

INHALTSVERZEICHNIS

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

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