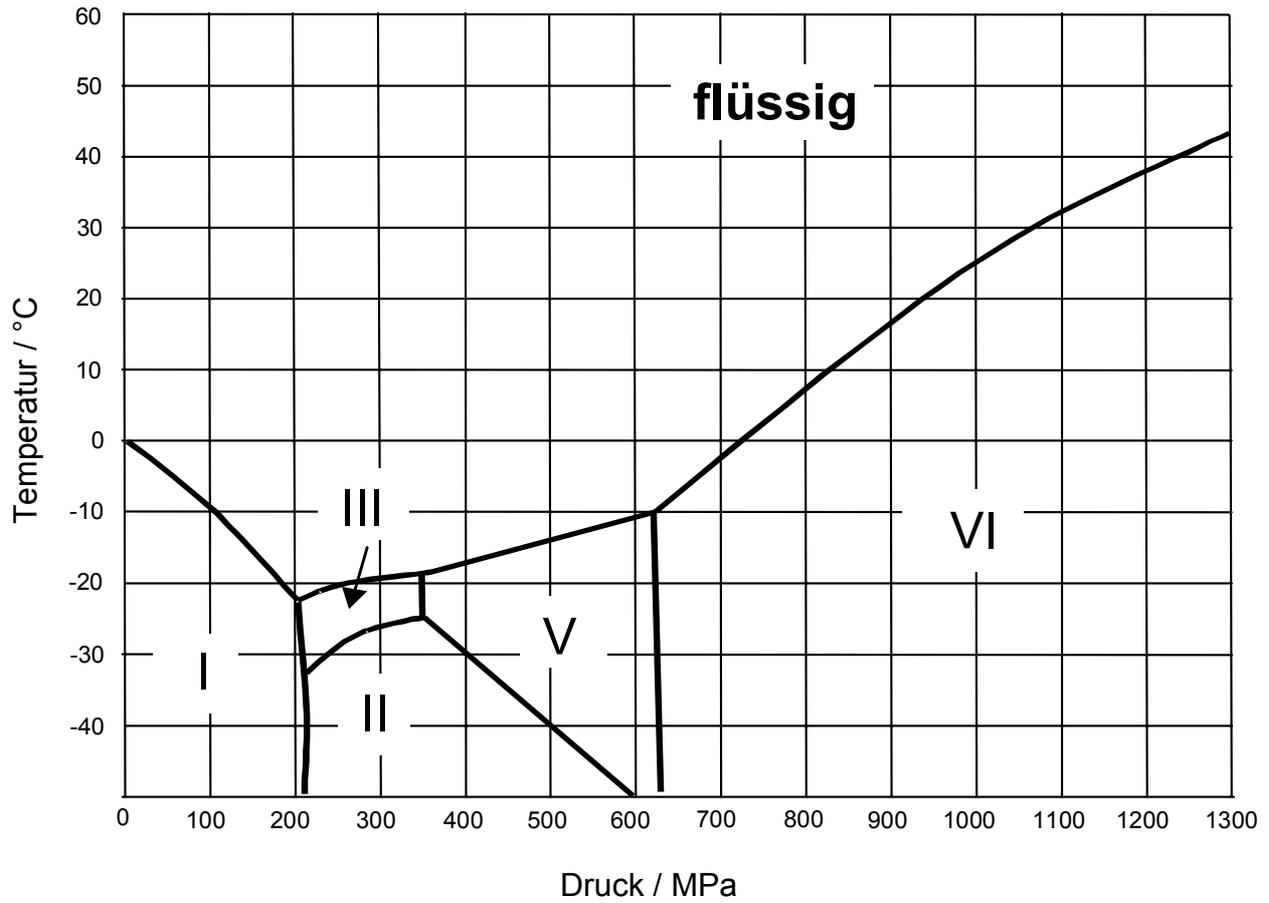


Abbildung 3.10: Phasendiagramm von Wasser [9]

Neben der bei Atmosphärendruck vorkommenden Eismodifikation I existieren im betrachteten Druck/Temperaturbereich vier weitere feste Phasen. Der Tripelpunkt Eis I - Eis III und flüssiges Wasser liegt bei -22 °C und $207,5\text{ MPa}$. Die fest/flüssig-Grenze steigt mit dem Druck danach wieder an und liegt bei Drücken über 720 MPa über 0 °C . Dieses Phänomen wird z.B. beim Hochdruckgefrieren genutzt.

Wie bereits erwähnt, führen hohe Drücke auch bei Flüssigkeiten zur Kompression. Dieser Volumeneffekt ist bei Wasser als Lösungsmittel grundlegend wichtig für chemische Reaktionen, die im und mit Wasser stattfinden. In Abbildung 3.11 ist das spezifische Volumen von Wasser in Abhängigkeit vom Druck dargestellt, berechnet nach den Formeln von PRUß et al. [80]. Bei 600 MPa und 20 °C beträgt die Volumenkontraktion etwa 14% gegenüber Atmosphärendruck.

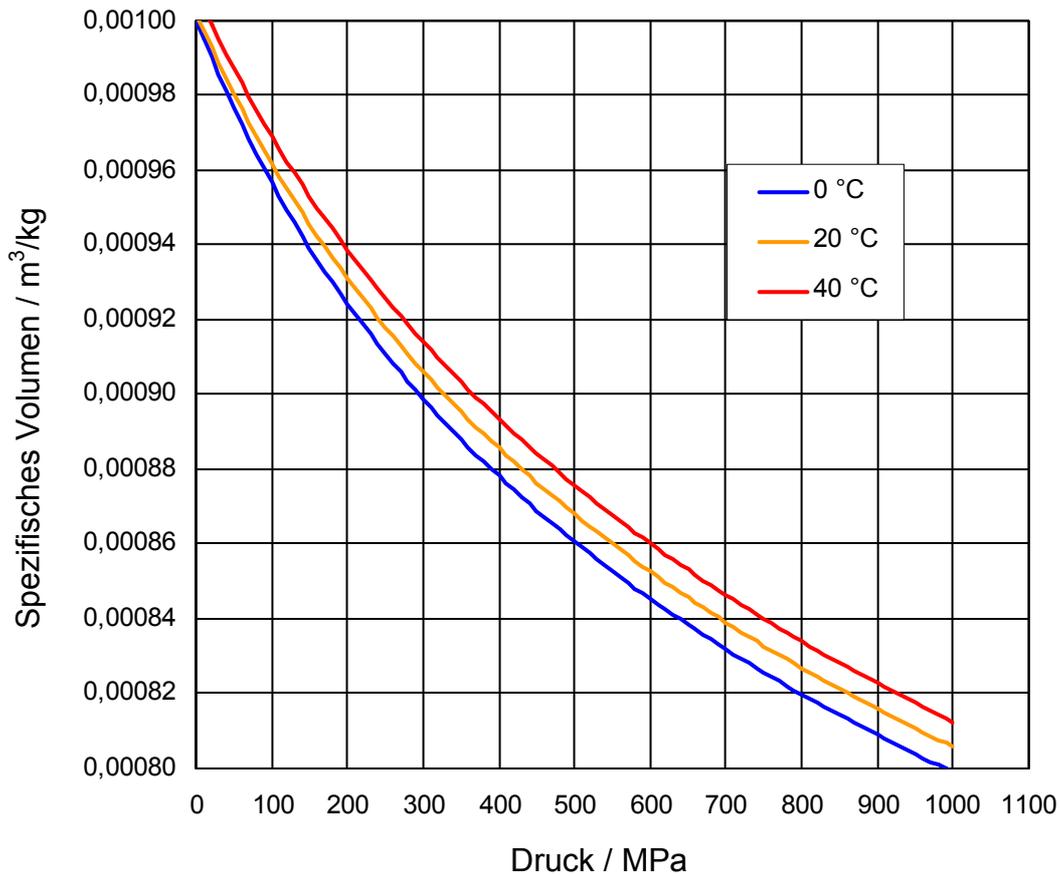


Abbildung 3.11: Spezifisches Volumen von Wasser in Abhängigkeit von Druck und Temperatur [80]

Der Zusammenhang zwischen dem thermischen Ausdehnungskoeffizienten α und der Temperatur in Abhängigkeit vom Druck wird in Abbildung 3.12 gezeigt.

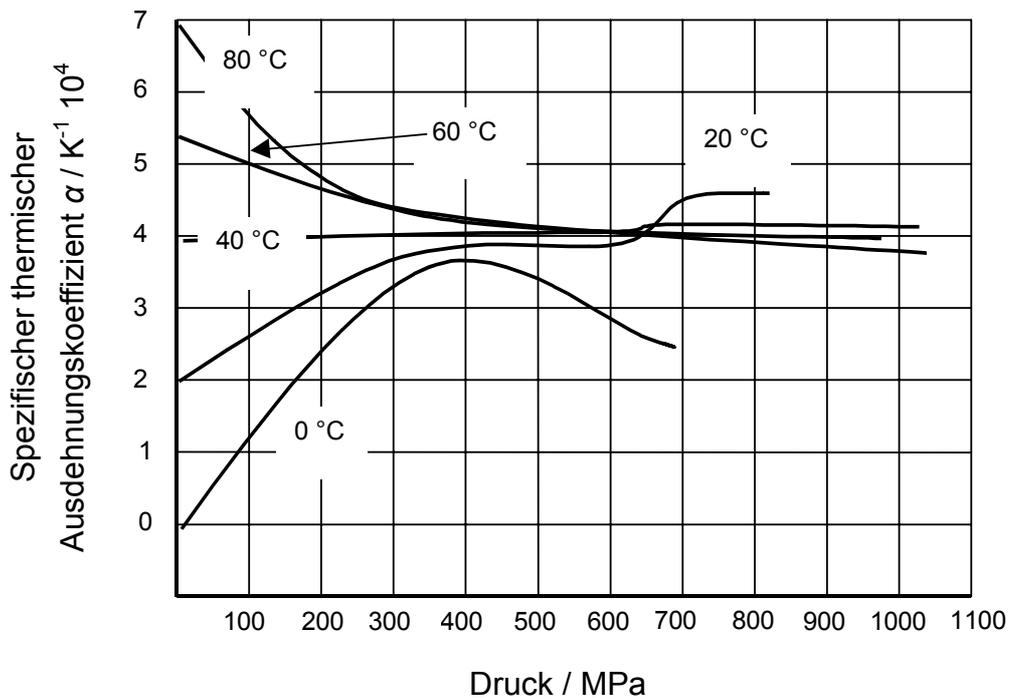


Abbildung 3.12: Thermischer Ausdehnungskoeffizient α von Wasser in Abhängigkeit von Druck und Temperatur [9]

Der thermische Ausdehnungskoeffizient α gibt die isobare spezifische Volumenänderung bei einer Temperaturänderung von 1 K an und ist eine Determinante zur Berechnung der adiabaten Temperaturänderung. Abbildung 3.13 zeigt die Abhängigkeit der spezifischen isobaren Wärmekapazität c_p vom Druck [9]. Die spezifische Wärmekapazität ist die zweite Determinante der adiabaten Temperaturänderung.

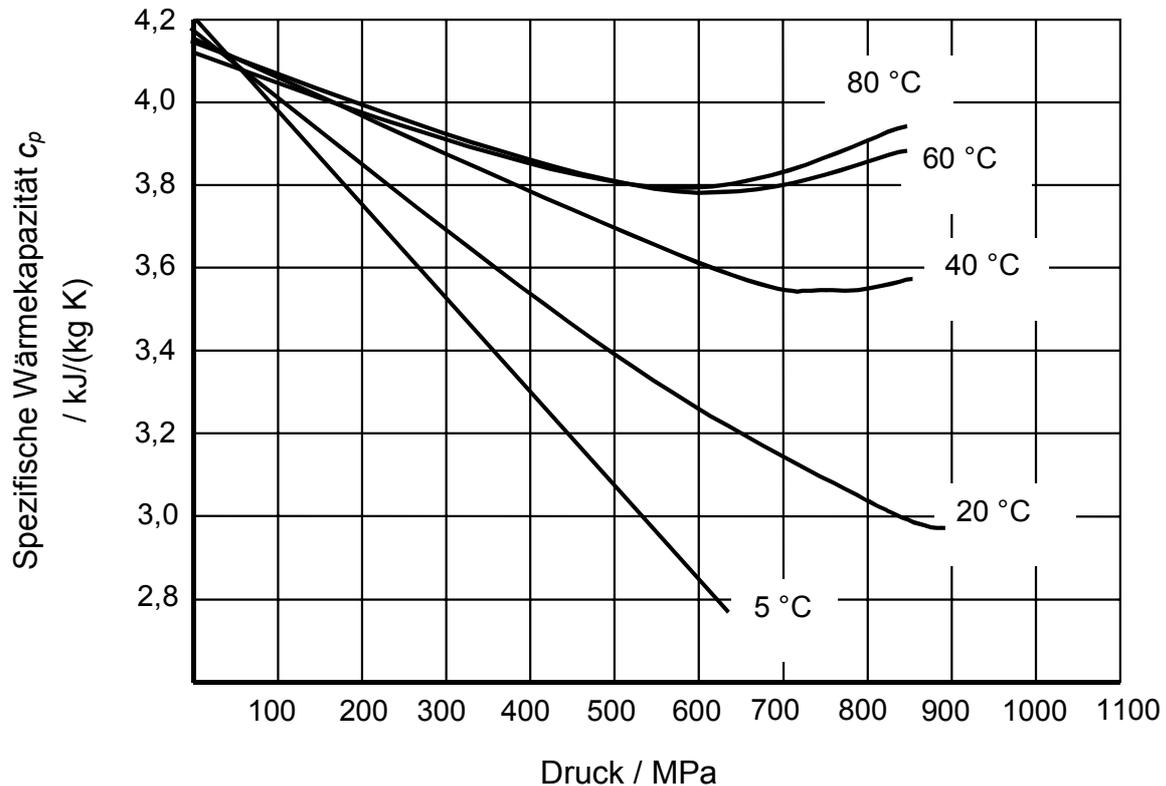


Abbildung 3.13: Spezifische Wärmekapazität c_p von Wasser in Abhängigkeit von Druck und Temperatur [9]

Nach dem 1. Hauptsatz der Thermodynamik führt eine Volumenänderungsarbeit zu einer Änderung der inneren Energie und damit zu einer Änderung der Temperatur eines Systems. Analog dazu wird durch die Druckerhöhung eine Temperaturänderung bei Wasser erzielt. Die Temperaturänderung kann über die Druck- und Temperaturabhängigkeit des thermischen Ausdehnungskoeffizienten α und der Wärmekapazität ausgedrückt werden. Die maximale Temperaturänderung wird bei einer adiabaten Kompression über folgende Gleichung beschrieben [9].

$$\left(\frac{\partial T}{\partial p} \right)_{\text{ad.}} = \frac{\alpha T}{\rho c_p} \quad (3.12)$$

c_p : isobare spezifische Wärmekapazität von Wasser [J/(kg K)]

ρ : Dichte von Wasser [kg/m³]

In Abbildung 3.14 sind die Temperaturerhöhungen von Wasser bei unterschiedlichen Anfangstemperaturen während der adiabaten Kompression dargestellt.

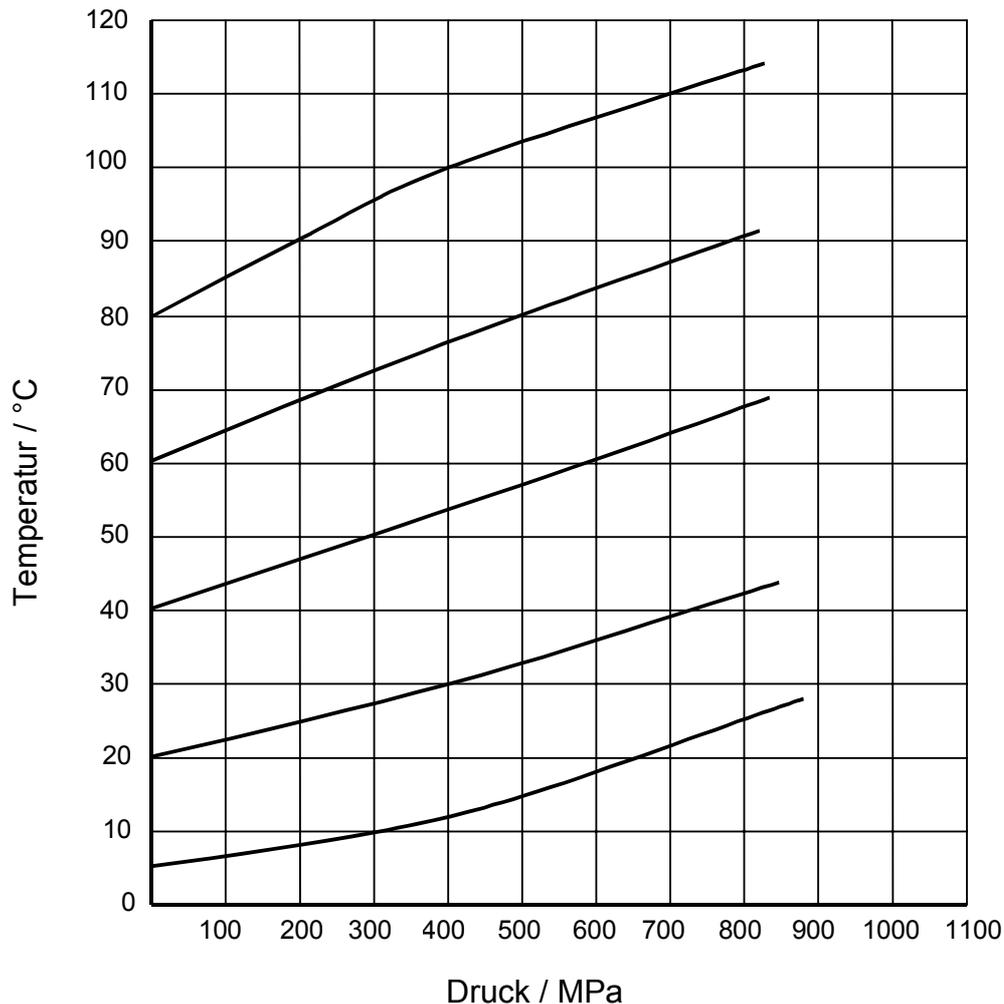


Abbildung 3.14: Temperaturerhöhung von Wasser während einer adiabaten Kompression [9]

Als Richtwert für die maximale (adiabate) Temperaturerhöhung bei Raumtemperatur sind ca. 2 K/100 MPa anzunehmen, bei höherer Ausgangstemperatur ca. 3 K/100 MPa.

In realen, nichtadiabaten Systemen sind die Temperaturänderungen geringer, da es während der Druckbehandlung zur Wärmeübertragung zwischen Produkt, Hochdruckmedium und der Behälterwand des Hochdruckautoklaven kommt. Analog zur Temperaturerhöhung durch die Kompression erfolgt eine Temperaturabsenkung mit gleichem Betrag durch den Entspannungsvorgang. Durch die erwähnte Wärmeübertragung während der Druckbehandlung führt die Entspannung zu einer entsprechenden Unterkühlung. Dieser Effekt muss beachtet werden, um etwa ungewolltes Einfrieren zu verhindern. HEINZ et al. [39] haben die Verläufe von Temperatur, Wärmeleitfähigkeit und spezifischer Wärmekapazität von Wasser während einer sechsminütigen Hochdruckbehandlung bis auf 800 MPa gemessen (Abbildung 3.15).

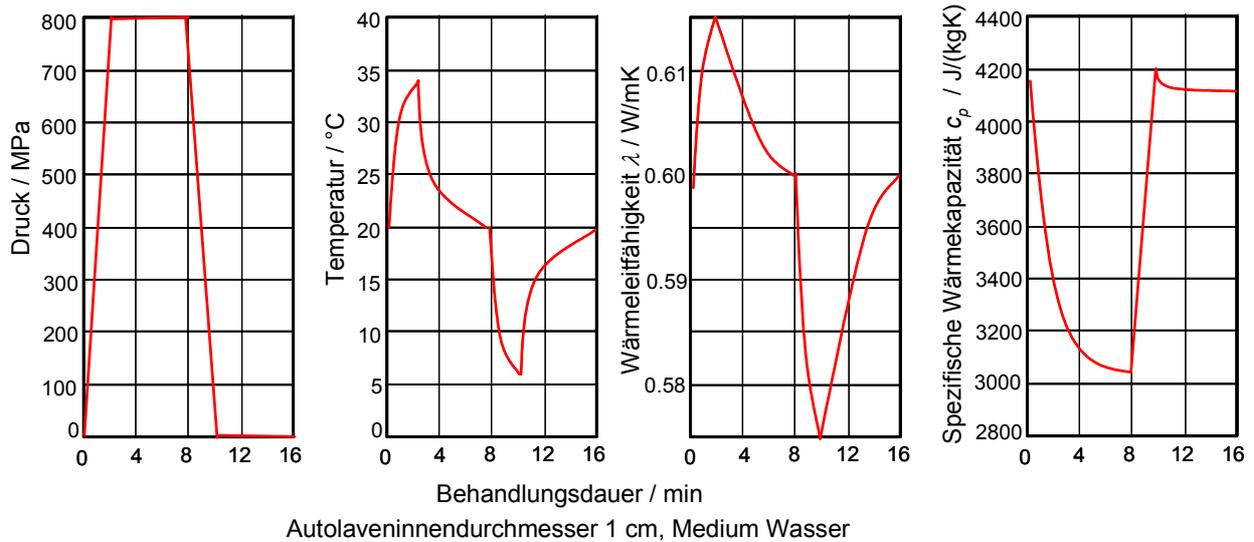


Abbildung 3.15: Temperatur, Wärmeleitfähigkeit und spezifische Wärmekapazität während Hochdruckbehandlung in Abhängigkeit vom Druck [39]

Während der Druckhaltephase sinkt die Temperatur auf die Ausgangstemperatur ab, was eine entsprechende Unterkühlung während der Entspannung zur Folge hat. Die Abkühlung während der Haltephase ist von der Geometrie des Autoklaven abhängig. Große Volumina haben ein größeres Volumen-Oberflächen-Verhältnis und entsprechend einen langsameren Wärmeaustausch. Abbildung 3.16 stellt die Temperaturverläufe in Autoklaven mit unterschiedlichen Innendurchmessern schematisch dar.

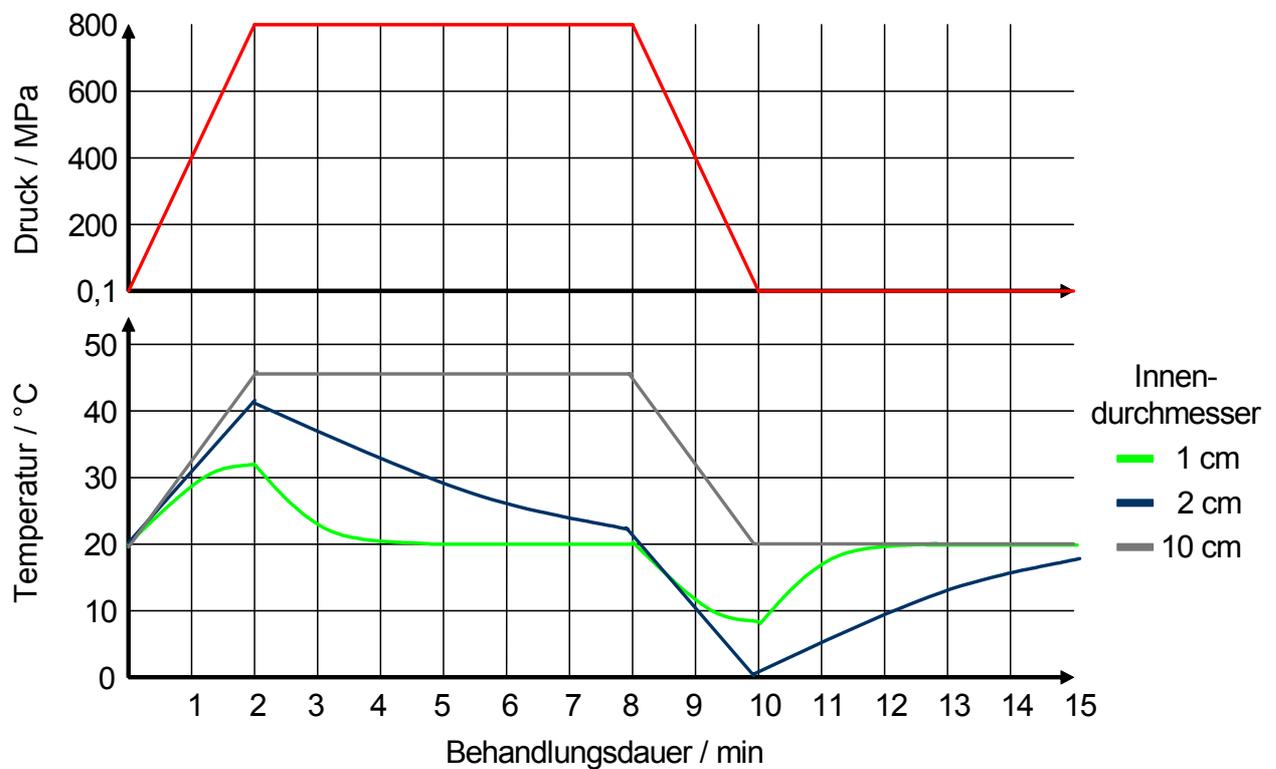


Abbildung 3.16: Temperaturverläufe während Hochdruckbehandlung in verschiedenen Autoklaven [39]

3.3.2 Einfluss hoher hydrostatischer Drücke auf Sensorik und Qualität von Lebensmitteln

Der Hauptgrund für die Anwendung hoher Drücke bei der Lebensmittelproduktion ist ein Sterilisationseffekt unter Beibehaltung des Frischecharakters, den gängige thermische Verfahren zur Haltbarmachung nicht erzielen können. Seit in den letzten zwei Jahrzehnten die Hochdruckbehandlung in der Lebensmitteltechnologie immer bekannter wurde, beschäftigten sich zahlreiche Arbeiten mit der Mikrobiologie, der Sensorik und der Analytik der Inhaltsstoffe von hochdruckbehandelten Lebensmitteln.

Erste Versuche mit Lebensmitteln unter Hochdruck wurden allerdings schon viel früher durchgeführt. PERCY WILLIAMS BRIDGMAN setzte 1914 rohes Eiweiß unter Druck (700 MPa, 30 min) und stellte fest, dass es roch und schmeckte wie roh, jedoch Farbe und Konsistenz von gekochtem Eiweiß hatte [10]. BRIDGMAN mutmaßte richtig, als er aufgrund der sensorischen Erscheinung annahm, dass der Koagulationsmechanismus ein anderer sei als der bei Erhitzung. 1946 wurde BRIDGMAN für seine Erfindungen in der Hochdrucktechnologie und seine Erkenntnisse in der Hochdruckphysik mit dem Nobelpreis gewürdigt. Die Erkenntnisse BRIDGMANS sollten, was die Lebensmitteltechnologie betrifft, für die nächsten Jahrzehnte unbeachtet bleiben.

In den meisten Fällen wird Hochdruck angewandt, um ein haltbares Lebensmittel mit ausgesprochenem Frischecharakter herzustellen. Aber auch andere Effekte, z.B. die gezielte Inaktivierung von Enzymen, werden genutzt. In eigenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass ein Lebensmittel aus frischem Obst und Gemüse (Äpfel, Karotten, Paprika) nach einer Hochdruckbehandlung (500 MPa, 10 min) seinen Frishegeschmack behält und mindestens 21 Tage bei Raumtemperatur mikrobiologisch unbedenklich bleibt, während unbehandelte Produkte rasch verderben. Analog dazu wurde auch die antioxidative Kapazität bestimmt, die nach der Hochdruckbehandlung signifikant höher war als nach einem thermischen Prozess.

Die Unterbindung unerwünschter chemischer Reaktionen ist ein weiterer Anwendungsgrund. Auf dem amerikanischen Markt befindet sich eine Avocadocreme (Avomex Inc., Mexico), die bei Luftsauerstoffkontakt nicht bräunt. Die enthaltenen Polyphenoloxidasen konnten durch Hochdruck inaktiviert werden [115]. Verallgemeinernd lässt sich sagen, dass eine Hochdruckbehandlung auf pflanzliche Strukturen einen erweichenden Effekt ausübt. SCHÖBERL [92] hat bei penetrometrischen Messungen ein Weicherwerden der Textur festgestellt, das bei 400-500 MPa sein Maximum erreicht. Derartig hochdruckbehandeltes Obst und Gemüse erweckt haptisch den Eindruck, als sei es blanchiert worden. Lediglich bei Kartoffeln wurde bei Drücken >500 MPa wieder eine etwas festere Textur gemessen.

Eigene rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen ein Verschwinden der Stärkekörner in den Zellen der Kartoffel (Abbildung 3.17). Die Stärke verkleistert und führt so zu einer Verfestigung.

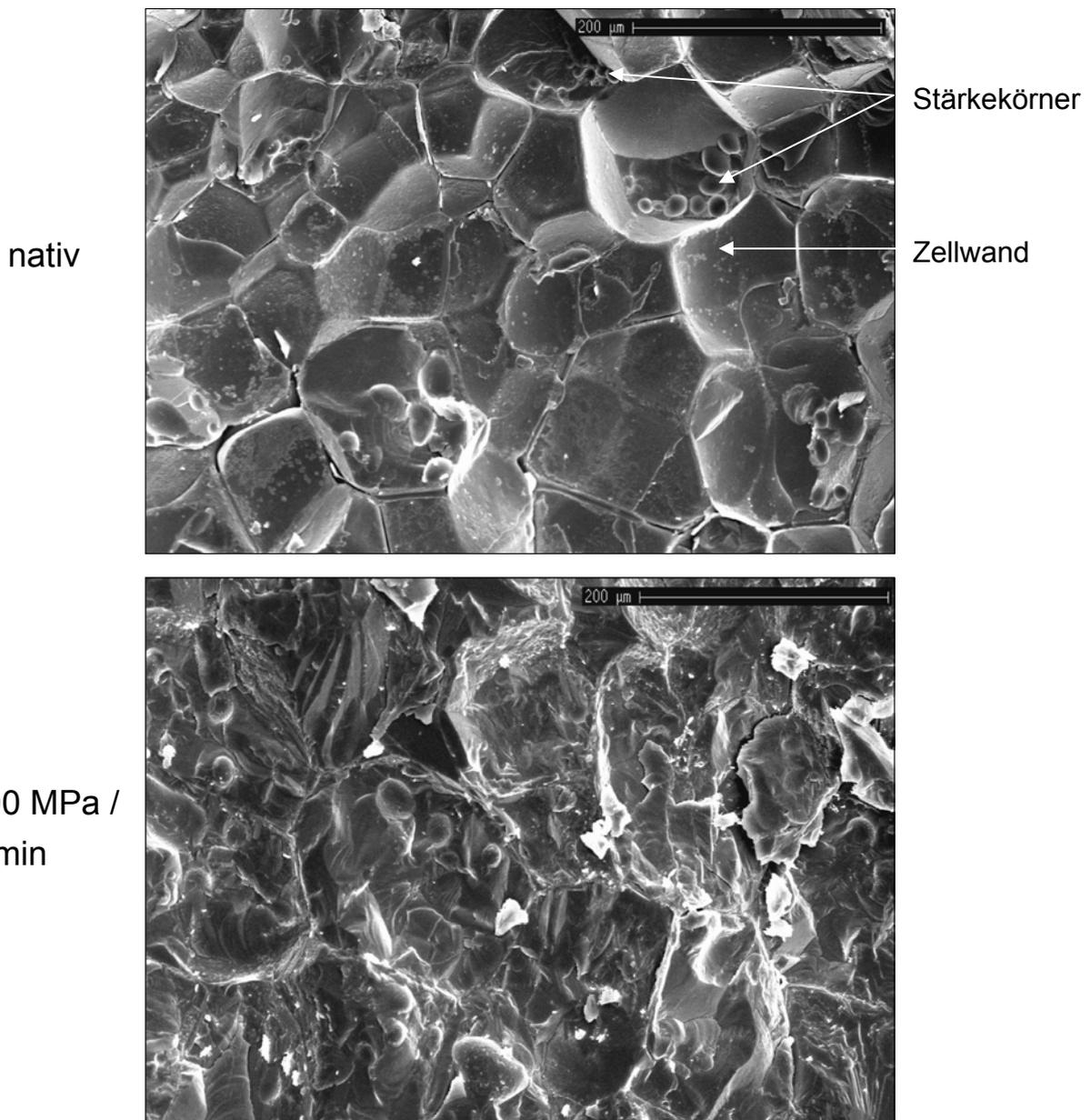


Abbildung 3.17: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von nativer (oben) und hochdruckbehandelter (600 MPa, 5 min) Kartoffel (unten)

Abbildung 3.17 zeigt neben der Stärkeverkleisterung auch den Einfluss auf den Zellverband der Pflanze. Einzelne Zellen und Zellwände sind im unteren Bild nicht mehr erkennbar. Die Zellwände wurden durchlässig und Protoplasma füllt die Zellzwischenräume aus. Hochdruck kann unter gegebenen Umständen Vernetzungs- und Polymerisationsreaktionen begünstigen, wie das Beispiel Kartoffel schon gezeigt hat. Durch Zugabe von Stärken oder anderen Hydrokolloiden kann die Textur nach der Hochdruckbehandlung gesteuert werden. Eigene Studien haben gezeigt, dass eine druckinduzierte elastische und plastische Verfestigung von Pulpen oder

Breimassen durch Zugabe von Stärken, Pektinen oder Alginaten und anschließender Hochdruckbehandlung möglich ist.

Auch Lebensmittel tierischer Herkunft werden hochdruckbehandelt. Neben der Haltbarmachung sind hier ebenfalls die Veränderungen von Textur und chemischen Faktoren von Bedeutung, wenn auch die Chemismen gänzlich anders sind. Rohes Fleisch und thermisch unbehandelte Fleischprodukte (Brät) zeigen nach Hochdruckbehandlung im Allgemeinen eine Texturverfestigung und einen Verlust der nativen roten Farbe. Dieser Effekt ist am deutlichsten bei Drücken >300 MPa zu beobachten [92]. Unter Druck werden die Autoxidation von Myoglobin zu braunem Metmyoglobin und eine Denaturierung des ganzen Proteins begünstigt. Die Verfestigung der Textur ist auf eine vernetzende Koagulation der gelösten sarkoplasmatischen Proteine zurückzuführen, wie Abbildung 3.18 zeigt.

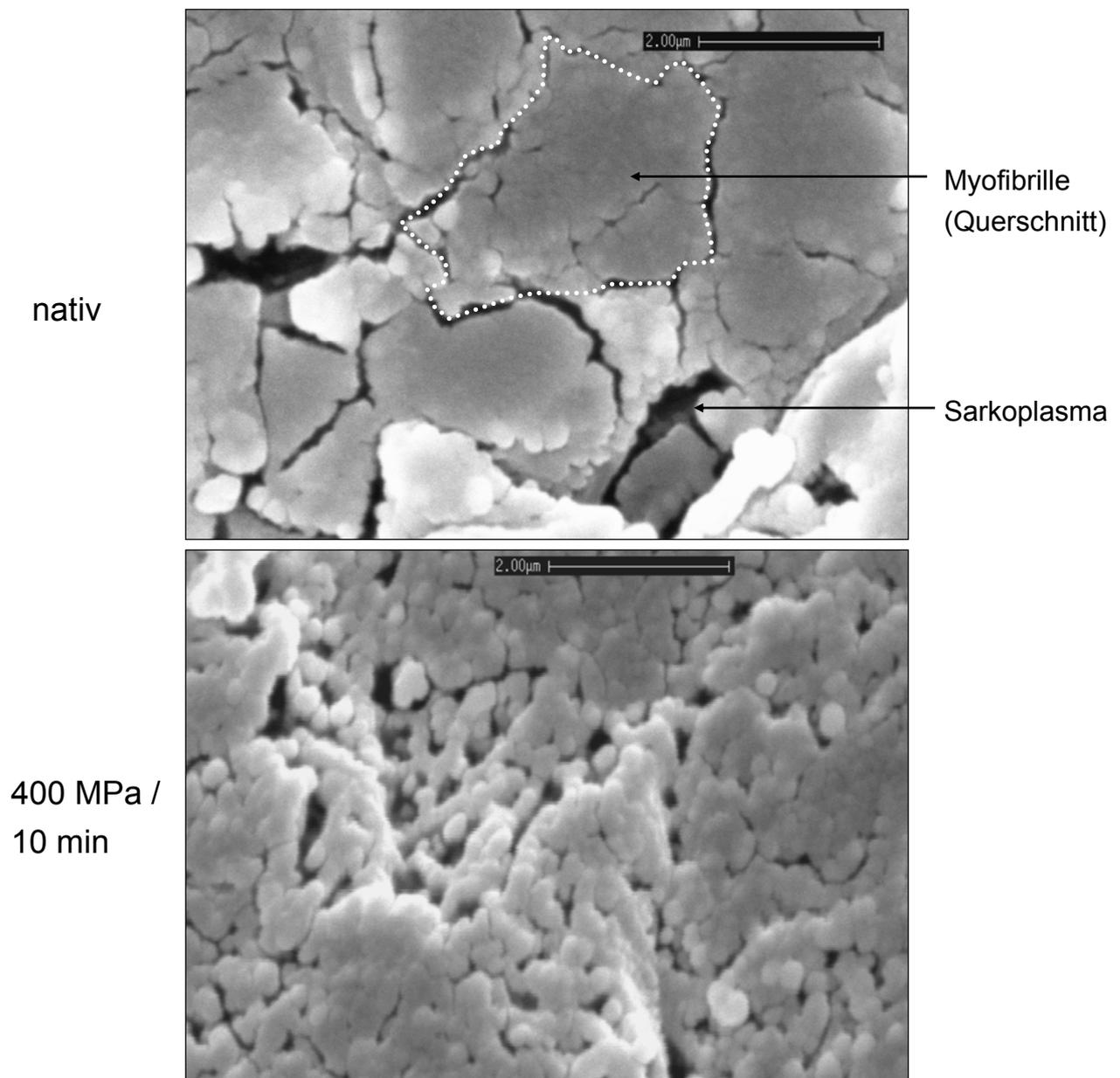


Abbildung 3.18: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von nativem (oben) und hochdruckbehandeltem (unten) Putenfleisch [91]

Abbildung 3.18 zeigt die mikroskopische Struktur von nativem Putenmuskelfleisch im Querschnitt (oben). Der weiß umrandete Bereich ist eine Myofibrille, die Räume zwischen den Myofibrillen sind *in vivo* mit Sarkoplasma ausgefüllt. Nach einer Hochdruckbehandlung (unten) zeigt sich eine netzartige Struktur, die durch Koagulation und Vernetzung der Sarkoplasmproteine zustande kommt.

Hochdruckbehandelte Fleisch- und Wurstwaren sind weniger zahlreich auf dem Markt vertreten als pflanzliche Produkte. Zum einen, weil bei diesen Produkten seltener ein Frischecharakter im Sinne von 'roh' erwünscht ist, zum anderen, da mikrobiologisch und inhaltsstofflich Fleisch- und Wurstwaren hinsichtlich ihrer Verbrauchersicherheit diffiziler sind. Dennoch gibt es Produkte. Ein spanischer Fleisch- und Wurstwarenproduzent vertreibt in Spanien und anderen EU-Ländern einen hochdruckbehandelten Kochschinkenaufschnitt (400 MPa, 10 min). Die Hochdruckbehandlung des fertig verpackten Produktes verlängert die Haltbarkeit deutlich, ohne die Sensorik des Produktes negativ zu verändern [28]. In den USA werden Austern im Großhandel vertrieben, deren Haltbarkeit und mikrobiologische Sicherheit durch eine Hochdruckbehandlung verbessert worden sind [60]. Ein wirtschaftlicher Nebeneffekt ist eine osmotisch bedingte Volumenzunahme des Muschelfleisches nach der Hochdruckbehandlung, die zu einer Steigerung des Nettoverkaufsgewichtes führt.

Der Einfluss von Hochdruck auf die Mikroorganismen in Milch wurde bereits 1899 von HITE et al. [43] erstmals untersucht. Heute werden Milch- und Milchprodukte aus unterschiedlichsten Gründen hochdruckbehandelt. Beschrieben wurden Verfahren zur Inaktivierung von Mikroorganismen, zur gezielten Veränderungen der Textur von Milchprodukten [41] und auch zur Veränderung der Antigenität allergieauslösender Milchproteine, worauf im Kapitel 3.3.4 eingegangen wird.

3.3.3 Einfluss hoher hydrostatischer Drücke auf Proteine

Die räumliche Faltung von Proteinen wird von vielen Faktoren bestimmt und ist heute noch nicht im Detail verstanden. Als endogener Faktor bleibt einzig die Aminosäuresequenz und eventuelle Glycosilierungen konstant und für jedes Protein charakteristisch. Exogene Faktoren sind chemisches Umfeld, Temperatur und Druck. Globuläre Proteine, die naturgemäß in wässrigem Milieu vorliegen, folgen bei der Ausbildung ihrer räumlichen Struktur einigen fundamentalen Prinzipien [34] wie z.B:

- energieoptimale Packung des hydrophoben Kerns
- minimale hydrophobe Oberfläche
- inter- und intramolekulare Bildung ionischer und nichtionischer Bindungen.

Hochdruck kann als exogener Faktor die Struktur von Proteinen beeinflussen. Bisher gibt es keinen dokumentierten Fall, dass Hochdruck vorhandene Kovalenzen löst, die Primärstruktur bleibt folglich erhalten. Auf der Ebene der Sekundär-, Tertiär- und

Quartärstruktur treten jedoch spezifische reversible und irreversible Veränderungen auf. Aufgrund der Diversität natürlicher Proteine und dem nur punktuellen Wissen über hochdruckinduzierte Veränderungen auf molekularer Ebene ist es schwer, generelle Aussagen zu treffen oder gar Gesetzmäßigkeiten aufzustellen. Proteindenaturierung und Enzyminaktivierung lassen sich durch Hochdruck ähnlich hervorrufen wie durch hohe Temperaturen. Die Denaturierung von Proteinen in Abhängigkeit von Druck und Temperatur wurde bereits in vielen Arbeiten untersucht und wird im Allgemeinen in einem p/T -Diagramm dargestellt. Abbildung 3.19. zeigt ein schematisches p/T -Diagramm, das in dieser Form für viele Proteine charakteristisch ist.

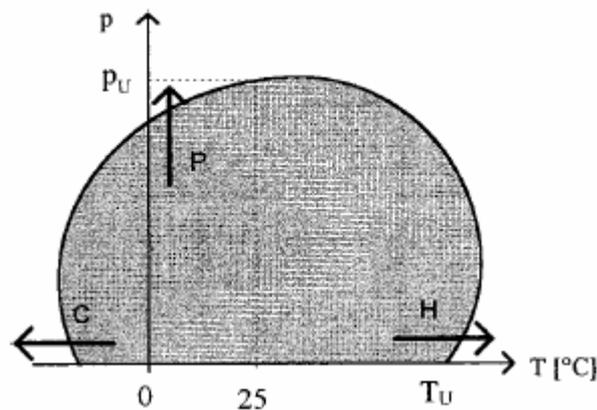


Abbildung 3.19: Schematisches p/T -Diagramm der Denaturierungsgrenze eines Proteins [94]

Die graue Fläche stellt das Gebiet dar, in dem ein Protein im nativ gefalteten Zustand vorliegt. Die Pfeile kennzeichnen die Art der Denaturierung, p für Druck (engl. pressure), H für Hitze (engl. heat) und C für Kälte (engl. cold), p_u ist die Druckdenaturierungsgrenze bei Normaltemperatur (25 °C). Interessanterweise wirkt Druck in einem gewissen Gebiet der Kältedenaturierung entgegen. Diese Phasendiagramme geben jedoch keine Auskunft über die Mechanismen der Denaturierung und implizieren, dass zwischen Druck- und thermischer Denaturierung kein qualitativer Unterschied besteht. Strukturuntersuchungen haben jedoch gezeigt, dass die molekularen Mechanismen durchaus unterschiedlich sind.

Nach dem Prinzip von Le Chatelier werden unter Druck Reaktionen, die mit einer Volumenabnahme einhergehen, gefördert. Reaktionen, wie z.B. die Bildung von Wasserstoffbrücken, die für die Proteinfaltung von Bedeutung sind, wurden bereits in Tabelle 3.6 zusammengestellt. Allerdings wäre es gewagt, aufgrund von bekannten Reaktionsvolumina druckinduzierte Proteinreaktionen vorauszusagen.

In mehreren Arbeiten zeichnete sich eine unterschiedliche Druckempfindlichkeit von Sekundärstrukturen ab. α -Helices scheinen durch Druck leichter zerstörbar zu sein als β -Faltblätter, deren Bildung in einigen Fällen sogar durch Druck induziert wurde. SMELLER et al. [94] haben bei Pferdeherzmyoglobin IR-spektroskopisch eine Zerstörung von α -Helices beobachtet und eine Bildung von intermolekularen

β -Faltblättern, wozu allerdings auch Temperaturen über 45 °C nötig waren. Interessanterweise bildeten sich die Faltblattstrukturen nicht während der Druckhaltephase, sondern während des Entspannungsvorganges. HAYAKAWA et al. [36] ermittelten spektroskopisch den Gehalt an α -Helices nach Erhitzung, chemischer Behandlung und Druckbehandlung der Proteine Ovalbumin, bovines Serumalbumin (BSA) und β -Lactoglobulin. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.7 dargestellt.

Tabelle 3.7: Prozentualer α -Helix-Gehalt von drei Proteinen nach Erhitzen, chemischer Behandlung und Hochdruckbehandlung [37]

Protein	Nativ	Hitze (80 °C, 10 min)	SDS (1 g/l)	Harnstoff (8 mol/l)	Guanidinium-Hydrochlorid (4 mol/l)	2-Mercaptoethanol (5 g/l)	Druck (1000 MPa, 20 °C)
Ovalbumin	33	23	51	11	9	0	0
BSA	70	39	54	18	21	0	35
β -Lactoglobulin	39	33	48	22	19	0	4

Bei BSA und β -Lactoglobulin führte die Druckbehandlung zu einem drastischen Verlust an α -Helices. Bei Ovalbumin waren keine Helices mehr nachweisbar.

Das Proteasom, ein multikatalytischer Enzymkomplex, der auf zellulärer Ebene für die "Entsorgung" unbrauchbar gewordener Zellbestandteile sorgt und der bei der Herstellung von Fleisch- und Wurstwaren ein wichtiger Reifebeschleuniger ist, kann *post mortem* durch Hochdruckbehandlung in seiner Aktivität gesteigert werden. Die Auswirkung der Hochdruckbehandlung auf die Sekundärstruktur dieses Proteinkomplexes (aus Hasenskelettmuskeln) wurde von YAMAMOTO et al. [120] durch Messung des Circular dichroismus untersucht. Die Sekundärstrukturanteile wurden aus den Spektren errechnet und sind in Tabelle 3.8 zusammengestellt.

Tabelle 3.8: Sekundärstruktur eines Proteasoms nativ und nach Hochdruckbehandlungen [120]

Druckbehandlung / MPa	Gehalt / %				
	α -Helix	β -Faltblatt	Turn	Zufallsstruktur	Gesamt
0,1	54,0 ± 5,9	18,3 ± 6,5	7,1 ± 4,3	20,7 ± 3,7	100,0
50	53,3 ± 3,6	21,3 ± 1,4	8,9 ± 1,8	16,4 ± 3,9	100,0
100	48,8 ± 3,3	21,3 ± 3,9	9,5 ± 0,3	24,4 ± 0,3	100,0
200	52,2 ± 3,0	22,4 ± 0,1	5,6 ± 1,3	19,9 ± 4,3	100,0
300	45,6 ± 1,9	27,1 ± 2,4	2,2 ± 2,2	25,3 ± 1,8	100,0
400	38,7 ± 10,1	24,9 ± 1,6	2,9 ± 2,9	25,4 ± 3,2	100,0

α -Helix- und Turnstrukturen waren instabil, ihr Anteil verringerte sich um ca. 15 % bzw. 4,2 % nach 400 MPa. β -Faltblätter bildeten sich mit zunehmendem Druck neu, nach 400 MPa erhöhte sich der Anteil um ca. 7 %.

Ähnliche Ergebnisse lieferte die CD-spektrometrische Untersuchung von β -Lactoglobulin, BSA und α -Lactalbumin [52]. Bei β -Lactoglobulin sank der Strukturanteil von α -Helices und β -Turns nach Behandlungen mit Drücken >200 MPa, während der Anteil an β -Faltblatt und Zufallsstrukturen anstieg (absolute Angaben fehlen). Bei BSA wurde eine leichte Abnahme der Turnstrukturen gemessen, während α -Helices und Zufallsstrukturen bei Drücken >200 MPa zunahm, konträr zu den Beobachtungen von HAYAKAWA et al. (siehe oben). Die Sekundärstruktur von α -Lactalbumin konnte durch Hochdruck nicht messbar beeinflusst werden.

Diese hochdruckinduzierten Strukturveränderungen führen häufig zu mehr oder weniger stabilen Intermediärzuständen innerhalb der Grenzen nativ / völlig aufgefaltet, die oft auch als molten globule (geschmolzenes Kügelchen) bezeichnet werden [34]. Dieser Zustand des 'geschmolzenen Kügelchens' zeichnet sich durch das Vorhandensein von Restbereichen nativer, geordneter Strukturen aus und damit einhergehend einer mehr oder weniger stark ausgeprägten Restfunktionalität des Moleküls. Die vom nativen Molekül gebildeten hydrophoben Kavitäten sind in diesem Zustand aufgebrochen und Wasser kann eindringen, was zu einem geringeren Gesamtmolekülvolumen führt. In vielen Fällen führt die Hochdruckbehandlung zu einer teilweisen oder kompletten Inaktivierung der biologischen Funktion, in Ausnahmen konnten auch Aktivitätssteigerungen beobachtet werden [42].

Der derzeitige Kenntnisstand lässt Verallgemeinerungen nicht zu, aber gewisse Beobachtungen häufen sich. Als Grenzbereich für irreversible Veränderungen werden häufig Drücke von ca. 300-400 MPa angegeben. Starke Denaturierungen, die auch zu Präzipitation führen können, werden häufig ab Drücken >500 MPa beobachtet.

3.3.4 Einfluss hoher hydrostatischer Drücke auf Allergene

Wie Hochdruck auf die Allergenität von Lebensmitteln wirkt, ist bisher sehr wenig untersucht worden. In einer Studie von JANKIEWICZ et al. [51] wurde der Einfluss verschiedener Verarbeitungsmethoden, u.a. einer Hochdruckbehandlung (600 MPa, 10 min), auf die Allergene des Selleries getestet, allerdings fehlen hier klinische Daten. Als Maß für die Allergenität wurden die IgE-Bindungskapazität nach SDS-Elektrophorese und Immunoblotting sowie die β -Hexosaminidase-Freisetzung (ein Allergiemediator) gemessen. Seren von drei Patienten und in Hasen gewonnenen Antiseren zeigten zu Selleriepräparaten eine geringere Affinität nach der Hochdruckbehandlung. Die Inaktivierung durch Kochen und durch Erhitzen im Mikrowellenfeld war allerdings drastischer. Die Freisetzung von β -Hexosaminidase von passiv sensitivierten RBL (rat basophil leukemia)-Zellen *in vitro* nach Provokation mit unterschiedlich behandelten Selleriepräparaten zeigt Abbildung 3.20.

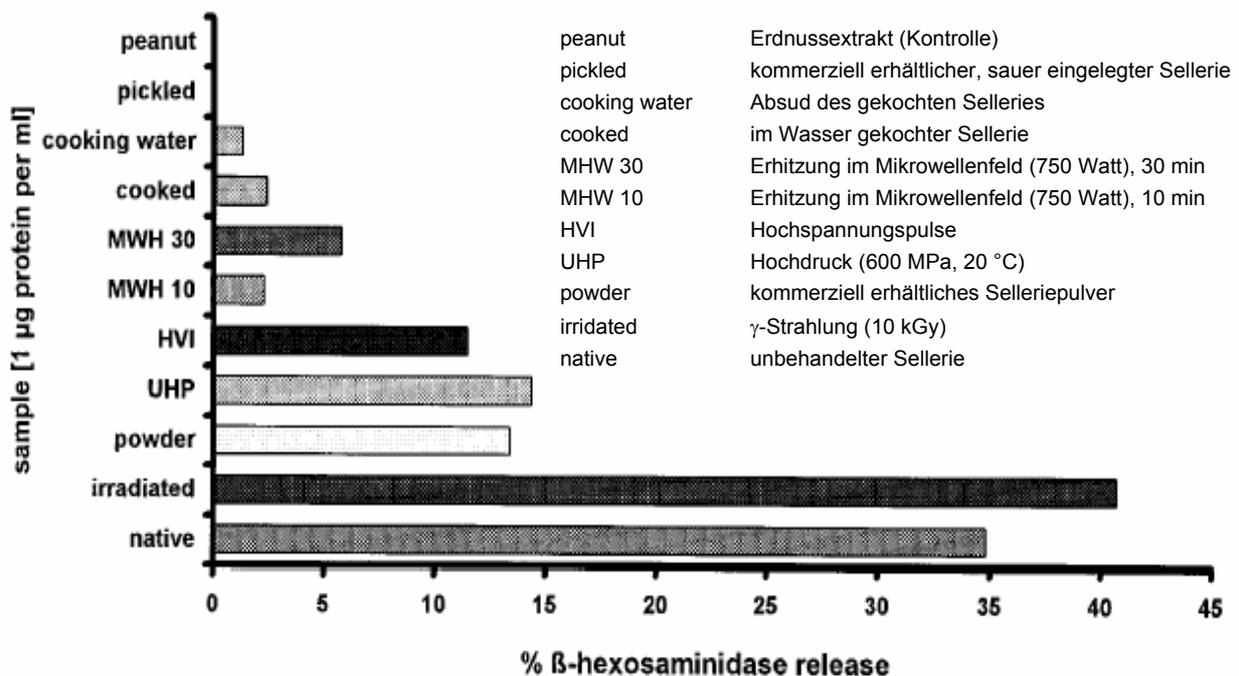


Abbildung 3.20: β -Hexosaminidase-Freisetzung von sensibilisierten RBL-Zellen [51]

Die Hochdruckbehandlung reduzierte die Freisetzung auf weniger als die Hälfte, verglichen mit nativem Sellerie. Eine γ -Bestrahlung erhöhte die Freisetzung.

Eine andere Arbeit ist eng an ein Produkt gebunden, das in Japan seit 1997 auf dem Markt ist. Ein als hypoallergen ausgelobter, vorgekochter Reis wird in einem Prozessschritt mit 400 MPa / 10 min bei 20 °C behandelt [101]. Der Grund für die verringerte Allergenität ist hier zunächst nicht die druckinduzierte Veränderung der Reisallergene, sondern eine partielle Zerstörung der Endospermzellen und die damit einhergehende Permeabilisierung, die einen „Auswascheffekt“ der Proteinfraction in die umgebende Flüssigkeit ermöglicht. Dieser Effekt konnte durch thermische

Behandlung nicht erzielt werden. Die bessere Verträglichkeit ist also auf den verringerten Allergengehalt zurückzuführen. Welche Veränderungen die Reisallergene durch die Behandlung erfuhr, wurde nicht untersucht [53].

Die druckinduzierte immunologische Veränderung von β -Lactoglobulin, dem Majorallergen der Kuhmilch, wurde anhand von ELISA-Tests mit spezifischen monoklonalen Hühnerantikörpern untersucht [48]. Da in diesem Fall keine Human-IgE-spezifischen Epitope erkannt werden, kann nicht von Allergenität gesprochen werden, sondern allgemein von Antigenität. Untersuchungen von hypoallergener Babynahrung mit diesem Testsystem haben allerdings eine gute Korrelation von Allergenität und Antigenität gezeigt. Entgegen der Erwartung erhöhte sich die Antigenität von β -Lactoglobulin nach Hochdruckbehandlungen. Dies wird zurückgeführt auf eine (prozesstechnisch durchaus erwünschte) Aggregation von β -Lactoglobulin, die durch Hochdruck im Vergleich mit einer thermischen Aggregation kleinere und lockerer assoziierte Aggregate hervorbringt. Die hochdruckinduzierte Aggregatstruktur hat demzufolge eine größere frei zugängliche Gesamtoberfläche und damit mehr zugängliche antigene Determinanten. Ob und wie sich diese antigenen Determinanten durch Hochdruck verändern, wieweit sie mit IgE-spezifischen Epitopen übereinstimmen und ob klinische Relevanz besteht, ist nicht bekannt.

Ein Molkenproteinhydrolysat, das vor der enzymatischen Hydrolyse mit 600 MPa hochdruckbehandelt wurde, zeigte im ELISA-Test gegenüber Hasen-Anti- β -Lactoglobulin eine verringerte Antigenität. Ein vergleichbarer Effekt konnte auch mit einer thermischen Behandlung (60 °C, 30 min) erzielt werden [67]. Auch hier wurden keine klinisch relevanten Aussagen getroffen.

3.4 Untersuchung der Proteinstruktur mit fouriertransformierter Infrarot- und Circular dichroismus-Spektroskopie

Obwohl mit Röntgenkristallographie und Nukleomagnetresonanz (NMR)-Spektroskopie Methoden zur Verfügung stehen, die Struktur und Konformation von Proteinen sehr genau darstellen können, ist die Spektroskopie mit anderen, weniger hoch auflösenden Methoden nach wie vor gängige Praxis. Zum einen ist die Präparation für diese hochauflösenden Methoden in vielen Fällen immens schwierig, zum anderen ist der materielle und apparative Aufwand hoch. Die „einfacheren“ spektroskopischen Methoden erlauben in vielen Fällen zudem eine höhere Variabilität der Konditionen, in denen das zu untersuchende Protein vorliegen kann.

In dieser Arbeit fanden die fouriertransformierte Infrarot (FTIR)-Spektroskopie und die Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie Anwendung, um Änderungen der Sekundärstruktur durch Hochdruckbehandlung zu erfassen. FTIR-Spektroskopie

eignet sich gut, um β -Faltblattstrukturen und ungeordnete Strukturen zu detektieren; die CD-Spektroskopie kann sehr zuverlässig α -Helices erkennen, so dass sich diese beiden Methoden gut ergänzen.

3.4.1 Circular dichroismus-Spektroskopie von Proteinen

Die CD-Spektroskopie ist eine Absorptionsspektroskopie im UV/VIS-Bereich. Im Gegensatz zu natürlichem Licht, dessen Schwingungsfeldvektoren senkrecht zur Ausbreitungsrichtung isotrop im Raum verteilt sind, befinden sich die Schwingungsfeldvektoren von polarisiertem Licht in einer definierten Ebene. Im trivialen Fall handelt es sich um eine gerade Ebene, man spricht dann von linearer Polarisierung. Zirkular polarisiertes Licht ist gekennzeichnet durch eine sich mit der Ausbreitungsrichtung drehenden Polarisationssebene. Die Spitze des Feldvektors der zirkular polarisierten Welle beschreibt somit eine Spiralbahn um die Ausbreitungsrichtung. Entsprechend der Drehrichtung der Polarisationssebene existieren links und rechts zirkular polarisierte Lichtwellen. Chirale Substanzen absorbieren links und rechts zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark, diesen Effekt nennt man Circular dichroismus. Das CD-Spektrum erhält man durch Auftragung der molaren Absorptionsdifferenz $\Delta\varepsilon$ zwischen links- und rechtszirkular polarisiertem Licht gegen die Wellenlänge. Statt $\Delta\varepsilon$ wird in der Literatur meist die molare Elliptizität Θ , die direkt mit $\Delta\varepsilon$ zusammenhängt ($\Theta = 3298 \cdot \Delta\varepsilon$), angegeben. Die Elliptizität ist ein Maß für die elliptische Polarisierung des Lichtes, zu der es infolge der Absorptionsdifferenz kommt. Da dies die allgemein gebräuchlichere Einheit ist, wird sie auch in dieser Arbeit verwendet.

Die CD-Spektren von Proteinen unterhalb einer Wellenlänge von 250 nm korrelieren stark mit dem jeweiligen Protein und seiner Konformation. Schon geringe Konformationsänderungen sind spektral sichtbar. Für die Auswertung von CD-Spektren werden Spektrensätze von Proteinen mit aufgeklärter Struktur verwendet [46] (s. Kapitel 3.4.4).

3.4.2 Infrarot-Spektroskopie von Proteinen

Die IR-Spektroskopie beruht auf der Absorption von Energie aus der einwirkenden Strahlung, durch die in der Probe Schwingungen angeregt werden. Die Absorptionen im IR-Bereich bewirken Streck-, Beuge- und Torsionsschwingungen der Atombindungen des Moleküls. Klassische dispersive IR-Spektrometer wirken sequenziell auf die Probe ein, bis der zu untersuchende Wellenlängenbereich abgetastet wurde. Im Gegensatz dazu wird bei der FTIR-Spektroskopie die Probe simultan mit allen Wellenlängenbereichen durchstrahlt und die Absorption des gesamten Wellenlängenbereiches aufgezeichnet. Hierzu werden die Wellenzüge des

Strahls in einem Interferometer zur Interferenz gebracht und die entstehenden Interferogramme aufgezeichnet. Aus dem Interferogramm kann mit Hilfe eines mathematischen Verfahrens, der Fouriertransformation, das Absorptions- oder Transmissionsspektrum errechnet werden. Diese errechneten Spektren sind prinzipiell identisch mit Spektren, die mit dispersiven Geräten aufgezeichnet werden können. Allerdings bietet FTIR-Spektrometrie einige Vorteile, wie weitaus höhere Messgeschwindigkeit, höhere Genauigkeit und Empfindlichkeit.

Für die Beurteilung von Proteinen ist besonders die Absorption im Bereich der Amidbanden von Interesse, speziell der Amidbanden I und II. Methodisch problematisch ist allerdings die relativ hohe Absorption von Wasser im Bereich von $1700\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ *, in dem auch die Amidbanden liegen. Diesem Problem begegnet man mit folgenden Strategien:

- Austausch von H_2O gegen D_2O . Die Absorption von schwerem Wasser ist im Bereich der Amidbanden weitaus geringer,
- Verwendung hochkonzentrierter Lösungen bei geringen Schichtdicken (μm -Bereich),
- Spektroskopie trockener Proben.

Die IR-Absorption von Proteinen im Bereich von $1700\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ wird hauptsächlich von Schwingungen der Peptidkette bestimmt, in geringem Maße auch von Schwingungen der Seitenketten. Besonders im Bereich der Amid I-Bande lassen sich einzelne Bandenpositionen bestimmten Sekundärstrukturmerkmalen zuordnen [46].

3.4.3 Auswertung von CD- und IR-Spektren

Für die Auswertung der Spektren müssen zunächst charakteristische Bandenbereiche für Strukturmerkmale gefunden werden. Das lässt sich grundsätzlich durch die Spektroskopie bekannter Strukturen erreichen. Gut geeignet für solche Zwecke ist das Polypeptid Poly-L-Lysin (PLL). Die Polypeptidkette des PLL bildet unter bestimmten Umgebungsbedingungen die Konformation einer α -Helix, eines β -Faltblattes oder ungeordneter Strukturen aus. Diesen Effekt nutzten 1969 GREENFIELD und FASMAN [31], um CD-Spektren reiner Sekundärstrukturen zu bestimmen. Durch mathematische Verfahren werden Spektren unbekannter Strukturen so ausgewertet, dass die Übereinstimmung mit den bekannten Spektren prozentual errechnet wird und somit der Anteil eines gewissen Strukturmerkmals. Heute wird prinzipiell genauso verfahren, nur ist der Satz an Spektren bekannter Proteine mittlerweile gewaltig angewachsen und wird von Computerprogrammen

* Aus historischen Gründen wird bei der Infrarotspektroskopie nicht die Wellenlänge, sondern die Wellenzahl (der Kehrwert der Wellenlänge) angegeben.

benutzt, um Spektren auszuwerten. Je nach Wellenlängenbereich und Art des Proteins werden Sätze mit bis zu 40 Vergleichsspektren verwendet [29].

PRIBIC et al. [78] haben aus einem Satz von 21 strukturaufgeklärten Proteinen charakteristische Spektren (CD und FTIR) für die Sekundärstrukturen α -Helix, antiparalleles β -Faltblatt, paralleles β -Faltblatt, β -Turn und „andere“ bestimmt. „Andere“ beinhaltet Strukturen, die nicht explizit einer Klasse zugeordnet sind, wie verschiedene Helixtypen oder kollagenartige Strukturen, hauptsächlich jedoch ungeordnete Struktur. Abbildung 3.21 zeigt die Spektren, links FTIR-Spektren im Bereich der Amid I-Bande, rechts die CD-Spektren. Tabelle 3.9 gibt die zugehörigen charakteristischen Maxima und Minima an.

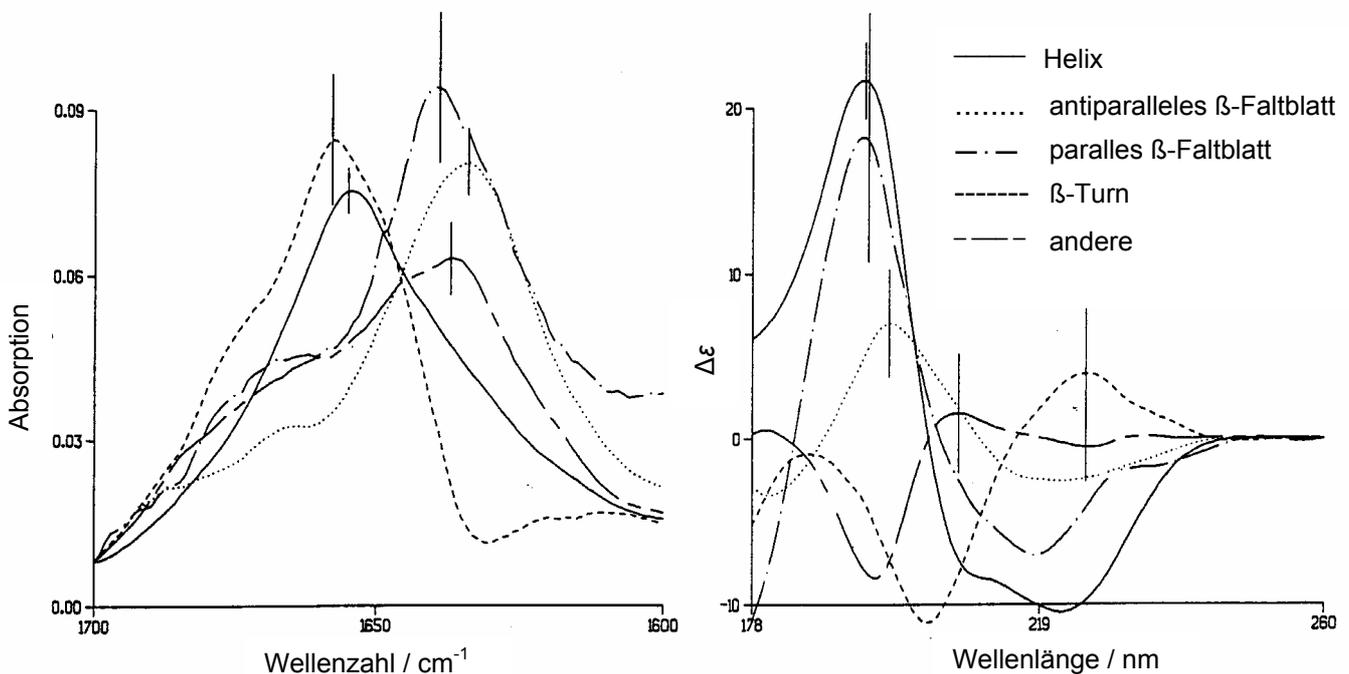


Abbildung 3.21: Theoretische IR-Absorptionsspektren (links) und CD-Spektren (rechts) von Sekundärstrukturen nach [78]

Tabelle 3.9: Charakteristische Minima und Maxima in CD- und FTIR-Spektren [78]

Spektrum	Extrema	α -Helix	β -Faltblatt, antiparallel	β -Faltblatt, parallel	β -Turn	andere
FTIR	max (cm ⁻¹)	1655	1634	1639	1658	1637
CD	max (nm)	194	198	194	226	208
CD	min (nm)	222	219	219	203	196

Die Bandenpositionen unterliegen einem gewissen Unsicherheitsfaktor, und die Angaben in der Literatur unterscheiden sich häufig. PELTON und MCLEAN [76] geben weiter gefasste FTIR-Bandenbereiche an. Die Werte sind in Tabelle 3.10 den Angaben von HOLTZHAUER [46] gegenüber gestellt.

Tabelle 3.10: Charakteristische FTIR-Bandenpositionen nach PELTON und MCLEAN [76] (normaler Satz) und HOLTZHAUER [46] (kursiver Satz)

Sekundärstruktur	Charakteristischer Bandenbereich / cm ⁻¹	
	H ₂ O	D ₂ O
α-Helix	1650-1657; <i>1648-1657 (einschl. ungeordneter Strukturen)</i>	1647-1654 <i>1648-1657</i>
<i>3₁₀-Helix</i>	<i>~ 1665</i>	
<i>β-Faltblatt, allgemein</i>	<i>1620-1640, 1670-1695</i>	<i>1620-1635</i>
β-Faltblatt, antiparallel	1612-1640, 1670-1690 (schwach)	1628-1635
β-Faltblatt, parallel	1626-1640	
Turn	1655-1675, 1680-1696; <i>1667-1686</i>	<i>~ 1644</i>
ungeordnet	1640-1651	1643

Für die Auswertung von CD-Spektren steht eine Vielzahl von Computerprogrammen zu Verfügung. Um mit Hilfe der Spektren aufgeklärter Proteine ein unbekanntes Spektrum zu analysieren, werden verschiedene mathematische Verfahren angewendet, wie z.B. lineare und multilineare Regressionsanalyse oder die Multikomponentenanalyse. Jüngste Verfahren basieren auf dem Prinzip des selbstlernenden neuronalen Netzwerks. Die Ein- und Ausgabeportale für Spektren bekannter und unbekannter Strukturen werden hierfür im Internet zur Verfügung gestellt [29].

3.4.4 Spektroskopische Untersuchung hochdruckbehandelter Proteine

Die spektroskopische Beobachtung irreversibler Effekte einer Hochdruckbehandlung gestaltet sich einfach, da die Proteinlösung nach der Behandlung unter Normalbedingungen spektroskopiert werden kann. Zu beachten ist, dass eventuelle Präzipitation die in Lösung stehende Proteinmenge verringern könnte. Auch die Zeitspanne nach der Hochdruckbehandlung vor der Spektroskopie ist zu beachten. Es könnten nicht spontane, langsam verlaufende Rückfaltungsprozesse eintreten. Für die meisten anwendungsbezogenen Untersuchungen sind lediglich die irreversiblen Effekte von Bedeutung, da die bleibenden Substrateigenschaften nach der Hochdruckbehandlung von Interesse sind.

Um hochdruckinduzierte molekulare Veränderungen und Chemismen besser verstehen zu können, ist es von Interesse, die spektroskopischen Veränderungen *in situ* zu verfolgen. Die Methodik auf diesem Feld ist jedoch von einigen technischen Schwierigkeiten geprägt. Da die Küvetten hochdruckfest sein müssen, kann nicht mit den üblichen Materialien gearbeitet werden. Als Fenstermaterial für Hochdruckzellen haben sich Quarz, Saphir und synthetischer Diamant etabliert, allerdings birgt jedes Material seine spezifischen Probleme. Quarz ist nur bedingt druckfest, Saphir und Diamant absorbieren im fernen UV-Bereich, und bei polarimetrischen Messungen stören depolarisierende Eigenschaften [38]. CD-Messungen sind deshalb nur sehr eingeschränkt im nahen UV-Bereich möglich.

Einfacher ist die Messung von Absorptionsspektren, unter die auch die für Proteine interessanten FTIR-Spektren fallen. In einer Arbeit von SMELLER et al. [94] (s. Kapitel 3.3.3) wurden *in situ*-Beobachtungen von Pferdeherzmyoglobin in einer Diamantzelle bei Drücken bis zu 1,2 GPa durchgeführt. Abbildung 3.22 zeigt die FTIR-Spektren im Bereich der Amid I-Bande von Pferdeherzmyoglobin nativ und hitzedenaturiert, sowie unter Hochdruck und nach der Entspannung.

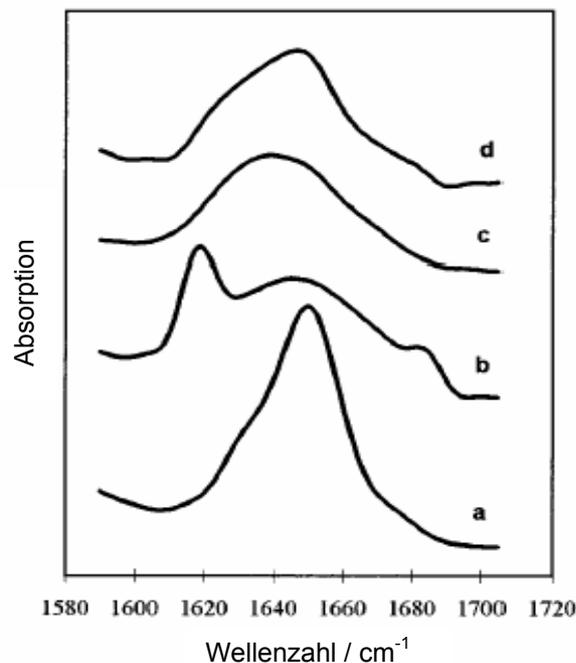


Abbildung 3.22: FTIR-Spektren von Myoglobin (a: nativ, b: hitzedenaturiert bei 90 °C, c: druckdenaturiert 1 GPa *in situ*, d: nach der Entspannung) [94]

Der im nativen Spektrum dominante Peak bei 1650 cm⁻¹ ist charakteristisch für den hohen α -Helix-Gehalt des Myoglobins. Die Peaks bei 1616 cm⁻¹ und 1685 cm⁻¹ sind in diesem Fall typisch für intermolekulare Wasserstoffbrücken (wahrscheinlich in Form intermolekularer β -Faltblätter), was auf die Aggregation des Proteins hinweist. Die Spektren des hochdruckbehandelten Proteins zeigen einen deutlichen Rückgang des Peaks bei 1650 cm⁻¹, was auf eine Zerstörung helikaler Strukturen hinweist. Die Bildung intermolekularer Bindungen scheint hier nicht einzutreten.

In einer Arbeit von PANICK und WINTER [72] wurde die druckinduzierte Denaturierung des Enzyms Ribonuclease A in D_2O mittels FTIR *in situ* verfolgt. Abbildung 3.23 zeigt die Absorption im Bereich der Amid I-Bande in Druckabhängigkeit.

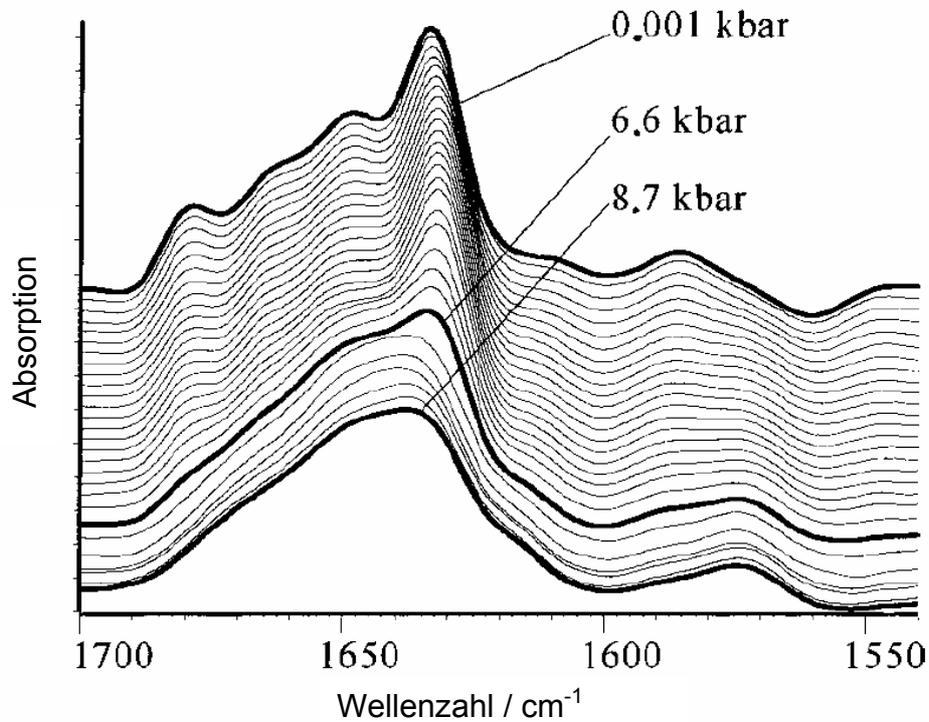


Abbildung 3.23: FTIR-Absorptionsspektren von Ribonuclease A bei Drücken bis 870 MPa [72]

Besonders die mit β -Faltblättern assoziierte Bande bei 1633 cm^{-1} zeigt im Bereich von 550-650 MPa einen deutlichen Rückgang. Aber auch α -Helices (Bande bei 1652 cm^{-1}) werden druckbedingt zerstört. Allerdings werden die Strukturen nicht gänzlich zerstört. Gleichzeitig konnte ein Anstieg der ungeordneten Strukturanteile (Bande bei 1645 cm^{-1}) verzeichnet werden.

4 Material und Methoden

4.1 Hochdruckprozessierung

Alle Hochdruckbehandlungen wurden mit einer Anlage der AAD Hochdrucktechnik GmbH (Bad Homburg) durchgeführt. Der Innendurchmesser des Autoklaven beträgt 65 mm, das Gesamtvolumen ist 1,5 l. Der Maximaldruck beträgt 700 MPa, die Druckaufbau- und Druckabbaurate sowie die Dauer der Haltephase sind rechnergesteuert.

Die Lebensmittelproben wurden in entsprechend große Stücke geschnitten, ca. 1 g für Pricktests und 50 g für orale Provokationstests, und mit einer Vakuumsiegelmaschine (Vacuboy, Komet GmbH, Plochingen) luftfrei in Polyethylenbeutel verschweißt. Nach der Hochdruckbehandlung wurde das Testmaterial in der Verpackung belassen und bei - 80 °C bis zur Verwendung aufbewahrt. Vergleichende Prick to Prick-Tests haben gezeigt, dass die Lagerung in gefrorenem Zustand keinen Einfluss auf die Reaktivität des Probenmaterials hat.

Flüssigkeiten (Allergenlösung) wurden in Minivials (Merck KGaA, Darmstadt, Volumen luftfrei ca. 0,8 ml) oder Mikrovials (Rotilabo Probenfläschchen C519.1, Roth GmbH, Karlsruhe, Volumen luftfrei ca. 0,4 ml) randvoll pipetiert und mit einem elastischen Teflonseptum (E156.1, Roth GmbH, Karlsruhe) luftblasenfrei verschlossen. Die elastischen Septen dienten hierbei der zerstörungsfreien Druckübertragung in das Innere der Glasvials. Zur Hochdruckbehandlung wurden die fest verschlossenen Vials mit etwas Wasser (um Luftpinschlüsse im Beutel zu vermeiden) in Polyethylenbeutel verschweißt. Nach der Hochdruckbehandlung wurden die Proben sofort verwendet oder bis zur Verwendung bei - 80 °C gelagert.

4.1.1 Druck- und Temperaturverläufe

Alle Druckbehandlungen wurden bei einer Umgebungstemperatur von ca. 20 °C durchgeführt. Die adiabaten Temperaturerhöhungen werden für die einzelnen Probenmaterialien in den entsprechenden Kapiteln besprochen. Vereinfachend kann für alle Proben eine maximale adiabate Erwärmung, wie sie bei Wasser auftritt, angenommen werden, da die Lebensmittelproben wie auch die Allergenlösungen zum größten Teil aus Wasser bestehen (s. Diagramm 3.14). Für die adiabate Erwärmung sind demnach bei einer Druckerhöhung auf 600 MPa ca. 15 K anzusetzen. Drücke von 100 bis 600 MPa bei einer Auf- und Abbaurate von 200 MPa/min und Haltezeiten von 0 bis 5 Minuten waren der Rahmen für die Hochdruckbehandlungen.

4.2 Klinisch-experimentelle Untersuchungen

Die klinische Relevanz der Hochdruckbehandlung kann anhand eines Vergleichs der Testreaktionen auf natives und behandeltes Material untersucht werden. Als Testpersonen kommen Patienten mit relevanter Anamnese und positiver Pricktestreaktion auf das native Lebensmittel in Betracht. Klinisch-experimentell wurden die Hautreaktion nach Provokation mit dem Testmaterial und die Symptomatik nach dem Verzehr einer gewissen Menge des Lebensmittels beschrieben, wobei der Patient nicht wusste, ob er natives oder hochdruckbehandeltes Material erhielt (einfach blinder oraler Provokationstest). Die Degranulation basophiler Granulozyten, ausgelöst durch Allergenexposition, wurde *in vitro* durchflusszytometrisch bestimmt.

4.2.1 Patientenkollektiv

Die Patienten waren zwischen 20 und 61 Jahre alt und frei von anderen (nicht allergischen) Erkrankungen. Im Rahmen der zur allergologischen Diagnostik bei den Patienten bereits ambulant durchgeführten Pricktests lag eine positive Reaktion gegen das zu testende Allergen vor. Die Patienten fanden sich zum Test in der Allergieabteilung der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der TU München ein. Nach einer umfassenden Aufklärung (Patientengespräch und Aufklärungsbogen) wurden die Tests durchgeführt. Nach dem Test verblieben die Patienten noch zwei Stunden unter ärztlicher Beobachtung, um eventuelle verzögerte Reaktionen gegebenenfalls behandeln zu können. Das Patientengespräch und die Durchführung der Tests wurden von einem Dermatologen / Allergologen durchgeführt. Die Patientendaten zu Alter, Geschlecht und Anamnese sind im Ergebnisteil angegeben.

Die Untersuchung wurde von der Ethikkommission der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München begutachtet und für ethisch unbedenklich befunden (siehe Kopie des Schreibens im Anhang). Die Empfehlungen des Weltärztebundes (revidierte Deklaration von Helsinki) wurden beachtet.

4.2.2 Pricktest

Tests auf der Haut sind als zuverlässiges, schnelles und minimalinvasives Diagnostikum der Allergologie weit verbreitet. Besonders der Pricktest hat sich gegenüber anderen Verfahren, wie z.B. dem Reibetest, als aussagekräftig, einfach durchführbar und gut standardisierbar erwiesen. Beim Pricktest wird ein Allergen mit Hilfe einer speziellen Pricklanzette ca. 0,5 mm tief in die Haut eingestochen. Liegt eine Sensibilisierung gegen das getestete Allergen vor, erscheinen innerhalb kurzer Zeit nach dem Einstich eine Quaddel (Erhabenheit) und ein Erythem (Rötung) rund um die Einstichstelle. Ein allgemein anerkannter Standard für die Vorgehensweise

und die Nadelform wurde 1981 eingeführt [11]. Dieser liegt auch den Tests dieser Arbeit zugrunde. Beim Pricktest wird zunächst mit einer Tropfpipette ein Tropfen der zu testenden Allergenlösung auf die Haut aufgetragen. Anschließend wird die Pricknadel durch den Tropfen in die Haut eingestochen [118].

Der Pricktest eignet sich begrenzt zur Diagnostik von Lebensmittelallergien und ist Grundlage vieler Arbeiten auf diesem Gebiet [5, 57, 77, 83, 109, 110]. Eine Modifikation des Pricktests, der so genannte Prick to Prick-Test (PTP), eignet sich besser zum Test auf Lebensmittelallergien, insbesondere, wenn keine relevanten Allergenlösungen erhältlich sind [118]. Beim Prick to Prick-Test wird die Nadel zuerst in das Testmaterial eingestochen und anschließend in die Haut. Diese Vorgehensweise erlaubt ferner einen direkten Vergleich unterschiedlich behandelter Lebensmittelproben.

Der Prick to Prick-Test findet in dieser Arbeit bei allen Lebensmitteln Anwendung und wurde vergleichend zwischen nativem und hochdruckbehandeltem Material durchgeführt. Bei allen Tests wurde eine standardisierte Pricknadel (Typ Mediprick, Servoprax GmbH) für den Einmalgebrauch verwendet. Die Prickpunkte wurden alle auf der Innenseite des Unterarms gesetzt, da hier von einer ähnlichen Hautreaktivität (respektive Mastzellendichte) ausgegangen werden kann, was für eine Vergleichbarkeit der Reaktionen wichtig ist. In manchen Fällen kann jedoch beobachtet werden, dass distal (nahe dem Handgelenk) bei gleichem Testmaterial kleinere Reaktionen auftreten als proximal (nahe der Unterarmbeuge). Native Proben wurden daher distal und hochdruckbehandelte Proben proximal getestet, um das Risiko falsch negativer Wertungen zu verringern. Zusätzliche Prickpunkte mit physiologischer Kochsalzlösung und Histaminlösung (Verdünnung 1/1000, Allergopharma KG, Reinbek) dienten als Negativ- bzw. Positivkontrolle. 20 Minuten nach der Ausführung wurden die Hautreaktionen gemessen. Als Maß für die Allergenität diente der größte Durchmesser von Quaddel und Erythem oder die Fläche der Quaddel. Das begleitende Erythem dient nur sekundär der Beurteilung. Zur Dokumentation wurde ein durchsichtiger Klebefilm (Multifilm, Tesa AG, Hamburg) aufgebracht, auf dem die Quaddelfläche mit einem geeigneten Stift umrandet wurde. Die umrandete Fläche wurde dann auf Millimeterpapier vermessen. Die Bewertung der Pricktestergebnisse wurde folgendermaßen durchgeführt:

- Reaktionen auf Nativmaterial (nicht hochdruckbehandelt) wurden als positiv gewertet, wenn sie noch mindestens 50 % des Wertes (Durchmesser oder Fläche) der Positivkontrolle mit Histamin aufwiesen.
- Reaktionen auf hochdruckbehandeltes Material wurden als positiv gewertet, wenn sie noch mindestens 50 % des Wertes der Reaktion auf das Nativmaterial aufwiesen.

4.2.3 Orale Provokation

Die klinische Relevanz einer Lebensmittelallergie kann mittels oralen Provokationstests überprüft werden. Die orale Provokation wird durch den Verzehr einer definierten Menge des zu testenden Lebensmittels durchgeführt. Zu den typischen Symptomen einer Typ-I-Reaktion gehört das orale Allergiesymptom mit Missempfindungen wie Jucken, Kribbeln, Nies- oder Hustenreiz im Mund- und Rachenraum. Seltener treten auch Schwellungen, Rötungen, Urticaria, Quincke-Ödeme und Durchfall auf. Diese Symptomatik ist nicht objektiv messbar und kann nur durch eine Befragung des Patienten über sein Befinden erfasst werden. Die Wahrnehmung dieser Empfindungen ist subjektiver Art und von psychischen Faktoren und der Erwartungshaltung der Testperson abhängig. Um subjektive Faktoren zu minimieren, sollte der Test verblindet sein, d.h. der Patient muss sich im Unklaren darüber sein, ob er allergenes Material oder ein Placebo erhält. Noch günstiger wäre ein doppelblinder Test: Der verabreichende Arzt weiß selbst nicht, um welches Material es sich handelt. Es wird somit vermieden, dass eine verborgene Erwartungshaltung des Arztes subtil auf den Patienten einwirken könnte [18]. Die Umsetzung dieser Forderungen ist in der Praxis jedoch oft nur begrenzt möglich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden einfach blinde orale Provokationen mit Apfelmateriale der Sorte 'Golden Delicious', durchgeführt, nachdem der Patient im Prick to Prick-Test bereits eine negative Reaktion auf den hochdruckbehandelten (600 MPa) Apfel gezeigt hatte. Da die hochdruckbehandelten Apfelstücke optisch und haptisch vom nativen Material zu unterscheiden sind, musste eine Verblindung erfolgen. Hierzu wurde die zu verzehrende Menge von 50 g im noch gefrorenen Zustand in einen Johannisbrotbaum/Reismehlbrei (Sinlac Spezialbrei, Nestlé Deutschland AG), ein Spezialbrei für die allergenfreie Diät, gerieben und vermischt. Geschmacklich waren native und hochdruckbehandelte Proben nicht von einander zu unterscheiden. Trat eine typische Allergiesymptomatik während der folgenden zwei Stunden nach dem Verzehr ein, wurde der Test als positiv bewertet und die Symptomatik dokumentiert. Traten keine Symptome auf, wurde der Test als negativ gewertet.

4.2.4 IgE-Bestimmung

Zur Beurteilung einer allergischen Reaktion ist die Kenntnis der Menge an allergenspezifischem und unspezifischem IgE im Blut des Patienten hilfreich. Zur Bestimmung wurde das CAP-FEIA-System (Pharmacia Upjohn GmbH, Freiburg) verwendet.

Testprinzip:

An schwammartigen Scheiben aus Celluloseacetatpropionat (CAP) gebundenes Allergen (isoliertes oder rekombinantes Allergen) oder Anti-IgE wird mit Serum

inkubiert und das gebundene IgE mittels enzymmarkiertem Antikörper nachgewiesen. Alkalische Phosphatase wandelt Methylumbilliferylphosphat in fluoreszenztes Methlumbilliferon um, welches quantitativ fluorimetrisch nachgewiesen wird und direkt mit der IgE-Serumkonzentration korreliert [121]. Das Testverfahren ist als Fluorescent Enzym Immunoassay (FEIA) bekannt.

IgE-Serumkonzentrationen werden in kU/l angegeben, wobei 1 kU/l 2,47 ng/l entsprechen (WHO Standard). Die CAP-FEIA-Ergebnisse werden semiquantitativ in die CAP-Klassen 0 bis 6 eingeteilt:

- 0 = negativ (< 0,35 kU/l)
- 1 = fraglich positiv (0,35 - 0,70 kU/l)
- 2 = positiv (0,70 - 3,50 kU/l)
- 3 = positiv (3,50 - 17,50 kU/l)
- 4 = positiv (17,50 - 50,00 kU/l)
- 5 = positiv (50,00 - 100,00 kU/l)
- 6 = positiv (>100,00 kU/l).

Im zuvor gängigen Verfahren war der IgE-spezifische Antikörper radioaktiv markiert und das Testsystem unter dem Namen RAST (Radio Allergen Sorbent Test) bekannt. Die davon abgeleiteten, in der Literatur häufig verwendeten, RAST-Klassen 0 bis 4 sind mit den CAP-Klassen 0 bis 4 analog.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden der Gesamt-IgE-Spiegel und der spezifische IgE-Spiegel gegen Apfel und Birke (Extrakte) mit den standardmäßig zum Testsystem gelieferten Allergenen bestimmt. Für die Bestimmung des rMal d 1-spezifischen IgE wurde das Allergen freundlicherweise von der Herstellerfirma an die CAP-Phase des Systems gekoppelt.

4.2.5 Quantitative Bestimmung der Degranulation basophiler Granulozyten

Basophile Granulozyten sind im Blut zirkulierende Leukozyten und machen normalerweise 0,5-1 % der weißen Blutzellpopulation aus. Antigenspezifisches IgE bindet an hochaffine Fc_ϵ -Rezeptoren von basophilen Granulozyten. Benachbarte IgE-Moleküle auf der Oberfläche der sensibilisierten Zellen werden durch Allergene kreuzvernetzt. Durch diese Vernetzung von IgE-Molekülen auf der Zelloberfläche kann es zur Degranulation der Zellen kommen. Bei dieser Degranulation wird eine Vielzahl an allergiespezifischen Mediatorsubstanzen, die, wie z.B. Histamin, in den Granula enthalten sind, ausgeschüttet [55]. Der Degranulationsgrad der basophilen Granulozyten im Blut von sensibilisierten Patienten nach der Stimulation mit einem Allergen ist daher ein Maß für die allergene Potenz der getesteten Substanz. Die Frage, ob hochdruckbehandeltes rMal d 1 nicht mehr in der Lage ist, die

Degranulation anzuregen, sollte durch eine Stimulation und anschließender durchflusszytometrischer Messung der Degranulation geklärt werden. Für die Stimulation und Aufbereitung des Patientenblutes wurde das Basotest[®]-Kit (Orpegen Pharma GmbH, Heidelberg) verwendet.

Testprinzip und Vorgehensweise:

100 µl heparinisiertes Patientenblut werden 10 min bei 37 °C mit 20 µl Basotest[®]-Stimulationspuffer inkubiert. Danach erfolgt die Stimulation (20 min bei 37 °C) mit 100 µl rMal d 1-Lösung, die mit Basotest[®]-Waschlösung auf die Konzentrationen 1, 0,1, 0,01 und 0,001 µg/ml Allergengehalt eingestellt wurde. Das chemotaktische Peptid N-Formyl-Met-Leu-Phe (enthalten im Basotest[®]) dient als Positivkontrolle, die Zugabe von Basotest[®]-Waschlösung als Negativkontrolle. Der Degranulationsprozess wird anschließend durch fünfminütige Inkubation auf Eis gestoppt. Die Zielzellen werden dann mit 20 µl Basotest[®]-Zweifarbreaenz (Inkubationszeit 20 min, auf Eis) gefärbt. Die Farbreagenz enthält zwei monoklonale Antikörper: Anti-IgE-PE, das mit dem Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin konjugiert ist und an humanes IgE bindet (und damit an basophile Granulozyten) und Anti-gp53-FITC, das das auf aktivierten basophilen Granulozyten exprimierte Glycoprotein gp53 erkennt und mit dem Farbstoff Fluorescein konjugiert ist. Nach dieser Anfärbung werden störende Erythrozyten durch Zugabe von 2 ml Basotest[®]-Lyselösung (Inkubation 10 min bei Raumtemperatur) und anschließendem Zentrifugieren (5 min, 250 g, 4 °C) und Dekantieren des Überstandes entfernt. Es folgt ein abschließender Waschschrift mit Zugabe von 3 ml Basotest[®]-Waschlösung, Zentrifugieren (5 min, 250 g, 4 °C) und Dekantieren des Überstandes. Die so aufbereiteten Proben werden bis zur Messung abgedeckt im Eisbad nicht länger als zwei Stunden aufbewahrt.

Verwendete Geräte und Reagenzien (außer Basotest[®]):

- Blutentnahmeröhrchen mit Heparin (Monovette, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht)
- Einmalprobenröhrchen (Falcon[®] Tube 50 ml, BD Biosciences Inc., USA)
- Steriles, pyrogenfreies Wasser zum Verdünnen der konzentrierten Lösungen (USF, Elga Water Systems, England)
- rMal d 1-Lösung (wie unter 4.4.2 beschrieben)
- Transferpipetten: 10 - 100 µl bzw. 200 - 1000 µl (Reasearch 100 bzw. 1000, Eppendorf AG, Hamburg)
- Flaschenaufsatzdispenser (Genius, Walu Labortechnik GmbH, Wertheim)
- Temperierbares Wasserbad (SW 21, JULABO Labortechnik GmbH, Seelbach)
- Vortex-Mischer (Vortex Genie 2, Scientific Industries Inc., USA)
- Temperierbare Zentrifuge (Rotixa KS, Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen)

Durchflusszytometrie:

Die Messungen wurden mit einem Durchflusszytometer FACSCalibur (BD Biosciences Inc., USA) durchgeführt und der zugehörigen Software CELL QUEST PRO verarbeitet. Die Geräteeinstellungen wurden, wie in der Arbeitsanweisung für Basotest® [70] vorgeschlagen, übernommen. Das Auswertefenster R1 wurde auf basophile Granulozyten mit starker IgE-Expression durch Setzen des Schwellenwertes im FL2-Kanal gesetzt (siehe Abbildung 4.1 A). Das Analysenfenster wurde festgelegt auf basophile Granulozyten wie in Abbildung 4.2. B, wobei der Schwellenwert auf Fluoreszenz 2 gesetzt wurde.

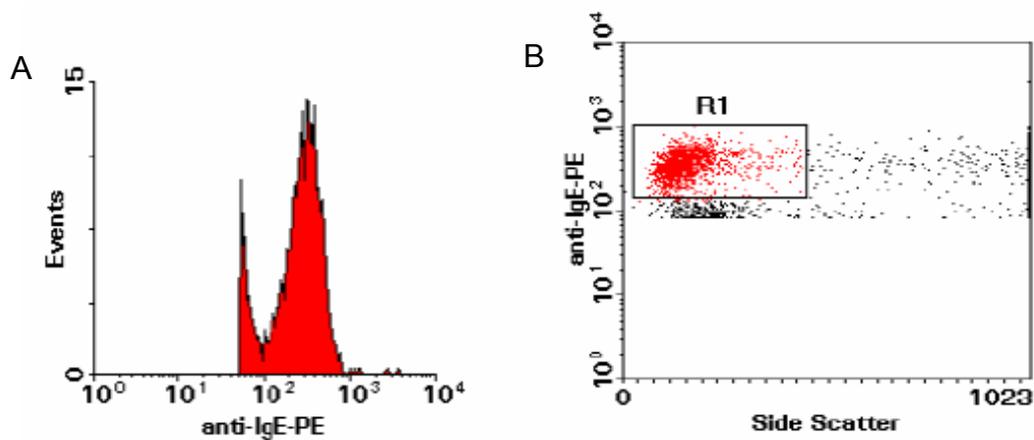


Abbildung 4.1: Geräteeinstellungen bei der Durchflusszytometrie [70]

Pro Probe wurden 1000 Granulozyten im Auswertefenster R1 akquiriert.

Abbildung 4.2 zeigt typische Histogramme für die Negativkontrolle mit Waschlösung (A), die Positivkontrolle mit N-Formyl-Met-Leu-Phe (C) und einen Testansatz mit einem Allergen. Der Marker M1 zeigt den als positiv bewerteten Bereich an.

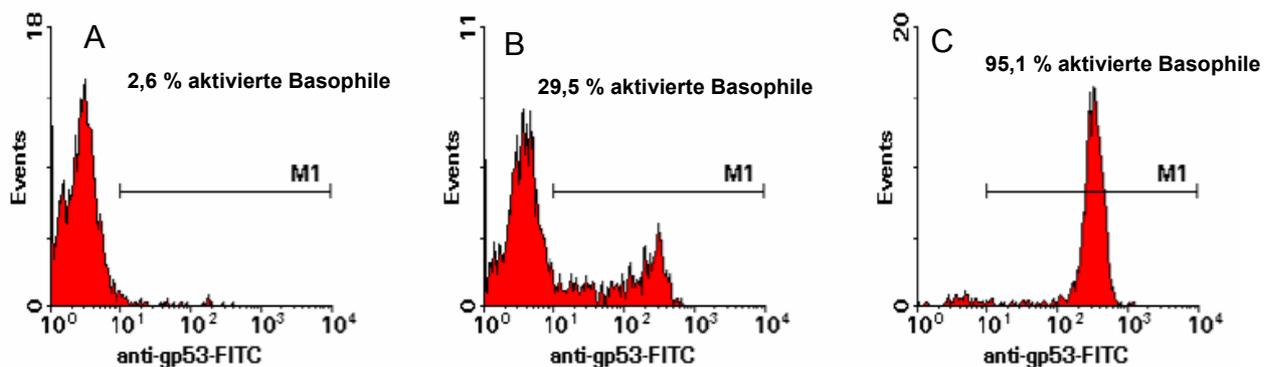


Abbildung 4.2: Typische Histogramme: Negativkontrolle (A), Testansatz (B) und Positivkontrolle (C) [70]

4.3 Spektralanalytik

4.3.1 Messung des Circular dichroismus

Die CD-Spektren wurden mit einem Jasco 715 Spektralpolarimeter (Jasco Ltd., Japan) gemessen mit folgenden Messparametern:

- Wellenlängenbereich: 300-180 nm
- Messschritt: 0,2 nm
- Empfindlichkeit: 50 mdeg
- Kumulation: 5 Spektren
- Stickstofffluss: ca. 5 l/min
- Quarzglasküvette (Suprasil QS, Hellma GmbH, Müllheim), Schichtdicke 1 mm.

Das Leerspektrum wurde durch die mit Puffer gefüllte Küvette gemessen und von den Spektren abgezogen. Zur Bearbeitung und Darstellung der Spektren wurde das Programm J-700 Standard Analysis, Version 1.50.01 (Jasco Ltd.) verwendet.

4.3.2 Messung der Infrarotspektren

Die IR-Spektren wurden als Absorption eines getrockneten Films der Proteinlösung mit einem IFS 28B Spektrometer im Verbund mit einem IRscope II Mikroskop (beide Geräte von Bruker GmbH, Karlsruhe) gemessen. Der Film entstand durch Auftropfen der Lösung (siehe 4.4.2.1) auf einen Probenträger mit einem nicht IR-absorbierenden ZnSn-Fenster (Bruker GmbH) und anschließender Trocknung im Exsikkator bei 20 °C. Das Auftropfen und Antrocknen wurde dreimal wiederholt, um eine ausreichende Schichtdicke zu erhalten. Jedes Spektrum wurde aus 128 Einzelinterferogrammen gemittelt. Folgende für Proteinuntersuchungen geeignete Messparameter wurden eingestellt:

- Wellenzahlenbereich: 4000-600 cm^{-1}
- Auflösung: 6 cm^{-1}
- Scangeschwindigkeit: 20 kHz
- Anzahl der Probenscans: 128
- Anzahl der Hintergrundscans: 128
- Zerofillingfaktor: 4.

Nach lichtmikroskopischer Begutachtung wurden drei Stellen des Filmes zur Messung ausgewählt. Es war zu beachten, dass der Film an der Messstelle eine ausreichende Absorption besaß (Schichtdicke) und nicht von Salzkristallen der Puffersalze unterbrochen war. Die Leerabsorption wurde an einer freien Stelle des ZnSn-Fensters gemessen und von den Spektren subtrahiert. Zur Auswertung, Bearbeitung und Darstellung der Spektren wurde das Programm Opus 3.1 for Windows NT (Bruker GmbH, Karlsruhe) verwendet.

4.3.3 Rechnergestützte Proteinstrukturvorhersage

Ein Molekülmodell ermöglicht eine Diskussion der in der Literatur beschriebenen Epitope von Mal d 1 und von verwandten Molekülen sowie deren mögliche Veränderung durch die Hochdruckbehandlung. Verschiedene Vorhersagemethoden für die Sekundär- und Tertiärstruktur von Mal d 1 wurden angewendet. Prinzipiell sind die Vorhersagemethoden danach zu unterscheiden, welche Basisdaten sie verarbeiten. Zum einen wurden die experimentellen Daten der CD-Spektroskopie benutzt, um die Sekundärstrukturgehalte im Molekül zu berechnen. Zum anderen wurde ein Homologiemodelling durchgeführt, das die Primärstruktur und homologe Primärstrukturen bereits aufgeklärter Moleküle als Berechnungsgrundlage nutzt. Folgende Methoden und PC-Programme wurden zur Auswertung der CD-Daten verwendet:

- Selbstkonsistente Näherung (engl. Self Consistent Method) mit dem Programm SELCON3, beschrieben von SREERAMA et al. [98, 99]
- Multilineare Regression mit dem Programm CONTIN [79, 99]
- Auswertung mittels selbstlernender Neuronale Netztechnik und einem Referenzproteinset mit dem Programm K2D [1]
- Least square fit-Methode (Methode der kleinsten Abstandsquadrate) mit einem Referenzset von GREENFIELD et al. [31] mit dem Programm DICHROPROT [17]
- Die Berechnung des α -Helixgehaltes mit der Greenfield-Fasman-Formel [31]

aus der molaren Elliptizität bei 208 nm:
$$f^{\alpha} = \frac{\theta_{208} + 4000^{\circ}}{-29000^{\circ}}$$

Alle Programme wurden von den Autoren für wissenschaftliche Zwecke frei zur Verfügung gestellt. Die einzelnen Methoden sowie deren Anwendung in der jeweilig aktuellsten Version werden von LOBEY et al. [59] im World Wide Web verfügbar gemacht (Adresse: <http://www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html/home.html>) und wurden in dieser Arbeit genutzt. Welche Methode die verlässlichsten Ergebnisse bringt, wird von dem Protein selbst und den Messparametern der Spektren bestimmt und wird bei der Auswertung selbst diskutiert.

Das Homologiemodelling wurde nach der Swissmodel-Methode [35] durchgeführt. Auch hierfür steht im World Wide Web ein Server zur Verfügung, der die Suche nach homologen Sequenzen in den Proteindatenbanken und das Modelling mit dem Programm ProMod II automatisch durchführt (Adresse: <http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html>). Für die Modellierung von Mal d 1 benutzte das Programm neben der Primärstruktur die aufgeklärten Strukturen von Pru av 1, dem Majorallergen in Kirschen [68], und Bet v 1, wie bereits beschrieben. Die Darstellungen der Moleküle wurden mit dem Visualisierungsprogramm RASTOP

Version 2.0 erstellt. Die Sekundärstruktur wurde zu Vergleichszwecken mit vier weiteren rechnergestützten Methoden berechnet:

- Methode nach RAGHAVA [82]
- Methode nach FRISHMAN et al. [23]
- PHD-Methode nach ROST et al. [85, 86,87]
- GOR IV-Methode nach GARNIER et al. [25].

4.4 Probenmaterial

Zur Untersuchung kamen verschiedene Lebensmittel, rekombinantes Mal d 1 und zwei Referenzsubstanzen für die Spektroskopie. Stets wurden native und hochdruckbehandelte Aliquote hergestellt, um vergleichende Testreihen zu ermöglichen.

4.4.1 Ausgewählte Lebensmittel

Die Obst- bzw. Gemüsearten Apfel (Sorte 'Golden Delicious'), Pfirsich, Kirsche, Karotte, Haselnuss und Sellerie wurden im Fachhandel gekauft. Die Vorbereitung, Behandlung und Lagerung der Proben gestaltete sich wie folgt:

1. Waschen mit kaltem Leitungswasser
2. Abtrocknen
3. Portionieren (Stücke von ca. 1 g für die Pricktests und 50 g für die orale Provokation)
4. Vakuumverpacken in Polyethylensiegelbeutel mit einem Vakuumverpacker (wie unter 4.1)
5. Behandlung (Hochdruck, Erhitzen im Wasserbad)
6. Lagerung bei -80 °C bis zur Verwendung.

4.4.2 Mal d 1

Rekombinant hergestelltes Mal d 1, wie beschrieben bei VANEK-KREBITZ et al. [106], wurde käuflich erworben (Biomay GesmbH, Wien). Tabelle 4. 1 gibt die Produktspezifikation wieder.

Tabelle 4.1: Produktspezifikation von rMal d 1

Molekularmasse	17 649 Da
Molekularer Extinktionskoeffizient	14 127 l mol ⁻¹ mm ⁻¹
Absorption bei 278 nm und 1 mg/ml	0,80
Reinheit	ca. 94 %
Puffer	TRIS / HCl pH 8,5

Das Protein liegt zusammen mit den Puffersalzen im lyophilisierten Zustand vor und muss daher zunächst in Lösung gebracht werden.

4.4.2.1 Rückfaltung in die native Konformation

Im lyophilisierten Zustand ist Mal d 1 nur bedingt löslich, und die dehydrierte Konformation muss nicht mit der nativen identisch sein. Versuche, das Protein bei niedrigen pH-Werten von ca. 4, wie sie etwa im Apfel vorliegen, zu lösen, schlugen fehl. Gut löslich ist das Protein bei pH 7 und 6 M Harnstoffkonzentration. Harnstoff wirkt auf Proteine in Lösung auffaltend, macht dadurch polare Gruppen zugänglich und erhöht so die Löslichkeit. Anschließendes dialytisches Entfernen des Harnstoffs ermöglicht dem Protein die Rückfaltung in den nativen Zustand, gleichzeitig bleibt es in Lösung. Diese Methode wird bei SON [96, 97] und auch in der Produktspezifikation vorgeschlagen. Für die experimentellen Bedingungen dieser Arbeit wurde die Methode folgendermaßen modifiziert:

Der für alle Lösungen und Verdünnungen verwendete Puffer war ein 10 mM K_2HPO_4 / HCL mit pH 7,0, mit Ausnahme der ersten CD Messung. Hier wurde ein 10 mM Na_2HPO_4 / HCL Puffer mit pH 7,0 verwendet. Herstellung:

1. Ca. 14 g K_2HPO_4 (p.A., wasserfrei, Merck KGaA, Darmstadt) in 100 ml H_2O (gereinigt und entionisiert mit Millipore[®] System) lösen
2. Mit 0,1 N HCl (Merck KGaA, Darmstadt) auf pH 7,0 titrieren (Verbrauch ca. 300 ml)
3. Den Puffer mit H_2O auf 10 mM Konzentration verdünnen.

Ein mg lyophilisiertes Mal d 1 samt den zugesetzten Salzen in 5 ml 6M Harnstoff-Puffer in einem Reagenzglas lösen. Die Lösung in einen Fertigdialyseschlauch (Spectra/Por Float-A-Lyzer mit einer Trenngrenze 3500 Da, Spectrum Laboratories Inc., USA) mit weiteren 5 ml 6 M Harnstoff-Puffer (Harnstoff: für biochemische Zwecke, Merck KGaA, Darmstadt) überführen (Konzentration ca. 0,1 mg/ml bei 10 ml Gesamtvolumen). Den Dialyseschlauch sicher verschließen und dann gegen sinkende Harnstoffkonzentrationen folgendermaßen dialysieren:

Dialysevolumen : 2 l im Standzylinder auf Magnetrührer mit ca. 60 U/min

1. Dialyseschritt gegen 5 M Harnstoff, 12 h
2. Dialyseschritt gegen 3 M Harnstoff, 12 h
3. Dialyseschritt gegen 2 M Harnstoff, 12 h
4. Dialyseschritt gegen 1 M Harnstoff, 12 h
5. Dialyseschritt gegen 0,5 M Harnstoff, 12 h
6. Dialyseschritt gegen 0 M Harnstoff, 6 h
7. Schritt 6 zweimal wiederholen.

Die so dialysierte Mal d 1-Lösung wird vorsichtig luftblasenfrei in die Vials pipetiert und wie unter 4.1 beschrieben weiterbehandelt.

4.4.3 Vergleichsproteine in der CD-Spektroskopie

Als Vergleich und zur Validierung der Methode ist es sinnvoll, neben dem unbekanntem Protein Proteine mit bekannter Struktur und bekannten Spektren zu untersuchen. In dieser Arbeit dienten Myoglobin (aus Pferdeherz, Sigma, Produkt Nr. M-1882) und Poly-L-Lysin (Molekularmasse 37,7 kDa, Sigma, Produkt Nr. P 9404) als Referenz. Die Struktur von Myoglobin ist sowohl durch NMR als auch Röntgenkristallographie bekannt. Auch IR- und CD-Spektren sind beschrieben, und selbst Hochdruckeffekte wurden mit diesen Methoden schon untersucht [94, 102].

Poly-L-Lysin (PLL) diente zur Erstellung von Referenzspektren in der CD-Spektroskopie [30, 31], da es in Abhängigkeit von pH und Temperatur verschiedene Konformationen einzunehmen vermag. Die Spektren sind daher hinreichend bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurden die PLL-Lösungen hochdruckbehandelt, um die Auswirkung auf die jeweilige Konformation im CD-Spektrum verfolgen zu können. Die PLL-Lösungen mit pH 11 wurden durch Lösen von PLL in H₂O (Millipore[®] gereinigt) und anschließendem titrimetrischen Einstellen der Lösung auf pH 11,0 mit 0,1 N Natronlauge (Titrisol, Merck KG, Darmstadt) hergestellt. Für die Lösungen mit pH 7 wurde ein 10 mM K₂HPO₄ / HCL Puffer wie für rMal d 1 verwendet.

4.4.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Auswertung der Spektren und die *in vitro*-Untersuchungen ist die Kenntnis der Proteinkonzentration erforderlich. Bei Mal d 1 brachte die photometrische Bestimmung der Konzentration bei 287 nm (wie in der Produktspezifikation vorgeschlagen) keine zuverlässigen Ergebnisse. Die Konzentration der Mal d 1-Lösung nach der Dialyse wurde daher mit der Bicinchoninsäure-Methode [95] bestimmt. Die Bestimmung wurde mit einem Testkit der Firma Uptima (Micro BCA Protein Assay Kit) durchgeführt.

Da PLL und Myoglobin sehr gut löslich sind und bei der Probenvorbereitung keine konzentrationsbeeinflussenden Arbeitsschritte (z.B. Dialyse) nötig waren, wurden die Konzentrationen anhand der Einwaage beim Auflösen angegeben und nicht weiter verifiziert.

5 Ergebnisse

5.1 Klinische Untersuchungen

Die klinischen Tests wurden an insgesamt 47 Patienten mit entsprechender Allergie und 15 gesunden Kontrollpersonen (K1-K15) durchgeführt. Tabelle 5.1 gibt die Patientendaten samt der durchgeführten Tests und der CAP-Klassen, soweit analysiert, wieder.

Tabelle 5.1: Daten der Patienten und Freiwilligen

(W = weiblich; M = männlich; PTP = Prick to Prick-Test; OPT = oraler Provokationstest; BT = Basotest®; A = Apfel; H = Haselnuss; Ka = Karotte; Ki = Kirsche; S = Sellerie; P = Pfirsich)

Nr.	Geschlecht	Alter	CAP-Klasse(n)	getestete Allergene	durchgeführte Tests
1	W	55	-	A	PTP
2	M	40, 41*	-	A, H, rMal d 1	PTP, OPT, BT*
3	W	53	-	A	PTP
4	M	24	-	A	PTP
5	W	25	G: 4 (35,0 kU/l) Apfel: 2 Mal d 1: 2 Birke: 3	A, H	PTP, OPT
6	M	34	G: 6 (256,0 kU/l) Apfel: 2 Mal d 1: 2 Birke: 3	A, H, S, Ka	PTP
7	W	44	G: 4 (24,7 kU/l) Apfel: 0 Mal d 1: 0 Birke: 3	A, H	PTP, OPT
8	W	60	G: 4 (36,8 kU/l) Apfel: 1 Mal d 1: 1 Birke: 4	A, H	PTP
9	M	21	G: 6 (>1000 kU/l) Apfel: 3 Mal d 1: - Birke: 6	A	PTP, OPT

10	M	43	G: 6 (488,0 kU/l) Apfel: - Mal d 1: - Birke: 3	A, H	PTP
11	M	23	G: 4 (36,8 kU/l) Apfel: 2 Mal d 1: 2 Birke: 3	A	PTP, OPT
12	M	35	G: 3 (15,9 kU/l) Apfel: 0 Mal d 1: 1 Birke: 2	A	PTP
13	W	40	G: 6 (414,0 kU/l) Apfel: 3 Mal d 1: 3 Birke: 5	A, Ka, P, Ki	PTP, OPT
14	M	20	G: 5 (519,0 kU/l) Apfel: 3 Mal d 1: 3 Birke: 4	A, Ka	PTP, OPT
15	W	42	G: 6 (290,5 kU/l) Apfel: 1 Mal d 1: 1 Birke: 3	A	PTP, OPT
16	M	24	G: 6 (457,0 kU/l) Apfel: 3 Mal d 1: 2 Birke: 5	A, Ki	PTP, OPT
17	W	49	G: 4 (46,2 kU/l) Apfel: 4 Mal d 1: - Birke: 4	A, P, Ki	PTP
18	M	20	G: 5 (76,4 kU/l) Apfel: 2 Mal d 1: 2 Birke: 3	A	PTP, OPT

19	W	22	G: 6 (447,0 kU/l) Apfel: - Mal d 1: - Birke: 6	A	PTP, OPT
20	W	30	G: 6 (105,0 kU/l) Apfel: 1 Mal d 1: 0 Birke: 3	A	PTP
21	W	43	G: 5 (65,1 kU/l) Apfel: 3 Mal d 1: 3 Birke: 6	A	PTP, OPT, BT
22	W	36	G: 5 (72,3 kU/l) Apfel: 1 Mal d 1: 1 Birke: 5	A	PTP, OPT
23	M	33	-	A	PTP
24	W	25	G: 6 (543,0 kU/l) Apfel: 2 Mal d 1: 0 Birke: 2	A	PTP, OPT
25	M	24	G: 6 (3414,0 kU/l) Apfel: 3 Mal d 1: 3 Birke: 5	A	PTP, OPT
26	W	30	G: 5 (53,1 kU/l) Apfel: 2 Mal d 1: 2 Birke: 4	A	PTP, OPT
27	M	38	-	A, P, Ki	PTP, OPT
28	W	59	G: 6 (418,0 kU/l) Apfel: 3 Mal d 1: 3 Birke: 4	A	PTP, OPT
29	W	58	G: 4 (21,2 kU/l) Apfel: 2 Mal d 1: 2 Birke: 4	A, Ka, P, Ki	PTP

30	M	58	-	A	PTP, OPT
31	M	25	-	A	PTP
32	W	25	-	A	PTP
33	W	52	-	Ki, P, Ka	PTP
34	M	24	-	H	PTP
35	W	58	-	S	PTP
36	W	22	-	Ka	PTP
37	W	29	-	P	PTP
38	M	28	-	P, Ki, rMal d 1	PTP, BT
39	M	61	-	rMal d 1	BT
40	M	31	-	rMal d 1	BT
41	W	30	-	rMal d 1	BT
42	W	51	-	rMal d 1	BT
43	W	47	-	rMal d 1	BT
44	W	41	-	rMal d 1	BT
45	M	24	-	rMal d 1	BT
46	W	33	-	rMal d 1	BT
47	W	23	-	rMal d 1	BT
K1	W	29	-	A, Ki, P, Ka, S	PTP
K2	M	28	-	A, Ki, P, Ka, S	PTP
K3	M	28	-	A, Ki, P, Ka, S	PTP
K4	M	27	-	A, Ki, P, Ka, S	PTP
K5	W	23	-	A, Ki, P, Ka, S	PTP
K6	M	32	-	A, Ki, P, Ka, S	PTP
K7	M	26	-	A, Ki, P, Ka, S	PTP
K8	W	28	-	A, Ki, P, Ka, S	PTP
K9	M	29	-	A, Ki, P, Ka, S	PTP
K10	M	28	-	A, Ki, P, Ka, S	PTP
K11	M	32	-	A, Ki, P, Ka, S	PTP
K12	M	61	-	A, Ki, P, Ka, S	PTP
K13	M	32	-	A, Ki, P, Ka, S	PTP
K14	W	28	-	A, Ki, P, Ka, S	PTP
K15	M	35	-	A, Ki, P, Ka, S	PTP

5.1.1 Pricktests mit hochdruckbehandelten Lebensmitteln (300 und 600 MPa)

In dieser Testreihe wurden die hochdruckbehandelten Lebensmittel PTP im Vergleich zum Nativmaterial getestet. Die Tests sollten zeigen, ob Hochdruckbehandlungen bei 300 bzw. 600 MPa mit einer Haltezeit von fünf Minuten im PTP-Test relevant sind. Es wurde der jeweils größte Durchmesser von Quaddel und Erythem vermessen. Die Ergebnistabellen 5.2 bis 5.7 geben die Durchmesser Quaddel / Erythem in Millimetern an. Die umfangreichste Testreihe mit 31 Patienten wurde mit dem Apfel 'Golden Delicious' durchgeführt, der auch im Mittelpunkt aller übrigen Untersuchungen stand.

5.1.1.1 Haselnuss

Tabelle 5.2: Ergebnisse des PTP-Tests mit Haselnuss

Patient (Nr. / Geschlecht / Alter)			nativ	300 MPa, 5 min	600 MPa, 5 min	positiv	negativ
2	M	39	11 / 23	4 / 9	3 / 10	11 / 26	0 / 0
5	W	25	5 / 15	1 / 3	1 / 4	7 / 14	0 / 0
6	M	34	8 / 10	8 / 10	8 / 11	11 / 16	0 / 0
7	W	44	5 / 17	4 / 17	4 / 13	6 / 19	0 / 0
8	W	60	10 / 38	10 / 40	6 / 28	10 / 35	0 / 0
10	M	43	6 / 11	2 / 3	4 / 11	9 / 21	0 / 0
34	W	24	11 / 35	1 / 2	1 / 4	10 / 25	2 / 3
Durchschnitt	4W 3M	38,4	6,6 / 21,3	4,3 / 12,0	3,9 / 11,6	9,1 / 22,3	0,3 / 0,4

5.1.1.2 Karotte

Tabelle 5.3: Ergebnisse des PTP-Tests mit Karotte

Patient (Nr. / Geschlecht / Alter)			nativ	300 MPa, 5 min	600 MPa, 5 min	positiv	negativ
6	M	34	6 / 9	4 / 5	2 / 4	11 / 16	0 / 0
13	W	40	6 / 17	3 / 9	2 / 5	5 / 13	0 / 0
29	W	58	5 / 22	2 / 11	1 / 5	5 / 20	0 / 0
33	W	52	5 / 20	2 / 8	0 / 5	6 / 23	0 / 0
36	W	22	6 / 17	3 / 5	0 / 3	6 / 17	0 / 0
Durchschnitt	1M 4W	41,2	5,6 / 17,0	2,8 / 7,6	1,0 / 4,4	6,6 / 17,8	0 / 0

5.1.1.3 Kirsche

Tabelle 5.4: Ergebnisse des PTP-Tests mit Kirsche

Patient (Nr. / Geschlecht / Alter)			nativ	300 MPa, 5 min	600 MPa, 5 min	positiv	negativ
13	W	40	6 / 17	0 / 1	1 / 6	5 / 13	0 / 0
16	M	24	15 / 34	11 / 33	4 / 28	9 / 21	0 / 0
17	W	49	6 / 21	3 / 8	2 / 3	5 / 13	0 / 0
27	M	38	6 / 15	6 / 15	3 / 10	8 / 40	0 / 0
29	W	58	9 / 28	6 / 19	2 / 11	5 / 20	0 / 0
33	W	52	7 / 21	3 / 19	0 / 7	6 / 23	0 / 0
38	M	28	3 / 7	0 / 0	0 / 0	4 / 8	0 / 0
Durchschnitt	4W 3M	41,3	7,4 / 20,4	4,1 / 13,6	1,7 / 9,3	6,0 / 19,7	0 / 0

5.1.1.4 Pfirsich

Tabelle 5.5: Ergebnisse des PTP-Tests mit Pfirsich

Patient (Nr. / Geschlecht / Alter)			nativ	300 MPa, 5 min	600 MPa, 5 min	positiv	negativ
13	W	40	4 / 9	3 / 7	4 / 9	5 / 13	0 / 0
17	W	49	5 / 17	2 / 7	4 / 7	5 / 13	0 / 0
27	M	38	5 / 7	5 / 13	4 / 10	8 / 40	0 / 0
29	W	58	5 / 25	3 / 15	1 / 9	5 / 20	0 / 0
33	W	52	5 / 16	2 / 18	2 / 10	6 / 23	0 / 0
37	W	29	4 / 5	0 / 0	0 / 0	6 / 19	0 / 0
38	M	28	2 / 5	0 / 0	0 / 0	4 / 8	0 / 0
Durchschnitt	4W 3M	42,0	4,3 / 12,0	2,1 / 8,6	2,1 / 6,4	5,6 / 19,4	0 / 0

5.1.1.5 Sellerie

Tabelle 5.6: Ergebnisse des PTP-Tests mit Sellerie

Patient (Nr. / Geschlecht / Alter)			nativ	300 MPa, 5 min	600 MPa, 5 min	positiv	negativ
6	M	34	5 / 7	0 / 1	0 / 0	11 / 16	0 / 0
35	W	58	6 / 13	5 / 10	4 / 9	6 / 15	0 / 0
Durchschnitt	1W 1M	46,0	5,5 / 10,0	2,5 / 5,5	2,0 / 4,5	8,5 / 15,5	0 / 0

5.1.1.6 Apfel

Tabelle 5.7: Ergebnisse des PTP-Tests mit Apfel

Patient (Kürzel / Geschlecht / Alter)			nativ	300 MPa, 5 min	600 MPa, 5 min	positiv	negativ
1	W	55	3 / 6	0 / 0	0 / 0	4 / 9	0 / 0
2	M	40	15 / 35	2 / 5	3 / 5	11 / 26	0 / 0
3	W	53	5 / 11	0 / 0	0 / 0	8 / 17	0 / 0
4	M	24	10 / 30	1 / 2	2 / 4	10 / 25	2 / 3
5	W	25	6 / 13	1 / 2	0 / 1	7 / 14	0 / 0
6	M	34	14 / 19	0 / 1	0 / 0	11 / 16	0 / 0
7	W	44	4 / 8	0 / 0	0 / 0	6 / 19	0 / 0
8	W	60	8 / 36	0 / 3	0 / 0	10 / 35	0 / 0
9	M	21	7 / 16	0 / 1	0 / 0	6 / 17	0 / 0
10	M	43	5 / 12	0 / 0	0 / 0	9 / 21	0 / 0
11	M	23	11 / 23	0 / 0	0 / 2	9 / 16	0 / 0
12	M	35	9 / 15	0 / 0	0 / 0	8 / 15	0 / 0
13	W	40	5 / 16	2 / 7	1 / 3	5 / 13	0 / 0
14	M	20	10 / 29	5 / 12	2 / 4	13 / 36	0 / 0
15	W	42	7 / 15	1 / 3	0 / 0	8 / 16	0 / 1
16	M	24	18 / 42	1 / 2	1 / 3	9 / 21	0 / 0
17	W	49	4 / 9	2 / 9	1 / 4	7 / 13	0 / 0
18	M	20	17 / 43	3 / 14	2 / 12	10 / 31	1 / 2
19	W	22	8 / 23	2 / 4	1 / 4	6 / 17	0 / 0
20	W	30	14 / 36	2 / 9	1 / 5	9 / 29	0 / 2
21	W	43	9 / 36	2 / 16	0 / 5	8 / 27	0 / 0
22	W	36	7 / 25	2 / 7	0 / 5	7 / 24	0 / 0
23	M	33	6 / 23	2 / 13	4 / 12	5 / 18	0 / 0
24	W	25	7 / 30	1 / 12	0 / 0	8 / 35	0 / 0
25	M	24	12 / 45	7 / 15	4 / 14	10 / 39	0 / 1
26	W	30	12 / 41	4 / 15	3 / 12	8 / 35	0 / 0
27	M	38	16 / 32	3 / 5	0 / 2	9 / 11	0 / 0
28	W	59	10 / 31	7 / 12	5 / 8	9 / 26	0 / 0
29	W	58	6 / 22	4 / 17	0 / 9	5 / 20	0 / 0
30	M	58	4 / 14	3 / 11	0 / 5	8 / 21	0 / 0
31	M	25	5 / -	1 / -	0 / -	7 / -	0 / 0
32	W	25	3 / -	1 / -	0 / -	7 / -	0 / 0
Durchschnitt	17W 14M	37,4	8,7 / 24,5	1,8 / 6,6	0,9 / 4,0	8,0 / 22,1	0,1 / 0,3

5.1.2 Pricktests mit Apfel zur Analyse der Inaktivierungskinetik

In dieser Testreihe wurden 12 Patienten (Tabelle 5.8) PTP mit nativem und hochdruckbehandeltem Apfel 'Golden Delicious' getestet.

Tabelle 5.8: Patientenkollektiv für die intensiven PTP Tests

Patient (Nr. / Geschlecht / Alter)			CAP-Klassen: gesamt, spezifisch	durchgeführte Tests
15	W	42	6, 1 (Apfel), 1 (Mal d 1), 3 (Birke)	PT, OPT (Apfel)
18	M	20	5, 2 (Apfel), 2 (Mal d 1), 3 (Birke)	PT, OPT (Apfel)
23	M	33	-	PT (Apfel)
24	W	25	6, 2 (Apfel), 0 (Mal d 1), 2 (Birke)	PT, OPT (Apfel)
25	M	24	6, 3 (Apfel), 3 (Mal d 1), 5 (Birke)	PT, OPT (Apfel)
26	W	30	5, 2 (Apfel), 2 (Mal d 1), 4 (Birke)	PT, OPT (Apfel)
27	M	38	-	PT, OPT (Apfel)
28	W	59	6, 3 (Apfel), 3 (Mal d 1), 4 (Birke)	PT, OPT (Apfel)
29	W	58	4, 2 (Apfel), 2 (Mal d 1), 4 (Birke)	PT (Apfel)
30	M	58	-	PT, OPT (Apfel)
31	M	25	-	PT (Apfel)
32	W	25	-	PT (Apfel)

Im Unterschied zu den vorherigen Tests wurde das Testmaterial hier Druckbehandlungen von 100 bis 600 MPa (Schritt 50 MPa) bei unterschiedlichen Haltezeiten (0,1 und 5 Minuten) unterzogen. Diese Testreihe sollte zeigen, ob und wie die hochdruckbedingte Verminderung der Allergenität von der Druckhöhe und der Druckhaltezeit abhängig sind. Als Maß für die allergische Reaktion wurde hier nicht der größte Durchmesser der Quaddel sondern deren Fläche gemessen. Die Ergebnisse sind für jeden Patienten in einem Balkendiagramm dargestellt. Die Höhe eines Balkens gibt einen Prozentwert an, wobei 100 % der Quaddelfläche entspricht, die der native Apfel hervorruft. Die Skalierung der Flächenwerte in Prozent gestattet den direkten Vergleich der Zahlenwerte sowie die Berechnung von Durchschnittswerten und von statistischen Größen. Die absoluten Zahlenwerte der Quaddelflächen sind im Anhang zu finden. In den Abbildungen 5.1 bis 5.12 sind die prozentualen Quaddelflächen als Balken dargestellt.

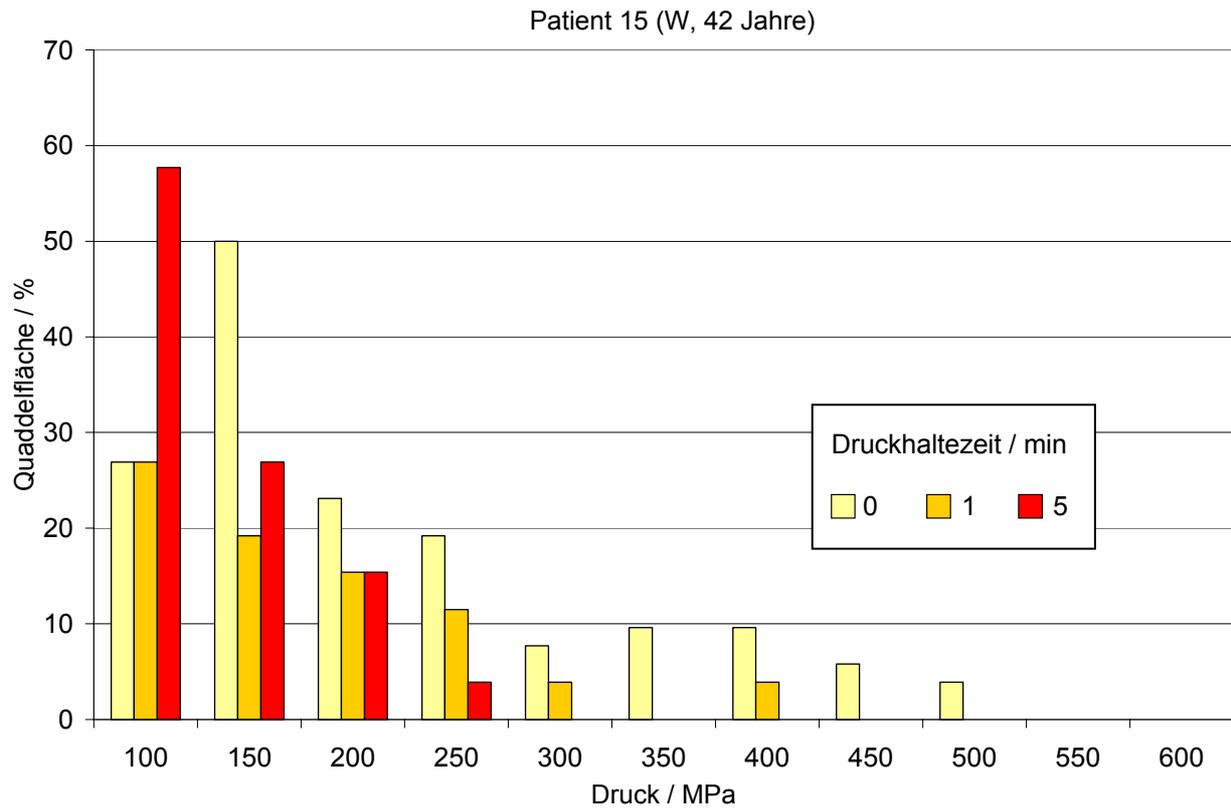


Abbildung 5.1: PTP-Test-Ergebnisse Patient 15

CAP-Klasse, spezifisch Apfelextrakt:	1
CAP-Klasse, Mal d 1-spezifisch:	1
CAP-Klasse, Gesamt-IgE:	6
Anamnese:	Apfelallergie

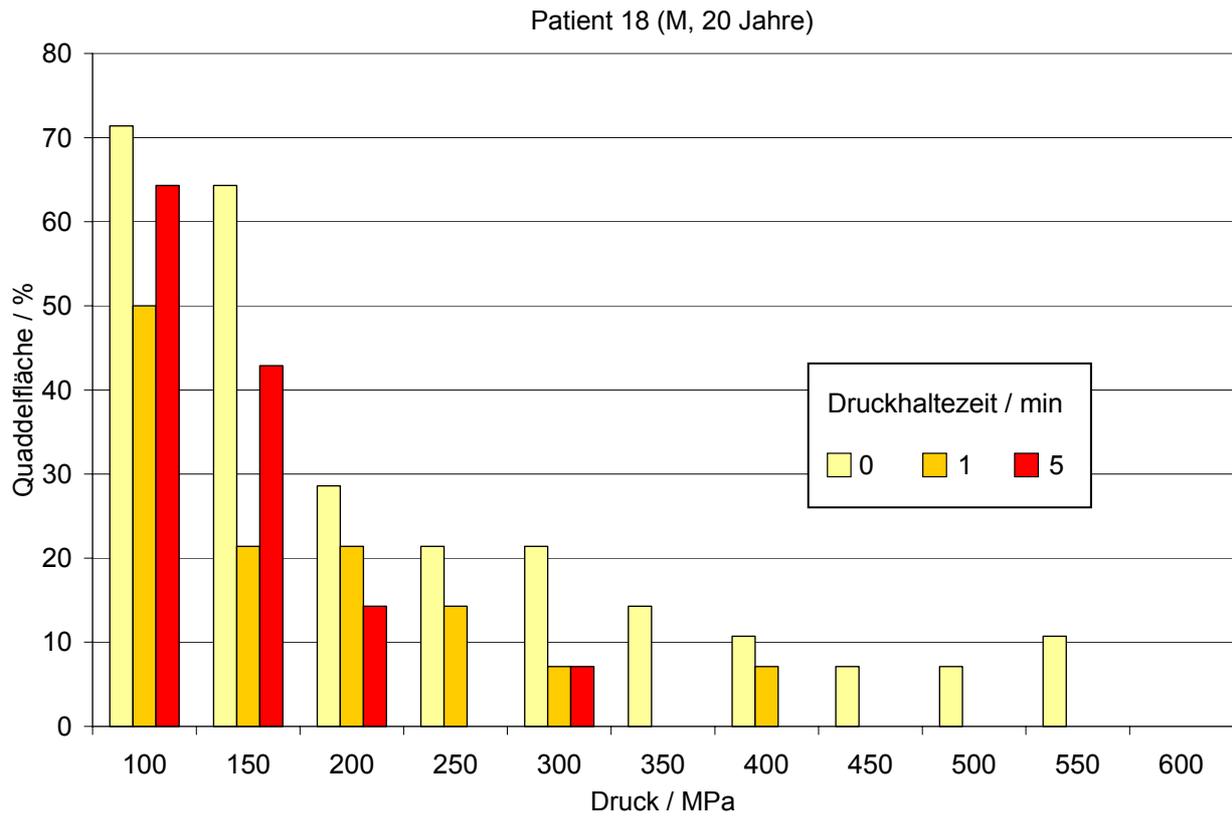


Abbildung 5.2: PTP-Test-Ergebnisse Patient 18

CAP-Klasse, spezifisch Apfelextrakt:	2
CAP-Klasse, Mal d 1-spezifisch:	2
CAP-Klasse, Gesamt-IgE:	5
Anamnese:	Apfelallergie

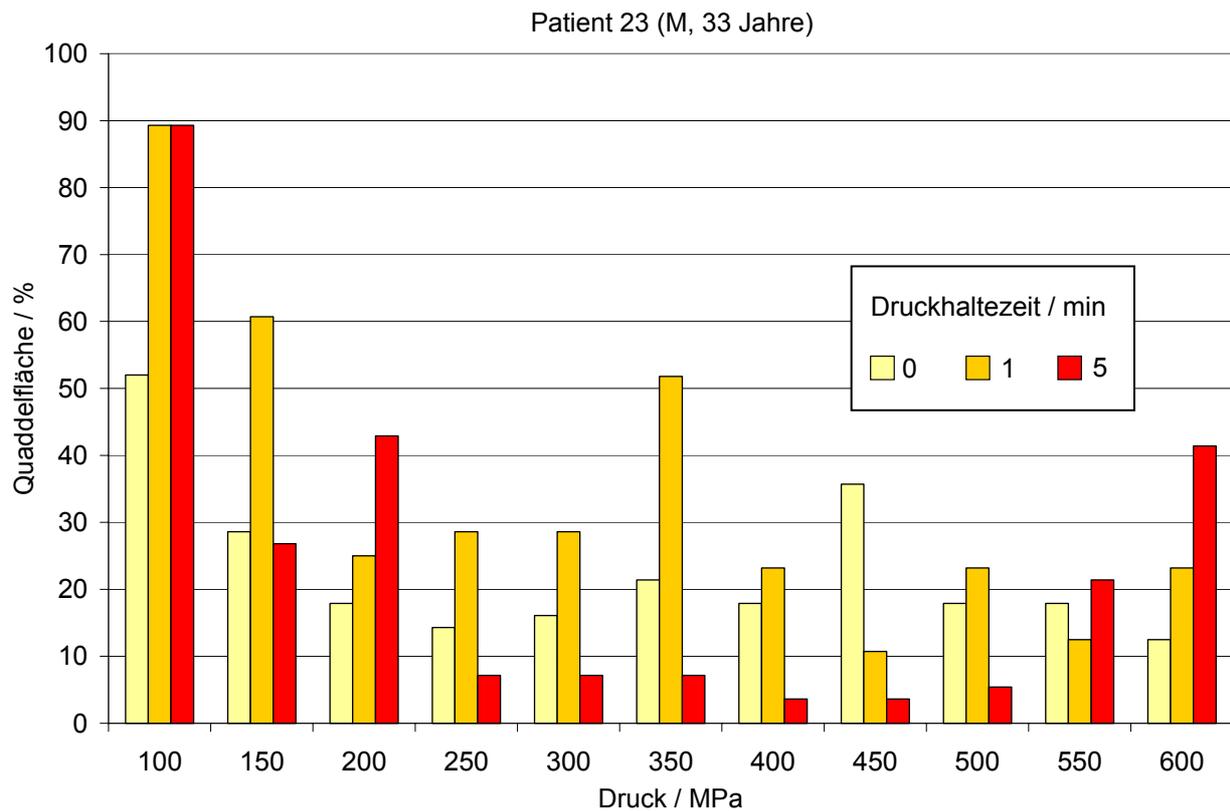


Abbildung 5.3: PTP-Test-Ergebnisse Patient 23

CAP-Klasse, spezifisch Apfelextrakt: -
 CAP-Klasse, Mal d 1-spezifisch: -
 CAP-Klasse, Gesamt-IgE: -
 Anamnese: Apfelallergie

Auffällig sind bei diesem Patienten die positiven Reaktionen bei den 350 und 600 MPa-Proben. Die Reaktionen sind zwar deutlich reduziert aber im Vergleich zu anderen Patienten stärker ausgeprägt. Es bleibt zu vermuten, dass hier eine Sensibilisierung gegen ein druckunempfindliches Minorallergen vorliegt, da CAP-Klassen leider nicht vorliegen.

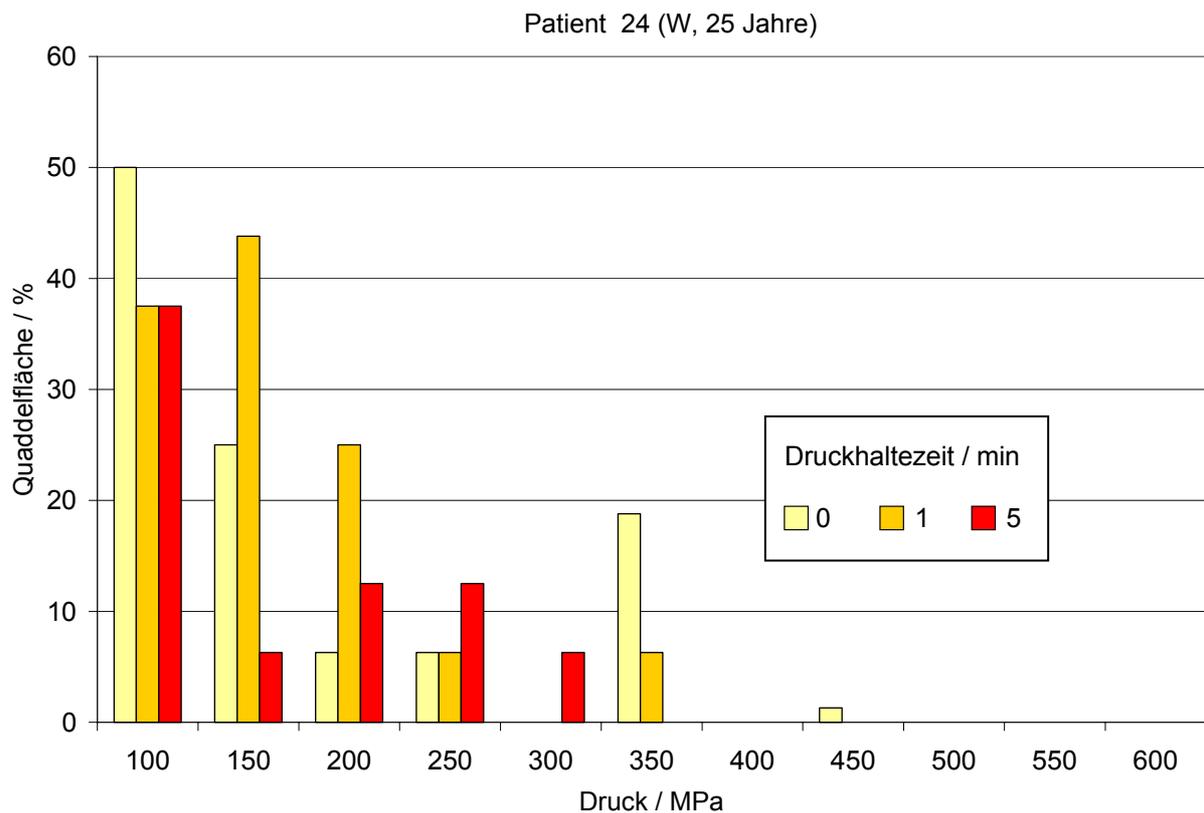


Abbildung 5.4: PTP-Test-Ergebnisse Patient 24

CAP-Klasse, spezifisch Apfelextrakt:	2
CAP-Klasse, Mal d 1-spezifisch:	0
CAP-Klasse, Gesamt-IgE:	6
Anamnese:	Apfelallergie

Trotz des hohen Gesamt-IgE-Spiegels (543,0 kU/l) und einer Sensibilisierung gegen Apfel- und Birkenextrakt liegen keine Mal d 1-spezifischen IgE vor. Folglich muss die Sensibilisierung gegen eines der Minorallergene gerichtet sein, das aber anders als bei den Patienten 23 und 26 leichter druckinaktivierbar ist.

Patient 25 (M, 24 Jahre)

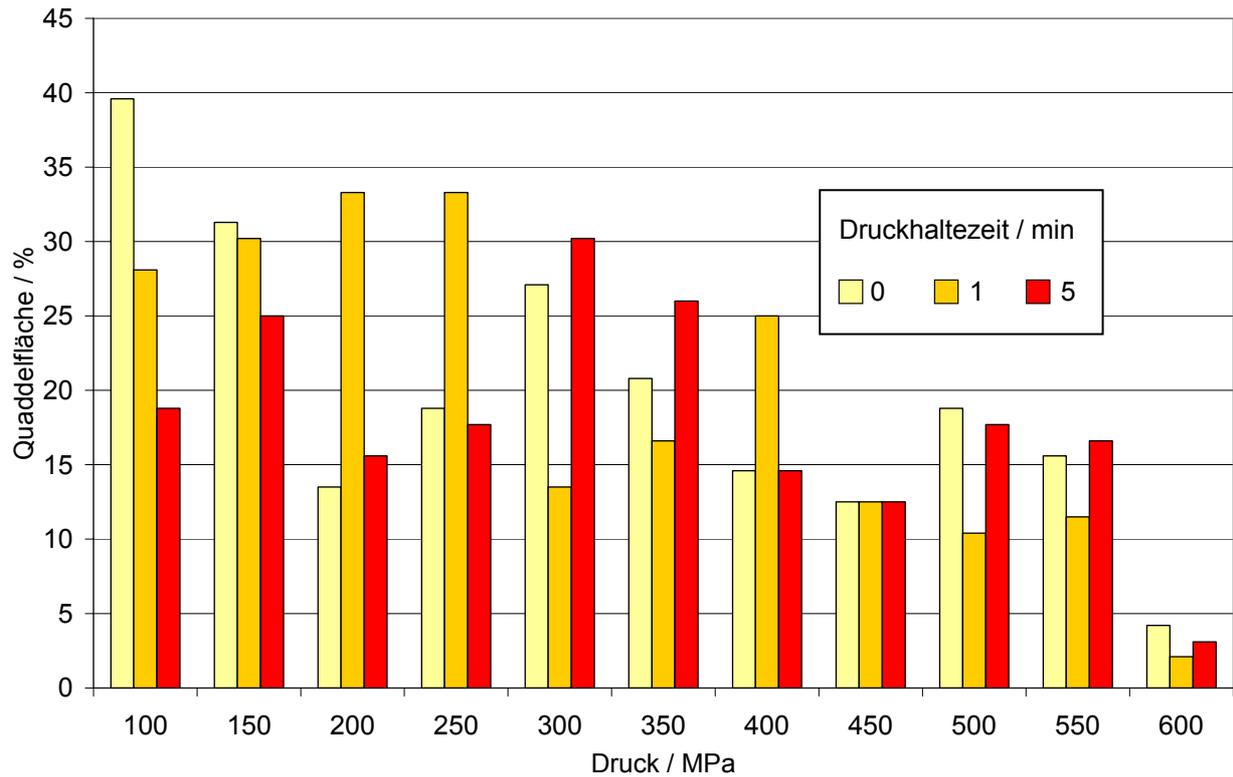


Abbildung 5.5: PTP-Test-Ergebnisse Patient 25

CAP-Klasse, spezifisch Apfelextrakt:	3
CAP-Klasse, Mal d 1-spezifisch:	3
CAP-Klasse, Gesamt-IgE:	6
Anamnese:	Apfelallergie

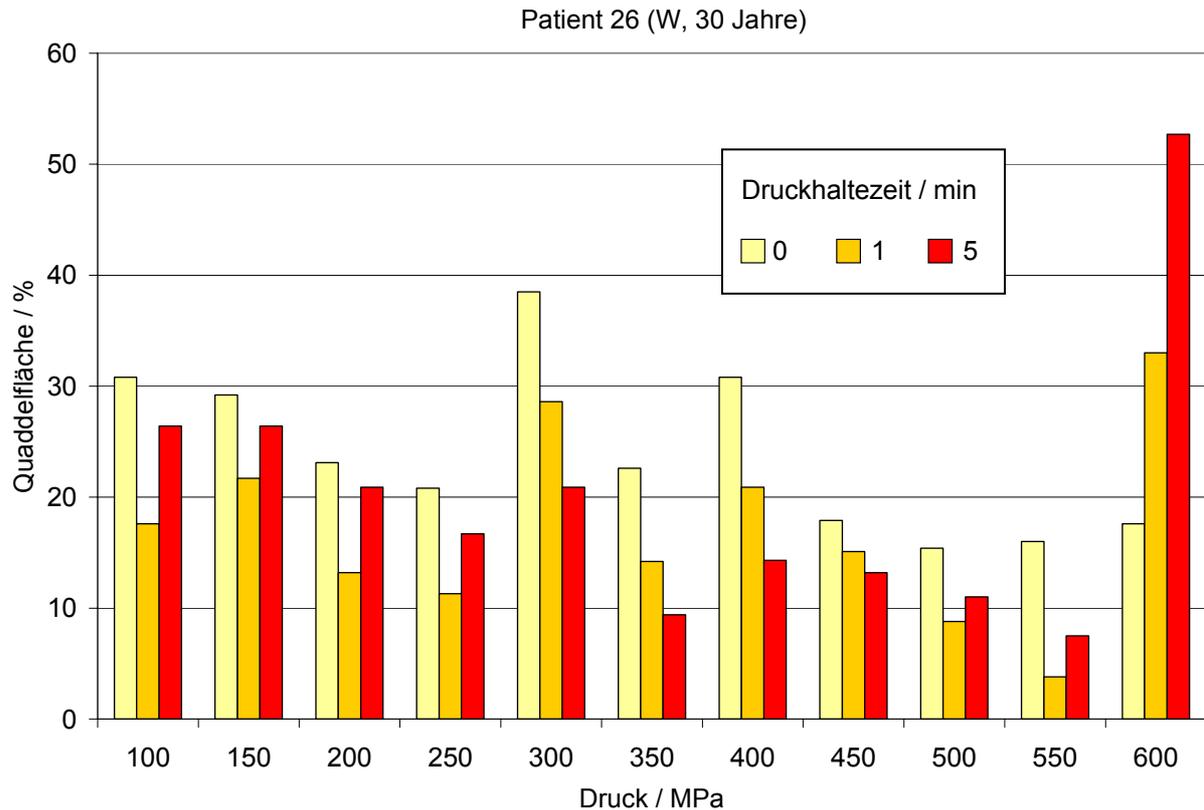


Abbildung 5.6: PTP-Test-Ergebnisse Patient 26

CAP-Klasse, spezifisch Apfelextrakt:	2
CAP-Klasse, Mal d 1-spezifisch:	2
CAP-Klasse, Gesamt-IgE:	5
Anamnese:	Apfelallergie

Insgesamt liegen bei dieser Patientin negative Reaktionen auf die hochdruckbehandelten Proben vor, mit einer Ausnahme bei 600 MPa. Der hohe Gesamt-IgE-Spiegel (CAP-Klasse 5) und eine Sensibilisierung gegen Birke (CAP-Klasse 4) könnten auf eine Sensibilisierung gegen ein druckbeständiges, ubiquitäres, Birkenpollen assoziiertes Minorallergen hinweisen.

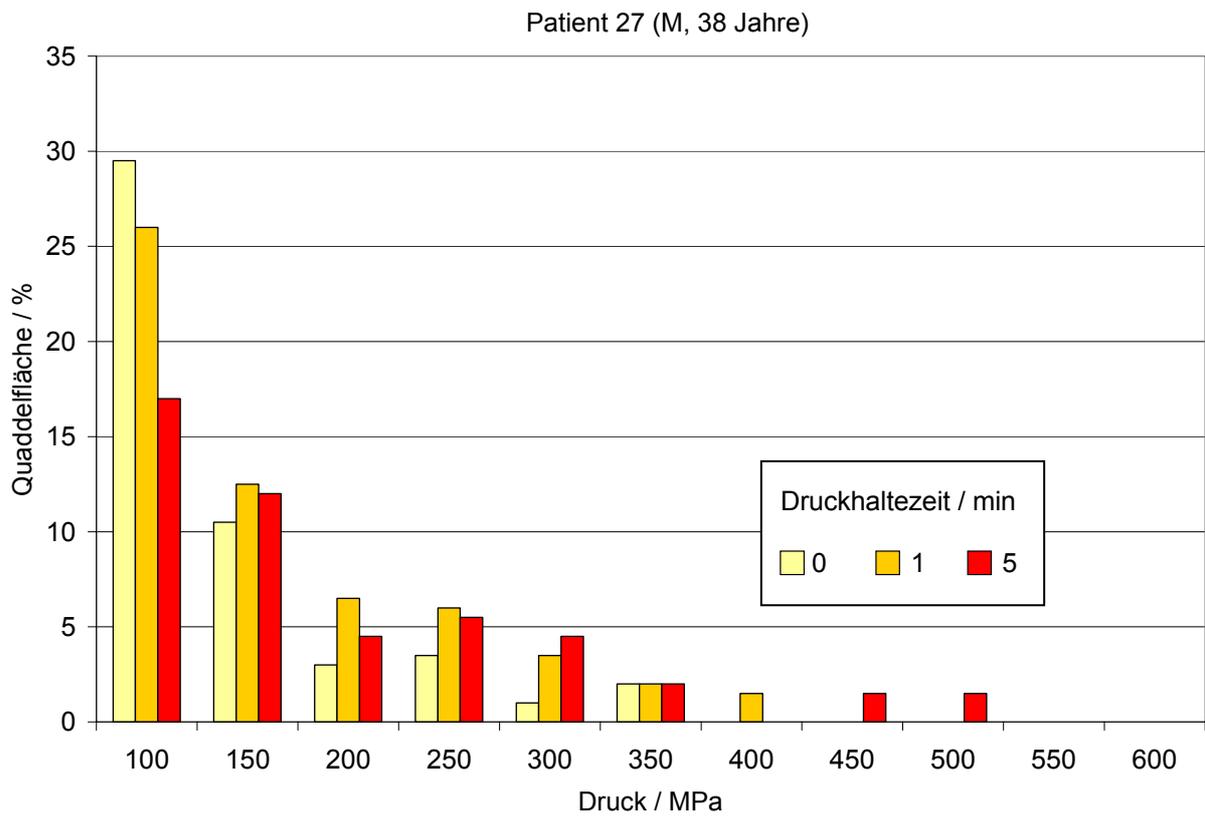


Abbildung 5.7: PTP-Test-Ergebnisse Patient 27

CAP-Klasse, spezifisch Apfelextrakt:	-
CAP-Klasse, Mal d 1-spezifisch:	-
CAP-Klasse, Gesamt-IgE:	-
Anamnese:	Apfelallergie

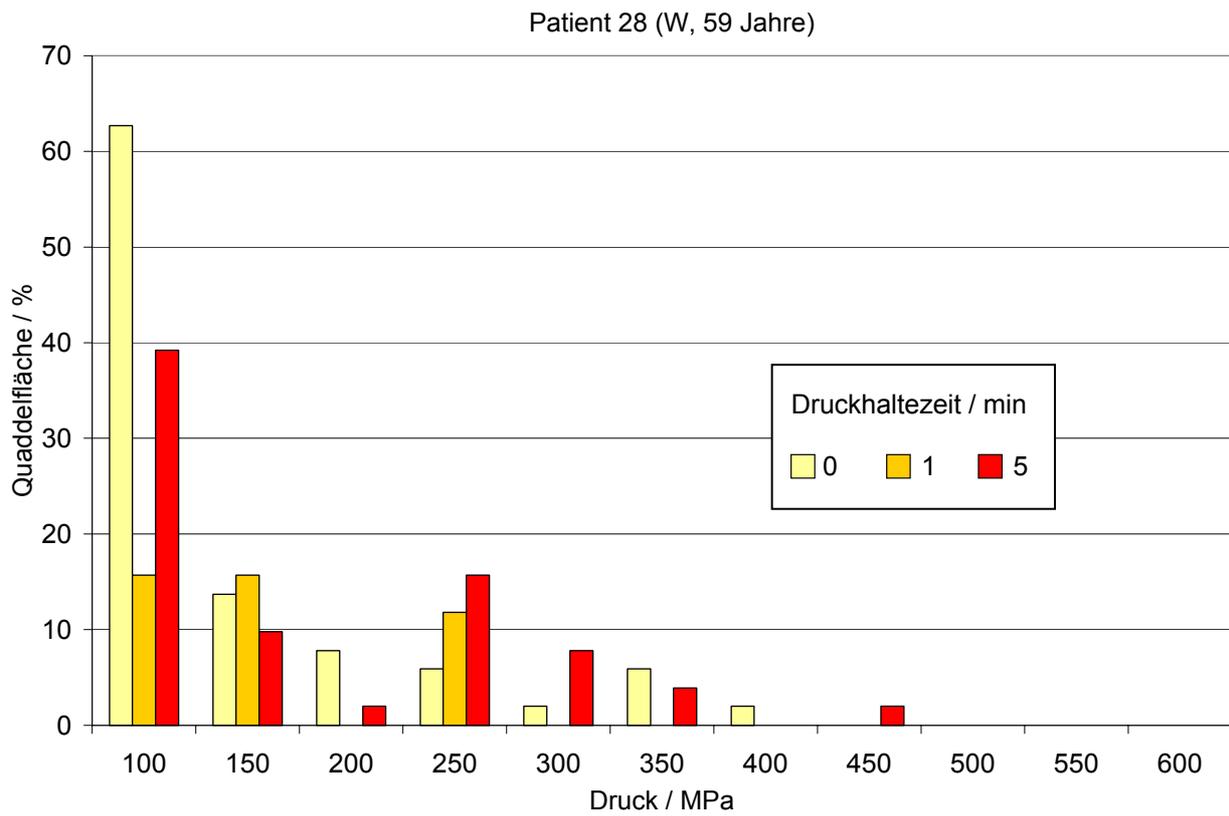


Abbildung 5.8: PTP-Test-Ergebnisse Patient 28

CAP-Klasse, spezifisch Apfelextrakt:	3
CAP-Klasse, Mal d 1-spezifisch:	3
CAP-Klasse, Gesamt-IgE:	6
Anamnese:	Apfelallergie

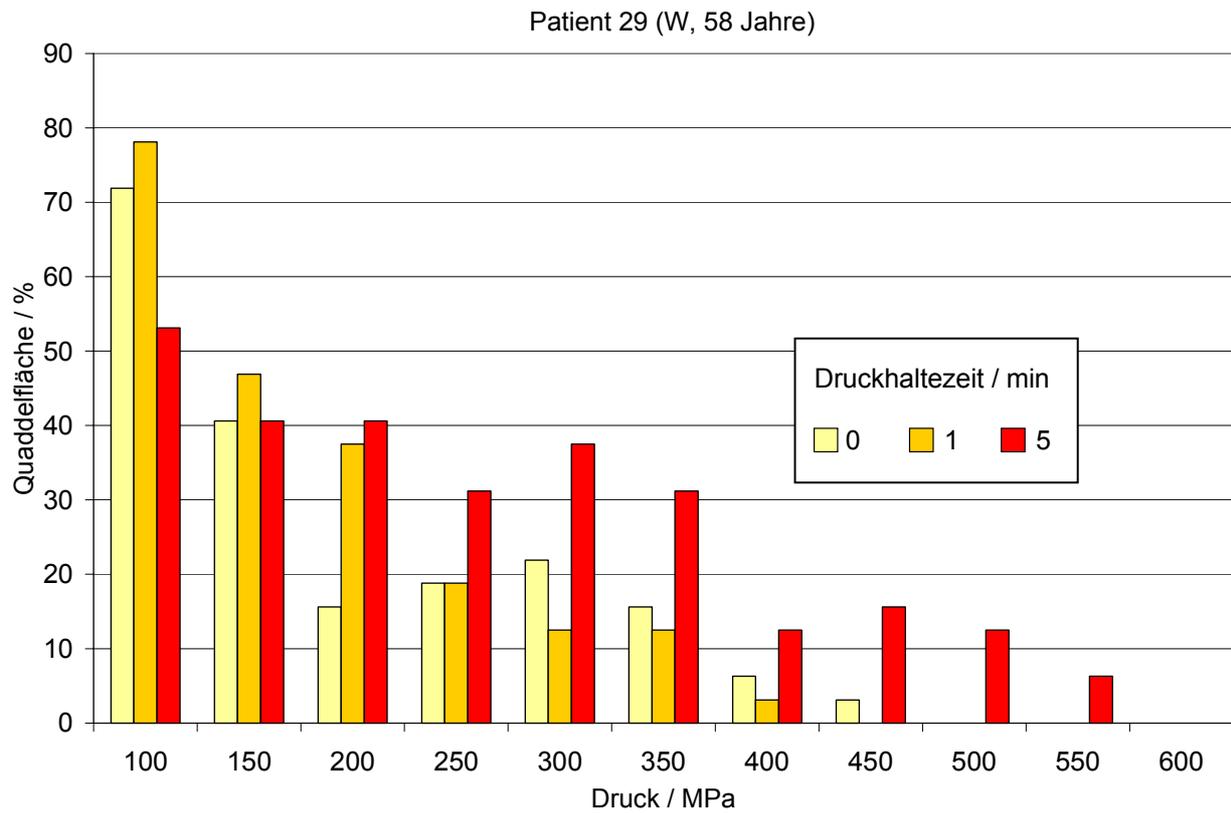


Abbildung 5.9: PTP-Test-Ergebnisse Patient 29

CAP-Klasse, spezifisch Apfelextrakt:	2
CAP-Klasse, Mal d 1-spezifisch:	2
CAP-Klasse, Gesamt-IgE:	4
Anamnese:	Apfelallergie

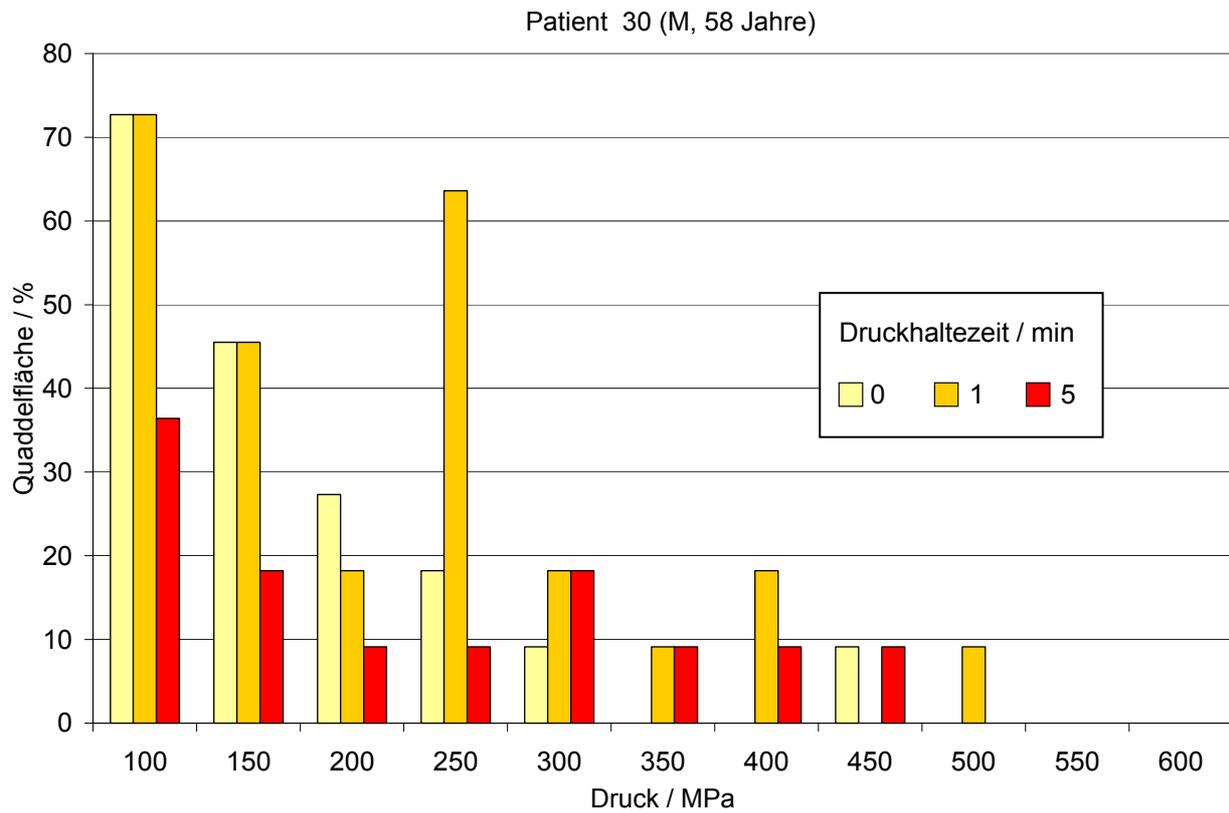


Abbildung 5.10: PTP-Test-Ergebnisse Patient 30

CAP-Klasse, spezifisch Apfelextrakt: -
CAP-Klasse, Mal d 1-spezifisch: -
CAP-Klasse, Gesamt-IgE: -
Anamnese: Apfelallergie

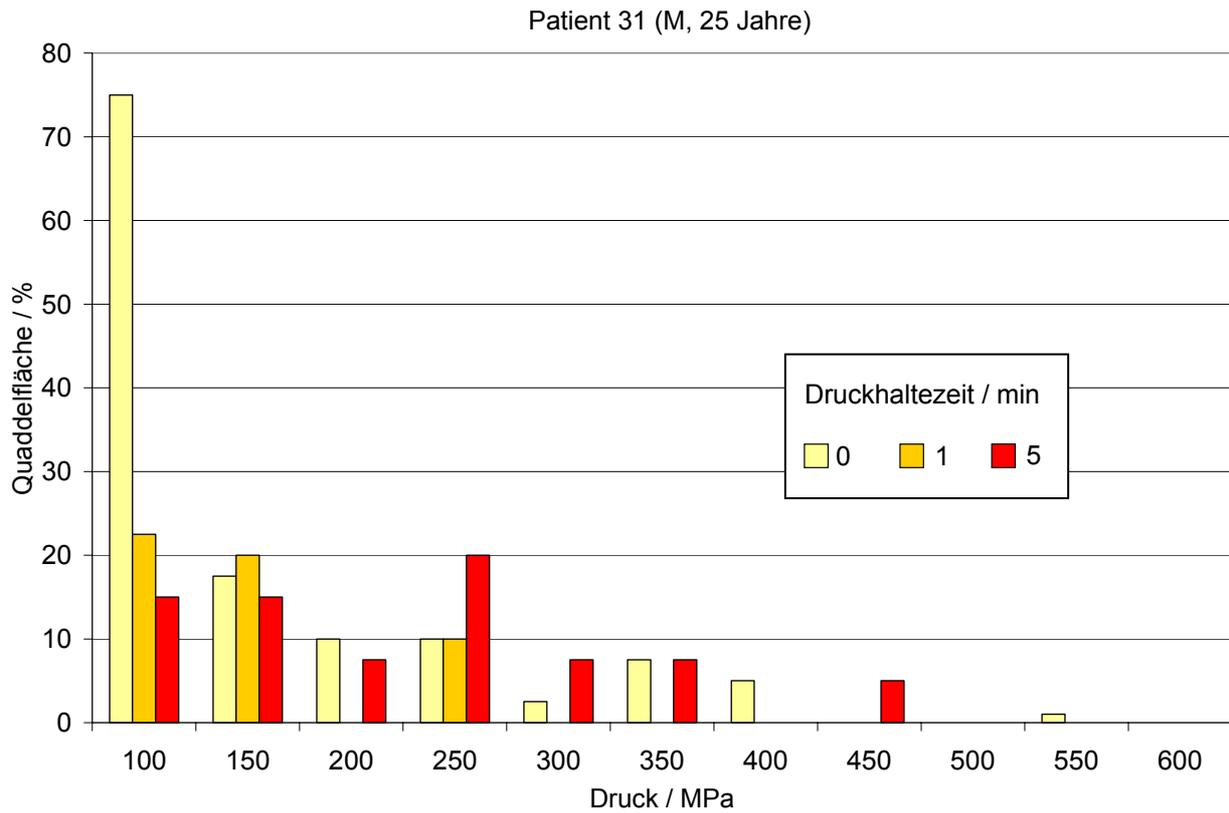


Abbildung 5.11: PTP-Test-Ergebnisse Patient 31

CAP-Klasse, spezifisch Apfelextrakt: -
CAP-Klasse, Mal d 1-spezifisch: -
CAP-Klasse, Gesamt-IgE: -
Anamnese: Apfelallergie

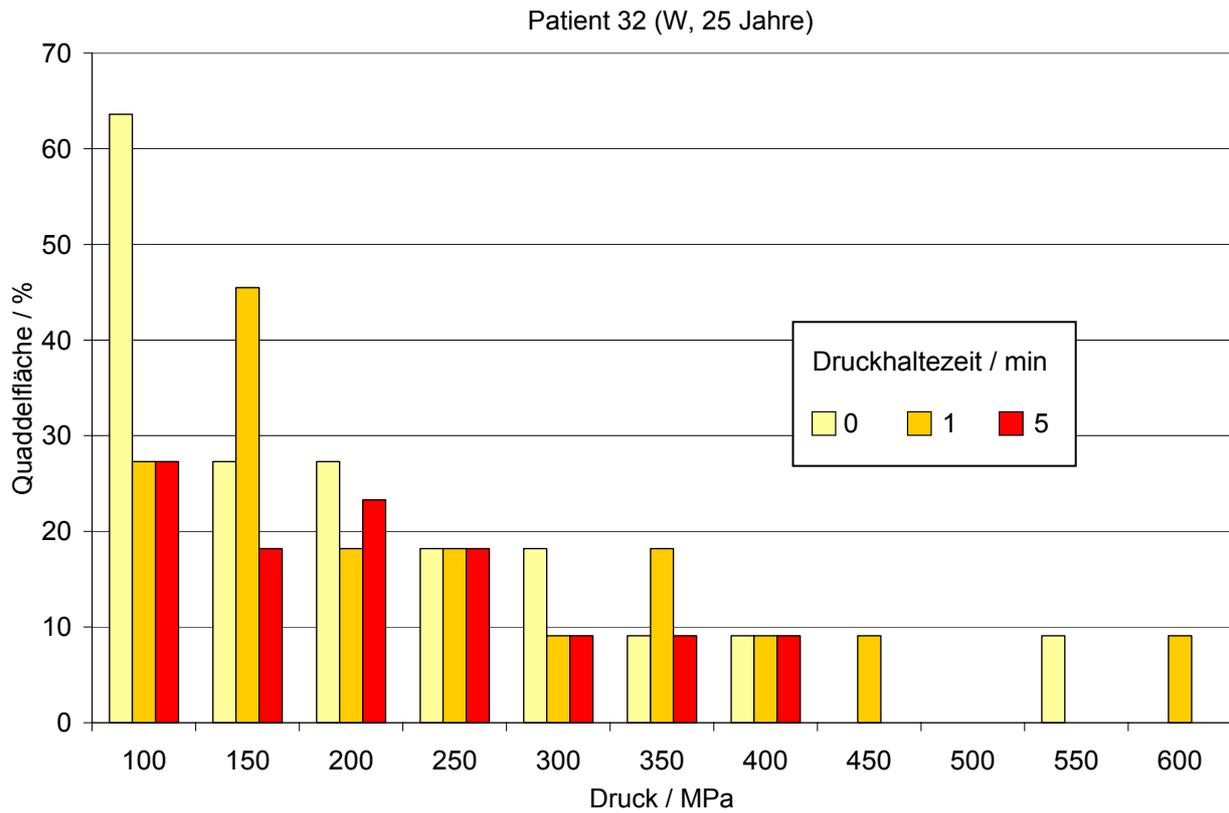


Abbildung 5.12: PTP-Test-Ergebnisse Patient 32

CAP-Klasse, spezifisch Apfelextrakt: -
 CAP-Klasse, Mal d 1-spezifisch: -
 CAP-Klasse, Gesamt-IgE: -
 Anamnese: Apfelallergie

5.1.3 Pricktests mit einer gesunden Kontrollgruppe

Die Gruppe anamnestisch gesunder Personen (K1-K15) wurde PTP mit Apfel, Kirsche, Pfirsich, Karotte und Sellerie getestet. Die Lebensmittel wurden nativ und hochdruckbehandelt (300 und 600 MPa, Haltezeit 5 min) getestet. Als Maß für die Hautreaktion wurden die jeweils größten Durchmesser (mm) von Quaddel und Erythem vermessen (s. Tabelle 5.9).

Tabelle 5.9: PTP-Test-Ergebnisse der gesunden Kontrollgruppe

Patient (Kürzel / Geschlecht / Alter)			Allergen	nativ	300 MPa, 5 min	600 MPa, 5 min	positiv	negativ
K1	W	29	Apfel	0 / 0	0 / 0	0 / 0	6 / 19	0 / 0
			Kirsche	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
			Pfirsich	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
			Karotte	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
			Sellerie	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
K2	M	28	Apfel	2 / 5	0 / 0	0 / 0	4 / 18	0 / 0
			Kirsche	3 / 7	0 / 0	0 / 0		
			Pfirsich	2 / 5	0 / 0	0 / 0		
			Karotte	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
			Sellerie	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
K3	M	28	Apfel	0 / 0	0 / 0	0 / 0	6 / 27	0 / 0
			Kirsche	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
			Pfirsich	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
			Karotte	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
			Sellerie	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
K4	M	27	Apfel	0 / 0	0 / 0	0 / 0	7 / 18	0 / 0
			Kirsche	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
			Pfirsich	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
			Karotte	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
			Sellerie	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
K5	W	23	Apfel	0 / 0	0 / 0	0 / 0	11 / 30	0 / 0
			Kirsche	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
			Pfirsich	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
			Karotte	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
			Sellerie	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
K6	M	32	Apfel	0 / 0	0 / 0	0 / 0	8 / 15	0 / 0
			Kirsche	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
			Pfirsich	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
			Karotte	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
			Sellerie	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
K7	M	26	Apfel	0 / 0	0 / 0	0 / 0	8 / 36	0 / 0
			Kirsche	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
			Pfirsich	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
			Karotte	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
			Sellerie	0 / 0	0 / 0	0 / 0		

K8	W	28	Apfel	0 / 0	0 / 0	0 / 0	8 / 18	0 / 0
			Kirsche	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
			Pfirsich	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
			Karotte	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
			Sellerie	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
K9	M	29	Apfel	0 / 0	0 / 0	0 / 0	10 / 18	0 / 0
			Kirsche	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
			Pfirsich	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
			Karotte	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
			Sellerie	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
K10	M	28	Apfel	0 / 0	0 / 0	0 / 0	7 / 12	0 / 0
			Kirsche	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
			Pfirsich	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
			Karotte	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
			Sellerie	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
K11	M	32	Apfel	0 / 0	0 / 0	0 / 0	5 / 20	0 / 0
			Kirsche	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
			Pfirsich	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
			Karotte	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
			Sellerie	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
K12	M	61	Apfel	0 / 0	0 / 0	0 / 0	9 / 27	0 / 0
			Kirsche	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
			Pfirsich	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
			Karotte	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
			Sellerie	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
K13	M	32	Apfel	0 / 0	0 / 0	0 / 0	6 / 17	0 / 0
			Kirsche	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
			Pfirsich	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
			Karotte	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
			Sellerie	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
K14	W	28	Apfel	0 / 0	0 / 0	0 / 0	7 / 17	0 / 0
			Kirsche	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
			Pfirsich	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
			Karotte	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
			Sellerie	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
K15	M	35	Apfel	0 / 10	0 / 10	0 / 10	5 / 32	0 / 0
			Kirsche	0 / 10	0 / 10	0 / 10		
			Pfirsich	0 / 10	0 / 10	0 / 10		
			Karotte	0 / 0	0 / 0	0 / 0		
			Sellerie	0 / 0	0 / 0	0 / 0		

Die Patienten K2 und K15 zeigten leichte Reaktionen auf native Lebensmittel bzw. Erytheme auf native und hochdruckbehandelte Lebensmittel. Eine atopische Prädisposition, die sich bisher nicht symptomatisch bemerkbar gemacht hatte, wird hierfür verantwortlich sein.

5.1.4 Orale Provokation

Insgesamt 19 Patienten (9 M, 10 W, Durchschnittsalter 33,4 Jahre), die PTP mit hochdruckbehandeltem Apfel negativ getestet worden waren, wurden oral mit hochdruckbehandeltem und teilweise (18 / 19) mit nativem Apfel 'Golden Delicious' provoziert. In Tabelle 5.10 sind die Patienten und die Befunde zusammengestellt.

Tabelle 5.10: Ergebnisse der oralen Provokationstests mit Apfel

Patient (Nr. / Geschlecht / Alter)			600 MPa	nativ
2	M	40	o.B.	Zungenschwellung nach 6 min
5	W	25	o.B.	Kribbeln am Gaumen nach 2 min
7	W	44	o.B.	Lippenschwellung nach 15 min
9	M	21	o.B.	Zungenschwellung nach 7 min
11	M	23	o.B.	Uvulaschwellung, Zungenkribbeln nach 3 min
13	W	40	o.B.	OAS, Zungenschwellung nach 8 min
14	M	20	o.B.	OAS nach 3 min, Durchfall nach einer Stunde
15	W	42	o.B.	Zungenschwellung nach 8 min
16	M	24	o.B.	anamnestisch Atemnot, OPT o.B.
18	M	20	o.B.	OAS nach 4 min
19	W	22	o.B.	Lippenschwellung nach 5 min
21	W	43	o.B.	anamnestisch OAS, OPT o.B.
22	W	36	o.B.	Kribbeln der Zunge, Hustenreiz nach 12 min
24	W	25	o.B.	OAS, RCA, Hustenreiz nach 3-9 min
25	M	24	o.B.	Quincke-Syndrom durch Lippenkontakt
26	W	30	o.B.	Tachykardie und OAS nach 5 min
27	M	38	o.B.	OAS, RCA, Hustenreiz nach 13 min
28	W	59	o.B.	RCA, OAS, Hustenreiz nach 2-14 min
30	M	58	o.B.	- (vom Patienten nicht gewünscht)

Abkürzungen: o.B.: ohne Befund; OAS: orales Allergiesyndrom; OPT: oraler Provokationstest;
RCA: Rhinokonjunktivitis allergica

5.2 *In vitro*-Diagnostik

5.2.1 Degranulation basophiler Granulozyten

Die Degranulation basophiler Granulozyten nach Stimulation mit rMal d 1 wurde im Blut von neun Apfelallergikern gemessen. Drei freiwillige, anamnestisch gesunde Personen spendeten Blut für die Negativkontrollen. Daten zu Alter, Geschlecht und Anamnese listet Tabelle 5.11 auf.

Tabelle 5.11: Blutspender für die Messung der Basophilendegranulation

Patient (Nr. / Geschlecht / Alter)			CAP-Klassen: gesamt, spezifisch
2	M	41	-
21	W	43	5, 3 (Apfel), 3 (rMal d 1), 6 (Birke)
38	M	28	-
39	M	61	-
40	M	31	-
41	W	30	-
42	W	51	-
43	W	47	-
44	W	41	-
45	M	24	-
46	W	33	-
47	W	23	-

Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.12 dargestellt. Die Stimulation mit rMal d 1 wurde mit vier unterschiedlich konzentrierten Lösungen durchgeführt. Die drei Negativkontrollen der Patienten 39, 40 und 46 sind am Tabellenende angeführt. Die optimale Konzentration, bei der Unterschiede der Degranulation je nach Behandlungsart evident sind, ist fett gedruckt.

Tabelle 5.12: Ergebnisse der Messung der Basophilendegranulation

Patient	[c] Mal d 1 / µg/ml	Anteil degranulierter basophiler Granulozyten / %				
		nativ	600 MPa, 5 min	erhitzt 100 °C	negativ	positiv
2	1	81,66	70,14	68,47	2,58	71,71
	0,1	49,26	54,12	73,10		
	0,01	5,60	14,76	19,22		
	0,001	3,05	2,97	38,86		
21	1	-	-	-	1,45	39,12
	0,1	89,26	89,53	-		
	0,01	70,53	74,04	-		
	0,001	12,7	15,67	-		
38	1	88,80	88,97	93,57	1,36	89,45
	0,1	50,33	68,23	81,43		
	0,01	21,90	75,33	51,72		
	0,001	47,32	14,65	43,22		
41	1	81,82	87,69	-	2,56	71,98
	0,1	27,85	43,92	62,53		
	0,01	2,92	26,51	-		
	0,001	5,8	1,42	-		
42	1	41,94	39,32	43,78	2,73	37,08
	0,1	25,69	36,39	42,56		
	0,01	3,92	11,78	14,00		
	0,001	10,99	5,65	4,11		
43	1	67,27	69,63	65,71	3,54	73,64
	0,1	59,78	49,00	63,54		
	0,01	34,39	13,69	41,89		
	0,001	31,19	34,79	39,96		
44	1	48,86	49,81	47,07	14,08	14,95
	0,1	15,24	43,93	46,71		
	0,01	2,46	3,11	15,55		
	0,001	7,27	0,53	1,16		
45	1	64,39	75,22	85,22	2,55	61,36
	0,1	10,75	25,29	41,85		
	0,01	17,47	4,99	4,79		
	0,001	37,33	2,12	2,81		

47	1	12,30	11,07	19,15	2,11	43,71
	0,1	2,04	2,11	11,98		
	0,01	2,33	1,31	1,42		
	0,001	2,43	6,74	1,31		
39 (Negativ- kontrolle)	1	1,82	1,73	-	7,26	14,77
	0,1	8,37	1,11	-		
	0,01	1,02	1,01	-		
	0,001	1,21	1,11	-		
40 (Negativ- kontrolle)	1	12,4	7,54	-	7,23	58,47
	0,1	3,56	3,00	-		
	0,01	-	-	-		
	0,001	-	-	-		
46 (Negativ- kontrolle)	1	1,88	1,35	1,46	1,05	15,34
	0,1	2,11	1,25	0,63		
	0,01	1,89	2,28	0,73		
	0,001	0,83	0,73	1,69		

5.3 Rechnergestützte Sekundär- und Tertiärstrukturvorhersage von Mal d 1

Die Tabellen 5.13 und 5.14 stellen die Ergebnisse der Sekundärstrukturvorhersage nach fünf verschiedenen Methoden dar. Folgende Methoden wurden angewendet und sind in den Tabellen mit Nummern 1-5 bezeichnet:

- 1) Methode nach RAGHAVA [82]
- 2) Methode nach FRISHMAN et al. [23]
- 3) PHD-Methode nach ROST et al. [85, 86, 87]
- 4) GOR IV-Methode nach GARNIER et al. [25]
- 5) Swissmodel-Methode nach GUEx et al. [35].

Methode 1 ist die ältere, Methode 5 die neuere, mit der auch das dreidimensionale Modell der Tertiärstruktur erstellt wurde. Tabelle 5.14 gibt den Anteil (%) der drei berechneten Sekundärstrukturen im Molekül wieder.

Tabelle 5.13: Berechnete Zusammensetzung der Sekundärstruktur von Mal d 1

Methode	1	2	3	4	5
α-Helix	24,7	21,5	27,9	29,11	20,9
β-Faltblatt	33,5	12,7	32,3	25,95	43,7
Zufallsstruktur	41,8	65,8	39,9	44,94	35,4

Legende für Tabelle 5.14:

- Nr.** Position in der Primärsequenz
- AS** Aminosäure im Einbuchstabencode
- 1- 5** Vorhersagemethode
- C** Zufallsstruktur
- E** β-Faltblatt
- H** α-Helix

Tabelle 5.14: Vorhersage der Sekundärstruktur nach verschiedenen Methoden (1-5)

Nr.	AS	1	2	3	4	5	Nr.	AS	1	2	3	4	5	Nr.	AS	1	2	3	4	5
1	G	C	C	C	C	E	54	K	E	E	E	E	E	107	C	E	C	C	C	E
2	V	E	C	C	C	E	55	K	E	E	E	E	E	108	G	E	C	C	C	C
3	Y	E	C	E	C	E	56	I	E	E	E	E	E	109	S	C	C	C	C	C
4	T	E	C	E	E	E	57	T	E	E	E	E	E	110	G	C	C	C	C	C
5	F	E	C	E	E	E	58	F	E	C	E	E	E	111	S	C	C	C	C	E
6	E	E	C	E	C	E	59	G	E	C	C	C	C	112	T	E	C	E	C	E
7	N	E	C	E	C	E	60	E	C	C	C	C	C	113	I	E	E	E	E	E
8	E	C	C	E	C	E	61	G	C	C	C	C	C	114	K	E	E	E	E	E
9	F	C	C	E	C	E	62	S	C	C	C	C	C	115	S	E	E	E	E	E
10	T	C	C	E	C	E	63	Q	C	C	C	C	C	116	I	E	C	E	E	E
11	S	C	C	E	C	E	64	Y	C	C	C	C	C	117	S	E	C	E	E	E
12	E	C	C	C	C	C	65	G	E	E	C	E	E	118	H	E	C	E	E	E
13	I	C	C	C	C	C	66	Y	E	E	E	E	E	119	Y	C	C	E	E	E
14	P	C	C	C	C	C	67	V	E	E	E	E	E	120	H	C	C	E	C	E
15	P	C	C	H	C	H	68	K	E	E	E	E	E	121	T	C	C	E	C	E
16	S	C	C	H	C	H	69	H	E	C	E	C	E	122	K	C	C	C	C	E
17	R	C	H	H	H	H	70	R	E	C	E	E	E	123	G	C	C	C	C	E
18	L	H	H	H	H	H	71	I	E	C	E	E	E	124	N	C	C	C	C	C
19	F	H	H	H	H	H	72	D	E	C	E	C	E	125	I	E	C	C	H	C
20	K	H	H	H	H	H	73	S	E	C	E	C	E	126	E	E	C	C	H	C
21	A	H	H	H	H	C	74	I	C	C	E	C	E	127	I	E	C	C	H	C
22	F	H	H	H	H	C	75	D	C	C	C	C	E	128	K	C	C	C	H	C
23	V	H	H	H	H	C	76	E	C	C	C	C	C	129	E	C	C	H	H	C
24	L	C	H	C	H	C	77	A	C	C	C	C	C	130	E	H	C	H	H	C
25	D	C	C	C	C	C	78	S	C	C	C	C	C	131	H	H	C	H	H	H
26	A	C	C	C	C	C	79	Y	C	C	C	C	E	132	V	H	C	H	H	H
27	D	C	C	C	C	C	80	S	C	C	E	C	E	133	K	H	C	H	H	H
28	N	C	C	C	C	C	81	Y	E	E	E	C	E	134	V	C	C	H	H	H
29	L	C	C	C	C	C	82	S	E	E	E	C	E	135	G	C	C	H	H	H
30	I	C	C	C	C	H	83	Y	E	E	E	E	E	136	K	C	C	H	H	H
31	P	C	C	C	H	H	84	T	E	E	E	E	E	137	E	H	C	H	H	H
32	K	C	C	C	H	H	85	L	E	E	E	E	E	138	K	H	C	H	H	H
33	I	C	C	C	H	H	86	I	E	C	E	E	E	139	A	C	C	H	H	H
34	A	H	H	C	H	C	87	E	E	C	E	C	C	140	H	H	C	H	H	H
35	P	H	H	C	H	C	88	G	C	C	E	C	C	141	G	H	C	H	H	H
36	Q	H	H	C	H	C	89	D	C	C	C	C	C	142	L	H	C	H	H	H
37	A	H	H	C	H	C	90	A	C	C	C	C	C	143	F	H	H	H	H	H
38	I	H	H	E	H	C	91	L	C	C	C	C	C	144	K	H	H	H	H	H
39	K	H	H	E	H	C	92	T	H	C	C	E	C	145	L	H	H	H	H	H
40	Q	H	H	E	H	E	93	D	H	H	C	E	C	146	I	H	H	H	H	H
41	A	H	H	E	H	E	94	T	H	H	C	E	E	147	E	H	H	H	H	H
42	E	H	H	E	H	E	95	I	H	H	E	E	E	148	S	H	H	H	H	H
43	I	H	H	E	H	E	96	E	H	H	E	E	E	149	Y	H	H	H	H	H
44	L	E	H	E	H	E	97	K	E	H	E	E	E	150	L	H	C	H	H	H
45	E	E	C	E	C	C	98	I	E	H	E	E	E	151	K	H	C	H	C	H
46	G	C	C	E	C	C	99	S	C	H	E	E	E	152	D	C	C	H	C	H
47	N	C	C	C	C	C	100	Y	E	C	E	E	E	153	H	C	C	C	C	H
48	G	C	C	C	C	C	101	E	E	C	E	E	E	154	P	C	C	C	C	C
49	G	C	C	C	C	C	102	T	E	C	E	E	E	155	D	C	C	C	C	C
50	P	C	C	C	C	C	103	K	E	E	E	E	E	156	A	C	C	C	E	C
51	G	C	C	C	C	C	104	L	E	E	E	E	E	157	Y	C	C	C	E	C
52	T	E	C	E	E	E	105	V	E	E	E	E	E	158	N	C	H	C	C	C
53	I	E	E	E	E	E	106	A	E	C	E	E	E							

Das Homologiemodelling unter Zuhilfenahme homologer, strukturaufgeklärter Sequenzen von Pru av 1 und Bet v 1 erzeugte ein dreidimensionales Modell, das in weiten Bereichen sowohl in der Sekundär- wie auch in der Tertiärkonformation den Vergleichsstrukturen von Pru av 1 und vor allem Bet v 1 ähnelt. Die Abbildungen 5.13 bis 5.15 zeigen das Modell

- in Spektralfarbandarstellung mit Beschriftung der Sequenz (blaues Ende: C-Terminus, rotes Ende: N-Terminus),
- mit Kennzeichnung der Sekundärstruktur (gelb: β -Faltblatt, rot: α -Helix, weiß: ungeordnet, blau: Turn)
- und aus verschiedenen Perspektiven.

Das Modell verbindet 1239 Atome mit 1266 kovalenten Bindungen, 122 Wasserstoffbrücken und keinen Disulfidbrücken. Fünf Helixabschnitte (rot), zwölf β -Faltblattabschnitte (gelb) und zwölf ungeordnete Bereiche (weiß) mit ebensovielen Turnstrukturen (blau) kennzeichnen die Sekundärstruktur (Abbildungen 5.14 und 5.15).

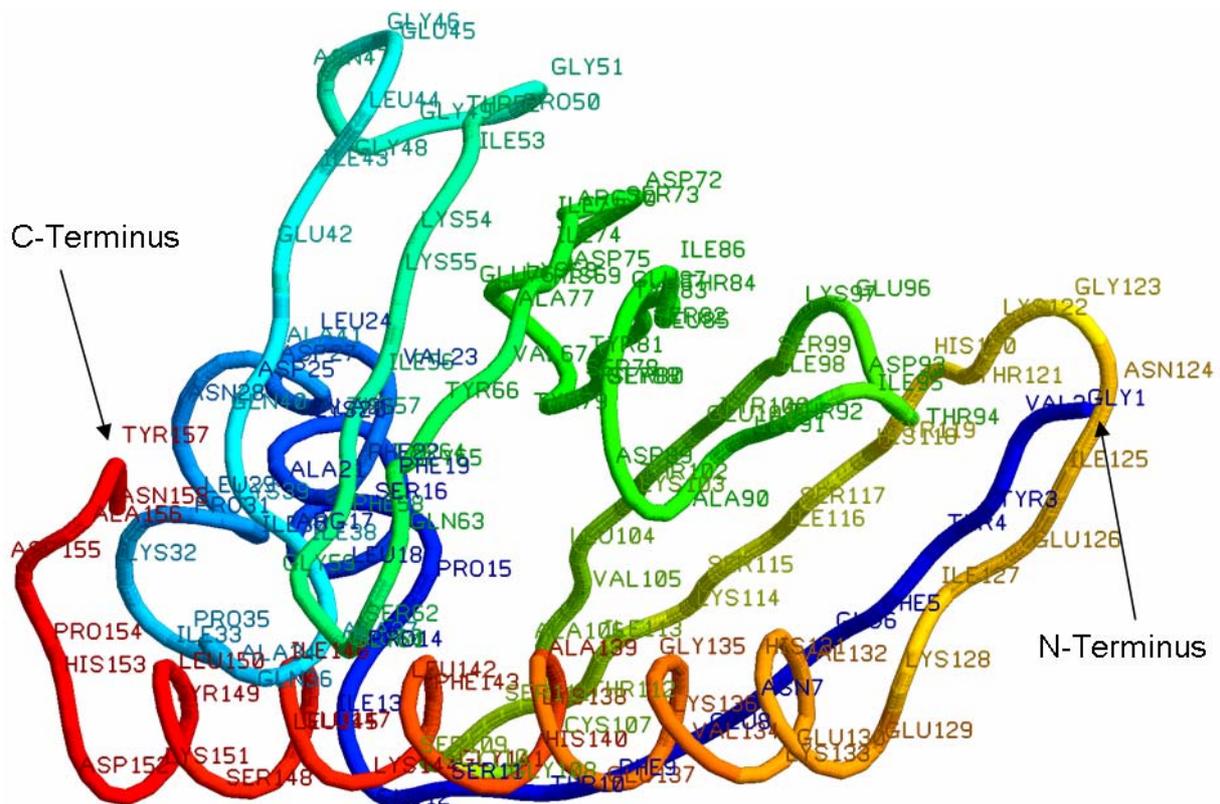


Abbildung 5.13: Homologiemodell von Mal d 1 (Spektralfarbandarstellung mit AS-Bezeichnung)

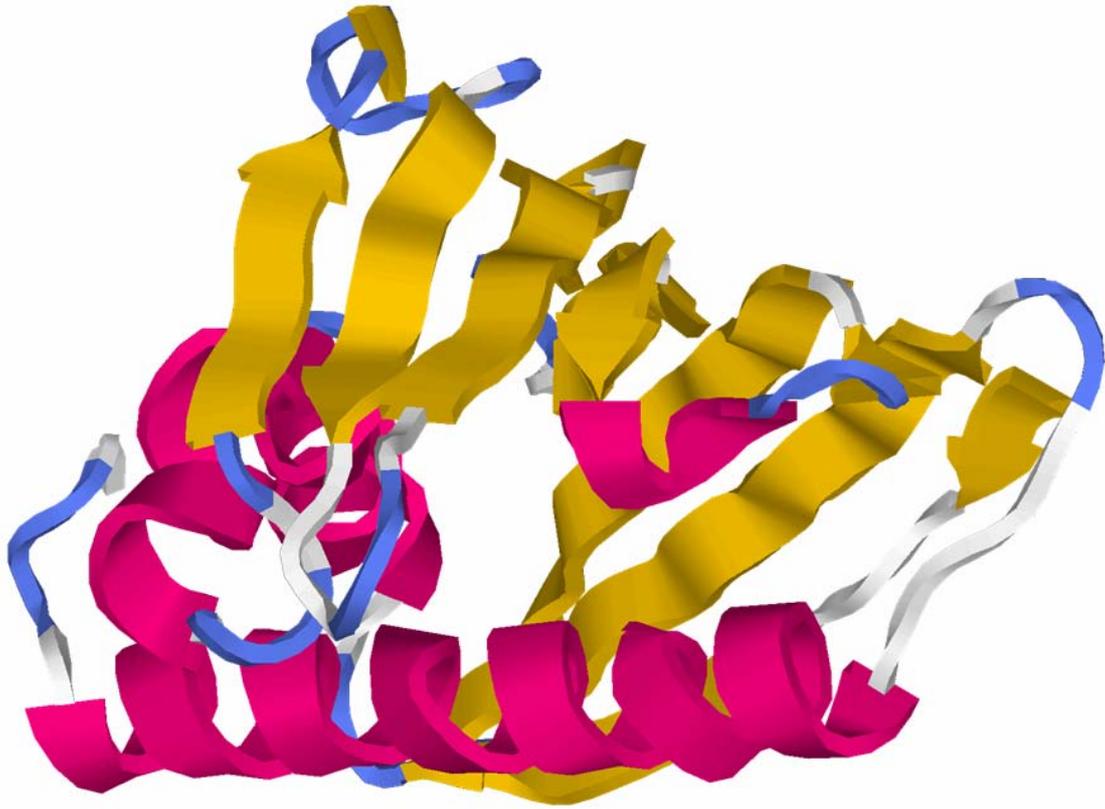


Abbildung 5.14: Homologiemodell von Mal d 1 (mit farblicher Kennzeichnung der Sekundärstruktur)

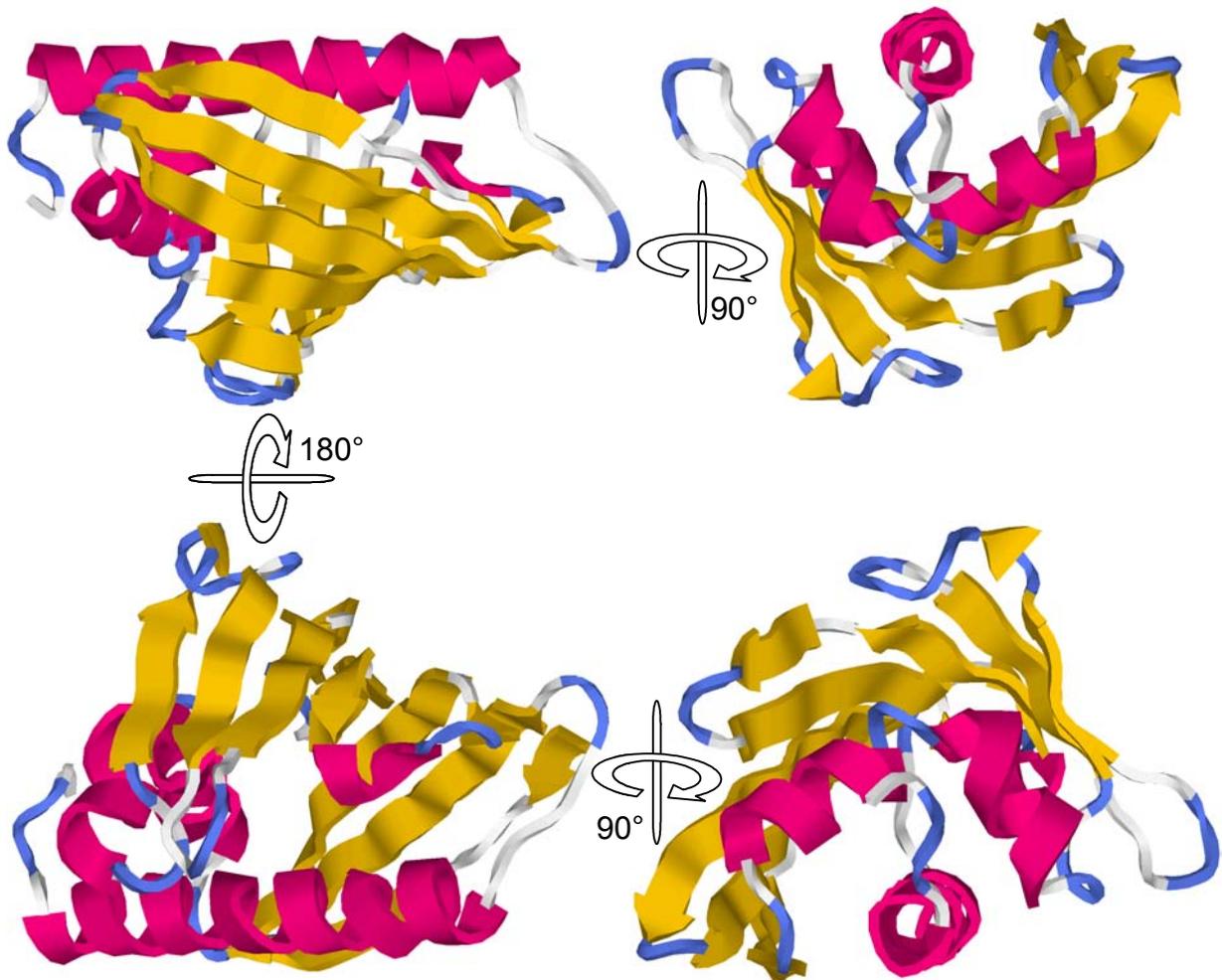


Abbildung 5.15: Homologiemodelle von Mal d 1 aus verschiedenen Perspektiven

5.4 Spektroskopische Untersuchungen von rMal d 1 und Referenzproteinen

Alle Druckbehandlungen der Lösungen zur Spektroskopie wurden mit einer Haltezeit von fünf Minuten und einer Auf- und Abbaurrate von 200 MPa/min durchgeführt.

5.4.1 Messung des Circular dichroismus

5.4.1.1 Spektren von rMal d 1

Die Messung des Circular dichroismus wurde zweimal durchgeführt. Bei der ersten Messung lag das Protein in 10 mM NaH₂PO₄ / HCL Puffer mit pH 7,0 vor. 1 mg wurde in 10 ml Puffer bei 6 M Harnstoffkonzentration aufgelöst. Die Proteinkonzentration nach der Dialyse konnte zu diesem Zeitpunkt nicht bestimmt werden. Die Umrechnung der Geräteeinheiten in die molare Elliptizität erfolgte daher mit einem angenommenen Vergleichswert aus der zweiten Messung (0,1193 mg/ml). Die Abbildungen 5.16 und 5.17 zeigen die Spektren der hochdruckbehandelten und thermisch behandelten rMal d 1-Lösungen im Vergleich zum Spektrum der unbehandelten Lösung (dunkelblau).

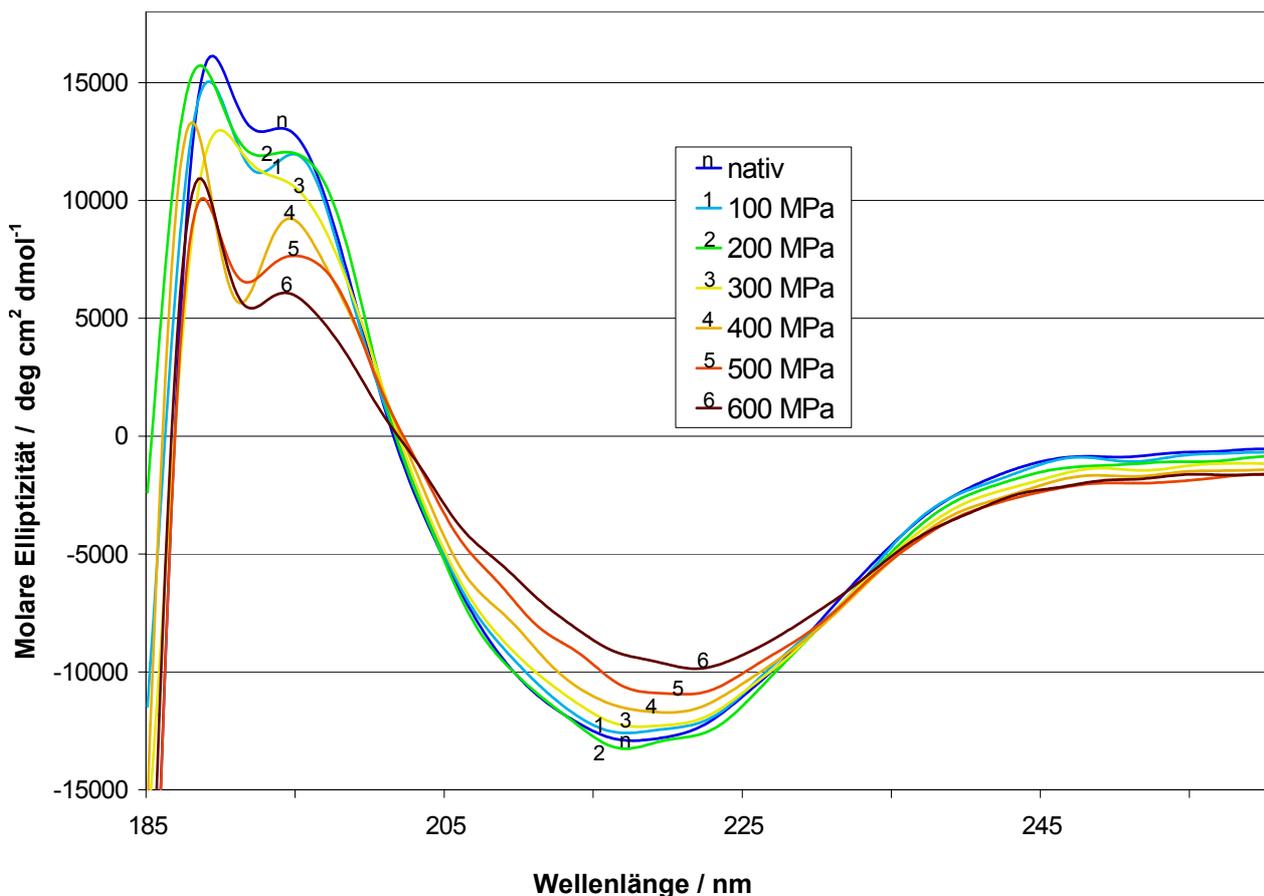


Abbildung 5.16: CD-Spektren von rMal d 1, nativ und hochdruckbehandelt

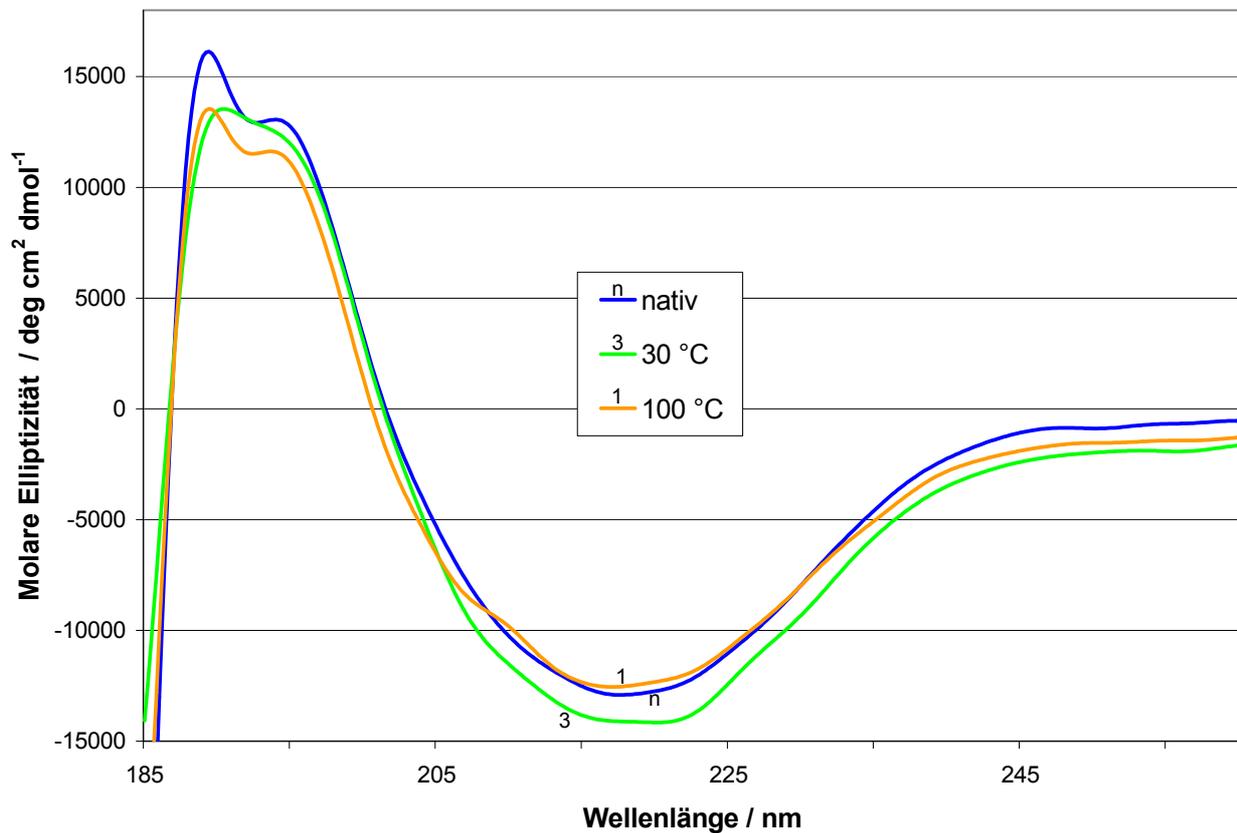


Abbildung 5.17: CD-Spektren von rMal d 1, nativ und thermisch behandelt

Zur Auswertung der Spektren erwies sich die Least square fit-Methode (Programm DICHROPROT) mit dem Referenzset von GREENFIELD et al. [31] am geeignetsten. Die errechneten Sekundärstrukturanteile des nativen Spektrums stimmten am besten mit dem Homologiemodell überein. Zusätzlich wurde der α -Helixgehalt mit der Greenfield-Fasman-Formel berechnet (grau hinterlegt). Tabelle 5.15 gibt die berechneten Sekundärstrukturanteile prozentual wieder. Turnstrukturen wurden mit dieser Methode nicht erkannt.

Tabelle 5.15: Auswertung der CD-Spektren von rMal d 1

	α -Helix	β -Faltblatt	Zufallsstruktur	Turn	Summe	$f^\alpha (\%) = \frac{\theta_{208} + 4000^\circ}{-290^\circ}$
Nativ	19,6	46,4	34,0	0,0	100,0	16,3
100 MPa	17,0	48,0	35,0	0,0	100,0	15,0
200 MPa	16,4	49,0	34,6	0,0	100,0	17,0
300 MPa	16,0	49,0	35,0	0,0	100,0	13,9
400 MPa	9,0	54,1	36,9	0,0	100,0	10,5
500 MPa	10,0	54,0	36,0	0,0	100,0	6,4
600 MPa	9,9	51,6	38,5	0,0	100,0	3,6
30 °C	16,8	47,1	36,1	0,0	100,0	21,4
100 °C	20,0	43,0	37,0	0,0	100,0	17,1

Bei der zweiten Messung von rMal d 1 lag das Protein in 10 mM NaH_2PO_4 / HCL Puffer mit pH 7,0 vor. Die Konzentration nach der Dialyse betrug 0,2386 mg / ml. Abbildung 5.21 zeigt die Spektren der nativen und der hochdruckbehandelten Lösungen.

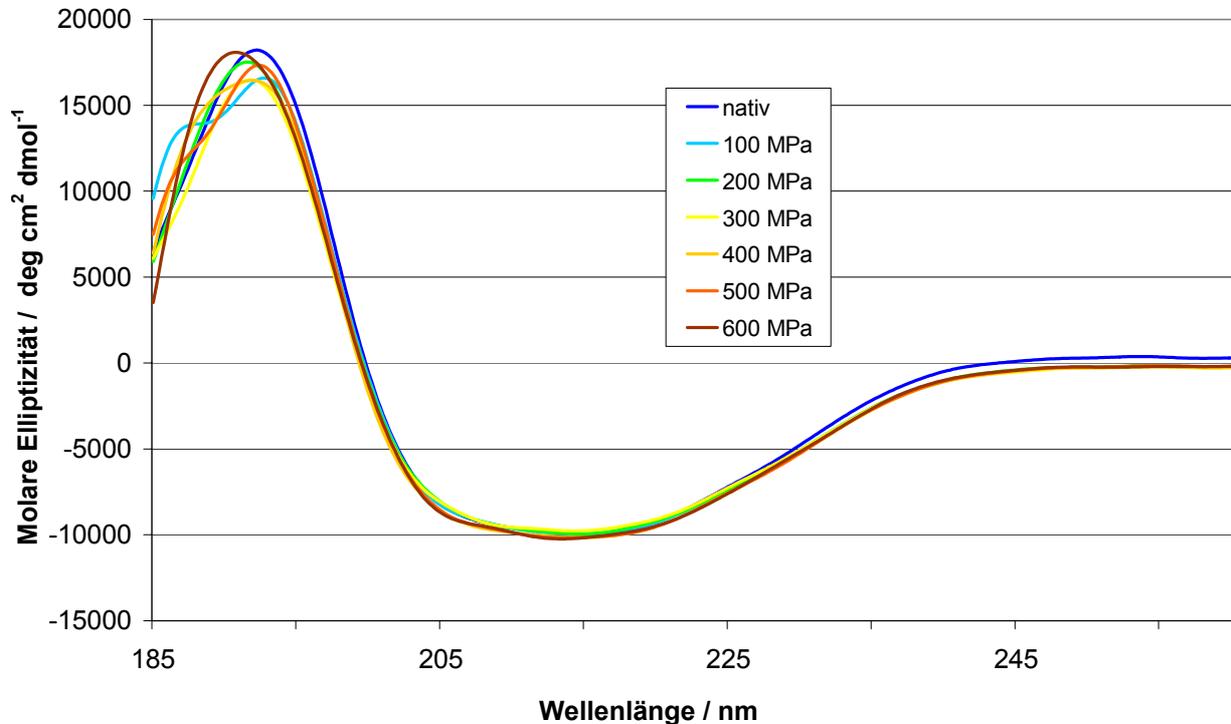


Abbildung 5.18: CD-Spektren von rMal d 1, nativ und hochdruckbehandelt (2. Messung)

Bei dieser Messung lag das rMal d 1 in höherer Konzentration (doppelte Einwaage vor der Dialyse) vor, was zu einem stärkeren Messsignal führte. Allerdings unterscheiden sich die Spektren in ihrer Charakteristik deutlich von den Spektren der ersten Messung. Auch der bei der ersten Messung deutlich erkennbare Hochdruckeffekt konnte hier nicht reproduziert werden. Die Ausschnittsvergrößerung der charakteristischen Minima bei 205-225 nm zeigt jedoch gewisse Unterschiede (Abbildung 5.22). Die Spektren 400, 500 und 600 MPa setzen sich in von den anderen ab. Die Minima sind ausgeprägter und in den kürzeren Wellenlängenbereich verschoben. Ein Grund für die qualitativ unterschiedlichen Ergebnisse könnten die Unterschiede in Konzentration und Pufferung sein, was jedoch unwahrscheinlich ist. Wahrscheinlicher ist, dass sich ein methodischer Unterschied hier bemerkbar macht. Bei der ersten Messung wurden die hochdruckbehandelten rMal d 1-Lösungen über Nacht im Kühlschrank gelagert und erst am nächsten Tag spektroskopiert, während bei der zweiten Messung die Spektroskopie direkt (<1 h) nach der Hochdruckbehandlung durchgeführt wurde. Möglicherweise initiiert Hochdruck eine langsam ablaufende Präzipitation, die augenscheinlich nicht zu bemerken ist. Typisch für eine derartige Präzipitation ist die Ausbildung von intermolekularen β -Faltblättern, was auch die berechnete Zunahme bei der ersten Messung erklärt.

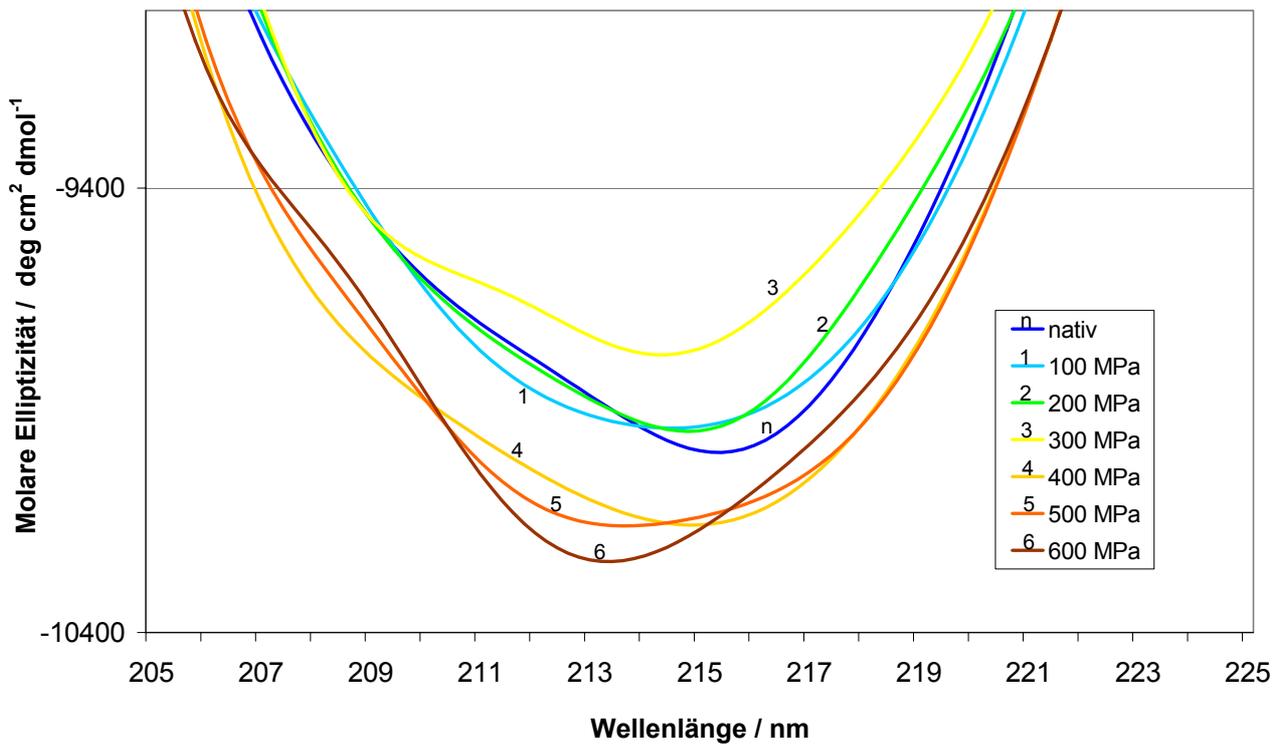


Abbildung 5.19: CD-Spektren von rMal d 1, Ausschnitt

Die Spektren der erhitzten Proben zeigen den deutlich denaturierenden Einfluss durch die Erhitzung auf 100 °C. Auch dieser Effekt konnte bei der ersten Messung nicht beobachtet werden, was sich aber mit der Präzipitation der hochdruckbehandelten Proben erklären lässt.

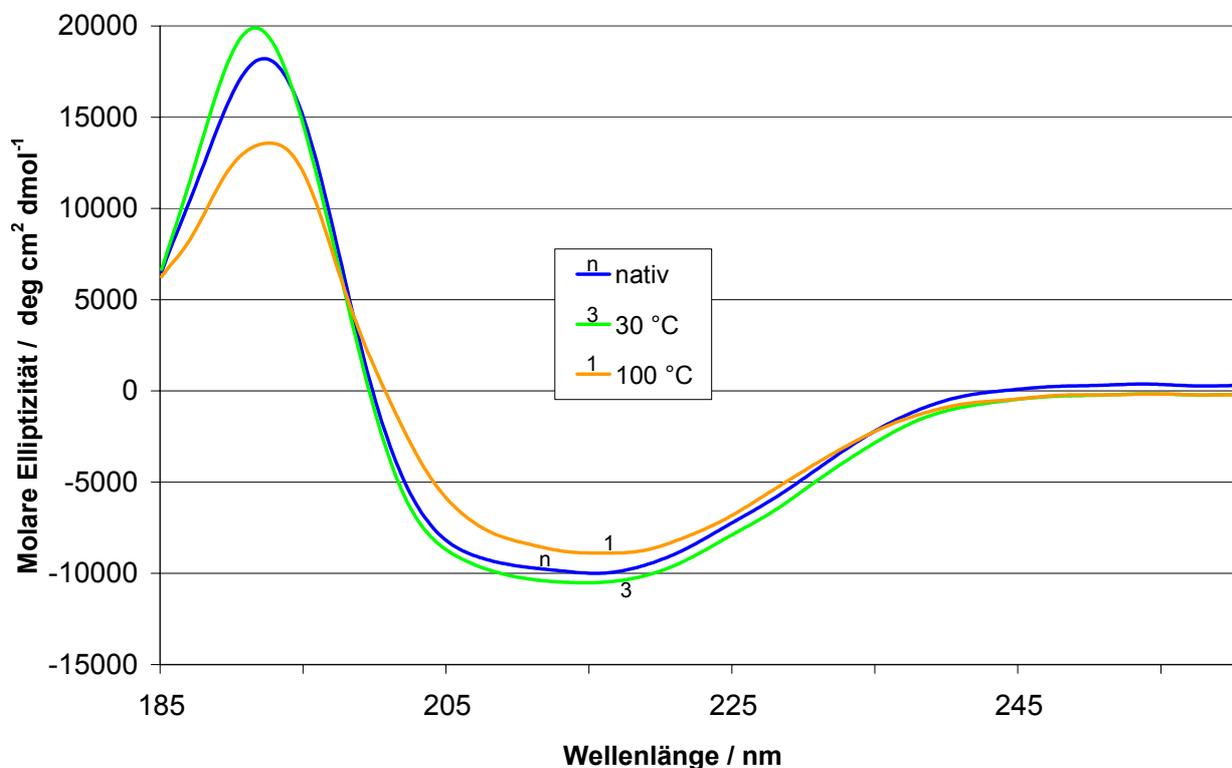


Abbildung 5.20: CD-Spektren von rMal d 1, nativ und thermisch behandelt

Für die Auswertung der Spektren erwies sich die Least Square Fit-Methode als ungeeignet. Gute Ergebnisse mit geringer mittlerer Fehlerabweichung konnte mit der CONTIN-Methode und einem Referenzspektrensatz aus 43 verschiedenen Proteinen, wie von SREERAMA und WOODY [99] beschrieben, erzielt werden. Tabelle 5.16 zeigt die Ergebnisse dieser Berechnung und die mit der Greenfield-Fasman-Formel berechneten α -Helixgehalte in Prozent.

Tabelle 5.16: Auswertung der CD-Spektren mit CONTIN und der Greenfield-Fasman-Formel

	α -Helix	β -Faltblatt	Turn	Zufallsstruktur	Summe	$f^\alpha (\%) = \frac{\theta_{208} + 4000^\circ}{-290^\circ}$
Nativ	22,8	24,3	23,8	29,0	99,9	18,2
100 MPa	22,5	24,8	25,6	27,2	100,1	18,1
200 MPa	20,9	26,0	25,0	28,1	100,0	18,2
300 MPa	21,2	25,4	25,9	27,4	99,9	18,2
400 MPa	21,5	23,5	26,4	28,6	100,0	19,5
500 MPa	23,4	24,5	26,0	26,2	100,1	19,2
600 MPa	21,1	25,9	24,3	28,7	100,0	19,0
30 °C	22,7	25,0	25,3	27,0	100,0	20,1
100 °C	20,1	28,1	22,8	28,9	99,9	12,9

Auffällig ist, dass hier ein hoher Anteil Turnstrukturen erkannt wird. Tendenziell lassen sich eine Abnahme des α -Helixgehaltes und ein paralleler Anstieg des β -Faltblattgehaltes erkennen (CONTIN-Werte). Dem gegenüber steht jedoch ein druckinduziert höherer α -Helixgehalt analog zur Staffelung der Spektren bei 208 nm, berechnet mit der Greenfield-Fasman-Formel.

5.4.1.2 Spektren von Myoglobin und Poly-L-Lysin

Als Referenzproteine dienten Myoglobin und PLL, die bis auf die Dialyse gleich behandelt wurden wie rMal d 1. Die folgenden Abbildungen zeigen die Spektren von Myoglobin hochdruck- (5.21) und thermisch behandelt (5.22).

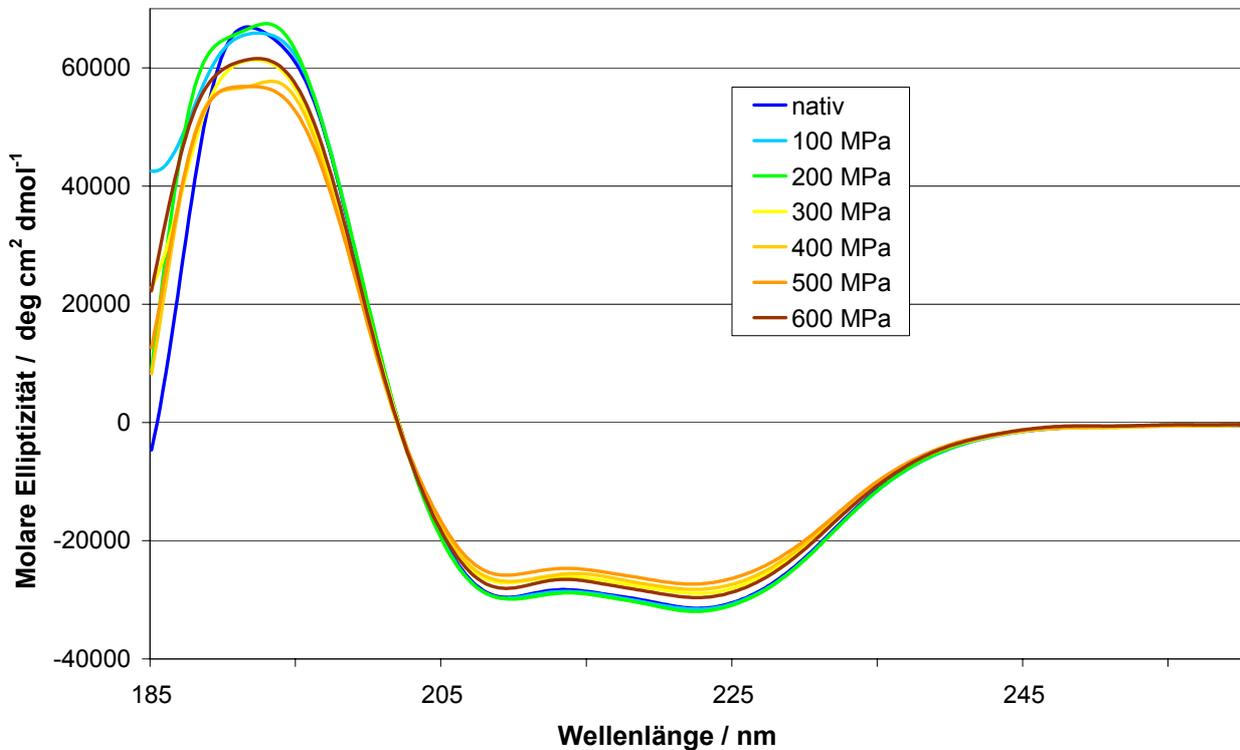


Abbildung 5.21: CD-Spektren von Myoglobin, nativ und hochdruckbehandelt

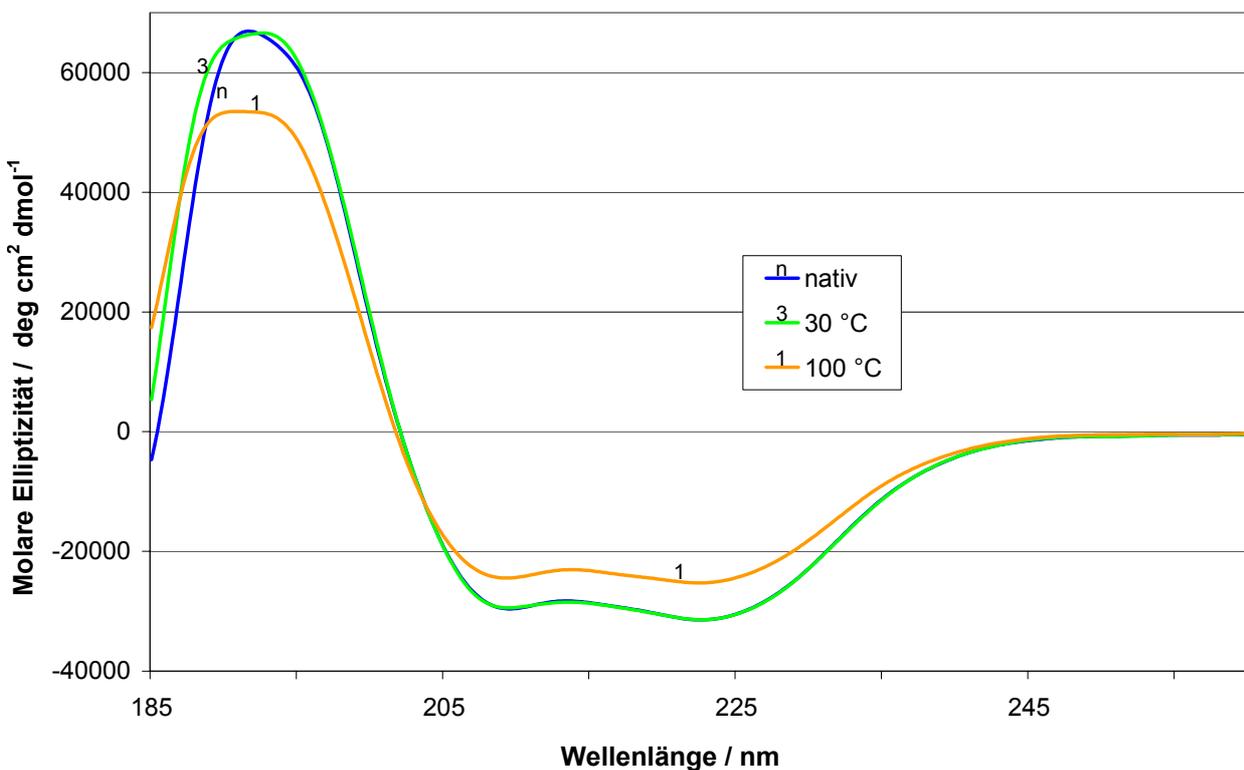


Abbildung 5.22: CD-Spektren von Myoglobin, nativ und thermisch behandelt

Abbildung 5.23 zeigt die CD-Spektren wie in Abbildung 5.21 im vergrößerten Ausschnitt um die beiden Minima der Spektren. Die Bestimmung des α -Helixgehaltes mit der Greenfield-Fasman-Formel erfolgte hier nicht bei 208 nm, sondern bei 209,4 nm, da das typische Minimum eindeutig hier lokalisiert ist.

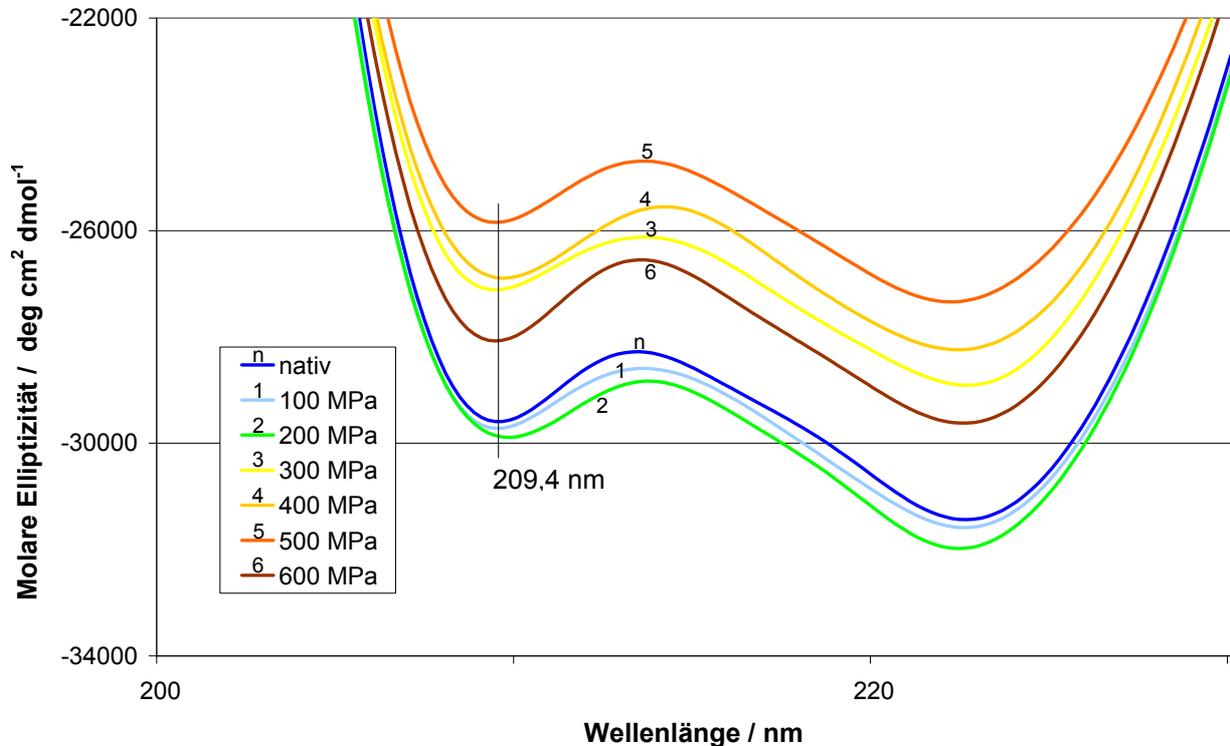


Abbildung 5.23: CD-Spektren von Myoglobin (Ausschnitt)

Die Auswertung der Myoglobinspektren mit der Least square fit-Methode wie oben produzierte eine falsche Identifikation von β -Faltblatt- und Zufallsstrukturen, die miteinander verwechselt wurden (rot hinterlegt), was bekanntermaßen ein Problem in der CD-Spektroskopie darstellt (Angaben in Tabelle 5.17 in Prozent).

Tabelle 5.17: Auswertung der CD-Spektren von Myoglobin mit der Least square fit-Methode und der Greenfield-Fasman-Formel

	α -Helix	β -Faltblatt	Zufallsstruktur	Turn	Summe	$f^\alpha(\%) = \frac{\theta_{209,4} + 4000^\circ}{-290^\circ}$
Nativ	86,9	13,1	0,0	0,0	100,0	88,3
100 MPa	84,3	14,7	0,0	1,0	100,0	88,7
200 MPa	86,3	13,7	0,0	0,0	100,0	89,2
300 MPa	87,9	12,1	0,0	0,0	100,0	79,7
400 MPa	80,2	15,6	0,0	4,2	100,0	78,9
500 MPa	85,2	13,6	0,0	1,2	100,0	75,3
600 MPa	85,3	13,7	0,0	1,0	100,0	83,0
30 °C	87,9	12,1	0,0	0,0	100,0	87,7
100 °C	96,0	2,6	0,0	1,4	100,0	70,5

PLL zeichnet sich durch die Eigenschaft aus, bei unterschiedlichen Milieubedingungen verschiedene Sekundärkonformationen auszubilden. Bei pH 11 liegt überwiegend helikale Konformation vor. Abbildung 5.24 zeigt die CD-Spektren von PLL bei pH 11 nativ und nach Druckbehandlungen mit 100, 200 und 600 MPa. Die Konzentration war 2,5 mg/ml.

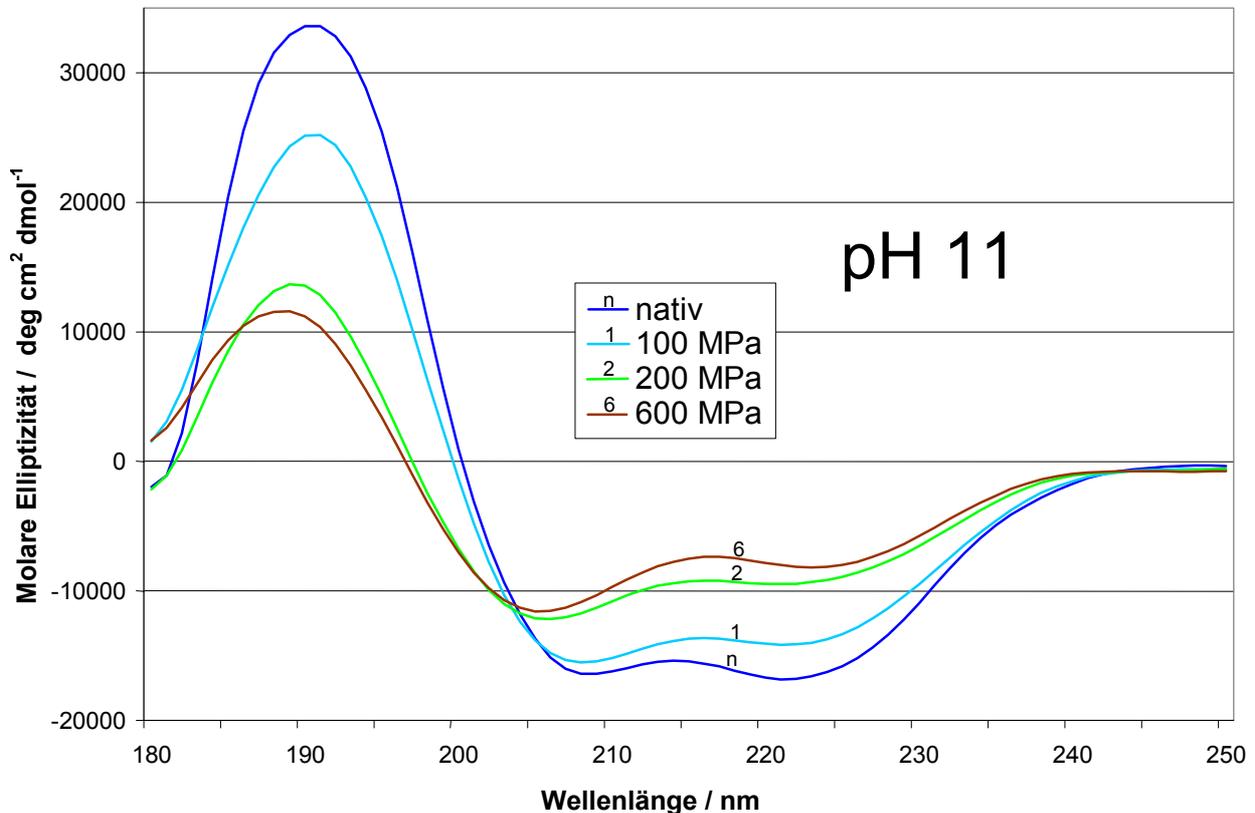


Abbildung 5.24: CD-Spektren von PLL, nativ und hochdruckbehandelt bei pH 11

Das Spektrum der nativen Probe weist die charakteristischen Extrema der α -helikalen Konformation auf. Hochdruck bewirkt mit steigendem Druck eine Verflachung der Spektren, was auf eine Zerstörung der Helices hinweist. Für die Auswertung erwies sich wiederum CONTIN mit sehr kleinen mittleren quadratischen Fehlerabweichungen als geeignet. Tabelle 5.18 zeigt die Ergebnisse in Prozent.

Tabelle 5.18: Auswertung der CD-Spektren von PLL bei pH11 mit CONTIN und der Greenfield-Fasman-Formel

	α -Helix	β -Faltblatt	Turn	Zufallsstruktur	Summe	$f^\alpha (\%) = \frac{\theta_{208} + 4000^\circ}{-290^\circ}$
Nativ	47,7	5,9	16,7	29,7	100,0	42,7
100 MPa	43,7	7,9	18,1	29,4	99,1	39,7
200 MPa	28,7	15,4	22,3	33,1	99,5	26,5
600 MPa	27,5	16,9	21,2	34,4	100,0	23,6

Die Auswertung ergibt eine deutliche druckbedingte Reduktion des α -Helix- und eine Zunahme des β -Faltblattgehaltes sowie der Turn- und Zufallsstrukturen.

Bei neutralem pH-Wert liegt PLL weitestgehend ungeordnet vor, so zeigen auch die Spektren bei pH 7 den typischen Verlauf (Abbildung 5.25). Hochdruck veränderte in diesem Fall die Spektren weniger drastisch.

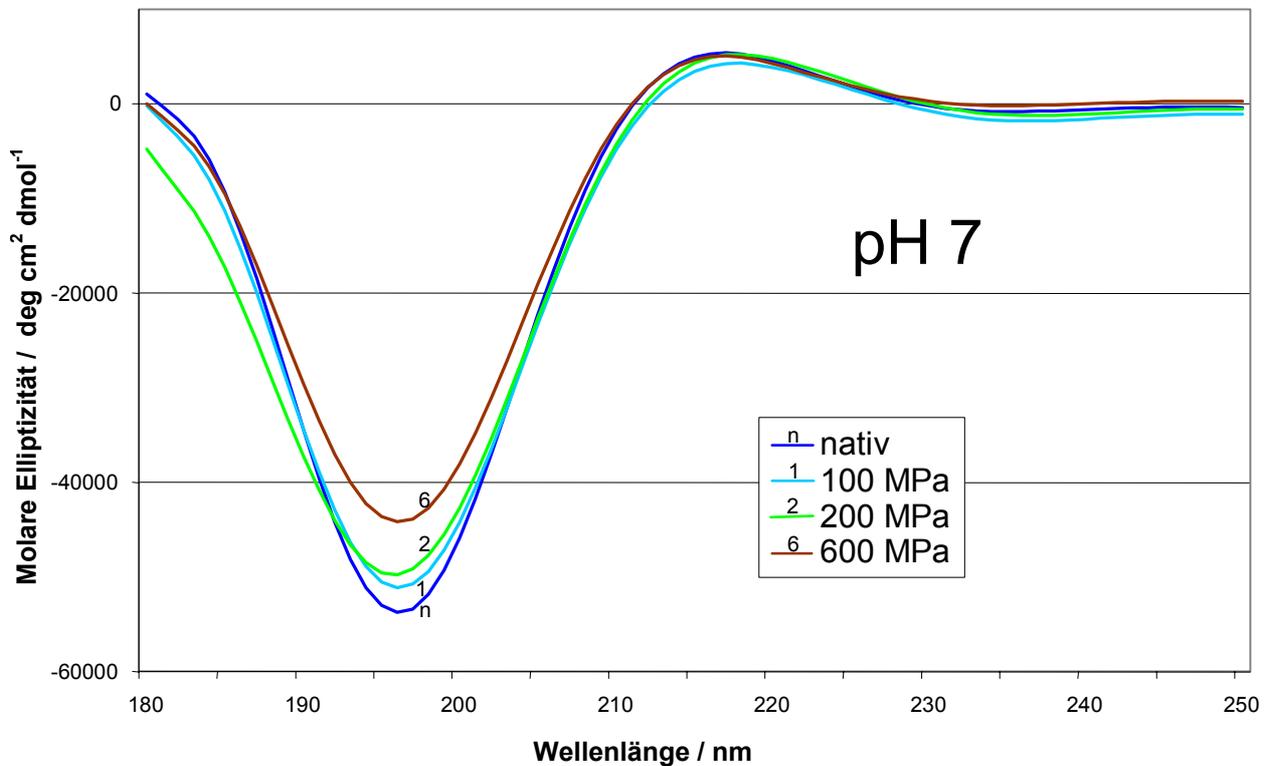


Abbildung 5.25: CD-Spektren von PLL, nativ und hochdruckbehandelt bei pH 7

Die rechnerische Auswertung der Spektren konnte mit keiner der zur Verfügung stehenden Methoden durchgeführt werden. Teilweise wurden ungeordnete Strukturen nicht oder falsch erkannt. Die Schwierigkeit, die Referenzspektrensätze anzupassen, schlug sich auch in entsprechend hohen mittleren quadratischen Fehlerabweichungen nieder, die mit Werten weit über 0,25 im inakzeptablen Bereich lagen.

Die geringe Verschiebung des 196 nm-Minimums könnte auf die Bildung von β -Faltblattstrukturen zurückzuführen sein. Das Temperaturoptimum für die Ausbildung von β -Faltblättern von PLL liegt bei 50 °C [16]. Da die Druckerhöhung mit einer adiabaten Erwärmung einhergeht, könnte diese Konformation begünstigt sein.

5.4.2 Infrarotspektroskopie von rMal d 1

Die Infrarotspektren von rMal d 1 wurden als Absorption eines getrockneten Films gemessen. Aufgrund der Inhomogenität der Filmschichtdicke sind absolute Werte der Transmission in den originären Spektren verschiedener Proben nicht vergleichbar. Dieser Effekt wurde durch eine Normierung der Spektren auf ein gemeinsames Integral kompensiert, die Ordinate ist daher dimensionslos. Abbildung 5.21 zeigt die Absorptionsspektren von rMal d 1-Filmen aus nativer und hochdruckbehandelter Lösung im Bereich der Amid I-Bande.

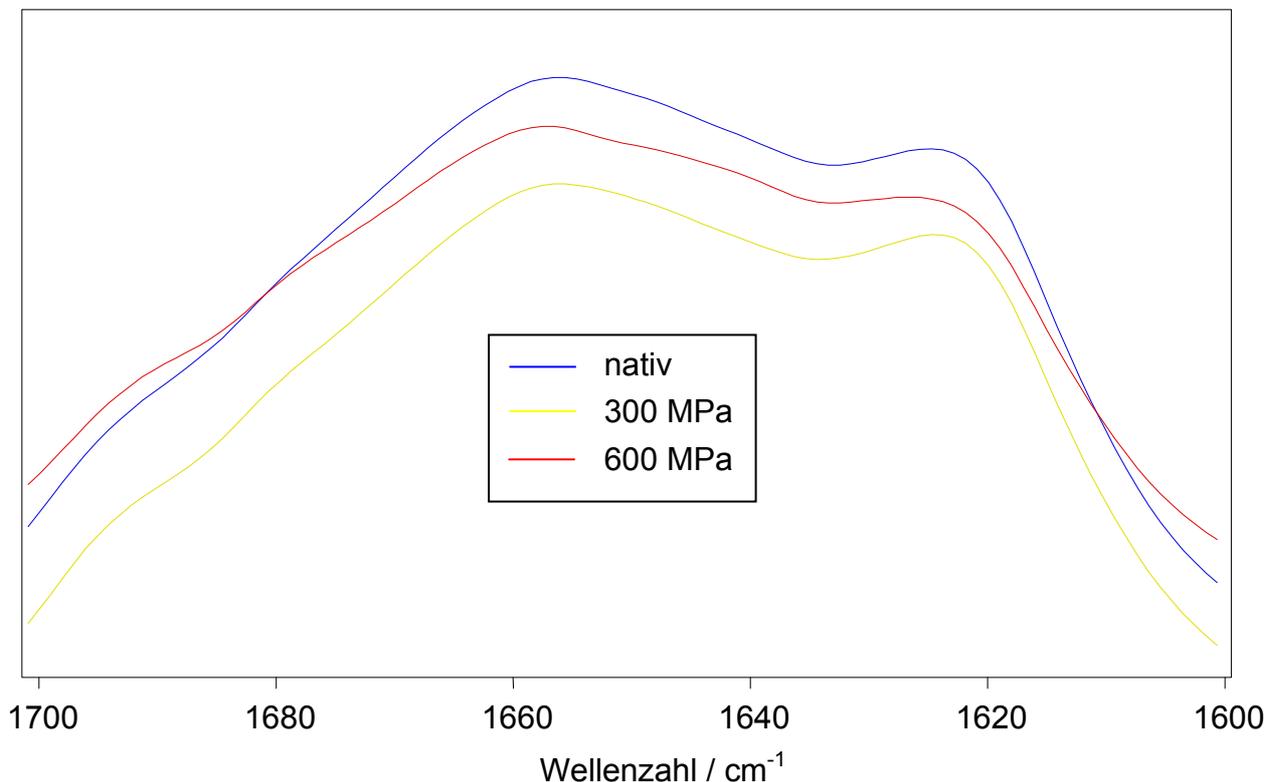


Abbildung 5.26: FTIR-Absorptionsspektren von rMal d 1 (Amid I-Bande)

Es muss erwähnt werden, dass die hier gezeigten Spektren keine Schlüsse auf die Proteinstruktur in Lösung zulassen, da die Auswirkung des Eintrocknens unbekannt ist. Zwei deutliche Maxima bei 1655 cm⁻¹ und 1624 cm⁻¹ lassen sich mit großer Sicherheit α -helikalen bzw. β -Faltblattstrukturen zuordnen. Diese beiden Maxima liegen bei den hochdruckbehandelten Proben tiefer im Vergleich zur Nativprobe, was auf eine Verringerung der entsprechenden Strukturanteile schließen lässt. Allerdings kommt die Positionierung der Spektren ausschließlich durch die oben erwähnte Normierung zustande. Die Charakteristik der Gesamtspektren ist jedoch nicht nur durch hochdruckinduzierte Effekte unterschiedlich, sondern auch durch unterschiedlich starke Absorption im Bereich der Wasserbanden (schwankende Luftfeuchtigkeit) und ein unterschiedliches Signal-Rausch-Verhältnis, das wesentlich von der Schichtdicke abhängt. Diese Faktoren wirken sich bei der Normierung

ebenfalls auf die horizontale Positionierung des Spektrums aus, die damit als unsicher gelten muss.

Die in den Absorptionsspektren erkennbaren Maxima in der Amid I-Region setzen sich erfahrungsgemäß aus mehreren Absorptionsbanden zusammen [27]. Eine Auflösung des Spektrums in Einzelbanden ist durch die Berechnung der zweiten Ableitung möglich. Die Einzelbanden sind dort durch Minima charakterisiert. Abbildung 5.22 zeigt die zweite Ableitung und die Positionen der charakteristischen Minima.

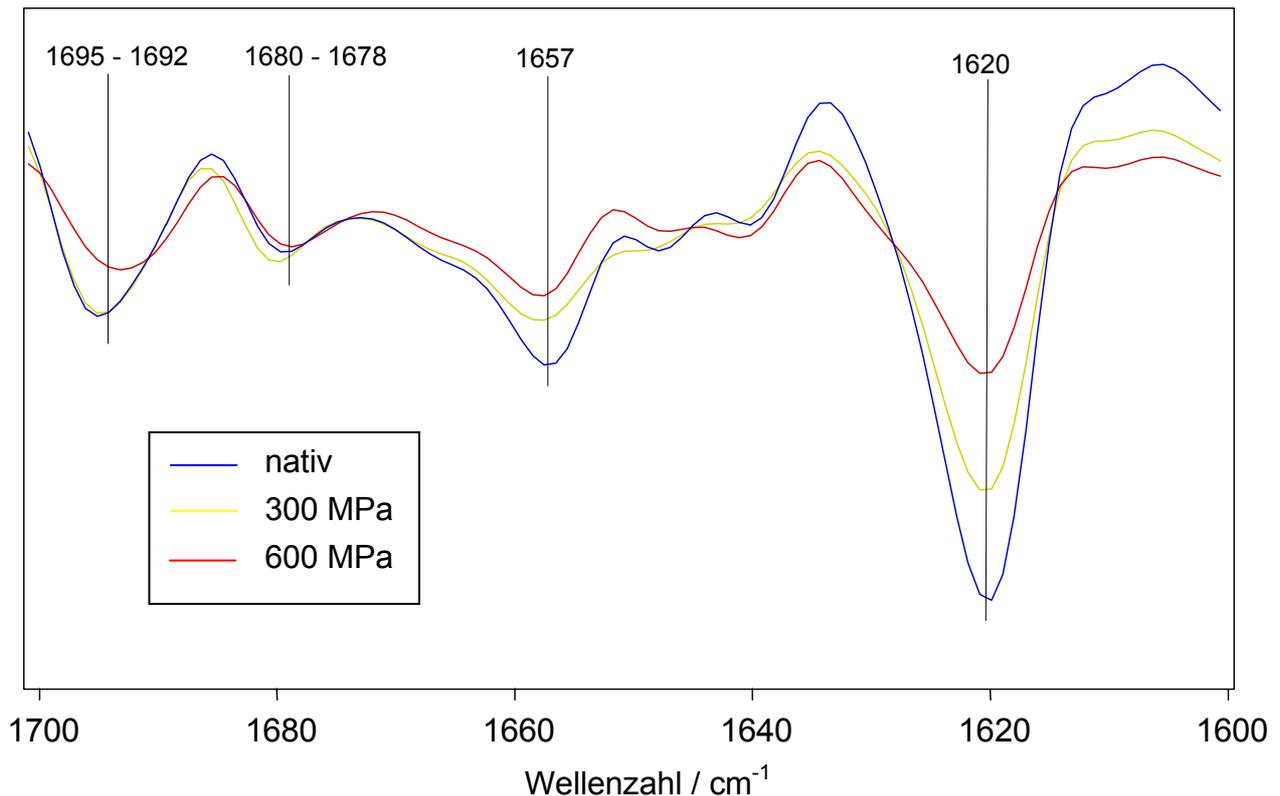


Abbildung 5.27: Zweite Ableitung der FTIR-Spektren

Zwei deutliche Banden bei 1620 cm^{-1} und 1657 cm^{-1} sind die Hauptkomponenten der Maxima in den Spektren. Die Bande bei 1620 cm^{-1} wird in der Literatur übereinstimmend der β -Faltblattstruktur zugeordnet, die bei 1657 cm^{-1} den α -Helices. Die schwächeren Banden $1680\text{ cm}^{-1} - 1678\text{ cm}^{-1}$ und $1695\text{ cm}^{-1} - 1692\text{ cm}^{-1}$ könnten mit Turnstrukturen bzw. β -Faltblattstruktur assoziiert sein [27, 46, 76]. Der wellige Bereich $1635\text{ cm}^{-1} - 1650\text{ cm}^{-1}$ dürfte durch verstärkte Rauschsignale zustande gekommen sein. Die Ausprägung der Minima bei 1620 cm^{-1} und 1657 cm^{-1} ist in der Reihenfolge nativ > 300 MPa > 600 MPa gestaffelt, was auf eine druckbedingte Verringerung der entsprechenden Strukturen schließen lässt.

6 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die klinischen und molekularen Auswirkungen der Hochdruckbehandlung auf die Allergenität von Lebensmitteln darzustellen. Zunächst sollten einfache PTP-Tests am allergischen Patienten mit verschiedenen hochdruckbehandelten Lebensmitteln klären, ob die Hochdruckbehandlung Einfluss auf die Allergenität hat. Bei vielen Lebensmitteln konnte dieser Einfluss im Sinne einer Verringerung der Allergenität dokumentiert werden. Am Beispiel des Apfels sollten die molekularen und immunologischen Hintergründe der hochdruckinduzierten Reduktion der Allergenität klinisch-experimentell und *in vitro* näher untersucht werden. Mittels CD- und FTIR-Spektroskopie sollten die Auswirkungen der Hochdruckbehandlung auf die Proteinstruktur des Majorallergens dargestellt werden.

6.1 Auswirkung der Hochdruckbehandlung auf die Allergenität von Haselnuss, Sellerie, Karotte, Pfirsich und Kirsche

Der Haselstrauch (*Corylus avellana*) ist in Europa weit verbreitet und die **Haselnuss** ein beliebtes Nahrungsmittel, das roh oder als Zutat in vielen Produkten der Lebensmittelindustrie verzehrt wird. 70-90 % der Pollinotiker sind gegen Haselnüsse sensibilisiert [71]. Das Majorallergen ist ein Bet v 1-homologes 18 kDa Protein Cor a 1, das sowohl in den Pollen als auch in den Nüssen vorkommt. Neben Cor a 1 sind weitere Proteine mit 47, 32, 35 und 9 kDa als Allergene identifiziert worden. Besonders das LTP-homologe 9 kDa Protein kann bei spezifisch sensibilisierten Patienten schwere Anaphylaxien hervorrufen und gilt als hitzestabil [75].

Die Ergebnisse des PTP Tests an sieben Patienten, die auf native Haselnuss eindeutig positiv reagierten, zeigen ein uneinheitliches Bild. 3 / 7 reagieren auf die hochdruckbehandelten Haselnüsse negativ, 4 / 7 positiv. Ein Grund dafür könnte die unterschiedliche Sensibilisierung auf das Majorallergen und/oder eines der Minorallergene, wie z.B. Haselnuss-LTP, sein. Leider liegen bei diesen Patienten keine Werte der spezifischen IgE-Spiegel vor.

LTP-Homologe anderer Spezies konnten bereits strukturaufgeklärt werden. LT Proteine sind α -helikale Proteine, deren Konformation durch Disulfidbrücken stabilisiert wird. Abbildung 6.1 zeigt als Beispiel das LTP aus Mais, bei dem die vier intramolekularen Disulfidbrücken gelb gekennzeichnet sind [26].

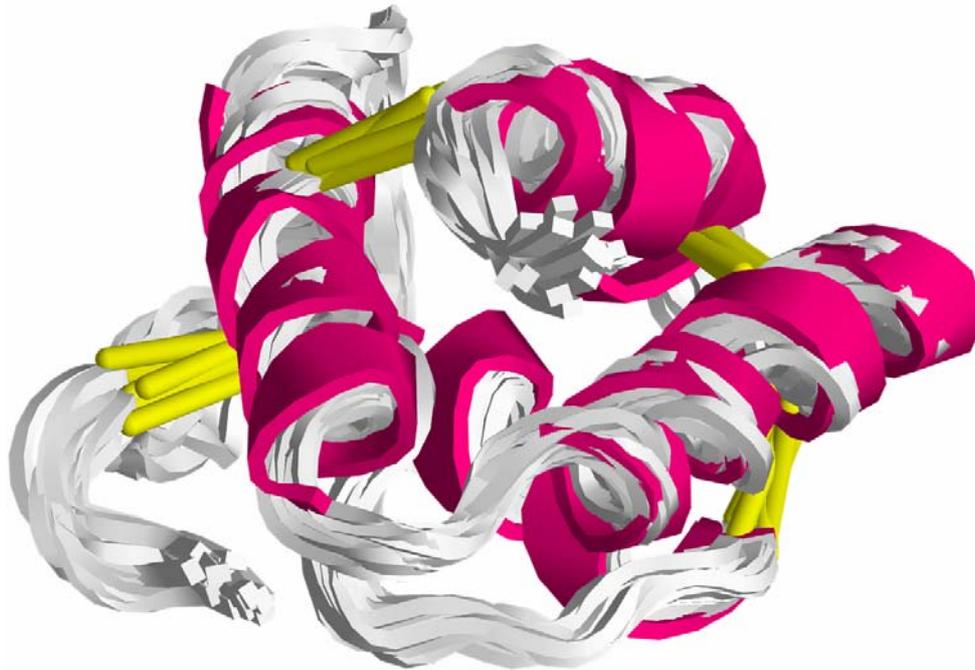


Abbildung 6.1: Lipidtransferprotein aus Mais (15 NMR Strukturen, gelb: Disulfidbrücken) [26]

Diese Stabilisierung der LTP-Moleküle verhindert wahrscheinlich hochdruckinduzierte Konformationsänderungen oder andere Prozesse, die zu einer Reduktion der allergenen Potenz führen. Eine unterschiedlich spezifische Sensibilisierung könnte auch eine in der Klinik beobachtete unterschiedliche Toleranz von thermisch behandelten Haselnüssen erklären. Manche Patienten berichten über Symptome nach dem Genuss roher Haselnüsse, verarbeitete Produkte, wie z.B. Nusskuchen, werden dagegen vertragen. Häufiger berichten Patienten, dass sie keinerlei Lebensmittel mit Haselnüssen vertragen [32].

Sellerie (*Apium graveolens*) wird als Stauden- und Knollengemüse wegen seiner stark würzenden Eigenschaften in vielen Gerichten verwendet und kann roh oder gekocht verzehrt werden. Die Bedeutung als Allergen ist groß, da zum einen schwerwiegende Reaktionen auch auf erhitzte und getrocknete Produkte beschrieben werden [3, 5], zum anderen, weil Sellerie in vielen industriellen Lebensmittelprodukten, vor allem Trockenprodukten, „versteckt“ in kleinen Mengen vorliegt [111]. Das Majorallergen des Selleries ist Api g 1 (Bet v 1-homolog), Minorallergene sind Api g 4 (Sellerieprofilin) und ein 60 kDa Protein. Viele Sellerieallergiker (55%) weisen spezifisches IgE gegen eine KCD (kreuzreaktive Carbohydratdeterminante) auf [61]. Die PTP Tests an zwei Patienten ergaben sowohl eine deutlich negative Reaktion auf hochdruckbehandelten Sellerie (Patient 6) wie auch eine unverändert positive Reaktion (Patientin 35). Patient 6 ist mit einem hohen Gesamt-IgE-Spiegel von 256 kU/l und positiven CAP-Klassen gegen Apfel, rMal d 1 und Birke wahrscheinlich hochgradig gegen Bet v 1-Homologe sensibilisiert. Die negative Reaktion auf den hochdruckbehandelten Sellerie ist somit möglicherweise auf eine Druckinaktivierung von Api g 1 zurückzuführen. Bei Patientin 35 wurden

keine IgE-Spiegel bestimmt, aber hier könnte eine unterschiedliche Sensibilisierung auf eines der Minorallergene vorliegen. BALLMER-WEBER et al. [3] untersuchten die Hitzestabilität der Sellerieallergene und geben diese mit KCD > Api g 4 > Api g 1 an. Die Hitzestabilität geht möglicherweise in diesem Fall mit der Hochdruckstabilität konform. Unterschiede sollten in Zukunft näher untersucht werden. Glykosidische Bindungen der KCD können durch Hochdruck nicht gespalten werden, auch wenn das tragende Protein denaturiert ist. Api g 4 als LT Protein ist stabiler als Api g 1. Die Inaktivierung der hitzestabilen Sellerieallergene durch Hochdruck ist somit unwahrscheinlich.

Die **Karotte** (*Daucus carota*) ist ein weit verbreitetes Lebensmittel und wird roh und gekocht in vielen Zubereitungen verzehrt. Bis zu 70 % der Pollinotiker entwickeln allergische Symptome nach Genuss von Karotten, hauptsächlich das OAS und seltener respiratorische oder systemische Reaktionen [6]. Das Majorallergen ist das Bet v 1-homologe 16 kDa-Protein Dau c 1, das 1998 identifiziert und sequenziert wurde [44]. Weitere Allergene konnten mittels Immunoblot mit großer Wahrscheinlichkeit identifiziert werden [6]:

- Ein Karottenprofilin mit 12 kDa,
- ein Isoflavonreduktase-homologes Protein mit 35 kDa (Bet v 6-homolog)
- und eine KCD.

Fünf Patienten wurden PTP mit nativer und hochdruckbehandelter Karotte getestet. Alle Patienten reagierten auf die 600 MPa-Proben negativ. Die 300 MPa-Proben erzeugten in zwei Fällen fraglich negative und in drei Fällen fraglich positive Reaktionen. Die Inaktivierung der Karottenallergene scheint zumindest in diesen fünf Fällen möglich. Anamnestisch berichten die meisten Karottenallergiker Symptombefreiheit nach dem Verzehr erhitzter Karottenprodukte. Die Karottenallergene scheinen damit insgesamt weniger stabil zu sein als z.B. die Allergene des Selleries. Die Tests bestätigen die Beobachtungen bei Haselnuss und Sellerie, dass die Hochdruckinaktivierbarkeit in den meisten Fällen mit der thermischen Stabilität korreliert.

Der **Pfirsich** (*Prunus persica*) wird als Tafelobst hauptsächlich roh verzehrt, aber auch thermisch behandelt als Konserve oder als Zutat in Backwaren. PASTORELLO et al. [73] haben ein LTP mit 9 kDa mittels Immunoblot als Majorallergen identifiziert. Es reagierte kein Serum der 15 Patienten, von denen sieben spezifisch auf Birke sensibilisiert waren, im Bereich um 18 kDa. Ein Bet v 1-homologes Allergen scheint demnach im Pfirsich nicht vorzuliegen. Vier Patienten aus dieser Gruppe reagierten auf ein Protein bei 15 kDa, bei dem es sich mit einiger Wahrscheinlichkeit um

Pfirsichprofilin handelt. Einige IgE-bindenden Komponenten im Bereich von 40-70 kDa wurden erkannt, aber nicht weiter spezifiziert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sieben Patienten PTP mit rohem und hochdruckbehandeltem Pfirsich getestet. Zwei Patienten (37 und 38) entwickelten auf die hochdruckbehandelten Proben keine Reaktionen mehr, zwei weitere (29 und 33) zeigten fraglich positive Reaktionen und drei Patienten (13, 17 und 27) reagierten noch positiv. Bei den Patienten 13, 17 und 29 liegen spezifische IgE gegen Apfel und Birke (CAP-Klasse >2) und bei den Patienten 13 und 29 auch gegen rMal d 1 vor. Da bei Pfirsich kein Bet v 1-Homologes vorhanden ist, müssen diese Pfirsichallergiker auch gegen ein anderes Pfirsichallergen sensibilisiert sein. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um das oben erwähnte Pfirsichprofilin. Eine Erklärung für die unterschiedlichen Hautreaktionen könnte sein, dass die nicht näher bestimmten Allergene bei 40-70 kDa eine KCD besitzen, die nicht hochdruckinaktivierbar ist, während das Profilin drucksensibel ist.

Die **Kirsche** (*Prunus avium*) ist ein viel konsumiertes Steinobst und wird roh oder vielfältig zubereitet verzehrt. Vier Allergene sind eindeutig identifiziert [4, 68]:

- Pru av 1, ein Bet v 1-homologes Protein
- Pru av 2, ein thaumatinhomologes Protein
- Pru av 3, ein LTP
- Pru av 4, ein Bet v 2-homologes.

16 von 23 Patienten (70 %) mit Birkenpollenallergie reagierten bei einer PT Studie mit rekombinanten Allergenen positiv auf Pru av 1, sieben Patienten (30 %) reagierten positiv auf Pru av 4. In einer zweiten Gruppe von Patienten mit positivem DBPCFC-Ergebnis auf Kirsche reagierten 22 von 24 Patienten (92 %) positiv auf rPru av 1, vier (17 %) auf Pru av 4 und ein Patient (4 %) auf Pru av 3 (Kirschenprofilin) [4].

Die Ergebnisse des PTP Tests mit nativer und hochdruckbehandelter Kirsche weisen auf eine unterschiedliche Drucksensitivität der Kirschallergene hin. Die Patienten 37 und 38 reagierten nicht mehr auf die hochdruckbehandelten Proben, allerdings war bei Patient 38 schon die Reaktion auf das native Material fraglich positiv zu bewerten. Die Patienten 27 und 13 reagierten unverändert positiv auf die Hochdruckproben, während die Patienten 17, 29 und 33 zwar schwächer, fraglich negativ reagierten. Eines oder mehrere Allergene in der Kirsche sind demnach durch Hochdruck immunologisch relevant veränderbar.

6.2 Auswirkung der Hochdruckbehandlung auf die Allergenität des Apfels

Die Pricktests mit 'Golden Delicious'-Äpfeln, die fünf Minuten mit 300 oder 600 MPa behandelt worden waren, an 31 Patienten zeigten in 27 Fällen eindeutig negative Befunde. Die Durchmesser der Erytheme und Quaddeln beim Test mit 300 MPa-Proben wiesen durchschnittlich 25,8 % (Erythem) bzw. 21,1 % (Quaddel) des Nativwertes auf, die der Tests mit 600 MPa-Proben noch 15,6 % bzw. 11,1 %. Abbildung 6.2 stellt das arithmetische Mittel der Hautreaktionen bildlich dar.

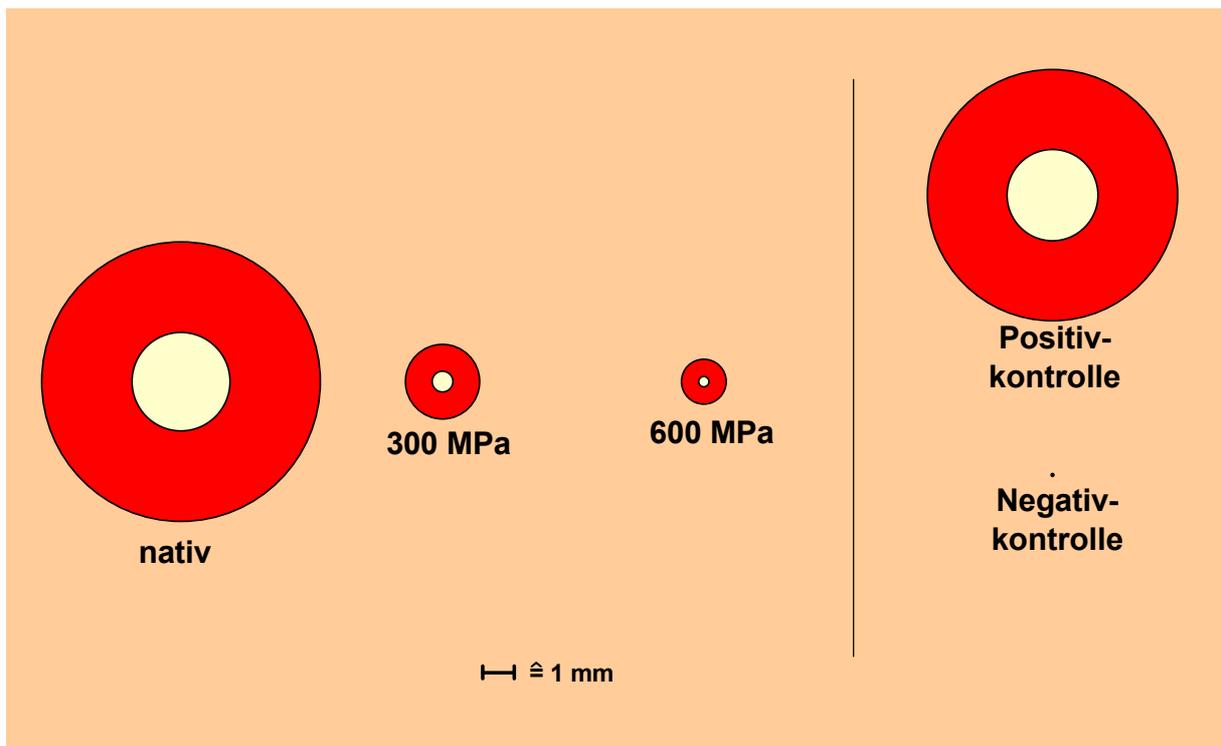


Abbildung 6.2: Mittlerer Quaddel- und Erythemdurchmesser (n = 31) bei dem orientierenden PTP Test mit Apfel 'Golden Delicious'

Bei allen Patienten war der Test mit nativem Material positiv zu bewerten, bei 4 / 31 bzw. 2 / 31 auch mit den 300 bzw. 600 MPa-Proben. Im Gegensatz dazu zeigten 6 / 31 Patienten bei den 300 MPa-Proben keine erkennbaren Hautreaktionen und 10 / 31 bei den 600 MPa-Proben. Bei 19 der getesteten Patient mit negativem Ergebnis auf die 600 MPa-Probe wurde oral provoziert (19 / 19 mit Apfel 600 MPa und 18 / 19 mit Apfel nativ). Der hochdruckbehandelte Apfel wurde von allen Patienten vertragen. Nativer Apfel provozierte bei allen Getesteten zumindest anamnestisch (2 / 19, die orale Provokation war ohne Befund) allergische Symptome. Die Entwicklung eines Quinke-Ödems durch Lippenkontakt und die hohen Spiegel an spezifischen und vor allem unspezifischen IgE (Mal d 1-spezifisch: CAP-Klasse 3, unspezifisch: CAP-Klasse 6 mit 3414,0 kU/l) sowie die positive PTP-Testreaktion auf den mit 300 MPa behandelten Apfel bei Patient 25 deuteten auf eine hochgradige Sensibilisierung hin.

Dennoch hat der Patient keine Symptome im OPT (siehe weiter unten) mit hochdruckbehandeltem Apfel gezeigt.

Als Fazit dieser Testreihe kann generell festgehalten werden, dass die Hochdruckbehandlung bei den getesteten Lebensmitteln im PTP Test eine wesentlich veränderte Klinik im Sinne einer besseren Verträglichkeit erzeugt.

Wie es scheint, sind die Bet v 1-homologen Majorallergene effizient durch Hochdruck zu inaktivieren. Seltener positive Reaktionen könnten mit einer Sensibilisierung auf druck- und meist auch hitzestabile Minorallergene erklärt werden.

Die PTP-Tests an zwölf Patienten mit Äpfeln, die Drücken zwischen 100 und 600 MPa bei Haltezeiten von 0, 1 und 5 Minuten ausgesetzt waren, sollten zeigen, ob und wie die Inaktivierung der Allergene von den Prozessparametern abhängt. Abbildung 6.3 gibt die durchschnittlichen prozentualen Quaddelflächen der zwölf Patienten als Balken wieder. Die Konfidenzintervalle sind für eine Vertrauensbasis von 95% und eine t-verteilte Grundgesamtheit berechnet [88].

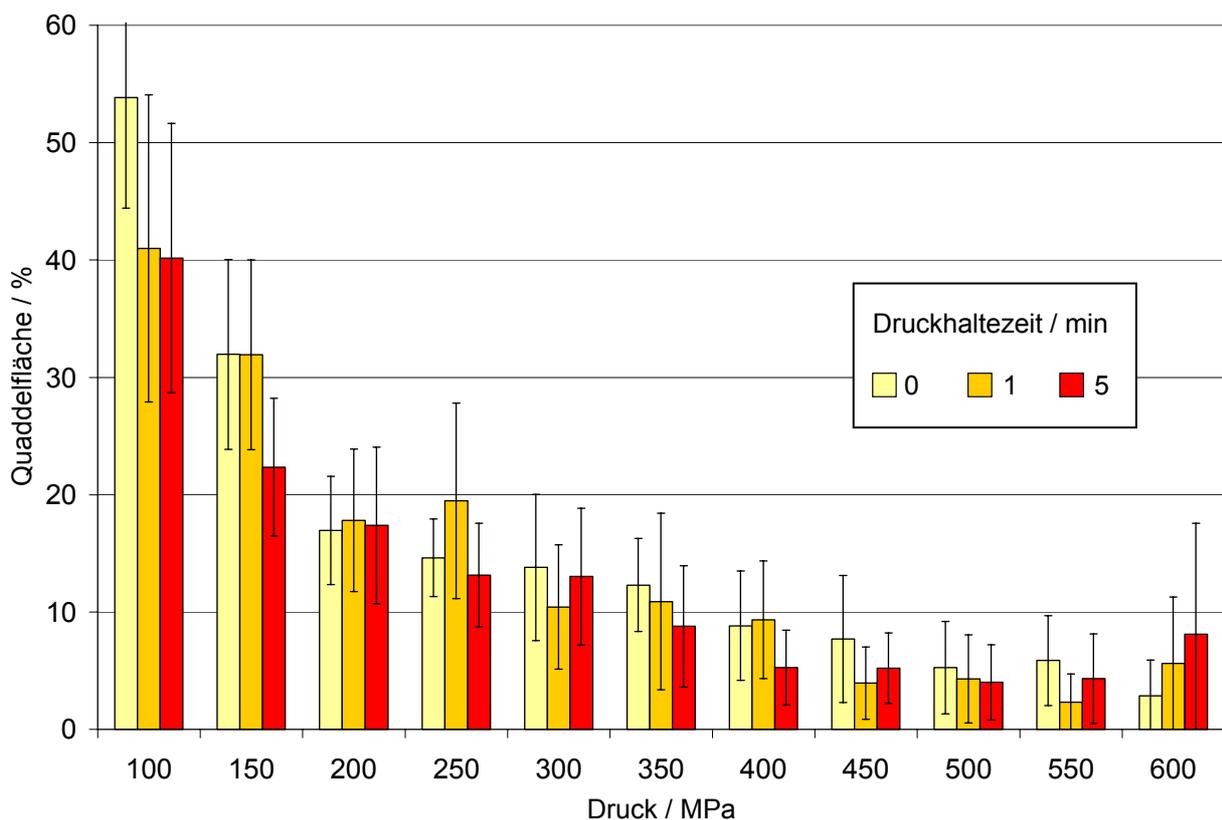


Abbildung 6.3: Durchschnittswerte der intensiven PTP Tests (Konfidenzintervalle mit $1-\alpha = 95\%$)

Schon die Hochdruckbehandlung mit 100 MPa reduzierte die allergische Reaktion deutlich. Mit einminütiger und fünfminütiger Druckhaltezeit ergaben sich durchschnittlich negative, jedoch nicht signifikant negative Reaktionen. Ohne Druckhaltephase behandelte Äpfel riefen Quaddeln mit 53,8 % der Nativfläche hervor und waren im Durchschnitt positiv zu bewerten. Alle Hochdruckbehandlungen ≥ 150

MPa riefen Hautreaktionen hervor, die signifikant negativ zu bewerten waren. Vergleicht man die Druckstufen untereinander, liegen die 200 MPa-Werte signifikant unter den 100 MPa-Werten, die nächsten signifikanten Sprünge sind bei 450 MPa (ein- und fünfminütige Haltezeit) und den 500 MPa-Werten. Eine Abhängigkeit der Allergeninaktivierung von der Druckhöhe besteht. Je höher der Druck, desto ausgeprägter wird die Inaktivierung. Vergleicht man die Reihen mit unterschiedlichen Druckhaltezeiten, treten bei den einzelnen Druckstufen keine signifikanten Unterschiede auf. Die Durchschnittswerte bei 100 und 150 MPa lassen jedoch eine Abhängigkeit der Allergeninaktivierung von der Haltezeit vermuten. Dieser Effekt scheint bei den höheren Druckstufen weniger bedeutsam zu sein. Betrachtet man die drei Haltezeitreihen als Verlauf über der Druckhöhe, scheint ein negativ logarithmischer Verlauf vorzuliegen. Eine Regressionsanalyse der durchschnittlichen Reihenwerte ergab die in Abbildung 6.4 dargestellten Regressionskurven mit den zugehörigen Funktionsgleichungen. Die Bestimmtheitskoeffizienten R^2 waren bei der logarithmischen Anpassung mit Werten $>0,9$ wie erwartet am höchsten im Vergleich zur linearen oder exponentiellen Anpassung.

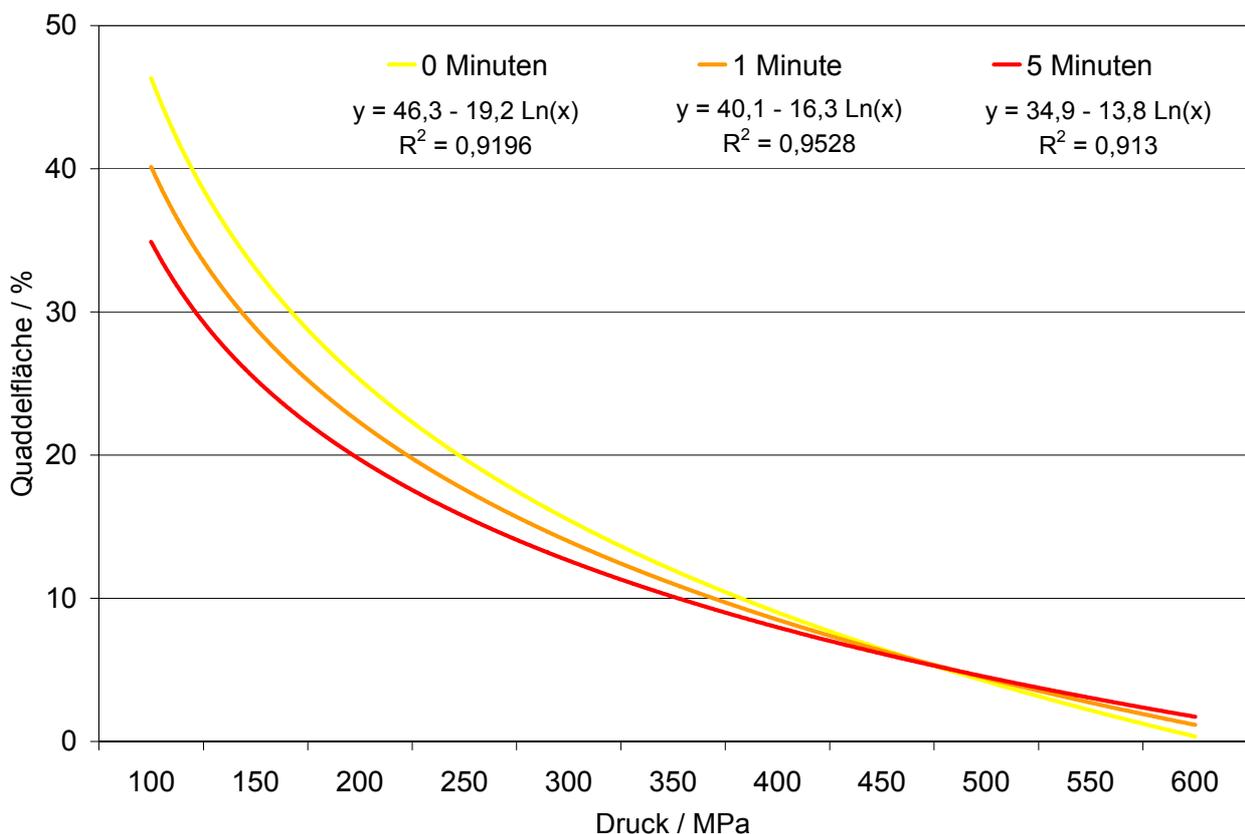


Abbildung 6.4: Regressionsanalyse der Haltezeitreihen

Eine Erklärung für diesen, wie bereits erwähnt, nicht signifikant dokumentierten Effekt könnte das Zusammenwirken von zwei oder mehr Mechanismen der Allergeninaktivierung sein. Zum einen wäre denkbar, dass die bei Drücken >100 MPa eintretende Zerstörung der Zellstrukturen des Apfels chemische Interaktionen

zwischen den Allergenen und anderen Substanzen ermöglicht, die bei intakter Zellstruktur nicht möglich sind [32]. Wenn es sich hierbei um eine endogene, enzymatische Reaktion handelt, wäre dieser Effekt durchaus von der Behandlungszeit abhängig und würde sich bei den Regressionsfunktionen in den unterschiedlich hohen Ordinatenabschnitten niederschlagen. Zum anderen könnten rein kompressionsbedingte, nicht zeitdeterminierte Effekte für eine molekulare Veränderung verantwortlich sein, die bei höheren Drücken in den Vordergrund treten. Drei Patienten reagierten im Vergleich zu den anderen neun dieser Testreihe ungewöhnlich. Patient 23 entwickelte bei allen hochdruckbehandelten Proben Quaddeln. Positive Reaktionen bei den 150 und 350 MPa-Proben (beide bei einer Minute Haltezeit) und eine ungewöhnlich ausgeprägte Reaktion auf die mit 550 und 600 MPa behandelten Proben bei fünf Minuten Haltezeit, die noch als negativ bewertet werden musste. Bei Patientin 26 fällt die positive Reaktion der 600 MPa / 5 min-Probe auf. Bis auf diese Ausnahme waren die Reaktionen zwar noch negativ, aber zeigten keine deutliche Abhängigkeit von der Druckhöhe.

Die Messung der Degranulation basophiler Granulozyten im Blut sensibilisierter Patienten nach rMal d 1-Exposition und die Spektroskopie des reinen Allergens in Lösung sollten Aufschluss darüber geben, ob ein rein kompressionsbedingter Effekt vorliegt und welcher Art er gegebenenfalls ist.

Die Ergebnisse der Spektroskopie haben belegt, dass Hochdruck eine molekulare Veränderung herbeiführt. Die CD-Spektroskopie ergab, dass rMal d 1 in nativ gefalteter Konformation α -Helices (ca. 20 %), β -Faltblätter (ca. 20-40 %), Turn- und Zufallsstrukturen (ca. 40-60 %) aufweist. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit dem erstellten Homologiemodell, das in erstaunlicher Weise mit der aufgeklärten Struktur von Bet v 1 übereinstimmt. Abbildung 6.5 stellt das Mal d 1-Modell und Bet v 1 [24] gegenüber.



Abbildung 6.5: Molekülstruktur von Mal d 1 (theoretisch) und Bet v 1

Dafür, dass das Homologiemodell von Mal d 1 als sehr realitätsnah gelten darf, sprechen mehrere Tatsachen:

- Mal d 1 ist ein Bet v 1-homologes Allergen. Dass beide Allergene nicht nur eine hohe sequenzielle, sondern auch konformationelle Ähnlichkeit verbindet, ist anzunehmen.
- Die Vorhersage der Sekundärstruktur hat mit verschiedenen Methoden ein relativ einheitliches Bild ergeben (s. Tabelle 5.14, Seite 82). Anzahl und Lokalisation der geordneten Strukturbereiche stimmen im Rahmen einer gewissen Variabilität überein.
- Die Anteile der Sekundärstrukturen im Modell stimmen mit den aus der CD- und FTIR-Spektroskopie gewonnenen Daten gut überein.

Die erste Messung der CD-Spektren zeigt einen deutlichen Effekt der Hochdruckbehandlung auf die Sekundärstruktur. Der α -Helixgehalt sinkt, β -Faltblätter werden neu gebildet. Diese Strukturverschiebung stellt sich jedoch erst einige Zeit nach der Hochdruckbehandlung ein. Hochdruck initiiert wahrscheinlich eine langsam ablaufende Präzipitation. CD-Spektren, die direkt nach der Behandlung gemessen werden, zeigen eine weniger drastische Veränderung. Möglicherweise wird Mal d 1 durch Hochdruck in den Zustand eines molten globule überführt. Diese Beobachtung wurde auch schon bei anderen Proteinen gemacht [34]. In diesem Zustand sinkt das Molekülvolumen durch die Öffnung von Kavitäten, gleichzeitig sinkt der Anteil geordneter Strukturelemente. Die These wird auch durch die FTIR-Spektren gestützt, die einen druckbedingten Verlust an α -Helices und β -Faltblättern detektiert. Speziell die CD-Spektren, vor allem die von PLL, sowie relevante Daten in der Literatur (siehe Kapitel 3.3.3) legen nahe, dass die Sekundärstrukturen unterschiedlich auf Hochdruck reagieren. α -Helices scheinen am wenigsten druckstabil zu sein, während β -Faltblätter stabiler sind und unter Umständen sogar neu ausgebildet werden. Zufalls- und Turnstrukturen scheinen ebenfalls stabiler zu sein bzw. gebildet zu werden. Betrachtet man das Homologiemodell von Mal d 1, wäre eine Auffaltung der c-terminalen α -Helix mit der Öffnung des hydrophoben Kerns verbunden. Ein Verlust der antiparallelen β -Faltblätter hätte zur Folge, dass diese Sequenzen nach der Hochdruckbehandlung für die Bildung intermolekularer β -Faltblätter zur Verfügung stünden. Dies würde eine langsame Präzipitation begünstigen.

Die Ergebnisse der Messung der Degranulation basophiler Granulozyten zeigten entgegen der Erwartung keinen Verlust der Allergenität nach Hochdruck- oder thermischer Behandlung. Ausgehend von einer druck- oder hitzebedingten Inaktivierung von rMal d 1, sollten die so behandelten Proben zu einer geringeren Degranulation führen als unbehandelte Proben. Der Anteil der degranulierten Zellen stieg jedoch in der Reihenfolge nativ < hochdruckbehandelt < erhitzt bei fast allen

Patienten an. Das Diagramm in Abbildung 6.6 gibt die Durchschnittswerte des Tests wieder, die Werte der Negativkontrollen wurden nicht mit einbezogen.

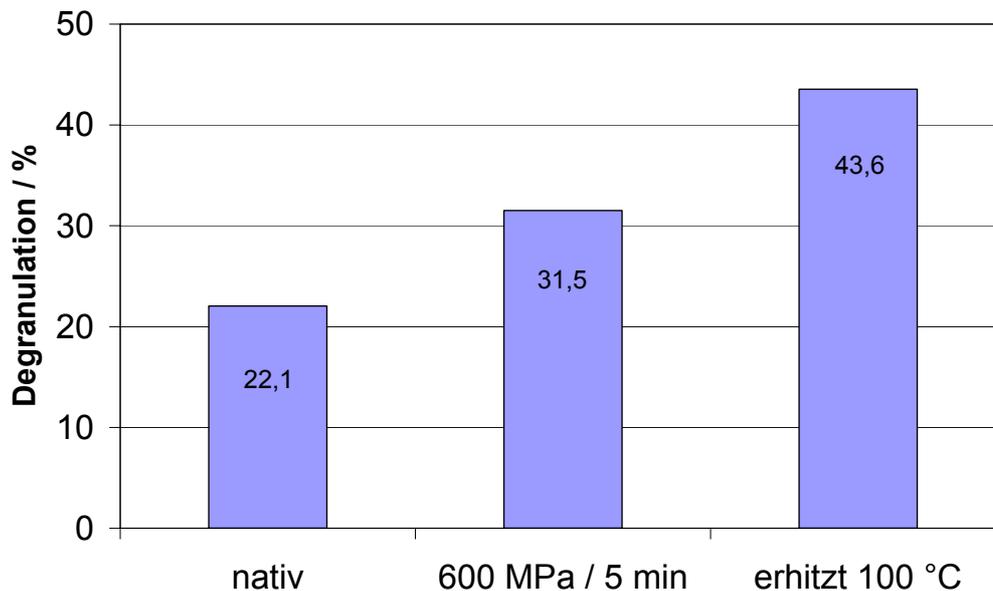


Abbildung 6.6: Durchschnittlicher Anteil an degranulierten basophilen Granulozyten bei neun Patienten nach Stimulation mit rMal d 1

Mögliche Erklärungen für diese Ergebnisse könnten wie folgt aussehen:

Eine druck- oder hitzebedingte Auffaltung der Molekülstruktur ermöglicht im *in vitro*-System des Basotest[®] unter Umständen einen intensiveren Zell-Allergen-Kontakt als *in vivo*. In dem System liegt ein rekombinantes Allergen vor, ohne andere im Apfel enthaltene Substanzen. Je stärker aufgefalteter das Allergen vorliegt, desto mehr Bindungen können einzelne Epitopteile und IgE-Fab eingehen. Die Bindungen wären auf Grund der Denaturierung zwar weniger spezifisch, aber zahlreicher, was zu einer intensiveren Vernetzung auf der Zelloberfläche führt.

Ein weiterer Grund für eine intensivere Vernetzung könnte die bereits erwähnte Präzipitation sein, die in dieser Art nur in der Allergenlösung und nicht im Apfel auftreten kann. Eine Di- oder Polymerisierung von Mal d 1-Molekülen (möglicherweise durch intermolekulare β -Faltblätter) bringt die Epitope der assoziierten Moleküle in eine räumlich-strukturelle Relation. Somit können Epitope von mehreren Molekülen eine Quervernetzung auf der Zelloberfläche herstellen und so zur Degranulation anregen. Hierin könnte der Hauptgrund für dieses Ergebnis zu sehen sein.

Es ist damit in Frage zu stellen, ob der Basotest[®] ein geeignetes System ist, die Potenz denaturierter Allergenlösungen zu testen, insbesondere weil die Auswirkungen eines Prozesses auf das isolierte Allergen in Lösung nicht mit denen in der natürlichen Matrix vergleichbar sind. In der Zellstruktur des Apfels beispielsweise ist eine druck- oder hitzebedingte Präzipitation der Mal d 1-Moleküle untereinander unwahrscheinlich.

Was die Basotest[®]-Reihe gezeigt hat, ist, dass dem Allergen in Lösung eine hochdruckinduzierte Veränderung widerfährt. Die Ergebnisse der CD-Spektroskopie werden damit indirekt bestätigt.

Der für diese Studie etablierte Basotest[®] mit rMal d 1 ist, dessen ungeachtet, ein sensitives und spezifisches *in vitro*-Testsystem zur Detektierung einer Apfelallergie.

6.3 Mechanismen der Reduktion des allergenen Potentials von Mal d 1

Zwei Mechanismen stehen hier zur Diskussion. Zum einen der bereits erwähnte endogene, vermutlich enzymatische Prozess, der durch die druckbedingte Zellzerstörung induziert wird, zum anderen der rein kompressionsbedingte Einfluss auf die intramolekularen Bindungen und damit die Konformation des Moleküls. Es liegt nahe, anzunehmen, dass beide Mechanismen gemeinsam zur Inaktivierung führen und eine gewisse Synergie aufweisen. Diese Art der Inaktivierung scheint nicht nur beim Apfel möglich zu sein, sondern auch bei den anderen in dieser Arbeit vorgestellten Lebensmitteln. Umfangreichere Testreihen zur Bestätigung der Klinik und weitere Analytik der Inaktivierungsmechanismen sind sicherlich nötig.

6.4 Wahrscheinlichkeit hochdruckinduzierter Neoallergene

Verändert man die Struktur von Proteinen, besteht die Möglichkeit, Sequenzen oder Konformationen freizulegen bzw. neu zu bilden, die potenziell immunogene Eigenschaften besitzen. Ist diese Veränderung geeignet, eine Allergie auszulösen, spricht man von einem Neoallergen. Es muss dabei unterschieden werden zwischen Neoallergenen, die zur *de novo*-Sensibilisierung führen können, und Neoallergenen, die kreuzreaktiv zu bekannten Allergenen sind.

Seit in den letzten zehn Jahren vermehrt gentechnisch modifizierte Lebensmittel erforscht und produziert werden, ist auch die genetische Modifikation, die mit einer Expression speziefremder Proteine im Zielorganismus einhergeht, als mögliche Quelle neuer Allergene in der Diskussion. Ein derartiger Fall trat erstmals 1996 ein, als ein allergenes 2S-Albumen Protein gentechnisch von der Paranuss in die Sojabohne übertragen wurde. Patienten, die allergisch auf Paranüsse reagierten zeigten nun auch Symptome nach dem Genuss des genetisch veränderten Soja [69]. TAYLOR et al. [104] empfehlen für jedes gentechnisch veränderte Lebensmittel eine sorgsame Untersuchung potenzieller Allergierisiken.

Die Bildung von Neoallergenen durch physikalisch-chemische Prozesse wurde bei Lebensmitteln nur selten beobachtet. Bei gerösteten Erdnüssen beispielsweise treten Sensibilisierungen gegen Maillardprodukte auf [13]. MALANIN et al. [62] berichten einen Fall von Anaphylaxie nach dem Genuss erhitzter Pekannüsse. Das betroffene Mädchen wies spezifisches IgE gegen ein hitzebehandeltes 15 kDa Protein auf.

VIETHS et al. [112] gelang es, Mäuse spezifisch gegen erhitzten Sellerie zu sensibilisieren. In einer Studie von CODINA et al. [14] wurde nachgewiesen, dass bestimmte Proteine in Sojabohnenhülsen nach Erhitzen ein höheres IgE-Bindungsvermögen besitzen. Die erhöhte Freisetzung von β -Hexosaminidase von RBL-Zellen nach Stimulation mit γ -bestrahltem Selleriepräparat wurde bereits im Grundlagenteil erwähnt.

Insgesamt muss jedoch festgehalten werden, dass diese Phänomene äußerst selten sind und dass die Prozessierung von Lebensmitteln meist zu einer Reduktion der Allergenität führt. Zudem ist das Auftreten echter Neoallergene in Lebensmitteln nur schwer zu erfassen, so lange das betreffende Lebensmittel noch nicht für die Allgemeinheit zugänglich ist. Bevor allergische Symptome auftreten, müsste eine *de novo*-Sensibilisierung auf das Neoallergen stattfinden können. Was die diesbezügliche Beurteilung von hochdruckbehandelten Lebensmitteln angeht, können keine verbindlichen Aussagen getroffen werden. Es sprechen jedoch zwei Tatsachen dafür, dass von der Hochdruckbehandlung *per se* keine Gefahr eines erhöhten allergenen Potenzials ausgeht:

- Schon seit mehr als zehn Jahren sind hochdruckbehandelte Lebensmittel, pflanzlicher wie tierischer Herkunft, kommerziell in vielen Ländern erhältlich. Es ist bisher kein Fall einer spezifischen Sensibilisierung bekannt geworden.
- Die in dieser Arbeit vorgestellten Patienten haben im PTP Test und im OPT in keinem Fall auf die hochdruckbehandelten Proben stärker reagiert als auf die nativen.

Im Einzelfall kann jedoch die Bildung von Neoallergenen nicht ausgeschlossen werden, so dass bei der Zulassung neuer hochdruckprozessierter Lebensmittel eine Risikoanalyse und eventuell klinische Studien empfehlenswert sind.

6.5 Abschließende Betrachtung und Ausblick

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Hochdruckbehandlung neue Wege bei der Herstellung von verträglichen und gleichzeitig minimal prozessierten Lebensmitteln eröffnet. Für zukünftige Arbeiten wäre eine weitere Aufklärung der molekularen Einflüsse der Hochdruckbehandlung interessant. Die propagierte hochdruckinduzierte enzymatische Zerstörung von Allergenen könnte effektiv mittels SDS-PAGE und anschließendem Immunoblot aufgeklärt werden: Die Auftrennung der Proteinextrakte hochdruckbehandelter sowie nativer Lebensmittel könnte druckinduzierte proteolytische Prozesse aufdecken. Eine immunospezifische Färbung könnte Aufschluss über Druckstabilität der Allergene geben. Der Einfluss auf die Molekülkonformation könnte mit Hilfe hochauflösender Methoden wie NMR oder Röntgenkristallographie weiter aufgeklärt werden.

Besonders die Überprüfung der immunologischen und klinischen Relevanz verschiedener hitzestabiler Allergene nach Hochdruckbehandlung könnte interessant sein, wenn sich herausstellt, dass Hochdruck eine neue Inaktivierungsmöglichkeit bietet.

Aber auch andere potenzielle Anwendungen der beobachteten Effekte wären denkbar. Ein Hochdruckprozess, eventuell kombiniert mit thermischer Behandlung, könnte für die Herstellung von Hyposensibilisierungslösungen von Interesse sein. Allergenextrakte und rekombinante Allergene werden seit einiger Zeit als Mittel für die spezifische Immuntherapie (Hyposensibilisierung) erforscht und eingesetzt [12]. KLEIN-TEBBE et al. [56] versprechen sich von „veränderten Allergenen“ künftig eine verbesserte Wirksamkeit der spezifischen Immunotherapie bei geringeren unerwünschten Nebenwirkungen.

7 Zusammenfassung

Birkenpollen assoziierte Allergene lösen die meisten Lebensmittelallergien bei Erwachsenen in Mitteleuropa aus. Zur Untersuchung des Einflusses einer Hochdruckbehandlung auf die Allergenität von Lebensmitteln wurden verschiedene Lebensmittel, deren Allergene Birkenpollen assoziiert sind, ausgewählt. Die Auswahl umfasste Haselnuss, Karotte, Kirsche, Pfirsich, Sellerie und Apfel. Native und hochdruckbehandelte Lebensmittelproben (300 und 600 MPa bei fünfminütiger Haltezeit) wurden mittels Prick to Prick-Test am allergischen Patienten getestet. In vielen Fällen konnte eine Reduktion der Allergenität durch die Hochdruckbehandlung verzeichnet werden, die mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine Veränderung von β 1-homologer Allergene zurückzuführen ist. Die Allergenität einiger Minorallergene scheint durch Druck nicht reduzierbar zu sein, was bei entsprechend sensibilisierten Patienten zu positiven Reaktionen im Prick to Prick-Test trotz vorangegangener Hochdruckbehandlung des Lebensmittels führte.

Die Reduktion der Allergenität wurden am Beispiel des Apfels und seines Majorallergens Mal d 1 klinisch-experimentell und *in vitro* eingehend untersucht. Die Ergebnisse der Pricktests wurden durch orale Provokationstests auf ihre klinische Relevanz überprüft. 19 von 19 Apfelallergikern tolerierten hochdruckbehandelten Apfel bei einer placebokontrollierten verblindeten Provokation ohne Beschwerden. Eingehende Prick to Prick-Tests zeigten, dass die Inaktivierung der Allergene mit der Druckhöhe korreliert.

Rekombinant hergestelltes Mal d 1 wurde in einem neutralen Puffer gelöst und in die native Konformation überführt. Diese Allergenlösung wurde nativ und hochdruckbehandelt spektroskopisch untersucht. CD-Spektren und FTIR-Spektren belegen eine hochdruckinduzierte Veränderung der Proteinstruktur, die vermutlich eine langsam ablaufende Präzipitation auslöst. Die gleiche Allergenlösung wurde benutzt, um *in vitro* basophile Granulozyten in heparinisierendem Blut allergischer Patienten zur Degranulation anzuregen. Hochdruck- und thermisch behandeltes Mal d 1 führten im verwendeten Basotest[®]-System wider Erwarten zu einer stärkeren Degranulation, was möglicherweise auf eine verstärkte Vernetzungsreaktion auf der Zelloberfläche, hervorgerufen durch die hochdruckinduzierte Präzipitation der Mal d 1- Moleküle, zurückzuführen sein könnte.

Der Inaktivierung der Apfelallergene liegen wahrscheinlich zwei Mechanismen zugrunde. Zum einen eine kompressionsbedingte Veränderung der Proteinstruktur, die spektroskopisch und *in vitro* auch belegt werden konnte, zum anderen ermöglicht

die ab 100 MPa beobachtete Zerstörung der Zellstrukturen im Apfel endogene, enzymatische Prozesse, die zur Zerstörung der Allergene führen.

Bei keinem der getesteten Patienten traten stärkere Reaktionen auf das hochdruckbehandelte Lebensmittel ein als auf das native. Auch beim Prick to Prick-Test mit einer Kontrollgruppe anamnestisch gesunder Personen waren keine ungewöhnlichen Reaktionen aufgetreten. Das Auftreten von kreuzreaktiven Neoallergenen in hochdruckbehandelten Lebensmitteln wurde in der Literatur noch nicht beschrieben und auch in dieser Arbeit konnte kein Hinweis darauf gefunden werden. Mögliche nicht kreuzreaktive Neoallergene wurden in dieser Arbeit nicht untersucht, da eine Allergie gegen diese Allergene erst nach einer spezifischen Sensibilisierung auftreten kann.

Die Hochdruckbehandlung als relativ neue Prozesstechnik in der Lebensmittelindustrie kann zur Herstellung von Lebensmitteln mit ausgesprochenem Frischecharakter und minimiertem allergenen Risiko eingesetzt werden.

8 Summary

In central Europe most food allergies in adults are caused by birch pollen related allergens. The aim of this study is to elicit the influence of high pressure treatment on the allergenicity of foods. Several birch pollen allergy related foods were selected for testing. The selection included hazelnut, carrot, cherry, peach, celery and apple. Native and high pressure treated samples (300 MPa and 600 MPa and 5 minutes dwell) were tested by means of prick to prick test in allergic patients. In general, a decrease of allergy symptoms due to high pressure treatment could be observed. An inactivation of the Bet v 1 homologue allergens may be responsible for this effect. Nevertheless, some of the minor allergens seem to be more high pressure resistant. Thus, some patients sensitized to these allergens develop allergic skin reaction despite high pressure treatment.

To investigate mechanisms of high pressure allergen inactivation, apples and the major apple allergen Mal d 1 were analyzed *in vitro* and *in vivo*. Prick to prick test results were affirmed by oral provocation test. In a placebo controlled blinded provocation study 19 / 19 allergic patients, reporting on symptoms after apple consumption, tolerated high pressure treated apple (600 MPa, 5 minutes) without symptoms. Extensive prick to prick tests show a correlation between allergen inactivation and applied pressure altitude.

Recombinant Mal d 1 was dissolved in neutral buffer and transmuted to native conformation. Native and high pressure treated aliquots were analyzed by means of spectroscopy. CD and FTIR spectra showed high pressure induced structural alterations. This is probably leading to a slowly developing precipitation of respective protein. The same allergen solution was used for *in vitro* stimulation of basophile granulocytes in heparinized blood of allergic patients. High pressure and thermally treated Mal d 1 unexpectedly led to higher degranulation ratio in the Basotest[®] system. An enforced bridging due to Mal d 1 precipitation may be responsible for this.

Two molecular mechanisms are likely to be liable for the allergen inactivation: First, alteration of protein structure due to volume compression, verified by spectroscopy and *in vitro* tests and second, an endogenous enzymatic process enabled by high pressure induced cell disruption (pressure >100 MPa).

None of the patients in this study showed more severe reactions to high pressure treated food samples as to native samples. Also a healthy control group (15 persons) showed no remarkable prick to prick test reactions to high pressure treated foods. An occurrence of cross reactive neoallergens in foods due to high pressure treatment has not been documented in current literature so far. Nor does the present study reveal any hints on that. Possible non cross reactive neoallergens have not been analyzed in this study as an allergic reaction to these allergens requires a preliminary specific sensitization.

High pressure processing as a novel technique in food industries can be an innovative chance to produce fresh tasting foods with minimized risk of allergy.

9 Literatur

- 1 ANDRADE MA, CHACON P, MERELO JJ, MORAN F (1993). Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. *Protein Engineering* **6** 383-390
- 2 AULEPP H, VIETHS S (1992). Probleme der Nahrungsmittelallergie. *Deutsche Lebensmittel Rundschau* **88** 171-179
- 3 BALLMER-WEBER BK, HOFFMANN A, WÜTHRICH B, LÜTTKOPF D, POMPEI C, WANGORSCH A, KÄSTNER M, VIETHS S (2002). Influence of food processing on the allergenicity of celery: DBPCFC with celery spice and cooked celery in patients with celery allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **110** 167-173
- 4 BALLMER-WEBER BK, SCHEURER S, FRITSCHKE P, ENRIQUE E, CISTERO-BAHIMA A, HAASE T, WÜTHRICH B (2002). Component-resolved diagnosis with recombinant allergens in patients with cherry allergy. *Allergy* **57** 228-235
- 5 BALLMER-WEBER BK, VIETHS S, LÜTTKOPF D, HEUSCHMANN P, WÜTHRICH B (2000). Celery allergy confirmed by double-blind, placebo-controlled food challenge: A clinical study in 32 subjects with a history of adverse reactions to celery root. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **106** 373-378
- 6 BALLMER-WEBER BK, WÜTHRICH B, WANGORSCH A, FÖTISCH K, ALTMANN F, VIETHS S (2001). Carrot allergy: Double-blinded, placebo-controlled food challenge and identification of allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **108** 301-307
- 7 BESLER M, STEINHART H, PASCHKE A (2001). Stability of food allergens and allergenicity of processed foods, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **756** 207-228
- 8 BREITENEDER H, EBNER C (2000). Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **106** (1) 27-36
- 9 BRIDGMAN PW (1911). Water in the Liquid and Five Solid Forms under Pressure. *Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences* **47** 441-558
- 10 BRIDGMAN PW (1914). The Coagulation of Albumen by Pressure. *Journal of Biological Chemistry* **19** 511-512

- 11 BROWN HM, SU S, THANTREY N (1981). Pricktesting for allergens standardized by using a precision needle. *Journal of Clinical Allergy* **11** 95-98
- 12 CHAPMAN MD, SMITH AM, VAILES LD, ARRUDA LK, DHANARAI V, POMES A (2000). Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **106** (3) 409-418
- 13 CHUNG SY, CHAMPAGNE ET (1999). Allergenicity of Maillard reaction products from peanut proteins. *Journal of Agricultural Food Chemistry* **47** 5227-5231
- 14 CODINA R, OEHLING AG JR, LOCKEY RF (1998). Neoallergens in heated soybean hull. *International Archives of Allergy and Immunology* **117** 120-125
- 15 COOMBS RRA, GELL PGH (1963). The classification of allergic reactions underlying disease, in: *Clinical aspects of immunology*, Davis, Philadelphia
- 16 DAVIDSON B, FASMAN GD (1967). The Conformational Transitions of Uncharged Poly-L-Lysine. *Biochemistry* **6** 1616-1629
- 17 DELÉAGE G, GEOURJON C (1993). An interactive graphic program for calculating the secondary structures content of proteins from circular dichroism spectrum. *Bioinformatics* **9** 197-199
- 18 DGAI DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR ALLERGOLOGIE UND KLINISCHE IMMUNOLOGIE, ÄDA ÄRZTEVERBAND DEUTSCHER ALLERGOLOGEN, DAAU DEUTSCHE AKADEMIE FÜR ALLERGOLOGIE UND UMWELTMEDIZIN (2000). *Weißbuch Allergie in Deutschland 2000*. Urban Vogel Medien- und Medizin- Verlagsgesellschaft
- 19 DOOLITTLE RF (1985). Proteine. *Spektrum der Wissenschaft* **09/1985**
- 20 EBNER C, BIRKNER T, VALENTA R, RUMPOLD H, BREITENBACH M, SCHREINER O, KRAFT D (1991). Common epitopes of birch pollen and apples – studies by Western and Northern blot. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **88** 588-594
- 21 EBNER C, HOFFMANN-SOMMERSGRUBER K, BREITENEDER H (2001). Plant food allergens homologous to pathogenesis-related proteins. *Allergy* **56** 43-44
- 22 EXL BM, DELAND U, SECRETIN MC, PREYSCH U, WALL M, SHMERLING DH (2000). Improved general health status in an unselected infant population following an allergen reduced dietary intervention programme. The ZUFF-study-programme. Part I: Study design and 6-month nutritional behaviour. *European Journal of Nutrition* **39** 89-102

- 23 FRISHMAN D, ARGOS P (1995). Knowledge-based secondary structure assignment. *Proteins: structure, function and genetics* **23** 566-579
- 24 GAJHEDE M, OSMARK P, POULSEN FM, IPSEN H, LARSEN JN, VAN NEERVEN RJJ, SCHOU C, LOWENSTEIN H, SPANGFORT MD (1996). X-ray and NMR structure of Bet v1, the origin of birch pollen allergy. *Nature structural biology*, **3** (12) 1040-1045
- 25 GARNIER J, GIBRAT JF, ROBSON B (1996). GOR Method for Predicting Protein Secondary Structure from Amino Acid Sequence. *Methods in Enzymology* **266** 540-553
- 26 GOMAR J, PETIT MC, SODANO P, SY D, MARION D, KADER JC, VOVELLE F, PTAK M (1996). Solution structure and lipid binding of a nonspecific lipid transfer protein extracted from maize seeds. *Protein Science* **5** 565-577
- 27 GOORMAGHTIGH E, CABIAUX V, RUYSSCHAERT JM (1990). Secondary structure and dosage of soluble and membrane proteins by attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy on hydrated films. *European Journal of Biochemistry* **193** 409-420
- 28 GREBOL N (2002). Commercial use of High Hydrostatic Pressure in Sliced Cooked Ham in Spain. Trends in High Pressure Bioscience and Biotechnology, Hayashi R (Ed.). Elsevier Science B.V. 385-388
- 29 GREENFIELD N (1996). Methods to Estimate the Conformation of Proteins and Polypeptides from Circular Dichroism Data. *Analytical Biochemistry* **235** 1-10
- 30 GREENFIELD N, DAVIDSON B, FASMAN GD (1967). The Use of Computed Optical Rotatory Dispersion Curves for the Evaluation of Protein Conformation. *Biochemistry* **6** 1630-1637
- 31 GREENFIELD N, FASMAN GD (1969). Computed Circular Dichroism Spectra for the Evaluation of Protein Conformation. *Biochemistry* **8** 4108-4116
- 32 GRIMM V (2002). Persönliche Mitteilungen. Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergie am Biederstein, München
- 33 GRIMM V, RING J (2002). "Pollen-associated" food allergy. Why hay fever patients also react to apples and nuts. *MMW Fortschritte der Medizin* **144** 38-40
- 34 GROSS M, JAENIKE R (1994). Proteins under pressure. *European Journal of Biochemistry* **221** 617-630

- 35 GUEX N, DIEMAND A, PEITSCH MC (1999). Protein modelling for all. *Trends in Biochemical Sciences* **24** 364-367
- 36 HAYAKAWA I, LINKO YY, LINKO P (1996). Mechanism of High Pressure Denaturation of Proteins. *Food Science and Technology* **29** (8) 756-762
- 37 HAYAKAWA I, LINKO YY, LINKO P (1996). Novel Mechanical Treatments of Biomaterials. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* **29** 395-403
- 38 HAYASHI R, KAKEHI Y, KATO M, TANIMIZU N, OZAWA S, MATSUMOTO M, KAWAI S, PUDNEY P (2002). Circular dichroism under high pressure. Trends in High Pressure Bioscience and Biotechnology, Hayashi R (Ed.). Elsevier Science B.V. 583-590
- 39 HEINZ V (1997). Wirkung hoher hydrostatischer Drücke auf das Absterbe- und Keimungsverhalten sporenbildender Bakterien am Beispiel von *Bacillus subtilis* ATCC 9372. Dissertation Technische Universität Berlin
- 40 HELM RM, BURKS AW (2000). Mechanisms of food allergy. *Current Opinion in Immunology* **12** 647-653
- 41 HINRICHS J (2001). Thermisch und hydrostatisch induzierte Milchgele als Basis für neuartige Milchprodukte. *Deutsche Milchwirtschaft* **52** 1016-1020
- 42 HINRICHS J (2000). Ultrahochdruckbehandlung von Lebensmitteln mit Schwerpunkt Milch und Milchprodukte – Phänomene, Kinetik und Methodik. Habilitationsschrift, Technische Universität München
- 43 HITE BH (1899). The effect of pressure in the preservation of milk. West Virginia Agricultural Experiment Station 15-35
- 44 HOFFMANN-SOMMERGRUBER K, O'RIORDAIN G, AHORN H, EBNER C, LAIMER DA, CAMARA MACHADO M, PUHRINGER H, SCHEINER O, BREITENEDER H. (1999). Molecular characterization of Dau c 1, the Bet v 1 homologous protein from carrot and its cross-reactivity with Bet v 1 and Api g 1. *Clinical and Experimental Allergy* **29** 840-847
- 45 HOLM J, BÆRENTZEN G, GAJHEDE M, IPSEN H, LARSEN JN, LØWENSTEIN H, WISSENBACH M, SPANGFORT MD (2001). Molecular basis of allergic cross-reactivity between group 1 major allergens from birch and apple. *Journal of Chromatography B* **756** 307-313

- 46 HOLTZHAUER M (Hrsg.), BEHLKE J. (1996). Methoden in der Proteinanalytik. Springer, Berlin
- 47 HSIEH LS, MOOS JR M, LIN Y (1995). Characterization of apple 18 and 31 kd allergens by microsequencing and evaluation of their content during storage and ripening. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **96** 960-970
- 48 ILLGNER S (2000). Einfluss von hydrostatischem Druck und Temperatur auf die Antigenität von β -Lactoglobulin. Diplomarbeit, Fachhochschule Weihenstephan
- 49 JACOBS DR JR, MURTAUGH MA (2000). It's more than an apple a day: an appropriately processed, plant-centered dietary pattern may be good for your health. *American Journal of Clinical Nutrition* **72** 899-900
- 50 JÄGER L (1998). Biochemie, Immunologie und Nomenklatur wichtiger Nahrungsmittelallergene unter Berücksichtigung deren Kreuzreaktivität. *Allergologie* **21** (1) 24-32
- 51 JANKIEWICZ A, BALTES W, BÖGL KW, DEHNE LI, JAMIN A, HOFFAMNN D, HAUSTEIN D, VIETHS S (1997). Influence of Food Processing on the Immunochemical Stability of Celery Allergens. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **75** 359-370
- 52 KANNO C, MU TH (2002). Gel formation of individual milk whey proteins under hydrostatic pressure. Trends in High Pressure Bioscience and Biotechnology, Hayashi R (Ed.). Elsevier Science B.V. 453-460
- 53 KATO T, KATAYAMA E, MATSUBARA S, OMI Y, MATSUDA T (2000). Release of Allergenic Proteins from Rice Grains Induced by High Hydrostatic Pressure. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **48** 3124-3129
- 54 KESSLER HG (1996). Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik. Verlag A. Kessler, München
- 55 KLEIN J (1991). Immunologie. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim
- 56 KLEINE-TEBBE J, FUCHS T, KLIMEK L, KÜHR J, LEPP U, NIGGEMANN B, RAKOSKI J, RENZ H, SALOGA J, SIMON J (2001). Positionspapier der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie inhaltlich abgestimmt mit dem Ärzteverband Deutscher Allergologen. *Pneumologie* **55** 438-444

- 57 LEVY DA, MOUNEDJI N, NOIROT C, LEYNADIER F (1999). Allergenic sensitization and clinical reactions to latex, food and pollen in adult patients. *Clinical and Experimental Allergy* **30** 270-275
- 58 LIU S, MANSON JE, LEE IM, COLE SR, HENNEKENS CH, WILLETT WC, BURING JE (2000). Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease: the Women's Health Study. *American Journal of Clinical Nutrition* **72** 922-928
- 59 LOBLEY A, WALLACE BA (2000). Dichroweb: A Website for the Analysis of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra. *Biophysical Journal (Annual Meeting Abstracts)* **80** 373a
- 60 LOPEZ-CABALLERO ME, PEREZ-MATEOS M, MONTERO P, BORDERIAS AJ (2000). Oyster Preservation by High-Pressure Treatment. *Journal of Food Protection* **63** 196-201
- 61 LÜTTKOPF D, BALLMER-WEBER BK, WÜTHRICH B, VIETHS S (2000). Celery allergens in patients with positive double-blind placebo-controlled food challenge. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **106** 390-398
- 62 MALANIN K, LUNDBERG M, JOHANSSON SG (1995). Anaphylactic reaction caused by neoallergens in heated pecan nut. *Allergy* **50** 988-991
- 63 MASSON P, TONELLO C (2000). Potential Applications of High Pressure in Pharmaceutical Science and Medicine. *High Pressure Research* **19** 223-231
- 64 MEYER E, HÖHN G, FISCHER S, MEYER-PITTRÖFF R, PETRY H, LÜKE W (2001). High hydrostatic pressure: An inactivation procedure to produce a whole inactivated virus vaccine against HIV-1 retaining the native envelope glycoprotein complex. 6th European Conference on Experimental AIDS Research, Edinburgh, 23. - 26. 6. 2001, 70
- 65 MIRZA O, HENRIKSEN A, IPSEN H, LARSEN JN, WISSENBACH M, SPANGFORT MD, GAJHEDE M (2000). Dominant Epitopes and Allergic Cross-Reactivity: Complex Formation Between a Fab Fragment of a Monoclonal Murine IgG Antibody and the Major Allergen from Birch Pollen Bet v 1. *Journal of Immunology* **165** 331-338
- 66 MÖLLER M, PASCHKE A, VIELUF D, KAYAMA M, VIETHS S, STEINHART H (1997). Characterization of allergens in kiwi fruit and detection of cross-reactivity with allergens of birch pollen and related fruit allergens. *Food and Agricultural Immunology* **9** 107-121

- 67 NAKAMURA T, SADO H, SYUKUNOBE Y (1993). Production of low antigenic whey protein hydrolysates by enzymatic hydrolysis and denaturation with high pressure. *Milchwissenschaft* **48** 141-145
- 68 NEUDECKER P, SCHWEIMER K, NERKAMP J, SCHEURER S, VIETHS S, STICHT H, RÖSCH P (2001). Allergic cross-reactivity made visible: solution structure of the major cherry allergen Pru av 1. *The Journal of Biological Chemistry* **276** 22756-22763
- 69 NORDLEE JA, TAYLOR SL, TOWNSEND JA, THOMAS LA, BUSH RK (1996). Identification of a Brazil-Nut Allergen in Transgenic Soybeans. *The New England Journal of Medicine* **334** 688-692
- 70 ORPEGEN PHARMA GMBH (1997). Arbeitsanweisung Basotest® Version 06/97
- 71 ORTOLANI C, BALLMER-WEBER BK, SKAMSTRUP HANSEN K, ISPANO M, WÜTHRICH B, BINDSLEV-JENSEN C, ANSALONI R, VANNUCCI L, PRAVETTONI V, SCIBILIA J, POULSEN LK, PASTORELLO EA (2000). Hazelnut allergy: A double-blind, placebo-controlled food challenge multicenter study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **105** 577-581
- 72 PANICK G, WINTER R (2000). Pressure-Induced Unfolding/Refolding of Ribonuclease A: Static and Kinetic Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study. *Biochemistry* **39** 1862-1869
- 73 PASTORELLO EA, FARIOLI L, PRAVETTONI V, ORTOLANI C, ISPANO M, MONZA M, BAROGLIO C, SCIBOLA E, ANSALONI R, INCORVAIA C, CONTI A (1999). The major allergen of peach (*Prunus persica*) is a lipid transfer protein. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **103** 520-526
- 74 PASTORELLO EA, PRAVETTONI V, FARIOLI L, ISPANO M, FORTUNATO D, MONZA M, GIUFFRIDA MG, RIVOLTA F, SCIBOLA E, ANSALONI R, INCORVAIA C, CONTI A, ORTOLANI C (1999). Clinical role of a lipid transfer protein that acts as a new apple-specific allergen. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **104** 1099-1106
- 75 PASTORELLO EA, VIETHS S, PRAVETTONI V, FARIOLI L, TRAMBAIOLI C, FORTUNATO D, LÜTTKOPF D, CALAMARI M, ANSALONI R, SCIBILIA J, BALLMER-WEBER BK, POULSEN LK, WÜTRICH B, SKAMSTRUP HANSEN K, ROBINO AM, ORTOLANI C, CONTI A (2002). Identification of hazelnut major allergens in sensitive patients with positive double-blind, placebo-controlled food challenge results. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **109** 563-570

- 76 PELTON JT, MCLEAN LR (2000). Spectroscopic Methods for Analysis of Protein Secondary Structure. *Analytical Biochemistry* **227** 167-176
- 77 POULSEN LK (2001). *In vivo* and *in vitro* techniques to determine the biological activity of food allergens. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **756** 41-55
- 78 PRIBIC R, VAN STOKKUM IHM., CHAPMAN D, HARIS PI, BLOEMENDAL M (1993). Protein Secondary Structure from Fourier Transform Infrared and/or Circular Dichroism Spectra. *Analytical Biochemistry* **214** 366-378
- 79 PROVENCHER SW, GLÖCKNER J (1981). Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry* **20** 33-37
- 80 PRUß A, WAGNER W (1995). Eine neue Fundamentalgleichung für das fluide Zustandsgebiet von Wasser für Temperaturen von der Schmelzlinie bis zu 1273 K bei Drücken bis zu 1000 MPa. Fortschr.-Ber. VDI, Reihe 6, Nr. 320, VDI-Verlag, Düsseldorf
- 81 PÜHRINGER H, MOLL D, HOFFMANN-SOMMERGRUBER K, WATILLON B, KATINGER H, DA CAMARA MACHADO ML (2000). The promoter of an apple Ypr10 gene, encoding the major allergen Mal d 1, is stress- and pathogen-inducible. *Plant Science* **152** 35-50
- 82 RAGHAVA GPS (2001). A Graphical Web Server for the Analysis of Protein Sequences and Alignment. *Biotech Software & Internet Report: The Computer Software Journal for Scientists* **2** 254-257
- 83 REINDL J, ANLIKER MD, KARAMLOO F, VIETHS S, WÜTHRICH B (2000). Allergy caused by ingestion of zucchini (Cucurbita pepo): Characterization of allergens and cross-reactivity to pollen and other foods. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **106** 379-385
- 84 RING J (1988). Angewandte Allergologie, 2. Auflage. MMV Medizin Verlag, München
- 85 ROST B (2001). Review: Protein Secondary Structure Prediction Continues to Rise. *Journal of Structural Biology* **0** 1-15
- 86 ROST B, SANDER C (1993). Prediction of Protein Secondary Structure at Better than 70% Accuracy. *Journal of Molecular Biology* **232** (2) 584-599

- 87 ROST B, SCHNEIDER R, SANDER C (1997). Protein Fold Recognition by Prediction-based Threading. *Journal of Molecular Biology* **270** (3) 471-480
- 88 SACHS L (1969). Statistische Auswertemethoden. Springer, Berlin
- 89 SALCEDO G, DIAZ-PERALES A, SANCHEZ-MONGE R (1999). Fruit allergy: plant defence proteins as novel potential panallergens. *Clinical and Experimental Allergy* **29** 1158-1160
- 90 SASAGAWA A, YAMAZAKI A (2002). Development and Industrialisation of Pressure-Processed Foods. Trends in High Pressure Bioscience and Biotechnology, Hayashi R (Ed.). Elsevier Science B.V. 375-384
- 91 SCHEIBENZUBER M, RUß W, GÖRG A, MEYER-PITTOFF R (2002). Scanning Electron Microscopic Study of High Pressure Induced Microstructural Changes of Proteins in Turkey and Pork Meat. Trends in High Pressure Bioscience and Biotechnology, Hayashi R (Ed.). Elsevier Science B.V. 545-550
- 92 SCHÖBERL H (1999). Physikalisch-chemische und strukturelle Auswirkung einer hydrostatischen Hochdruckbehandlung auf Lebensmittel. Dissertation, Technische Universität München
- 93 SKAMSTRUP HANSEN K, VESTERGAARD H, STAHL SKOV P, SONDERGAARD KHINCHI M, VIETHS S, POULSEN LK, BINDSLEV-JENSEN C (2001). Double-blind, Placebo-controlled Food Challenge with Apple. *Allergy* **56** 109-117
- 94 SMELLER L, RUBENS P, HEREMANS K (1999). Pressure Effekt on the Temperature-Induced Unfolding and Tendency To Aggregate of Myoglobin. *Biochemistry* **38** 3816-3820
- 95 SMITH PK, KROHN RI, HERMANSON GT, MALLIA AK, GARTNER FH, PROVENZANO MD, FUJIMOTO EK, GOEKE NM, OLSON BJ, KLENK DC (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* **150** 76-85
- 96 SON DY (1999). Klonierung und Epitopanalyse von Isoformen des Hauptallergens Mal d 1 aus Äpfeln. Dissertation, Technische Universität Berlin
- 97 SON DY, SCHEURER S, HOFFMANN A, HAUSTEIN D, VIETHS S (1999). Pollen-related food allergy: cloning and immunological analysis of isoformes and mutants of Mal d 1, the major apple allergen, and Bet v 1, the major birch pollen allergen. *European Journal of Nutrition* **38** 201-215

- 98 SREERAMA N, VENYAMINOV SY, WOODY RW (2000). Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Inclusion of Denatured Proteins with Native Proteins in the Analysis. *Analytical Biochemistry* **287** 243-251
- 99 SREERAMA N, WOODY RW (2000). Estimation of protein secondary structure from CD spectra: Comparison of CONTIN, SELCON and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Analytical Biochemistry* **282** 252-260
- 100 SUSANI M, JERTSCHIN P, DOLECEK C, SPERR WR, VALENT P, EBNER C, KRAFT D, VALENTA R, SCHEINER O (1995). High level expression of birch pollen profilin (Bet v 2) in *Escherichia coli*: purification and characterization of the recombinant allergen. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **215** (1) 250-263
- 101 SUZUKI A (2002). High pressure-processed foods in Japan and the world. Trends in High Pressure Bioscience and Biotechnology, Hayashi R (Ed.). Elsevier Science B.V. 365-374
- 102 TANAKA N, IKEDA C, KANAORI K, HIRAGA K, KONNO T, KUNUGI S (2000). Pressure Effect on the Conformational Fluctuation of Apomyoglobin in the Native State. *Biochemistry* **39** 12063-12068
- 103 TAUSCHER B (1995). Pasteurisation of food by high pressure: chemical aspects. *Lebensmittel Untersuchung und Forschung* **200** 3-13
- 104 TAYLOR SL, HEFLE SL (2001). Will genetically modified food be allergic?. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **107** (5) 765-771
- 105 UEHARA M, SATO K, ABE Y, KATAGIRI M (2001). Sequential IgE epitope analysis of a birch pollen allergen (Bet v1) and an apple allergen (Mal d1). *Allergology International* **50** 57-62
- 106 VANEK-KREBITZ M, HOFFMANN-SOMMERGRUBER K, LAIMER DA CAMARA MACHADO M, SUSANI M, EBNER C, KRAFT D, SCHEINER O, BREITENEDER H (1995). Cloning and sequencing of Mal d 1, the major allergen from apple (*Malus domestica*), and its immunological relationship to Bet v 1, the major birch pollen allergen. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **214** (2) 538-551
- 107 VAN LOON LC, PIERPOINT WS, BOLLER T, CONEJERO V (1994). Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology Reporter* **12** 245-64.

- 108 VAN LOON LC, VAN STRIEN EA (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 types proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **55** 85-97
- 109 VIETHS S, AULEPP H, SCHÖNING B, BALTES W (1993). Identifizierung kreuzreagierender Allergene in Pollen und pflanzlichen Lebensmitteln. *Lebensmittelchemie* **47** 49-53
- 110 VIETHS S, AULEPP H, SCHÖNING B, TSCHIRNICH R (1995). Untersuchung zur Apfelallergie bei Birkenpollenallergikern. *Allergologie* **18** (3) 89-97
- 111 VIETHS S, AULEPP H, WOLLENBERGER H, FISCHER K, DEHNE LI, BÖGL KW (1994). Versteckte Allergene in Lebensmitteln. *Bundesgesundheitsblatt* **2/94**
- 112 VIETHS S, HOFFMANN A, HOLZHAUSER T, MULLER U, REINDL J, HAUSTEIN D (1998). Factors influencing the quality of food extracts for *in vitro* and *in vivo* diagnosis. *Allergy* **53** 65-71
- 113 VIETHS S, JANKIEWICZ A, SCHÖNING B, HAUENSTEIN D (1996). Profilin – ubiquitäre Proteine mit spezifischer physiologischer Funktion und potente Pflanzenallergene, Teil 1: Regulation der Aktinpolymerisation, Teil 2: Signaltransduktion, Molekülstruktur und Allergenität. *Allergo Journal* **5** 89-92 und 157-163
- 114 VIETHS S, SCHÖNING B, PETERSEN A (1994). Characterisation of the 18-kDa Apple Allergen by Two-Dimensional Immunoblotting and Microsequencing. *International Archives of Allergy and Immunology* **104** 399-404
- 115 WEEMAES CA, LUDI KHUYZE LR, VAN DEN BROECK I, HENDRICKX ME (1998). Kinetics of combined pressure-temperature inactivation of avocado polyphenoloxidase. *Biotechnology and Bioengineering* **60** 292-300
- 116 WEN J, VANEK-KREBITZ M, HOFFMANN-SOMMERGRUBER K, SCHEINER O, BREITENEDER H (1997). The Potential of Bet v 1 Homologues, a Nuclear Multigen Family, as Phylogenetic Markers in Flowering Plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **8** (3) 317-333
- 117 WILSON IB, HARTHILL JE, MULLIN NP, ASHFORD DA, ALTMANN F (1998). Core alpha1,3-fucose is a key part of the epitope recognized by antibodies reacting against plant N-linked oligosaccharides and is present in a wide variety of plant. *Glycobiology* **8** 651-661

- 118 WÜTHRICH B (1983). Allergologische Diagnostik bei atopischen Erkrankungen. In: Fortschritte der praktischen Dermatologie und Venerologie (Braun-Folko O. und Burg G., Ed.), Springer Verlag , Berlin, 261-262
- 119 WÜTHRICH B (1997). Oral allergy syndrome to apple after a lover's kiss. *Allergy* **52** 235-236
- 120 YAMAMOTO S, OTSUKA Y, MASUDA K, IKEUCHI Y, NISHIUMI T, SUZUKI A (2002). Effects of high pressure treatment on rabbit muscle proteasome. Trends in High Pressure Bioscience and Biotechnology, Hayashi R (Ed.). Elsevier Science B.V. 205-210
- 121 YMAN L (1990). Die neue Generation der Allergie-Testung: Pharmacia CAP System. *in-vitro Diagnostica Special* 118-22

10 Anhang

10.1 Votum der Ethikkommission

**Ethikkommission der Medizinischen Fakultät
der Technischen Universität München**

28. 06. 2001

Prof. Dr. A. Schömiß, Vorsitzender
Prof. Dr. F.B. Hofmann, stellvertretender Vorsitzender
Prof. Dr. G. Schmidt, Geschäftsführung
Tel. 4140-4371, Fax: 4140-4199

Herrn
Prof. Dr. J. Rakoski
Klinik für Dermatologie und Allergologie
Biedersteiner Str. 29

80802 München

Projektnummer: 512/01 (bitte bei jedem Schriftwechsel angeben)

Sehr geehrter Herr Kollege Rakoski,

in der Sitzung der Ethikkommission vom Dienstag, den 26. 06. 2000, wurde das von Ihnen eingereichte Projekt »Analyse des Einflusses einer Hochdruckbehandlung auf die Allergenität von Lebensmitteln« besprochen. Zur Begutachtung lagen Studienprotokoll, Kurzfassung und Patientenaufklärung/Einverständniserklärung vor. Die Ethikkommission, die sich aus den Mitgliedern Herr Prof. Dr. A. Schömiß, Herr Prof. Dr. F.B. Hofmann, Herr Prof. Dr. G.H. Schlund, Herr Prof. Dr. H. Präuer, Herr Prof. Dr. K. Ulm und Herr Dr. Haubenthaler, zusammensetzte, kam zu folgendem Votum:

Die Ethikkommission erhebt keine Einwände gegen die Durchführung der Studie.

Nach Abschluß der Studie sollen die Ergebnisse der Ethikkommission mitgeteilt werden, bzw. soll nach Publikation ein Sonderdruck zur Information an die Ethikkommission geschickt werden. Die Auflagen der Deklaration des Weltärztebundes von Helsinki, zuletzt geändert in Edinburg im Oktober 2000, hinsichtlich der ethischen und rechtlichen Aspekte biomedizinischer Forschung am Menschen sind strikt zu beachten. Die ärztliche und juristische Verantwortung verbleibt beim Projektleiter und seinen Mitarbeitern. Bitte beachten Sie, daß alle Änderungen in Protokoll, Patienteninformation und Aufklärung als auch alle schweren unerwarteten Nebenwirkungen oder Todesfälle schriftlich der Ethikkommission mitgeteilt werden müssen. Daneben bitte ich Sie zu beachten, daß Patientenaufklärung und –einverständniserklärung getrennt von Arzt und Patient unterschrieben und mit Datum gekennzeichnet werden müssen und jeweils ein Exemplar der Aufklärung beim Patienten verbleiben sollte.

Mit freundlichem Gruß

Prof. Dr. A. Schömiß
Vorsitzender

Abbildung 10.1: Kopie des Schreibens der Ethikkommission vom 28.06.2001

10.2 Rohdaten zum Pricktest mit Apfel (Parameteranalyse)

Patient	18			15			31		
	0 min	1 min	5min	0 min	1 min	5min	0 min	1 min	5min
	Quaddelfläche / cm ²								
Positiv	0,37			0,35			0,34		
Negativ	0			0			0		
Nativ	0,14			0,26			0,2		
100 MPa	0,1	0,07	0,09	0,07	0,07	0,15	0,15	0,045	0,03
150 MPa	0,09	0,03	0,06	0,13	0,05	0,07	0,035	0,04	0,03
200 MPa	0,04	0,03	0,02	0,06	0,04	0,04	0,02	0	0,015
250 MPa	0,03	0,02	0	0,05	0,03	0,01	0,02	0,02	0,04
300 MPa	0,03	0,01	0,01	0,02	0,01	0	0,005	0	0,015
350 MPa	0,02	0	0	0,025	0	0	0,015	0	0,015
400 MPa	0,015	0,01	0	0,025	0,01	0	0,01	0	0
450 MPa	0,01	0	0	0,015	0	0	0	0	0,01
500 MPa	0,01	0	0	0,01	0	0	0	0	0
550 MPa	0,015	0	0	0	0	0	0,01	0	0
600 MPa	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Patient	23			32			27		
	0 min	1 min	5min	0 min	1 min	5min	0 min	1 min	5min
	Quaddelfläche / cm ²								
Positiv	0,095			0,34			0,295		
Negativ	0			0			0		
Nativ	0,28			0,055			1		
100 MPa	0,13	0,25	0,25	0,035	0,015	0,015	0,295	0,26	0,17
150 MPa	0,08	0,17	0,075	0,015	0,025	0,01	0,105	0,125	0,12
200 MPa	0,05	0,07	0,12	0,015	0,01	0,015	0,03	0,065	0,045
250 MPa	0,04	0,08	0,02	0,01	0,01	0,01	0,035	0,06	0,055
300 MPa	0,045	0,08	0,02	0,01	0,005	0,005	0,01	0,035	0,045
350 MPa	0,06	0,145	0,02	0,005	0,01	0,005	0,02	0,02	0,02
400 MPa	0,05	0,065	0,01	0,005	0,005	0,005	0	0,015	0
450 MPa	0,1	0,03	0,01	0	0,005	0	0	0	0,015
500 MPa	0,05	0,065	0,015	0	0	0	0	0	0,015
550 MPa	0,05	0,035	0,06	0,005	0	0	0	0	0
600 MPa	0,035	0,065	0,115	0	0,005	0	0	0	0

Patient	26*			25			28		
	0 min	1 min	5min	0 min	1 min	5min	0 min	1 min	5min
	Quaddelfläche / cm ²								
Positiv	0,225	0,225		0,26			0,335		
Negativ	0	0		0			0		
Nativ	0,455	0,53		0,48			0,255		
100 MPa	0,14	0,08	0,12	0,19	0,135	0,09	0,16	0,04	0,12
150 MPa	0,155	0,115	0,14	0,15	0,145	0,12	0,035	0,04	0,025
200 MPa	0,105	0,06	0,095	0,065	0,16	0,075	0,02	0	0,005
250 MPa	0,11	0,06	0,09	0,09	0,16	0,085	0,015	0,03	0,04
300 MPa	0,175	0,13	0,095	0,13	0,065	0,145	0,005	0	0,02
350 MPa	0,12	0,075	0,05	0,1	0,08	0,125	0,015	0	0,01
400 MPa	0,14	0,095	0,065	0,07	0,12	0,07	0,005	0	0
450 MPa	0,095	0,08	0,07	0,06	0,06	0,06	0	0	0,005
500 MPa	0,07	0,04	0,05	0,09	0,05	0,085	0	0	0
550 MPa	0,085	0,02	0,04	0,075	0,055	0,08	0	0	0
600 MPa	0,08	0,15	0,24	0,02	0,01	0,015	0	0	0
Patient	29			24			30		
	0 min	1 min	5min	0 min	1 min	5min	0 min	1 min	5min
	Quaddelfläche / cm ²								
Positiv	0,115			0,145			0,25		
Negativ	0			0			0		
Nativ	0,16			0,08			0,055		
100 MPa	0,115	0,125	0,085	0,04	0,03	0,03	0,04	0,04	0,02
150 MPa	0,065	0,075	0,065	0,02	0,035	0,005	0,025	0,025	0,01
200 MPa	0,025	0,06	0,065	0,005	0,02	0,01	0,015	0,01	0,005
250 MPa	0,03	0,03	0,05	0,005	0,005	0,01	0,01	0,035	0,005
300 MPa	0,035	0,02	0,06	0	0	0,005	0,005	0,01	0,01
350 MPa	0,025	0,02	0,05	0,015	0,005	0	0	0,005	0,005
400 MPa	0,01	0,005	0,02	0	0	0	0	0,01	0,005
450 MPa	0,005	0	0,025	0,001	0	0	0,005	0	0,005
500 MPa	0	0	0,02	0	0	0	0	0,005	0
550 MPa	0	0	0,01	0	0	0	0	0	0
600 MPa	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* Der Test wurde bei Patient 26 an zwei verschiedenen Tagen durchgeführt.