

Hochschule Neubrandenburg
Fachbereich Agrarwirtschaft und Lebensmittelwissenschaften
Studiengang Lebensmitteltechnologie
SS 2009

Isolierung des Fischallergens Parvalbumin aus Thunfisch

Diplomarbeit zur Erlangung des akademischen Grades
Diplom-Lebensmitteltechnologe (FH)

Projektpartner : Hochschule Neubrandenburg

Verfasser: Matthias Schütz

Erstprüfer: Prof. Dr. Christine Wittmann

Zweitprüfer: Dr. Bettina Albrecht

urn:nbn:de:gbv:519-thesis 2009-0250-7

Abstract

Fish, as an important food source, has large potential to anaphylactic reactions. People with allergies are endangered by the world-wide trade of fish and the different declaration rules of the fish in the respective countries. This degree dissertation represents a section of a research project focusing on the fish allergen parvalbumin. Parvalbumin is the major fish allergen with a high rate of cross reactivity. In the present study the extraction und isolation of the protein parvalbumin from tuna was achieved. This isolation was accomplished by ammonium sulfate precipitation and following gel chromatography. For the check separation of the proteins a SDS-Polyacrylamid gels were used.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1 Einleitung	2
1.1 Allergien	2
1.2 Fisch als Allergieauslöser	3
1.3 Das Protein Parvalbumin	4
2 Material	5
2.1 Chemikalien	6
2.2 Puffer	6
2.3 Geräte	8
2.4 Sonstige Materialien	9
3 Methoden	10
3.1 Rohproteinaufschluss	10
3.2 Ammoniumsulfatfällung	13
3.3 Dialyse	14
3.4 Gelpermeationschromatographie (GPC)	16
3.5 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	17
3.5.1 Fixieren und Färben	17
3.5.2 SDS-Gel	18
3.6 Bradford-Test	19
3.7 Lyophilisierung	20
4 Ergebnisse	21
4.1 Thunfisch in Dosen	21
4.2 Thunfischfilet	22
4.3 Gelbflossen-Thunfisch	23
5 Diskussion	33
6 Zusammenfassung	36
7 Literaturverzeichnis	37
Verzeichnis der Tabellen	39
Verzeichnis der Abbildungen	41
Anlagenverzeichnis	43

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
AAR	Antikörper-Antigen-Reaktion
BSA	Rinderserumalbumin (eng. bovine serum albumin)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
GPC	Gel-Permeations-Chromatographie
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (eng. high pressure liquid chromatography)
IC	Ionenaustauschchromatographie
Ig	Immunglobuline
M	Mol/l
MG	Molekulargewicht
MWCO	Molekular Weight Cut Off
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (eng. phosphate buffered saline)
PV	Parvalbumin
RP/HPLC	Umkehr Phase – Hochdruckflüssigkeitschromatographie (eng. reversed phase high pressure liquid chromatography)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (eng. sodium dodecyl sulfate – polyacrylamid gel electrophoresis)
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

1 Einleitung

1.1 Allergien

Allergien sind verstärkte, immunologische Abwehrreaktionen, die lebensbedrohlich sein können. Substanzen, die dafür verantwortlich sind, bezeichnet man als Allergene (Antigene). Unter Vermittlung des Immunsystems werden so Überempfindlichkeitsreaktionen (Allergien) ausgelöst. In der Regel handelt es sich bei allergenen Substanzen um Eiweißverbindungen, bzw. binden die Substanzen dieses und wirken dadurch allergen. Zu den Allergenen gehören Albumine, Pollen, Schimmelpilze und viele andere. Die Aufnahme kann durch Inhalation, Ingestion (Essen), Injektion, Invasion (durch Bakterien, Parasiten) oder durch Körperkontakt erfolgen. Die aufgenommenen Stoffmengen können hierbei sehr gering sein, um zu anaphylaktischen Reaktionen zu führen (Geisler, 1992). Bei Allergien kommen Allergene mit dem Organismus in Kontakt. Der Körper erkennt diese Stoffe und bildet nun Antikörper (bzw. Immunzellen), welche gegen die Antigene gerichtet sind. Bei dieser Reaktion können verschiedene Immunglobuline (Ig) gebildet werden. Bei Allergien wird z.B. das IgE gebildet; während bei einem Kontakt mit Bakterien oder Viren das IgG gebildet wird. Zu einer anaphylaktischen Reaktion kommt es, wenn diese immunbiologische Reaktion zu stark ausfällt (Geisler, 1992). Der Körper reagiert im Fall von Allergenen auf Stoffe, die eigentlich keine Gefahr darstellen. Diese unerwünschte Reaktion führt jedoch zu Beschwerden, die den ganzen Körper erfassen. Das Gewebe und Organe können sich entzünden; weitere Beschwerden sind oft Atemnot, Fieber, Niesreiz, Kreislaufzusammenbrüche, Übelkeit oder auch Durchfall. Der Unterschied zu einer normalen Erkrankung ist, dass bei einer Erstaufnahme in der Regel keine allergische Reaktion erfolgt. Bei einem Erstkontakt mit dem Allergen werden die IgM, ein Pentamer aus Antikörpern gebildet. Eine Immunantwort wird vorbereitet. Bei wiederholter Aufnahme erfolgt dann eine allergische Reaktion und es bildet sich IgE. Wird das Allergen weiter aufgenommen, wird sich der allergische Effekt verstärken (Stiftung Warentest, 1998).

Immunoglobulin E (IgE) stammt aus dem lymphatischen Gewebe und macht nur eine Menge von 0,001 % der Immunglobuline aus, ist jedoch Auslöser für 90 % der allergischen Reaktionen. Ein Grund hierfür ist das Vorhandensein von IgE an Partien des Körpers, die leicht mit Allergenen in Kontakt kommen, wie Schleimhäute und Haut. Ist IgE in dieser Position und es kommt zu einer Antigen-Antikörper-Reaktion (AAR) können Entzündungsreaktionen die Folge sein. Diese

Reaktionen, welche direkt nach dem Kontakt auftreten, werden Soforttyp genannt. Hierzu gehören alle IgE vermittelten Allergien, wie Heuschnupfen oder Bronchialasthma (Stiftung Warentest, 1998). Der Spättyp ist eine Allergen-Immunzellen-Reaktion. Hier treten Verzögerungen von bis zu zwei Tagen auf, ein typischer Vertreter ist hier das Kontaktekzem (Stiftung Warentest, 1998; Geisler, 1992).

Hervorzuheben ist, dass die AAR überlebenswichtig ist. Auch wenn der Körper bei Allergien „überreagiert“, so schützt das Immunsystem den Körper vor Fremdstoffen, die Schaden anrichten würden (Stiftung Warentest, 1998).

Kreuzallergien sind allergische Reaktionen, deren Ursachen auf verschiedenen Quellen beruhen, wobei jedoch der gleiche Antikörper gebunden wird. Voraussetzung sind hierfür sogenannte Epitope. Dies sind Abschnitte eines Antigens, gegen den das Immunsystem Antikörper bildet. Der Körper erkennt diese Epitope, welche IgE reaktiv sind. (Bugajska-Schretter et al., 1998; Ferreira et al., 2004). Von vielen Proteinen existierten die cDNA-Sequenzen und damit in den meisten Fällen auch die 3D-Strukturen. Die meisten Allergene können so in Struktur-Proteingruppen zusammengefasst werden. Diese ähnlichen Strukturen stellen die molekulare Basis für allergische Kreuzreaktionen dar. Im Allgemeinen kommt es nur zu Kreuzreaktionen, wenn mindestens 70 % der cDNA-Sequenz übereinstimmen (Ferreira et al., 2004).

1.2 Fisch als Allergieauslöser

Thunfisch oder Sardellen mit dunklem Fleisch sind Fische, die einen hohen Gehalt an freiem Histamin aufweisen. Beim Verzehr von größeren Mengen dieses biogenen Amins, kann es bereits zu allergischen Reaktionen kommen (Stiftung Warentest, 1998). Bei Histamin handelt es sich um ein Hormon, welches auch als Mittlersubstanz bezeichnet wird. Histamin ist eine pseudoallergisch wirkende Substanz, da es Allergiesymptome direkt auslösen kann, ohne Vermittlung durch Antikörper, wie es für eine Allergie typisch ist. Bei einer „echten“ Allergie führt die Ausschüttung von Histamin aus den Mastzellen der Schleimhäute zu Juckreiz. In den Bronchien verkrampft die Muskulatur, es kommt zu Atemnot. Der Magen reagiert mit erhöhter Produktion von Magensäure, was zu Krämpfen und Durchfall führt, zusätzlich kann der Blutdruck rapide absinken. Auslöser von „echten“ Allergien sind meist bioaktive Moleküle (Stiftung Warentest, 1998). Zu diesen gehört auch Parvalbumin (PV), welches als Hauptallergen für Fisch bekannt ist (Van Do et al., 2005). Diese Moleküle erhöhen den Anstieg von IgE im Blutserum. Sie können

die Mastzellen direkt reizen oder fördern die Ausschüttung von entzündungsfördernden Substanzen. Andere Allergene erweitern die Blutgefäße und erhöhen die Durchlässigkeit, so dass es zu Hautschwellungen oder Quaddeln kommt (Stiftung Warentest, 1998). Fischallergene haben ein hohes allergenes Potential, so genügen bereits Mengen von 0,0001 µg des Allergens, um allergische Reaktionen zu verursachen. Kuhmilch als Vergleich würde eine Menge von 0,1 µg benötigen. Da Fischallergene in der Regel hitzestabil sind, können Allergiker den Fisch weder roh noch gekocht verspeisen. Empfindliche Allergiker reagieren bereits auf Kochdämpfe mit Ausschlag und asthmatischen Anfällen (Stiftung Warentest, 1998). Durch die hohe Sequenzhomologie der Parvalbumine kommt es zu Kreuzallergien. So zeigen Fischallergiker meist auf mehrere Fischarten anaphylaktische Reaktionen (Bugajska-Schretter et al., 1998).

1.3 Das Protein Parvalbumin

Parvalbumin ist ein saures Protein. Hohe Konzentrationen des Proteins sind in Fischen und Amphibien zu finden (Chen, 2006). PV kommt aber auch in Säugetieren vor, so wurde das Protein auch in Ratten oder Katzen nachgewiesen (Stichel et al., 1986; Berchtold et al., 1982). Das Molekulargewicht beträgt ca. 12 kDa. Die Hauptaufgabe ist das Transportieren und Binden von Calcium; so werden physiologische und zelluläre Funktionen gesteuert. PV unterstützt und steuert schnelle Muskelbewegungen, indem es die maximale Geschwindigkeit zwischen Kontraktion und Entspannung bestimmt. PV ist auch in Nichtmuskelzellen enthalten, wo es beispielsweise die Konzentration an Calcium in den Nervenzellen regelt (Arif, 2009). Die Konzentration von PV in Nervenzellen ist bedeutend für die Hirnleistung. Das Erinnern, Denken und Merken läuft nur optimal, wenn die Nervenzellen im Gleichtakt arbeiten. Durch Parvalbumin-Neuronen, welche so genanntes Protein bilden, werden Gammawellen erzeugt. Bei einer Veränderung der Gammawellen kommt es zu einer Veränderung der Verarbeitung von Informationen. So weisen Autisten eine veränderte Intensität der Gammawellen auf. Bei Schizophrenie sind zu wenig Parvalbumin-Neuronen vorhanden (Sohal et al., 2009). Ferner kann eine Störung in diesem Mechanismus bzw. ein Mangel an Parvalbumin, epileptische Anfälle hervorrufen. Das Herz kann durch einen Mangel an PV beeinträchtigt werden. Eine Störung des diastolischen Blutdrucks kann so zu Herzfehlern führen (Arif, 2009).

Fisch und Fischerzeugnisse werden heute weltweit verkauft. Wird ein Fischerzeugnis, also ein Lebensmittel aus Fisch oder Fischteilen angeboten (Leitsätze für Fisch, Krebse und Weichtiere

und Erzeugnisse daraus, 2008), ist dieses in der Regel leicht als Gefahr für den Allergiker zu erkennen. Doch in Zeiten des weltweiten Marktes und ständig neuer Produkte im Handel, ist es manchmal nicht leicht zu erkennen, ob Fisch in der Zutatenliste enthalten ist. Eine nicht ausreichende Deklaration stellt die größte Gefahrenquelle dar (Reese et al., 2007). Seit dem 25. November 2005 gilt europaweit die EU-Allergenkennzeichnungsverordnung auf verpackten Lebensmitteln. Laut dieser Vorschrift müssen allergene Proteine gekennzeichnet sein, auch wenn diese nur in Spuren enthalten sein könnten.

Für den Nachweis von Fischallergenen gibt es bisher kein zuverlässiges System. Eine Arbeit beschäftigte sich mit dem Nachweis von Parvalbumin aus Makrelen. Mittels einem PCR Test, wurde die DNA überprüft bzw. nachgewiesen. Dieser Test war jedoch nicht empfindlich genug, um auch geringste Mengen an Fischbestandteilen nachzuweisen (Choi et al., 2007). Ein weiteres Problem sind die unzähligen Fischarten, welche teils gleiche, aber auch unterschiedliche oder mehrere Parvalbumine enthalten (Van Do et al., 2005; Piront, Gosselin-Ray, 1975). Diese vorliegende Arbeit stellt einen Abschnitt in einem Forschungsprojekt dar, in welchem ein Schnelltest entwickelt werden soll, um in komplex zusammengesetzten und nicht ausreichend gekennzeichneten Lebensmitteln Fischbestandteile nachzuweisen. Zu diesem Zweck werden verschiedene Fischarten und deren Parvalbumine isoliert. Hierbei ist es nötig, mehrere Parvalbumine zu isolieren, da ein monoklonaler Antikörper nicht alle Isoformen der Parvalbumine erkennt (Chen et al., 2006). Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Thunfisch, welcher, neben den anderen Fischarten, einer der am meist verzehrten Fische ist (www.Fischinfo.de, 2009). Ziel dieser Arbeit ist es, das Parvalbumin des Thunfisches zu isolieren, so dass es möglich wird, monoklonale Antikörper für die Entwicklung eines immunchemischen Nachweisverfahrens herzustellen.

2 Material

Es wurden ein Thunfischfilet sowie verschiedene Thunfischdosen (s. Tabelle 1) im Handel erworben. Ein frischer Gelbflossen-Thunfisch mit einem Meter Länge und einem Gewicht von 13,7 kg, von „Deutsche SEE“ diente ebenfalls als Probe.

Tabelle 1: Produktübersicht der Thunfischdosen

Thunfischproben	Zutaten
TUNAFISH FILLETS -CLASSIC- „SEA GOLD“	Thunfisch, Wasser, Speisesalz
LE PÊCHEUR –CLASSIQUE-	Thunfisch, Wasser, Speisesalz
Thunfisch-Filets Naturale ohne Öl < 1% Fett, “Saupiquet”	Thunfisch, Wasser, Speisesalz
Thunfisch-Filets Naturale ohne Öl “Saupiquet”	Thunfisch, Wasser, Speisesalz
Thunfisch-Stücke (Skipjack) “LA MIRANDA”	Thunfisch, Wasser, Speisesalz

2.1 Chemikalien

Für die Versuche wurden folgende Chemikalien verwendet: Natriumdihydrogenphosphat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Dinatriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Ammoniumsulfat (Reinheit 99,0 %), TRIS, Glycerol, SDS, Coomassie Brilliant Blau R250, β -Mercaptoethanol, Bradford Reagenz, Glycin. Handelsübliche Chemikalien besaßen p.A. Qualität.

2.2 Puffer

Der Gel-Permeations-Chromatographie-Puffer (GPC-Puffer) für die Rohextraktion setzte sich aus den Komponenten Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4), Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4), Natriumchlorid und bidestilliertes Wasser zusammen. Die Konzentration des PBS-Puffers (phosphate buffered saline) betrug 0,01 M. Die Natriumchlorid-Konzentration betrug 0,15 M in der Lösung. Die Ingredienzien wurden in bidestilliertem Wasser und mittels Ultraschallbad gelöst. Der pH-Wert der Lösung wurde durch 1 M Natronlauge auf pH 7,0 eingestellt. Ein weiterer Puffer für die Extraktion waren der Tris/Glycin-Puffer, dieser entsprach dem Laufpuffer s. Tabelle 3. Der verwendete Extraktionspuffer von SDI (PART# 3305813) wurde ebenfalls als eine Variante für die Extraktion verwendet

Der Puffer für die SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis) wurde mit TRIS und SDS hergestellt. Aufgefüllt wurde mit 90 ml destilliertem Wasser. Durch Salzsäure (HCL) wurde der pH Wert auf 6,8 gesenkt. Bromphenolblau wurde anschließend gelöst. Der Puffer, welcher durch das enthaltene Mercaptoethanol die Proteine weiter reduziert (Spal-

tung von Disulfidbrücken) und damit denaturiert (Habermehl et al., 2002), wurde erst kurz vor der Benutzung fertig gemischt, um ein Reoxidieren der Pufferbestandteile zu vermeiden. Das heißt, dass Mercaptoethanol wurde unmittelbar vor Zugabe des Rohproteinaufschlusses bzw. einer Verdünnung davon hinzugegeben. Der Puffer wurde zweifach konzentriert hergestellt, da er im Verhältnis von 1:1 mit dem Extrakt gemischt wurde. Die Pufferbestandteile und deren Anteile sind in
abgebildet.

Tabelle 2: Zusammensetzung des zweifach konzentrierten SDS-Puffers

Chemikalien	Konzentrationen
TRIS	0.25 M
Glycerol	20% (v/v)
SDS	4% (w/v)
Bromaphenol Blue	0.005% (w/v)
β -Mercaptoethanol	10% (w/v)
HCL	pH 6.8

Der Laufpuffer wurde fünffach konzentriert hergestellt, so dass bei Bedarf mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt wurde. Die Zusammensetzung und die Mengen für die Herstellung von einem Liter sind in Tabelle 3 dargestellt. Um ein vollständiges Lösen der Salze zu gewährleisten, erfolgte auch hier eine Behandlung durch das Ultraschallbad.

Tabelle 3: Zusammensetzung des fünffach konzentrierten Laufpuffers

Chemikalien	Konzentration
TRIS	250 mM
Glycin	1,92 M
SDS	0,5 %

Die Färbelösung setzte sich aus Essigsäure, Coomassie Blau, Methanol und destilliertem Wasser zusammen (s. Tabelle 4). Essigsäure und Wasser kamen in eine Flasche, Methanol und Coomassie Blau in eine andere Flasche. Grund hierfür war, dass Coomassie Blau leicht ausfällt. Direkt vor der Nutzung der Lösung wurde ein Gemisch zu gleichen Teilen hergestellt.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Färbung und Fixierung für die SDS-PAGE

Chemikalien	Konzentration
Coomassie Blau R250	0,25 %
Essigsäure	10 (v/v)
Methanol	50 (v/v)
Wasser	40 (v/v)

Die Entfärbelösung bestand aus Essigsäure, Methanol und Wasser (s. Tabelle 5). Die Essigsäure und das Methanol wurden mittels Messzylinder abgemessen. Anschließend wurde mit destilliertem Wasser auf einen Liter aufgefüllt.

Tabelle 5: Zusammensetzung der Entfärbelösung für die SDS-PAGE

Chemikalien	Konzentration
Essigsäure	10 (v/v)
Methanol	15 (v/v)
Wasser	75 (v/v)

2.3 Geräte

Die verwendeten Geräte während der Proteinisolation sind in Tabelle 6 aufgeführt. Bei der verwendeten Matrix der Säule (Sephacryl S-100 HR) handelt es sich um ein „cross-linked copolymer allyl dextran“ vernetzt mit Bisacrylamid. Der Trennbereich dieser Matrix liegt in einem Bereich von 1 – 100 kDa (GE Healthcare, 2006).

Tabelle 6: Verwendete Geräte für die Proteinisolation

Gerät	Firma
pH-Meter 720	InoLab
Thermometer	InoLab
Elektronikrührer	Variomag
Gelfiltrationsapparatur	ABIMED Gilson
Säule HiPrep 16/60 (Sephacryl S-100 HR)	GE Healthcare Bio-Sciences AB
Photometer SPECORD S100	Carl Zeiss Technology
Minigel-Twin chamber	Biometro
Stromversorgung PHERO_STRB 1253	Biotechfischer
Zentrifuge 3K30	Sigma Laboratory Centrifuges
Zentrifuge 1-13	Sigma Laboratory Centrifuges
Membran Vakuumpumpe MZ C2	CHRIST
Gefriertrocknungsanlage Typ 100503	CHRIST
Vakuumkonzentrator RVC 2-25	CHRIST
Gefriertrocknungsanlage Delta 1-24K mit Anlagensteuerung LMC-2	CHRIST

2.4 Sonstige Materialien

Alle weiteren verwendeten Materialien sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Übersicht über ansonsten verwendete Materialien

Material	Firma
Dialyseschlauch V Serie (5000 MWCO)	ZelluTrans ROTH
PC + Software Aspect Plus MFC Application	Carl Zeiss Jena GmbH
SDS-PAGE Protein Marker	Serva Electrohoresis
ProGel Tris Glycin 18%, 1,0 mm	anamed Elektrophorese GmbH

3 Methoden

Alle Arbeitsschritte im Laufe der Proteinisolierung erfolgten bei einer Temperatur von 4 °C. Die verwendeten Lösungen und Puffer wurden mit bidestilliertem Wasser hergestellt und bei 4 °C gelagert. Die Proben wurden bei einer Temperatur von -20 °C gelagert.

3.1 Rohproteinaufschluss

Die Proteinextraktion dient zur Gewinnung eines Rohextraktes, welcher in weiteren Schritten bearbeitet werden kann. Als häufigste Quellen dienen Zellen oder Gewebe. Für die Extraktion von Proteinen gibt es im Wesentlichen zwei Standardmethoden. Eine Variante ist das Kochen der Probe mit dem Auftragspuffer. Dies ist für die Elektrophorese geeignet. Die andere Möglichkeit ist das Extrahieren der Probe mit einem Lysepuffer, eventuell unter Zugabe eines Detergen-ses (Geckeler et al., 1998).

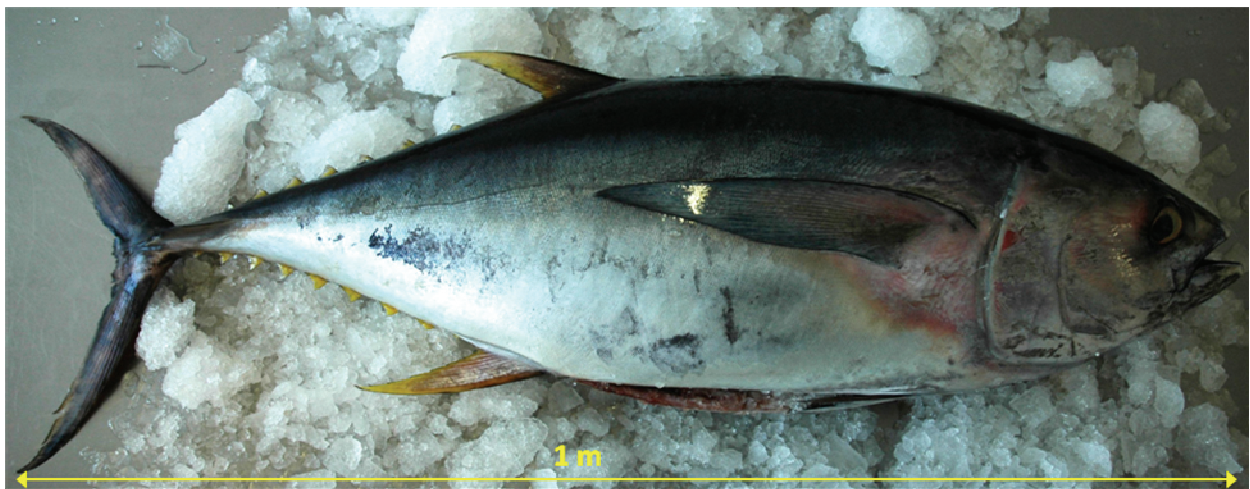


Abbildung 1: Gelbflossen-Thunfisch

Die Probenvorbereitung des Gelbflossen-Thunfisches (s. Abbildung 1) begann mit dem Zerlegen. Es wurden der Kopf und die Schwanzflosse entfernt. Der Fisch wurde quer, entlang der Mittelgräte geteilt, um die Filets zu lösen. Anschließend wurde der Thunfisch gehäutet. Die Fraktionierung des Fleisches begann direkt hinter der Kieme, wobei in jeweils 5 cm breite Stücke (s. Abbildung 2) geteilt wurde. Außerdem erfolgte eine Einteilung in Rückenbereich, Mitte

(Roter Muskel) und Bauchbereich (s. Abbildung 2 und Abbildung 3). Das Thunfischfilet wurde direkt verwendet. Beim Thunfisch aus den Dosen wurde die Salzlake entfernt.

Der Fisch wurde mit einem Messer vorzerkleinert. Das Homogenisieren erfolgte im Mixer unter Zugabe des GPC-Puffers. Alternativ erfolgte die Zugabe des Tris/Glycin- oder SDI-Puffers. Es wurde ein Verhältnis von 1 (Fisch): 2 (Puffer) verwendet. Zuerst wurden zwei Drittel der Pufferlösung hinzugegeben und homogenisiert. Diese Masse wurde in ein Becherglas gefüllt. Mit der restlichen Pufferlösung wurde der Mixer gefüllt. Es erfolgte ein erneutes Mischen, um dann die verbliebenen Proteine zu überführen. Die einzelnen Mengen der untersuchten Thunfischfraktionen sind in Tabelle 8 abgebildet. Der Extrakt wurde bei 100 °C für 10 min erhitzt. Hier wurden hitzeempfindliche Proteine ausgefällt. Durch anschließendes Filtrieren erfolgte das Abtrennen von denaturierten Proteinen. Das Entfernen von kleineren Partikeln erfolgte durch das Zentrifugieren bei 16000 x g für 20 min (Faeste, Plassen, 2008; Pechère et al., 1973).

Tabelle 8: Einwaage der verschiedenen Thunfischfraktionen und des GPC-Puffers

Thunfischfraktion (s. Abb. 2)	Einwaage Thunfisch in g	Menge des GPC-Puffer in ml
1-O	100	200
1-U	100	200
3-O	50	100
3-U	50	100
6-O	50	100
6-U	50	100
3-R	70	140
6-R	100	200

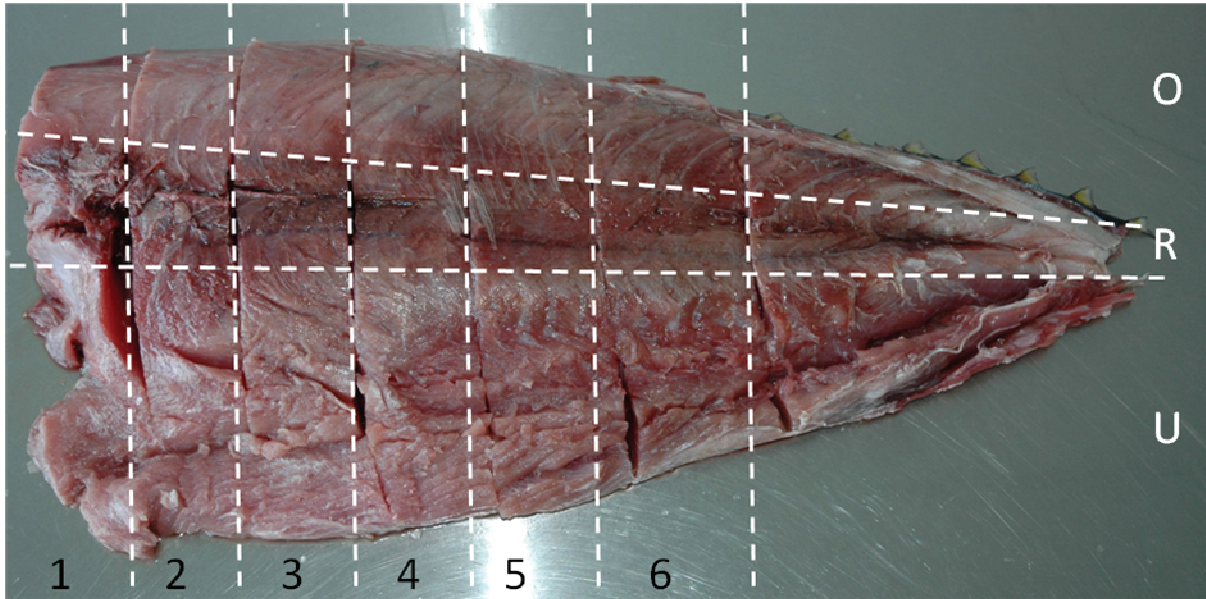


Abbildung 2: Aufteilung des Thunfisches in Fragmente von 1 bis 6 und Rücken-Muskelfleisch (O), rotes Muskelfleisch (R), Bauch-Muskelfleisch (U)

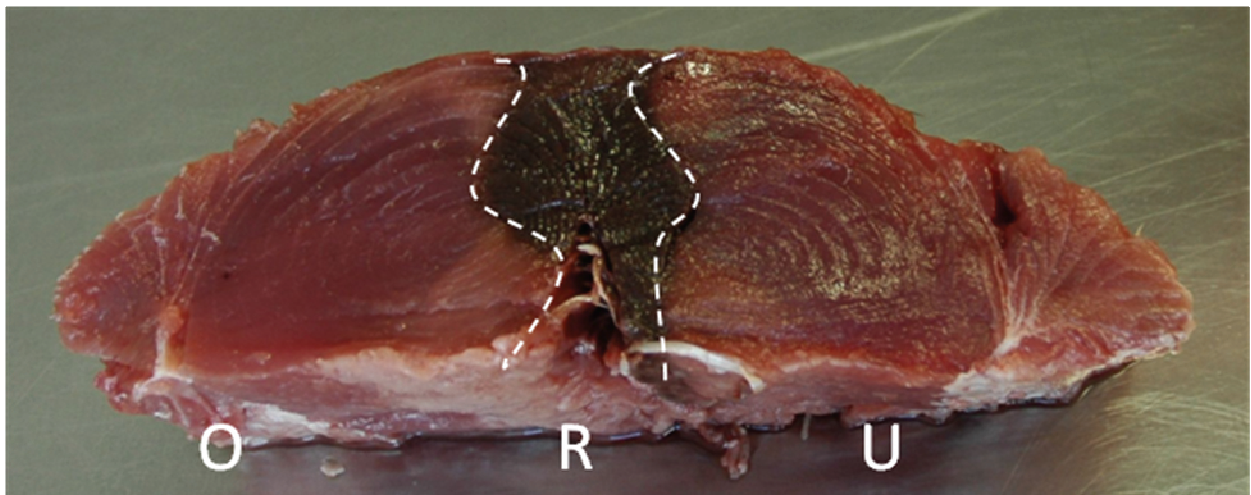


Abbildung 3: Querschnitt des Gelbflossen-Thunfischfilet mit Rücken-Muskelfleisch (O), rotem Muskelfleisch (R) und Bauch-Muskelfleisch (U)

Um die Ausbeute an Protein zu erhöhen wurden für die Extraktion verschiedene Puffer, Einwirkzeiten des Puffers und das Erhitzen vor dem Mischen bzw. danach untersucht. Eine Aufstellung der Versuche stellt Tabelle 9 dar.

Tabelle 9: Übersicht der Varianten zur Optimierung der Rohproteinkonzentration bei der Extraktion des Thunfisches

Bezeichnung	Puffer	Einwirkzeit in h	Erhitzung
1A	GPC-Puffer	-	Das Erhitzen erfolgte vor dem Mischen, direkt nach der Homogenisierung.
1.1A		1	
1.2A		22	
2A	Tris/Glycin-Puffer	-	
2.1A		1	
2.2A		22	
3A	SDI-Puffer	-	
3.1A		1	
3.2A		22	
1B	GPC-Puffer	-	Das Erhitzen erfolgte nach dem Mischen.
1.1B		1	
1.2B		22	
2B	Tris/Glycin-Puffer	-	
2.1B		1	
2.2B		22	
3B	SDI-Puffer	-	
3.1B		1	
3.2B		22	

3.2 Ammoniumsulfatfällung

Globuläre Proteine haben grundsätzlich einen hydrophoben Kern und eine hydrophile Hülle. Ionische Aminosäuren befinden sich in der Hülle, so dass die Proteine in reinem Wasser leicht aggregieren und ausfallen. Durch die Zugabe von kleinen Mengen (0,5 mM) an Neutralsalzen werden die Ladungen kompensiert, und das Protein baut eine Hydrathülle auf. Diese Systeme sind jedoch instabil. Eine Verringerung der Wasserkonzentration oder Veränderung der Wasserstruktur führt in Abhängigkeit von der Proteingröße und der Ladungsverteilung zum Ausfällen (Kleber et al., 1997). Durch Neutralsalze wie Ammoniumsulfat, Natriumsulfat oder Kaliumsulfat wird die Proteinhydratisierung gestört, da sie mit den Proteinen um Wassermoleküle für die Bildung einer Hydrathülle konkurrieren. Ist der Salzgehalt hoch genug, fällt das Protein aus. Ammoniumsulfat wird aufgrund der hohen Ionenstärke und der guten Wasserlöslichkeit bevorzugt (Geckeler et al., 1998). Eine ähnliche Wirkung haben auch Lösungsmittel, die mit Wasser mischbar sind (Methanol, Ethanol, Aceton). Diese können jedoch ins Proteininnere gelangen und Denaturierungseffekte auslösen. (Kleber et al., 1997).

Die Ammoniumsulfatfällung ist eine native Fällung. Die biologische Aktivität der Proteine bleibt erhalten (Rehm, 2006). Durch steigende Salzkonzentrationen ermöglicht man fraktionierte Fällungen (Habermehl et al., 2002). Die Zugabe des Salzes sollte hierbei langsam erfolgen, da ansonsten gewünschte Proteine ausfallen können (Geckeler et al., 1998).

Zur Fällung der Proteine wurde in der vorliegenden Arbeit Ammoniumsulfat verwendet. Dieses war grobkörnig vorhanden und musste mit dem Mörser zerkleinert werden, so dass es sich schneller in der Rohextrakt-Proteinlösung löste. Die benötigte Menge richtete sich hier nach Tabelle 26 (Anlage 2). Für die Sättigung von 65 % ergab sich eine Menge von 39,8 g/100 ml. Für eine Sättigung von 65 % auf 100 % wurde eine Menge von 24,4 g/100 ml benötigt. Die Proteinlösung wurde während der Fällung in einem Eisbad auf ca. 0 °C gehalten. Die Durchmischung erfolgte mittels Elektronik- und Magnetrührers. Nachdem alle Vorbereitungen getroffen waren, begann die Fällung. Das Ammoniumsulfat für die erste Fraktion wurde langsam hinzugegeben. Sank der pH-Wert unter 6,8, wurde mit Natriumhydroxid neutralisiert. Das Rühren und Kühlen erfolgte nach der Zugabe des Ammoniumsulfates für weitere 60 min, um ein vollständiges Lösen zu gewährleisten. Im Anschluss wurde für 30 min, 4000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen, und es erfolgte die zweite Fällung durch Ammoniumsulfat. Anschließend wurde erneut für 60 min bei 0 °C weitergerührt. Das Zentrifugieren erfolgte für 20 min, 9000 x g und 4 °C. Der Überstand konnte verworfen werden. Das gefällte Protein wurde mit 10 ml GPC-Puffer in Lösung gebracht und für die Dialyse gewonnen.

3.3 Dialyse

Die Dialyse ist eine statische Version der Membranfiltration. Die Trennung beruht auf Diffusion und Konzentrationsunterschieden. Störende Substanzen mit geringem Molekulargewicht lassen sich durch eine Dialyse entfernen. Die Dialyse eignet sich auch als Pufferaustausch, bzw. zum Entsalzen. Das Volumen des Austauschpuffers (destilliertes Wasser) sollte dabei mindestens 100fach so groß wie das Probenvolumen sein. Die Austauschlösung besitzt in der Regel eine geringe Ionenstärke. Die kleinen Moleküle, abhängig von der Größe der Membran, diffundieren durch den Dialyseschlauch bis ein Gleichgewicht der Konzentration eintritt (Geckeler et al., 1998).

Der Dialyseschlauch wurde vor der Benutzung mehrfach mit destilliertem Wasser gespült, da dieser in einer Natriumbenzoatlösung lagerte. Nach der Reinigung des Schlauches konnte die

gewonnene Proteinlösung aus der Ammoniumsulfatfällung in einen Dialyseschlauch überführt werden. Der Schlauch wurde an beiden Seiten mehrfach eingeschlagen und durch Klammern verschlossen. Nun wurde der Beutel in einen GPC-Puffer gegeben, in welchem der Konzentrationsausgleich stattfand. Die Dialyse fand bei einer Temperatur von 4 °C bzw. in einem Eisbad statt. Nach bestimmten Zeitintervallen (s. Tabelle 10), wurde der Puffer gewechselt. Mit Erreichen einer Verdünnungsstufe von mindestens 10^6 war die Probe gereinigt. Bevor die Gelfiltration begann, erfolgte ein Filtern durch eine Porengröße von 0,45 μm , um Komplexe zu entfernen, die sich während der Dialyse nicht lösten.

Tabelle 10: Verdünnungsstufen der Dialyse mit GPC-Puffer (Ausgangsmenge 7 ml; ab Verdünnungsstufe 2 20 ml)

Verdünnungsstufe	Puffermenge in ml	Zeitintervall in h	Rühren	Verdünnung
1	3000	4	nein	1:428
2	2000	4	nein	1:42857
3	1000	2	ja	1:2142857
4	1000	2	ja	1:107142857

Die zweite Dialyse nach der GPC erfolgte mit destilliertem Wasser. Hierbei wurde analog der Dialyse mit GPC-Puffer vorgegangen. In diesem Schritt wurden alle Salze so weit entfernt, dass die Gefriertrocknung erfolgen konnte. Die Verdünnungsschritte sind in Tabelle 11 angegeben.

Tabelle 11: Verdünnungsstufen der Dialyse mit bidestilliertem Wasser (Ausgangsmenge 80 ml)

Verdünnungsstufe	Puffermenge in ml	Zeitintervall in h	Rühren	Verdünnung
1	2500	4	nein	1:33
2	2500	4	nein	1:1111
3	2500	2	ja	1:37037
4	2500	2	ja	1:1234567

3.4 Gelpermeationschromatographie (GPC)

Bei der GPC handelt es sich um eine Niederdruck-Größenausschlusschromatographie (Rehm, 2006). Als Matrix, bzw. Trägermittel werden poröse Perlen eingesetzt. Durch gezielte Kreuzvernetzungen erhält man Perlen mit definierter Porengröße. Die Trägermittel enthalten zu meist Polysaccharide und damit Hydroxylgruppen. Hierdurch wird die Matrix hydrophil, und es entsteht in wässrigen Lösungen ein Gel. Diese vernetzten Polysaccharide werden als Gelmatrix bezeichnet. Moleküle, die größer als die Poren sind, gelangen nicht in das Innere der Perlen. Für kleine Moleküle sind die Poren zugänglich. Zudem erhöht sich die Anzahl der passierbaren Poren, je kleiner die Proteine sind. Demnach gelangen größere Moleküle schneller durch die Gelmatrix als kleine Teilchen. Der Parameter, welcher die Grenze zum Eindringen in die Poren definiert, nennt sich Ausschlussgrenze. Dieser Wert ist ein Maß für die kleinsten molaren Massen, welche nicht mehr in die Poren eindringen können (Kleber et al., 1997).

Um mit der Filtration beginnen zu können, wurde die Anlage vorbereitet. Man begann mit dem Entgasen des Fließmittels. Die Lösungen wurden dazu mit Ultraschall unter Vakuum behandelt. Es folgte das Spülen der Anlage mit entgastem, bidestilliertem Wasser. Die Menge an Wasser entsprach einer halben Säule. Bei einem Säulenvolumen von 120 ml und einem Durchfluss von 0,5 ml/min dauerte dies zwei Stunden. Weiteres Spülen erfolgte mit GPC-Puffer (doppeltes Säulenvolumen, 1 ml/min) für weitere vier Stunden (GE Healthcare, 2006). In dieser Phase bildete sich bei einer Absorption von 280 nm eine konstante Basislinie im Absorptionsdiagramm. Am „Terminal“ wurden die Parameter für die Messung eingegeben (s. Tabelle 12). Die Präzipitat-Lösung wurde in die Apparatur gestellt und das Programm gestartet. Der Puffer bildete die Referenzprobe. Die einzelnen Fraktionen, welche sich als Peaks darstellten, wurden in Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Parvalbumin war aufgrund seiner Größe der letzte Peak, und hatte eine Durchlaufzeit von etwa 300 Zyklen (150 Minuten). Der GPC-Lauf wurde mehrmals wiederholt, um eine ausreichende Menge an Eluat aufzufangen. Im Anschluss erfolgte eine Dialyse gegen destilliertes Wasser, um die Salze zu entfernen.

Tabelle 12: Parameter für die Gelfiltration

Parameter	Wert in ml (Versuch 1)	Wert in ml (Versuch 2)
Ansaugvolumen	4000	4000
Vorspülen	100	100
Injektorvolumen	3800	4800
Nachspülen	1000	1000

3.5 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine Variante der Gelelektrophorese. Durch die Beladung mit SDS werden die Eigenladungen überdeckt. So entstehen anionische Moleküle mit konstanter Nettoladung pro Masseinheit. Unterschiedliche Formen werden ausgeglichen, da die räumlichen Strukturen durch Spalten der Wasserstoffbindungen aufgelöst werden. Das Protein wird linearisiert. Die Trennung der Proteine erfolgt durch das elektrische Feld. Um die relativen Massen interpretieren zu können, wird ein Marker mit definierten Proteinen als Vergleich aufgetragen (Geckeler et al., 1998).

3.5.1 Fixieren und Färben

Die Proteine werden im Gel durch ein Methanol-Essigsäure-Wassergemisch fixiert. Die Essigsäure kann gegebenenfalls durch Trichloressigsäure ersetzt werden. Die Fixierung basischer Proteine erfordert die Verwendung von Formaldehyd. Vor dem Färben mit Silber, muss der Formaldehyd vollständig ausgewaschen werden. Coomassie Blau ist ein Färbemittel, welches man ab einer Proteinkonzentration von oberhalb 0,2 µg/Bande verwendet. Unterhalb dieser Konzentration verwendet man Silber, kolloidales Coomassie oder Fluoreszenzfarbstoffe. Bei größeren Proteinmengen verwendet man die Acetat-Färbung. Hierbei fällt in den SDS-Gelen das nicht gebundene SDS aus und wird trübe. Die Proteinfraktionen bleiben klar und können leicht gegen einen schwarzen Hintergrund betrachtet werden.

Erfolgt die Färbung mit Coomassie Blau, entfärbt man im Anschluss mit Essigsäure und Methanol. Diese Lösung sollte mehrmals gewechselt werden. Bei der Silberfärbung bilden die Silberionen Komplexe mit den Proteinen. Die Nachweisgrenze liegt hier bei 5 ng/Bande. Fluoreszenzfarbstoffe binden sich ebenfalls an die SDS-Protein-Komplexe und spiegeln durch Färbungs-

stärke die Größenordnung der Proteinmenge sehr gut wieder. Nach der Färbung durch Fluoreszenz-Farbstoffe können die Proteine noch geblottet oder eluiert werden (Geckeler et al., 1998).

3.5.2 SDS-Gel

SDS bindet die meisten Proteine. Hierbei entsteht ein Komplex mit konstantem Ladungs-Masse-Verhältnis. Die Proteine werden bei dieser Reaktion denaturiert; wodurch Wechselwirkungen zwischen den Proteinen verhindert werden. Durch diesen Vorgang kann man die Proteinkomplexe nach Größe unterscheiden. Dies nutzt man bei der SDS-Elektrophorese. Die Proteinkomplexe wandern hierbei im elektrischen Feld zur Kathode. Der Molekularsiebeffekt der Polyacrylamidmatrix trennt die Komplexe hierbei nach ihrem Molekulargewicht (Rehm, 2006).

Vom Rohproteinextrakt wurde die Extinktion gemessen, um über eine Standardkurve den Proteingehalt zu ermitteln. Eine Konzentration von etwa 1 mg/ml an Proteinen ist über eine Verdünnung mit bidestilliertem Wasser anzustreben (Rehm, 2006). Der Probenpuffer wurde zu gleichen Teilen mit der Probe vermischt. Jeweils 50 µl wurden in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert. Das Mischen erfolgte durch „Vortexen“. Durch ein Wasserbad wurde das Gemisch für 5 min bei 100°C erhitzt. Es erfolgte ein Kühlen auf Raumtemperatur und anschließend das Zentrifugieren mit 10000 U/min für drei Minuten. Das weitere Vorgehen richtete sich nach der Anleitung für Fertiggele. Demnach wurde die Gelzelle aus der Verpackung entnommen und mit Wasser abgespült. Das Klebeband (Reste des Klebers) und der Kamm wurden entfernt. Die Taschen der Zellen sind mit bidestilliertem Wasser gespült worden. Die Elektrophoresezelle wurde mit der Gelzelle aufgebaut und mit dem Laufpuffer gefüllt. In die einzelnen Zellen wurde eine Probenmenge von 20 µl eingefüllt. Es folgte der Anschluss an die Stromquelle und die Wahl des Programmes. Eine Spannung von 200 mV und eine Stromstärke von 50 mA wurden ausgewählt. Als Richtlinie galt hier der Geltyp (anamed, 2009). Die Elektrophorese wurde beendet als sich die blaue Lauf-front des Probenpuffers im unteren Bereich der Gelzelle befand. Nach Abschalten der Stromquelle wurde die Gelzelle geöffnet. Der Stromdurchgangsspalt wurde vom Gel getrennt, so dass das Gel entnommen werden konnte. Die Fixierung und Färbung der Proteine erfolgte durch die Färbelösung (s. Tabelle 4). Coomassie Blau fällt leicht aus; daher wurde Wasser und Essigsäure in eine Flasche und Methanol und Coomassie Blau in eine andere Flasche abgefüllt. Das Gemisch wurde im gleichen Verhältnis dazugegeben. Das Gel sollte gleichmäßig bedeckt sein. Nach einer Stunde bei 37 °C und ca. 30 U/min im Inkubationsschüttler war der Prozess beendet.

Nun erfolgte das Entfärben. Dazu wurde die Färbelösung entfernt, das Gel mit destilliertem Wasser gespült und das Entfärbemittel (s. Tabelle 5). hinzugegeben. Nach einer Stunde im Schüttler bei 37 °C und ca. 30 U/min, wurde die Entfärbelösung erneuert. Im Anschluss wurde mit destilliertem Wasser gespült. Abschließend konnte die optische Auswertung der Proteinfractionen im Gel erfolgen. Hierzu erfolgte ein Vergleich mit Abbildung 4. Die gesuchte Bande musste sich also im unteren Bereich zwischen Lysozym und Aprotinin befinden, da Parvalbumin eine Größe von etwa 12 kDa hat.

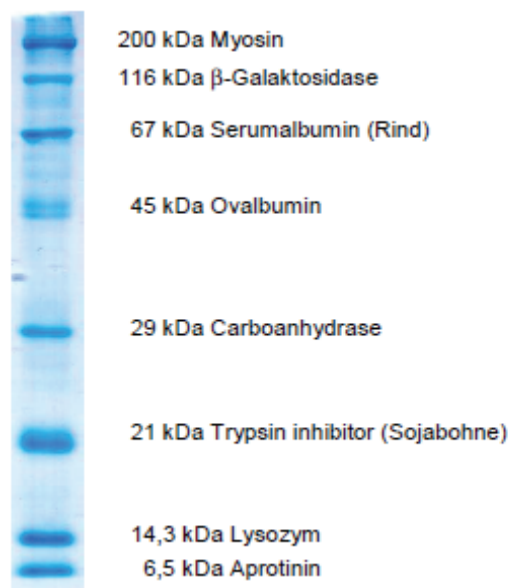


Abbildung 4: Proteinmarker (Serva Electrohoresis, 2009)

3.6 Bradford-Test

Der Bradford-Test ist eine photometrische Methode zur quantitativen Bestimmung des Proteingehaltes. Das Prinzip der Methode ist, dass sich der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau an Proteine bindet. In saurer Lösung entstehen so Proteinkomplexe. Der unprotonierte Farbstoff wird stabilisiert; hierbei verschiebt sich das Absorptionsmaximum der Farbe von 465 nm auf 595 nm. Durch die Zunahme der Extinktion bei 595 nm kann so die Proteinkonzentration ermittelt werden. Die Stärke der Farbreaktion ist bei jedem Protein unterschiedlich, so dass eine Ermittlung der Proteinkonzentration als semi-quantitativ angesehen werden muss. Um eine möglichst hohe Genauigkeit zu erzielen, wurde eine Kalibrationskurve mit Rinderserumalbumin in dem verwendeten Puffer erstellt. Vorteile der Konzentrationsbestimmung nach Bradford sind die schnelle Reaktivität und Sensibilität. Die Farbentwicklung ist bereits nach zwei Minuten beendet und die

Nachweisgrenze liegt im Mikrogramm pro Milliliter-Bereich. Nachteile sind die Störanfälligkeit gegenüber anderen proteinchemischen Reagenzien (starke Laugen, Reduktionsmittel, SDS) oder ein saures Milieu, in dem viele Proteine ausfallen können (Rehm, 2006; Chemie.DE Information Service, 2009).

Die Durchführung richtete sich nach der Anleitung des Herstellers (Sigma-Aldrich, 06/04). Es wurde nach dem „Standard Assay Protokoll 3.1“ vorgegangen. Die zu untersuchende Probe wurde gegebenenfalls auf etwa 1 mg/ml verdünnt. Eine Menge von 595 µl Bradford Reagenz (Raumtemperatur) wurde mit 20 µl der Probe vermischt und 15 min in Dunkelheit inkubiert. Danach wurden die Proben bei 594,70 nm im Photometer gemessen und die Konzentration mit Hilfe der Eichkurve (s. Abbildung 5) berechnet.

3.7 Lyophilisierung

Das Aufkonzentrieren der Proteinlösung erfolgte durch Gefriertrocknen bzw. durch das Verdampfen der Lösung unter Vakuum. Die Gefriertrocknung ist allerdings nur möglich, wenn die gesuchten Proteine unempfindlich gegenüber dem Einfrieren und Auftauen sind. Die Probe wird eingefroren und unter Vakuum erwärmt. Bei dem Gefriertrocknen geht das Wasser direkt vom festen zum gasförmigen Aggregatzustand über (Sublimation) und wird entfernt. Die Proteinlösung sollte von Salzen und anderen nicht sublimierenden Stoffen befreit werden, da ansonsten die Osmolarität und damit der Schmelzpunkt ansteigen (Kleber et al., 1997). Durch Zugabe von Additiven (z.B. Saccharose) kann man empfindliche Moleküle während des Einfrierprozesses schützen. Der Vorgang des Einfrierens sollte sehr schnell geschehen, um die Probe nicht zusätzlich zu belasten. Das Vakuum sollte ferner so stark sein, dass die Probe durch die Verdunstungsenthalpie im gefrorenen Zustand bleibt. Diese Methode der Trocknung ist aufgrund der verwendeten, niedrigen Temperatur sehr schonend (Geckeler et al., 1998).

Die Parameter für die Gefriertrocknungsanlage sind in Tabelle 27 (Anlage 2) abgebildet.

4 Ergebnisse

Abbildung 5 stellt die Eichkurve dar. Auf dieser Kurve beruhen die errechneten Proteingehalte der Fischproben.

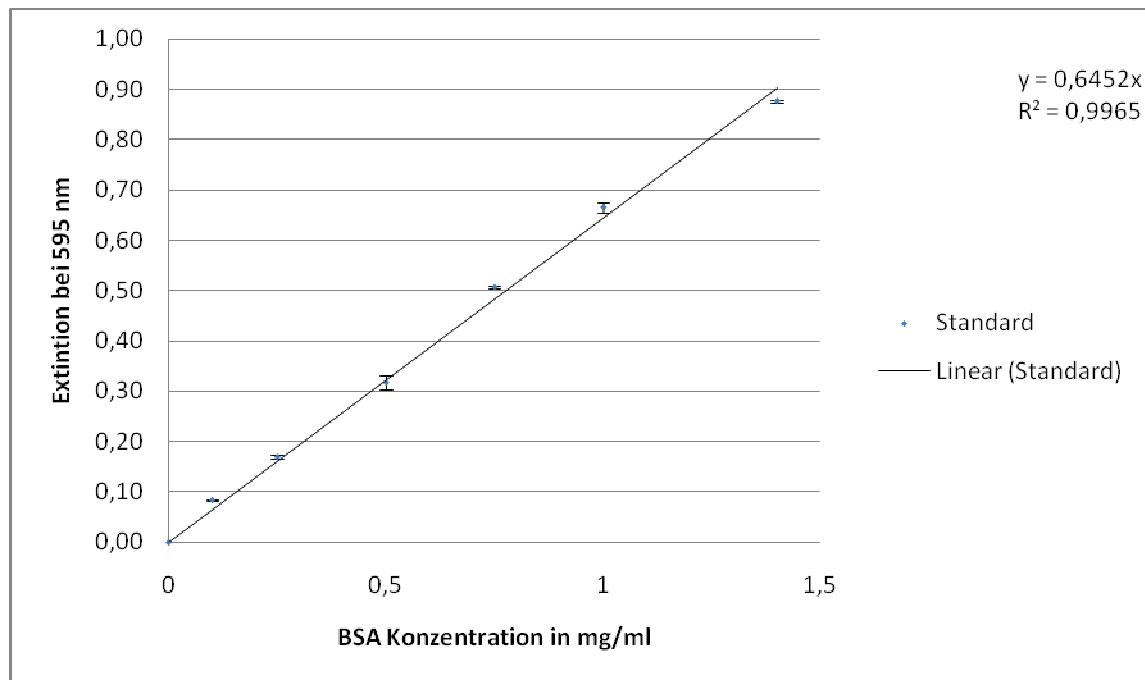


Abbildung 5: Eichkurve nach Bradford (Daten s. Anlage 1, Tabelle 22)

4.1 Thunfisch in Dosen

Abbildung 6 zeigt ein SDS-Gel der Rohproteine der einzelnen Thunfisch in Dosen-Varianten. Wie zu erkennen, sind die Proteine weitgehend degeneriert, so dass keine einzelnen Fraktionen zu erkennen sind. Eine Isolierung war in diesem Fall nicht möglich.

Tabelle 13: Extinktion und Proteingehalt des Thunfischs in Dosen nach Bradford

Proben	Extinktion der Proben; Verdünnung 1:2	Proteingehalt in mg /ml
1	0,1757	0,5446
2	0,1926	0,5970
3	0,2231	0,6915
4	0,2292	0,7105
5	0,1837	0,5694

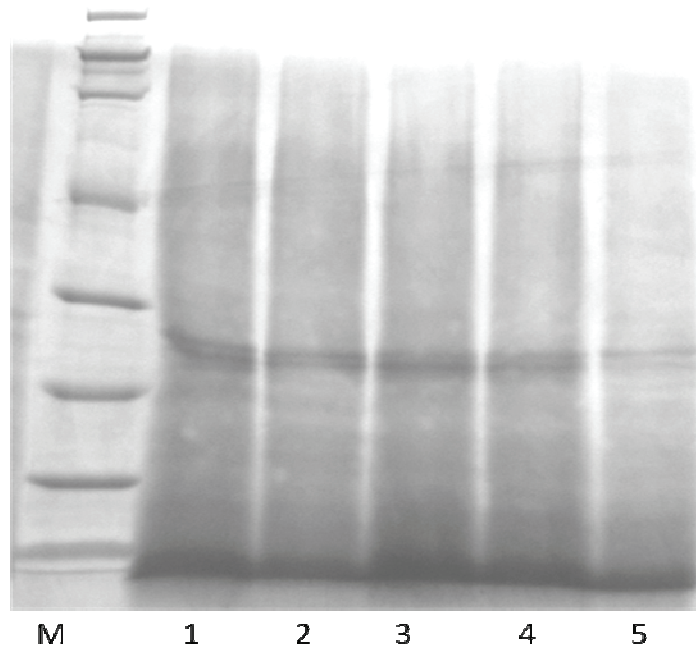


Abbildung 6: SDS-Gel des Thunfisch in Dosen M (Marker), 1-5 (Proben s. Tabelle 1)

4.2 Thunfischfilet

Das Thunfischfilet konnte nicht zur Isolierung von Parvalbumin verwendet werden, da das Protein über das SDS-Gel (s. Abbildung 7) nicht nachgewiesen werden konnte. Als Vergleich wurden weitere Fischarten mitgeführt, die für das Forschungsprojekt von Interesse waren. Zu erkennen war, dass alle Proben, außer die des Filets vom Thunfisch, Parvalbumin enthielten.

Tabelle 14: Proteingehalt des Thunfischfilets

Proben	Extinktion der Proben; Verdünnung 1:2	Proteingehalt in mg /ml
1	0,1589	0,493
2	0,1601	0,496

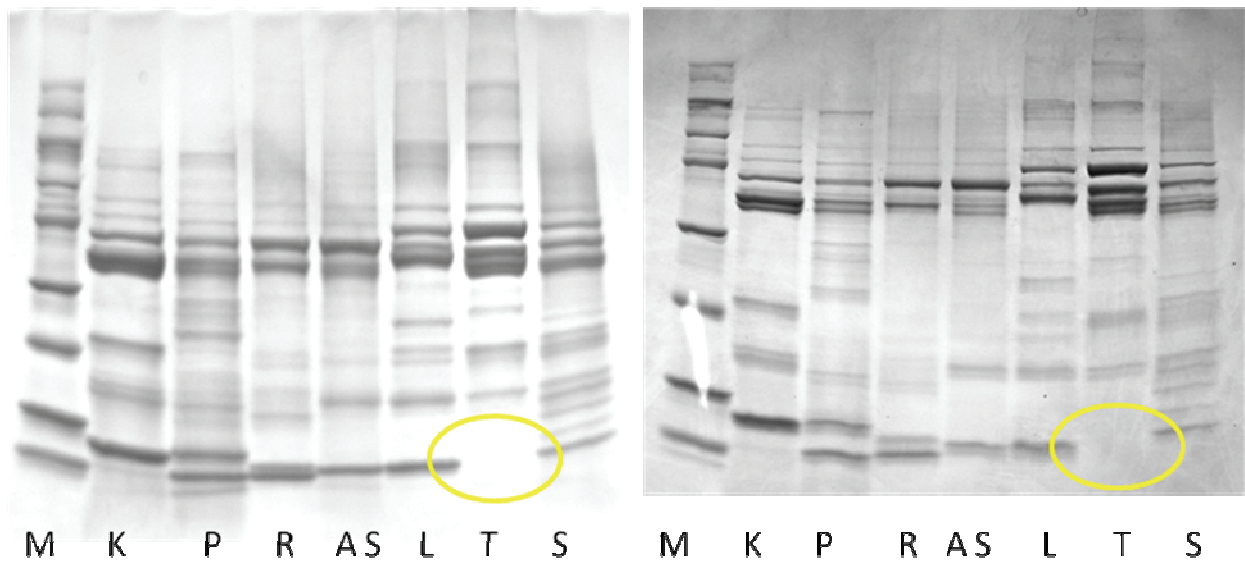


Abbildung 7: SDS-Gele des Thunfischfilets (T) im Vergleich mit Kabeljau (K), Pangasius (P), Rotbarsch (R), Alaska Seelachs (A S), Lachs (L) und Scholle (S); Marker (M)

4.3 Gelbflossen-Thunfisch

Bei der Proteinisolierung vom Gelbflossen-Thunfisch wird im Folgenden in Versuch 1 und Versuch 2 unterschieden. Es handelte sich im Wesentlichen um den gleichen Ablauf. Unterschiede bestanden in der Extraktionsdauer. Diese war im Versuch 2 länger, außerdem wurde der Probenansatz erst nach dem Mischen erhitzt. Im Versuch 1 wurde das SDS-Gel zur Kontrolle der Aufreinigung nach der Gelfiltration und Konzentrierung erstellt. Im Versuch 2 erfolgten die Lyophilisierung und anschließend die Überprüfung durch das Gel.

Die einzelnen Thunfischfraktionen (s. Abbildung 2) wurden untersucht, um festzustellen wie groß die Proteinkonzentrationen sind und in wie weit PV enthalten ist. Der Proteingehalt (s. Tabelle 15), nach dem ersten Trennschritt schwankt zwischen 0,37 – 0,49 mg/ml. Der Parvalbumingehalt (s. Abbildung 8), zeigte, dass im Kopfbereich der Gehalt an PV am größten ist und nach hinten abnimmt. Vergleicht man die Fraktionen 1-O (Rückenbereich) und 1-U (Bauchbereich), erkennt man eine höhere Konzentration im Bauchbereich als im Rückenbereich. Das rote Muskelfleisch zeigte ebenfalls Banden zwischen 6 und 14 kDa. Da jedoch die vorderen Bereiche höhere Konzentrationen aufwiesen, wurden diese Teile für die Parvalbumingewinnung genutzt.

Tabelle 15: Proteingehalt der Gelbflossen-Thunfischfraktionen (Daten s. Anlage 1, Tabelle 23)

Thunfischfraktionen (s. Abb. 2)	Proteingehalt in mg/ml
1-O	0,498
1-U	0,449
3-O	0,389
3-U	0,373
6-O	0,390
6-U	0,373
3-R	0,420
6-R	0,443

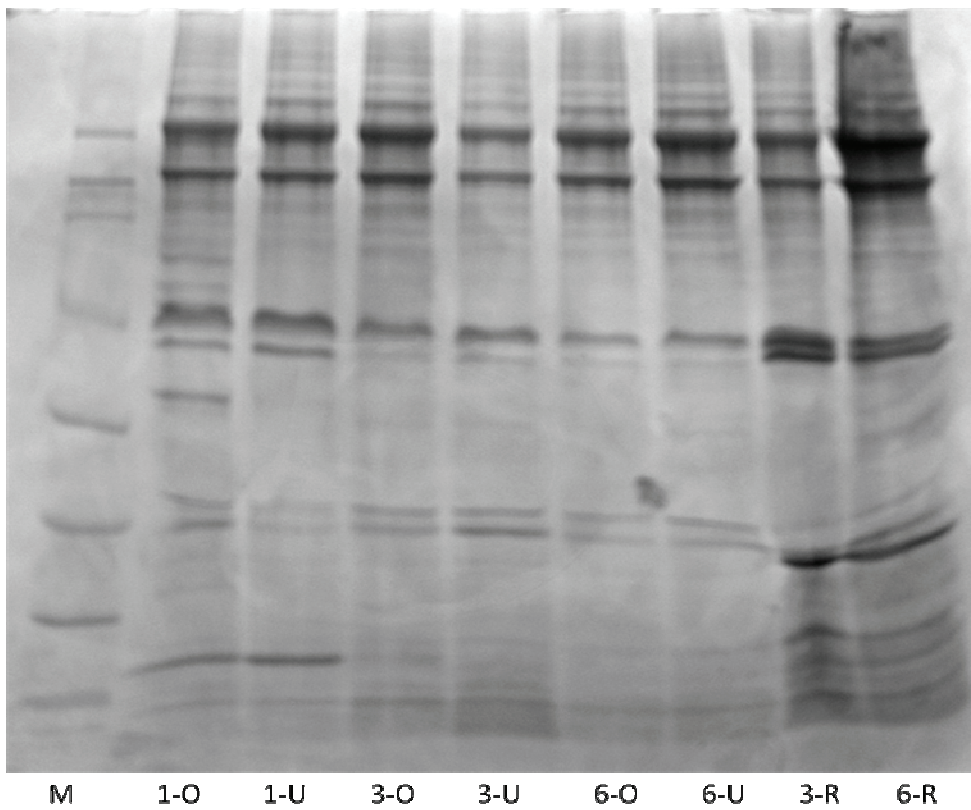
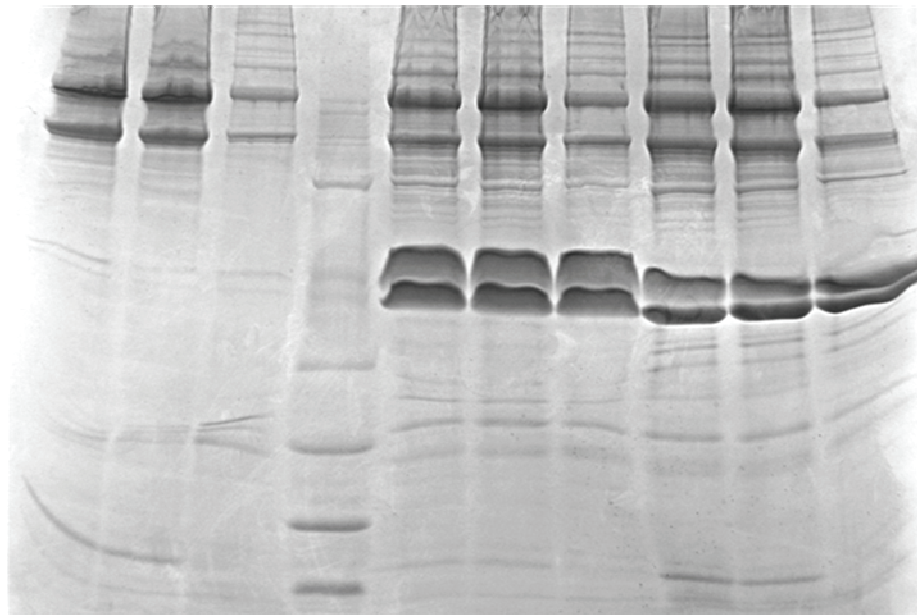


Abbildung 8: SDS-PAGE der Thunfischfraktionen (Fraktionen s. Abbildung 2; M (Marker))

Um die Proteinausbeute zu erhöhen, erfolgte eine Optimierung der Extraktion. Es wurden verschiedene Puffer und Extraktionszeiten untersucht (s. Tabelle 9), um mehr Parvalbumin zu gewinnen. Die Ergebnisse aus Tabelle 16 zeigen, dass sich die Ausbeute mit der Mischzeit erhöht. Dies wiederholt sich in allen Versuchen, unabhängig vom Puffer oder wann die Erhitzung erfolgte. Abbildung 9 zeigt ein SDS- Gel, in welchem die Extrakte der Versuche aufgetragen wurden. Der Tris/Glycin-Puffer ist am ineffektivsten, um PV zu extrahieren. In dem relevanten Bereich, zwischen 6 und 14 kDa ist kaum eine Proteinfraction zu erkennen. Der Puffer von SDI extrahiert ein breiteres Spektrum an Proteinen als der GPC-Puffer. Da jedoch die Intensität der Parvalbuminkonzentration im Gel durch den GPC-Puffer am stärksten war, wurde dieser für weitere Optimierungsversuche verwendet. Der Puffer wurde bei verschiedenen Einwirkzeiten und zu verschiedenen Zeitpunkten des Erhitzungsschrittes (vor bzw. nach dem Mischen durch den Inkubationsschüttler) weiter erprobt.

Tabelle 16: Extinktionen und Proteingehalt der Extraktionsversuche mit verschiedenen Puffern (GPC-Puffer, Tris/Glycin-Puffer, SDI-Puffer und Erhitzung vor, bzw. nach der Mischzeit (A: zuerst erhitzt und dann gemischt; B: zuerst gemischt und dann erhitzt))

Variante	A		B	
	Extinktion bei 595 nm	Proteingehalt in mg/ml	Extinktion bei 595 nm	Proteingehalt in mg/ml
1	0,1613	0,2500	0,1409	0,2184
1.1	0,2978	0,4616	0,2886	0,4473
1.2	0,2807	0,4351	0,2205	0,3418
2	0,1457	0,2258	0,1191	0,1846
2.1	0,3261	0,5054	0,2453	0,3802
2.2	0,2747	0,4258	0,2025	0,3139
3	0,1353	0,2097	0,1721	0,2667
3.1	0,3212	0,4978	0,2881	0,4465
3.2	0,2768	0,4290	0,2122	0,3289



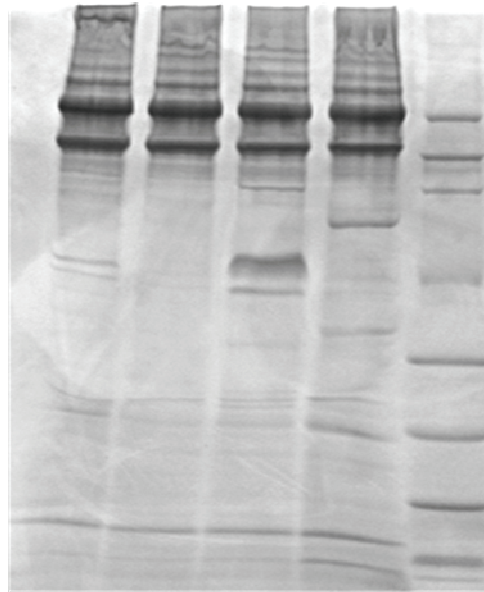
1 A 1.1 A 1.1 B M 2 A 2.1 A 2.1 B 3 A 3.1 A 3.1 B

Abbildung 9: SDS-Gel Rohproteinextraktion mit 1 (GPC-Puffer), 2 (Tris/Glycin-Puffer), 3(SDI-Puffer) Mischzeiten 1,2,3 (keine Mischzeit), 1.1, 2.1,3.1 (Mischzeit 1 h), A (zuerst erhitzt, dann gemischt), B (zuerst gemischt, dann erhitzt)

Tabelle 17 zeigt, dass sich die Proteingehalte des sofort erhitzten Extraktes auch nach einer Mischzeit von 22 h nur minimal unterscheiden. Man erkennt jedoch, dass sich das Mischen des nicht erhitzten Extraktes positiv auf den Proteingehalt auswirkt. Auch in Abbildung 10, in welcher die einzelnen Varianten abgebildet sind, erkennt man, dass der Gehalt an PV in Versuch 3B am höchsten ist. In diesem Versuch erfolgte ein Mischen über 22 h und anschließend das Erhitzen. Vergleicht man die Parvalbuminkonzentration der Versuchsreihe A auf Grund der Intensität der Bande, so sind auch hier kaum Unterschiede zu erkennen. Die ermittelten Proteinkonzentrationen bestätigen das Ergebnis.

Tabelle 17: Extinktionen und Proteingehalt der Extraktionsversuche mit GPC-Puffer nach der variablen Mischzeiten und Erhitzungsvarianten (A: zuerst erhitzt und dann gemischt; B: zuerst gemischt und dann erhitzt)

Variante	A		B	
	Extinktion bei 595 nm	Proteingehalt in mg/ml	Extinktion bei 595 nm	Proteingehalt in mg/ml
1	0,1290	0,1999	0,1788	0,2771
4	0,1353	0,2097	0,2270	0,3518
22	0,1374	0,2130	0,3089	0,4788



1A 3A 1B 3B M

Abbildung 10: SDS-Gel der Extraktionsversuche von Thunfisch (2-U) mit GPC-Puffer unter Variablen Mischzeiten und Erhitzungsbedingungen (1: 1h Mischzeit; A: zuerst Erhitzt, dann gemischt; B: zuerst gemischt, dann erhitzt; M: Marker)

Der zweite Aufreinigungsschritt war die fraktionierte Ammoniumsulfatfällung. Abbildung 11 zeigt die einzelnen Fällungsvarianten. Um eine gute Trennung zu erreichen wurden Sättigungen von 45 – 75 % getestet. Bei 45 % sieht man im oberen Bereich des SDS-Gels (29 – 116 kDa) mehrere Proteinbanden. Bei 55 % nehmen diese Banden ab, und ab einer Sättigung von 65 % sind diese kaum noch zu erkennen. Da jedoch auch die Intensität der Bande von PV ab einer Sättigung von 65 % Sättigung abnimmt, liegt das Optimum für Thunfisch zwischen einer Sättigung von 55 % und 65 %. Für die folgenden Versuche erfolgte die Trennung bei einer Sättigung von 60 %. Vergleicht man die Proteinkonzentrationen der Ammoniumsulfatfällungen aus Tabelle 23 und Tabelle 24 (Anlage 1) ist zu erkennen, dass die Summe der einzelnen Fraktionen von Überstand und Pellet nicht 0,4 – 0,5 mg/ml, sondern geringer sind. Begründet ist dies durch die Zugabe von 10 ml Wasser zum Lösen des jeweiligen Pellet, wodurch die Proteinkonzentration sinkt. Die Daten der Tabelle 18 zeigen, dass mit steigender Ammoniumsulfatkonzentration ein Ansteigen der Proteinkonzentration im Pellet und ein Absinken im Überstand zu erkennen ist.

Tabelle 18: Proteingehalt des Gelbflossen-Thunfisches der Fraktion 1-O, bei verschiedenen Extraktionsgradienten der Ammoniumsulfatfällung (Daten s. Anhang 1, Tabelle 24)

Extraktionsgrad in %	Fraktion	Proteingehalt in mg/ml
45	Pellet	0,132
45	Überstand	0,269
55	Pellet	0,205
55	Überstand	0,205
65	Pellet	0,280
65	Überstand	0,202
75	Pellet	0,307
75	Überstand	0,104

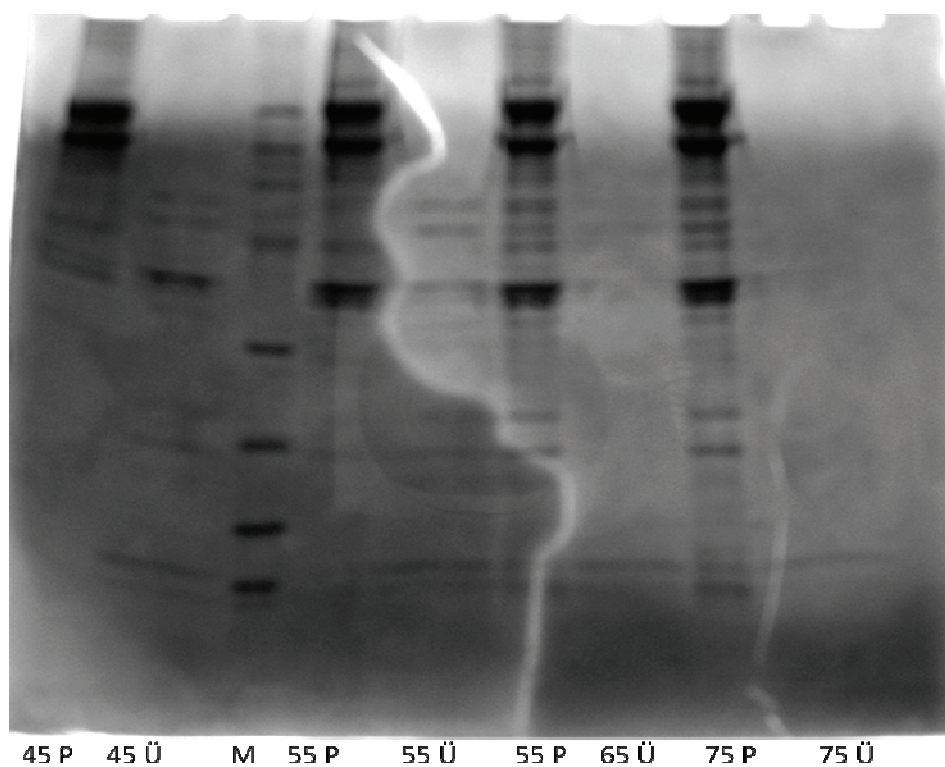


Abbildung 11: SDS-Gel der Ammoniumsulfatfällungen; Sättigung von 45 – 75 %; P (Pellet), Ü (Überstand)

Während der Dialyse von Versuch 1 bildeten sich im Schlauch einige Proteinaggregate. Um zu untersuchen, welche Proteinfractionen im Überstand und welche im Pellet sind, erfolgte ein Zentrifugieren bei 4000 x g, 4 °C, für 30 min. Das Pellet wurde mit einem Milliliter Wasser suspendiert. Die Ergebnisse (s. Abbildung 12) zeigten, dass im Überstand (Ü3) deutlich mehr Parvalbumin als im Pellet enthalten war. Ferner war der Anteil an größeren Proteinen im Pellet größer, wie an der Doppelbande im oberen Bereich des Gels zu sehen ist. Somit wurde der Über-

stand für die Gelfiltration genutzt. Die anderen drei Fraktionen (Ü1, P1, Ü2) dienen zur Kontrolle der Fraktionierung. Man sieht P1 (Pellet nach der ersten Fraktionierung) mit einem verstärkten Anteil an großen Proteinen, Ü1 hingegen hat fast nur noch kleine Moleküle. Die anderen Fraktionen sind durch den geringen Proteingehalt kaum zu erkennen. In Ü2 (Fraktion nach der zweiten Fällung) sind kaum noch Proteine enthalten, was nach der Sättigung von 100 % auch gewünscht ist.

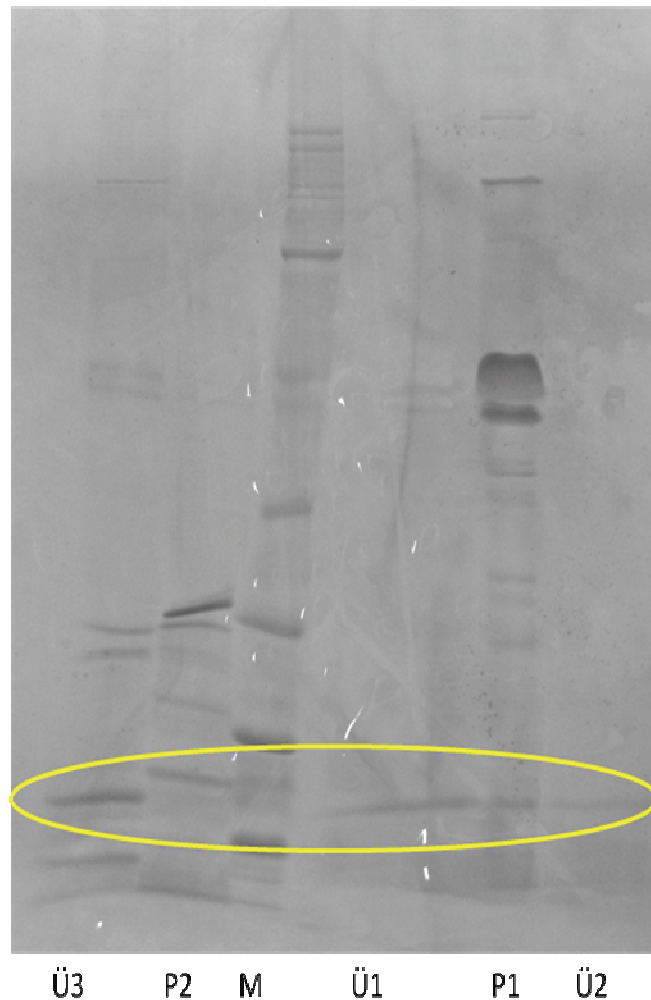


Abbildung 12: SDS-Gel (Versuch1) der Ammoniumsulfatfraktionen Ü3 (Überstand nach Dialyse und erneuter Zentrifugierung), P2 (Pellet nach Dialyse und Zentrifugierung gelöst in Wasser), M (Marker), Ü1 (Überstand nach der ersten fraktionierten Fällung), P1 (Pellet nach der ersten fraktionierten Fällung gelöst in Wasser), Ü2 (Überstand nach zweiter fraktionierter Fällung)

Tabelle 19: Daten der Extinktion nach Aufreinigung und Gelfiltration Versuch 1 (Proteinfraktion nach 300 Zyklen)

Messung	Extinktion bei 595 nm	Proteingehalt in mg/ml
1	0,0359	0,056
2	0,0379	0,059

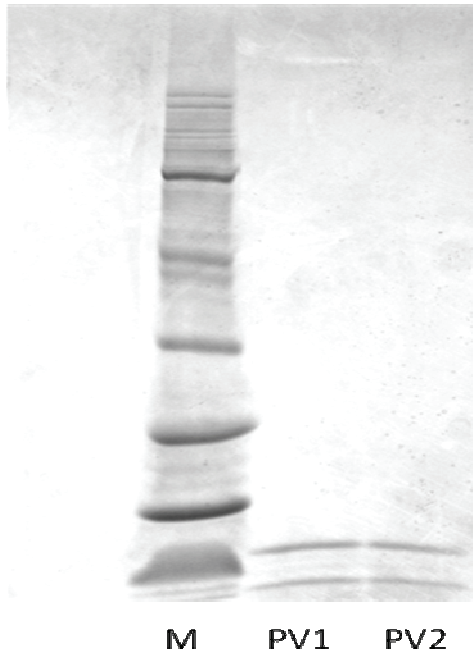


Abbildung 13: SDS Gel (Versuch1) nach der Aufreinigung durch die Gelfiltration, M (Marker), PV1, PV2 (aufgereinigte Parvalbuminproben)

Die Probe wurde nach der Dialyse eingengt, d. h., dass das Wasser mittels Vakuumkonzentrator entfernt wurde. Ziel war es, die Proteinkonzentration zu erhöhen, um ein SDS-Gel anfertigen zu können. Die Ausgangsmenge betrug ca. 45 ml. Nach 8 h im Konzentrator bei 30 °C wurde das Volumen auf ca. 7 ml verringert. Abbildung 13 stellt das SDS-Gel (Versuch1) nach der Aufreinigung durch die Gelfiltration dar. Wie zu erkennen, war das Trennen erfolgreich. PV1 und PV2 zeigen nur eine Proteinfraktion im unteren Bereich des Gels. Dieses Protein ist Parvalbumin. Die Proteinausbeute der Rohextraktion, bis hin zur Isolierung, war allerdings sehr gering, mit einer Konzentration von 0,059 mg/ml (s. Tabelle 19). Bei einem Einsatz von 100 g würde sich eine theoretische Gesamtausbeute von 1,3 mg errechnen.

Bei Versuch 2 wurde eine Menge von 200 g aus der Fraktion 2-U verwendet. Nach der Ammoniumsulfatfällung und der anschließenden Dialyse ergab sich eine Menge von 22 ml mit einer Proteinkonzentration von ca. 0,41 mg/ml. Um die Anzahl der Gelfiltrationsläufe zu verringern, erfolgte eine Einengung (s. Tabelle 20) um etwa 50 %.

Tabelle 20: Proteingehalt und Volumenänderung während der Einengung (Extinktionen s. Anlage 1, Tabelle 25)

Messung	Proteingehalt in mg/ml	Volumen in ml
zu Beginn	0,41	22
	0,42	
zum Ende	0,73	12
	0,75	

Abbildung 14 zeigt die Trennung der Proteine durch die Gelfiltration (Versuch 2). Peak 1 (P1) und Peak 2 (P2) sind die ersten beiden Peaks, also der größeren Proteine, welche abgetrennt werden sollten. P1 und P2 wurden direkt aufgetragen. Vergleicht man die Intensität der Banden, so sind die Proteinkonzentrationen von Peak 2 größer. Dies bestätigt auch die Extinktionskurve (s. Abbildung 15). Eine Trennung der Proteinfractionen ist im SDS-Gel jedoch nicht zu erkennen.

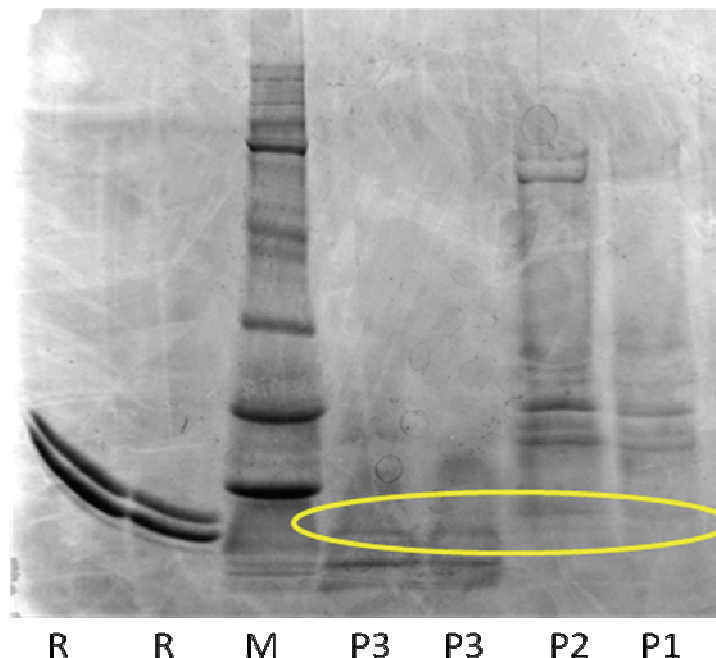


Abbildung 14: SDS-Gel (Versuch 2) Proteinfractionen nach der Gelfiltration

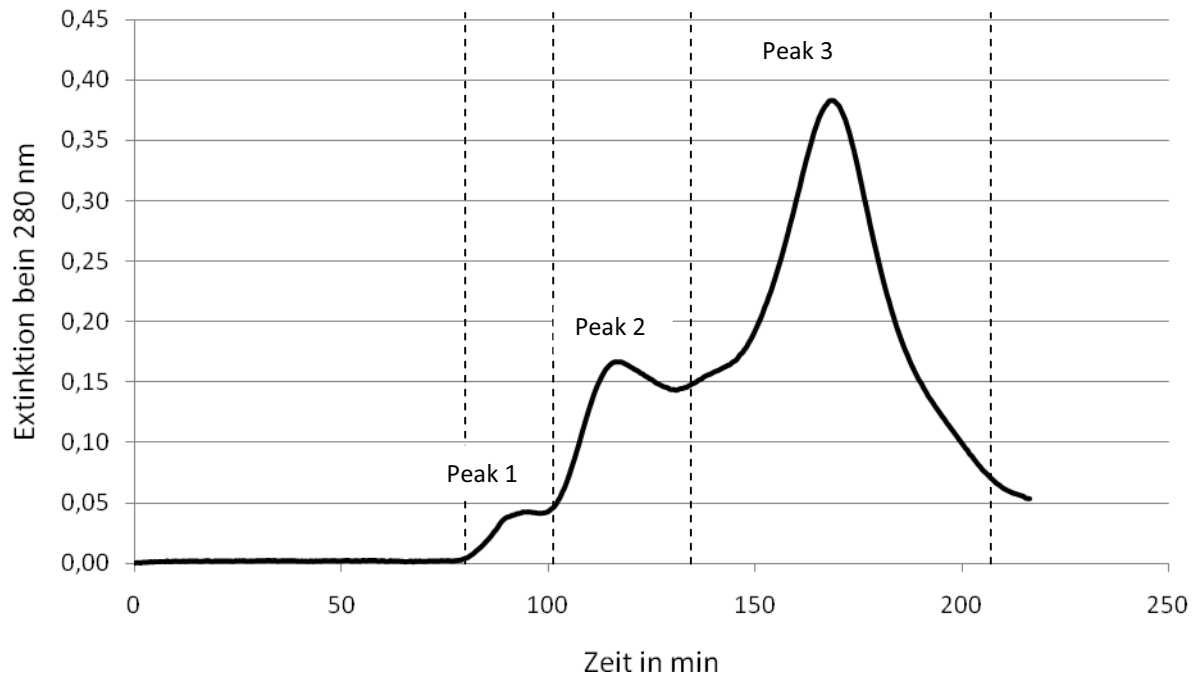


Abbildung 15: Kurve in Abhängigkeit von Zeit und Extinktion bei 280 nm während der Gelfiltration (Versuch 2)

Peak 3 (P3) wurde Gefriergetrocknet (s. Anlage 2. Tabelle 27). Für das Gel wurde eine Konzentration von 1 mg/ml hergestellt. Man erkennt, dass hier die Isolierung weitgehend erfolgreich war, da diese größeren Proteine kaum in der Fraktion P3 auftauchen, welche dass isolierte Parvalbumin darstellen. Betrachtet man aber Abbildung 16, in welcher verschiedene Konzentrationen von P3 aufgetragen wurden, erkennt man besonders im Bereich der Konzentration von 5 – 15 mg/ml die Verunreinigungen. In dem Bereich bis zu 25 kDa sind Proteine im Hintergrund als Rauschen zu erkennen. Eine weitere Bande befindet sich zwischen 29 kDa und 45 kDa, welche ab einer Konzentration von kleiner als 5 mg/ml jedoch nicht mehr zu erkennen ist. In dem Bereich um 6,5 kDa sind drei Proteinbanden zu erkennen. Diese erkennt man auch in der Probe aus dem Kopfbereich. Auch beim Marker scheinen diese Banden vorhanden zu sein.

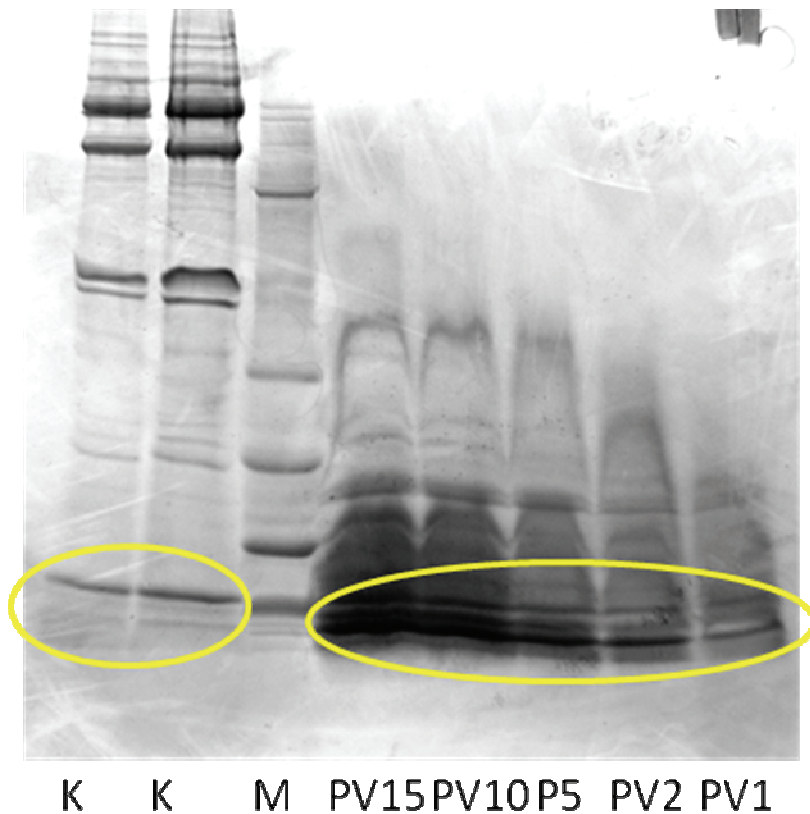


Abbildung 16: SDS-Gel (Versuch 2) PV-Konzentrationen von 1 – 15 mg/ml nach der Gelfiltration, M (Marker), K (Muskelfleisch aus dem Kopfbereich)

5 Diskussion

Thunfischfilet und Thunfisch in Dosen waren aufgrund des Fehlens bzw. der Nichtnachweisbarkeit von Proteinen im Größenbereich von Parvalbumin ungeeignet für die Isolation des allergenen Proteins. So war es nötig, einen kompletten Thunfisch zu untersuchen. Die Studie von Lim et al. (2005) untersuchte ebenfalls einen ganzen Thunfisch (*Thunnus tonggol*). Der Fisch wurde gehäutet und vertikal geteilt. Es folgte eine Einteilung in Segmente. Die Segmentierung begann 20 mm hinter dem Kopf. Die Einteilung erfolgte von vorn nach hinten in jeweils 25 mm breite Streifen und Rücken, Bauch und Mitte (roter Muskel). Die einzelnen Abschnitte wurden auf den Parvalbumingehalt untersucht. Im Ergebnis wurde festgestellt, dass der Gehalt von Kopf zum hinteren Teil des Fisches abnimmt. Ferner war im unteren, weißen Muskel der Anteil an Parvalbumin höher als im Rückenteil. Im roten Muskelfleisch konnte hingegen kein Parvalbumin nachgewiesen werden. Der höchste Anteil an Allergen ist demnach unmittelbar am Fischkopf im

Bauchbereich zu finden. Dieser Bereich ist am besten für Untersuchungen zu Parvalbumin geeignet. Die Ergebnisse erklärten die widersprüchlichen Aussagen zu früheren Untersuchungen des Parvalbumingehalt in Thunfisch (Lim et al., 2005). Vergleicht man die Studie nach Lim et al. (2005) mit der jetzigen Untersuchung, so sind die Ergebnisse nahezu identisch. Im roten Muskelfleisch, s. Abbildung 8 Fraktion 3-R und 6-R sind jedoch Proteinbanden im Bereich von 6 – 14 kDa zu erkennen. Ob es sich hierbei tatsächlich um PV handelt wurde nicht nachgewiesen. Es ist jedoch zu vermuten, dass es sich um PV handelt, da in einer Studie nach Kobayashi et al., (2006), der Gehalt von Parvalbumin im roten und weißen Muskelfleisch untersucht wurde. Dabei stellte man fest, dass in beiden Muskelfraktionen das PV vorhanden war. Die Menge des Proteins im roten Muskelfleisch war hier wesentlich geringer, als im Vergleich zum weißen Muskelfleisch. Das Potential zu allergenen Reaktionen ist demnach auch geringer (Kobayashi et al., 2006).

Die Konzentration an Parvalbumin im Thunfisch war wesentlich geringer, im Vergleich zu den anderen untersuchten Fischarten. Thunfisch gehört zwar zu den kaltblütigen Wirbeltieren wie andere Fischarten, jedoch besitzt er ein endothermisches System. Dieses System ermöglicht dem Thunfisch eine Erhöhung der Körpertemperatur. Auch homoiotherme Tiere zeigen ein geringeres Vorhandensein an Parvalbumin. Die Gemeinsamkeit einer erhöhten Körpertemperatur wird als Ursache für den geringen Parvalbumingehalt angesehen (Kawase et al., 2001).

In den beiden Versuchen sollte PV isoliert werden, jedoch ist im Versuch 2 die Aufreinigung der Probe wesentlich schlechter. Der erste Unterschied im Ablauf war der Proteinaufschluss. Dieser kann jedoch als Grund ausgeschlossen werden, da in Abbildung 9: SDS-Gel Rohproteinextraktion mit 1 (GPC-Puffer), 2 (Tris/Glycin-Puffer), 3(SDI-Puffer) Mischzeiten 1,2,3 (keine Mischzeit), 1.1, 2.1,3.1 (Mischzeit 1 h), A (zuerst erhitzt, dann gemischt), B (zuerst gemischt, dann erhitzt)Abbildung 9 und Abbildung 10 die SDS-Gele nach der Extraktion, klare Banden zeigen. Der nächste Unterschied war die Aufkonzentrierung der Probe. Während der Einengung sind die Salzkonzentrationen gestiegen. Die PBS-Konzentration müsste demnach etwa 20 mM und die Natriumchlorid-Konzentration 0,3 M betragen. Die empfohlene Konzentration des Phosphat-Puffers von 50 mM (GE Healthcare, 2006) wurde nicht erreicht, aber die empfohlene Natriumchlorid-Konzentration von 0,15 M (GE Healthcare, 2006) wurde demnach weit überstiegen. Die optimalen Konzentrationen dienen dazu, die unspezifischen Bindungen auf ein Minimum zu reduzieren und damit eine optimale Trennung zu erreichen. Durch die erhöhte Natriumchlorid-

Konzentration könnte die Isolierung der Proteinfractionen negativ beeinflusst worden sein. Im Versuch 2 war die aufgetragene Menge an Probe um 21 % höher; auch der Proteingehalt der Probe war durch die Einengung und die optimierte Extraktion mehr als doppelt so hoch. Die Trennung wird dadurch jedoch nur gering vermindert. Der letzte Unterschied bestand darin, dass im Versuch 1 keine Lyophilisierung der aufgereinigten Probe, sondern nur eine Aufkonzentrierung stattfand. Vergleicht man aber die Peaks P1, P2 und P3 aus Abbildung 14 miteinander, so sind in allen 3 Fraktionen Verunreinigungen zu erkennen. P1 und P2 wurden nicht gefriertrocknet. Die Lyophilisierung als Ursache der Verunreinigung bzw. Degenerierung der Proteine kann somit ausgeschlossen werden. Abbildung 15 bestätigt die Vermutung der unzureichenden Trennung durch die Gelfiltration. Zu erkennen ist, dass die Basislinie zwischen den Peaks nicht erreicht wurde. Um die Aufreinigung zu verbessern, sollte der Richtwert von 0,15 M Natriumchlorid im Puffer eingehalten werden. Die Durchlaufgeschwindigkeit von 0,5 ml/min könnte gesenkt werden. Die einzelnen Peaks würden dann nicht so stark ineinander übergehen, und die Proteinfractionen würden besser getrennt werden (Rehm 2006).

Da eine möglichst reine Probe für die Herstellung monoklonaler Antikörper anzustreben ist, muss die vorhandene Probe weiter gereinigt werden. Eine Möglichkeit wäre die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC). Durch die HPLC wird eine wesentlich bessere Trennung durch die höhere theoretische Trennstufenanzahl von 10000 bis 40000 erreicht. Bei Niederdruckanlagen, wie der Gelfiltration, beträgt die Anzahl der Stufen wenige hundert (Geckeler et al., 1998). Speziell die Reversed-Phase-HPLC (RP/HPLC) sollte besonders geeignet sein, da diese für kleine Proteine optimal ist (Rehm, 2006). Eine Alternative, das PV aus dem Rohprotein zu isolieren wäre die Ionenaustauschchromatographie (IC). Der wesentliche Vorteil ist hierbei die große Beladbarkeit, so könnten die ersten Aufreinigungsschritte bis hin zur GPC ersetzt werden. Weitere Vorteile der IC wären die besseren Reinigungsfaktoren und erhöhte Ausbeuten im Vergleich zur GPC (Rehm, 2006).

Eine Alternative wäre die Antikörper-Herstellung mit dem GPC-Produkt, welches die Verunreinigungen enthält. Die HPLC gereinigten Purifikate könnten dann einem Screening unterzogen werden. Die Antikörper mit der höchsten Affinität würden so erkannt werden. Abbildung 16 lässt vermuten, dass etwa drei Proteinfractionen im unteren Bereich von 14 kDa vorhanden sind. Die Vermutung, dass es mehrere Proteinbanden in diesem Bereich gibt, bestätigt auch Abbildung 8. Hier sind im relevanten Bereich des roten Muskelfleisches (3-R und 6-R) mehrere Proteinban-

den zu erkennen. Eine ähnliche Untersuchung erfolgte in einer Studie nach Celio et al. (1988), in welcher mehrere monoklonale Antikörper aus dem Parvalbumin des Karpfens untersucht wurden. Es ergab sich, dass einige Antikörper das Parvalbumin aus Ratten und anderen Tieren erkannten, andere hingegen nicht so gut bzw. gar nicht (Celio et al., 1988). Eine weitere Studie beschäftigte sich mit verschiedenen Antisera gegen Parvalbumine aus verschiedenen Fischarten. Die Ergebnisse zeigten auch hier ein breites Spektrum an Reaktionen (Piront, Gosselin-Ray, 1975).

6 Zusammenfassung

Fisch ist einer der häufigsten IgE vermittelten Auslöser für Nahrungsmittelallergien. Das Calcium bindende Protein Parvalbumin dominiert bei Fisch. Die Struktur des Parvalbumins ist in verschiedenen Fischarten ähnlich, so dass es zu Kreuzreaktionen kommt.

Die Aufgabe dieser Diplomarbeit war es, das Protein Parvalbumin aus Thunfisch zu isolieren. Es sollte möglichst rein sein, so dass es für die Herstellung monoklonaler Antikörper verwendet werden kann.

Es wurde zunächst unter Standard-Bedingungen extrahiert, d.h. man orientierte sich an den vorangegangenen Extraktionsversuchen der anderen Fischarten. Durch die Ammoniumsulfatfällung und Gelchromatographie erfolgte die Isolation des Protein Parvalbumin. Da die Ausbeute an Parvalbumin jedoch sehr gering war, erfolgte eine Optimierung der Extraktion, um die Ausbeute des Allergens zu erhöhen. Fazit dieser Versuche war, eine Extraktion mit erhöhter Mischzeit und dem Erhitzen der Proteinlösung nach dem Mischen.

Das isolierte Parvalbumin wurde in Versuch 1 gewonnen. Im Versuch 2 konnte kein reines Protein erhalten werden. Es zeigten sich im SDS-Gel Verunreinigungen durch andere Proteine. Der wesentliche Unterschied in den Versuchen war die aufkonzentrierte Proteinlösung vor der Gelchromatographie in Versuch 2. Dies führte zu einer unzureichenden Trennung der einzelnen Fraktionen. Um das verunreinigte Protein aus Versuch 2 zur Herstellung monoklonaler Antikörper verwenden zu können, muss es durch Ionenaustauschchromatographie bzw. RP/HPLC weiter isoliert werden.

7 Literaturverzeichnis

anamed Elektrophorese GmbH: Arbeitsanleitung für Fertiggele, 2009.

Arif, S.H.: A Ca^{2+} -binding protein with numerous roles and uses: Parvalbumin in molecular biology and physiology. Wiley Periodicals, Inc. BioEssays. Volume 31 (2009), S. 410 – 421.

Berchtold, M. W.; Wilson, K. J.; Heizmann C. W.: Isolation of Neuronal Parvalbumin by High-Performance Liquid Chromatography. Characterization and Comparison with Muscle Parvalbumin. Biochemistry. Volume 21 (1982), S. 6552.

Bugajska-Schretter, A.; Elfman, L.; Fuchs, T.; Kapiotis, S. Rumpold, H.; Valenta, R.; Spitzauer, S.: Parvalbumin, a cross-reactive fish allergen, contains IgE-binding epitopes sensitive to periodate treatment and Ca^{2+} depletion. Journal of Allergy and Clinical Immunology. Volume 101 No. 1 (1998), S. 67 – 74.

Celio, M. R.; Baier, W.; Schärfer, L.; De Viragh, P. A.; Gerday, Ch.: Monoclonal antibodies directed against the calcium binding protein parvalbumin. Cell Calcium. Volume 9 (1988) S. 81 – 86.

Chemie.DE Information Service GmbH, <http://www.chemie.de/lexikon/d/Bradford-Test/>, Stand: 11.05.2009

Chen, L.; Hefle, S. L.; Taylor, S. L.; Swoboda, I.; Goodman, R. E.: Detecting Fish Parvalbumin with Commercial Mouse Monoclonal Anti-frog Parvalbumin IgG. Journal of agricultural and food chemistry. Volume 54 No. 15. (2006), S. 5577 – 5582.

Choi, K.Y.; Hong, K. W.: Genomic DNA Sequence of Mackerel Parvalbumin and a PCR-Test for Rapid Detection of Allergenic Mackerel Ingredients in Food. Food Sci. Biotechnologie. Volume 16 No. 1 (2007), S. 67 – 77.

Deutsche See GmbH, Sitz und Registergericht Bremerhaven. Reg.-Nr. HRB 5040 BHV.

Faeste, C. K.; Plassen, C.: Quantitative sandwich ELISA for the determination of fish in foods. Journal of Immunological Methods 329 (2008), S. 45 – 55.

Ferreira, F.; Hawranek, T.; Gruber, P.; Wopfner, N.; Mari, A.: Allergic cross-reactivity: from gene to the clinic. Allergy. Volume 59 No. 3 (2004), S. 243 – 267.

GE Healthcare Bio-Sciences AB: Instructions 28-4026-53 AB, 08/2006.

Geckeler, K. E.; Eckstein, H.: Bioanalytische und biochemische Labormethoden. Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH. Braunschweig/ Wiesbaden, 1998.

Geisler, L.: Innere Medizin II, 14. Auflage. W. Kohlhammer, Stuttgart 1992.

Habermehl, G.,G.; Hammann, P. E.; Krebs, H.C.: Naturstoffchemie. Eine Einführung. 2. Auflage. Berlin. Springer, 2002.

Kawase, S.; Ushio, H. Ohshima, T.; Yamanaka, H.; Fukuda, H.: Preparation of monoclonal antibodies against tuna Parvalbumin. *Fisheries Science*. Volume 67 (2001), S. 559 – 561.

Keller, M.: Rangfolge der bedeutendsten See- und Süßwasserfische in Prozent.
www.fischinfo.de/index.php?1=1&page=marktanteile&link=f2. Stand: 11. 08 2009

Kleber, H.-P.; Schlee, D.; Schöpp, W.: *Biochemisches Praktikum. Methoden für Studium, Praxis, Forschung*. 5. Auflage. Jena. Gustav Fischer, 1997.

Kobayashi, A.; Tanak, H.; Hamada, Y.; Ishizaki, S.; Nagashima, Y.; Shiomi, K.: Comparison of allergenicity and allergens between fish white and dark muscles. *Allergy*. Volume 61 No. 3 (2006), S. 357 – 363.

Leitsätze für Fisch, Krebse und Weichtiere und Erzeugnisse daraus. Neufassung vom 27. November 2002 (Beilage Nr. 46 b zum BAnz. Vom 7. März 2003, GMB1 Nr. 8 – 10 S. 157 vom 20. Februar 2003), geändert am 08. 01. 2008 (Beilage zum BAnz. Nr. 89 vom 18. 06. 2008, GMB1 Nr. 23 – 25 S. 451 ff vom 19. 06. 2008).

Lim DL, Neo KH, Goh DL, Shek LP, Lee BW: Missing Parvalbumin: Implications in diagnostic testing for tuna allergy. *The Journal of Allergy and clinical immunology*, Volume 115(4) (2005), S. 874 – 875.

Pechère, J.-F.; Demaille, J.; Capony, J.-P.: Muscular Parvalbumins: Preparative and analytical methods of General Applicability. *Biochimica et biophysica acta : BBA ; international journal of biochemistry*. Elsevier. Amsterdam bio., Band 236 (2) (1973), S. 391 – 408.

Piront, A.; Gosselin-Rey, C.: Immunological Cross-Reactions among Gadidae Parvalbumins. *Biochemica/Systematics and Ecology*, Volume 3 (1975), S. 251 – 255.

Reese, I. ; Constien, A.; Schäfer, C.: *Richtig einkaufen bei Nahrungsmittel-Allergie*. Stuttgart. Trias, 2007.

Rehm, H.: *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. 5. Auflage. München. Spektrum Akademischer, 2006.

SERVA Electrophoresis GmbH,
www.serva.de/servaWeb/www_root/documents/43200_d_1.pdf, Stand: 23.04.2009.

Sohal, S. V.; Zhang, F.; Yizhar, O.; Deisseroth, K.: Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *nature*. Vol. 459/ 4 (2009), S.698 – 702.

Stichel, C. C.; Kägi, U.; Heizmann, C. W.: Parvalbumin in Cat Brain: Isolation, Characterization, and Localization. *Journal of Neurochemistry*. Volume 47 No. 1 (1986), S. 46 – 53.

Stiftung Warentest: *Allergien. Das Immunsystem auf Abwegen*. 2. Auflage. Berlin, 1998.

Van Do, T.; Hordvik, I.; Endresen, C.; Elsayad, S.: Charakterization of parvalbumin, the major allergen in Alaska pollak, and comparison with codfish Allergen M. *Molecular Immunology*. Elsevier. Volume 42 (2005), S. 345-353.

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Produktübersicht der Thunfischdosen.....	6
Tabelle 2: Zusammensetzung des zweifach konzentrierten SDS-Puffers.....	7
Tabelle 3: Zusammensetzung des fünffach konzentrierten Laufpuffers.....	7
Tabelle 4: Zusammensetzung der Färbung und Fixierung für die SDS-PAGE.....	8
Tabelle 5: Zusammensetzung der Entfärbelösung für die SDS-PAGE.....	8
Tabelle 6: Verwendete Geräte für die Proteinisolation.....	9
Tabelle 7: Übersicht über ansonsten verwendete Materialien.....	9
Tabelle 8: Einwaage der verschiedenen Thunfischfraktionen und des GPC-Puffers.....	11
Tabelle 9: Übersicht der Varianten zur Optimierung der Rohproteinkonzentration bei der Extraktion des Thunfisches.....	13
Tabelle 10: Verdünnungsstufen der Dialyse mit GPC-Puffer (Ausgangsmenge 7 ml; ab Verdünnungsstufe 2 20 ml).....	15
Tabelle 11: Verdünnungsstufen der Dialyse mit bidestilliertem Wasser (Ausgangsmenge 80 ml).....	15
Tabelle 12: Parameter für die Gelfiltration.....	17
Tabelle 13: Extinktion und Proteingehalt des Thunfisches in Dosen nach Bradford.....	21
Tabelle 14: Proteingehalt des Thunfischfilets.....	22
Tabelle 15: Proteingehalt der Gelbflossen-Thunfischfraktionen (Daten s. Anlage 1, Tabelle 23).....	24
Tabelle 16: Extinktionen und Proteingehalt der Extraktionsversuche mit verschiedenen Puffern (GPC-Puffer, Tris/Glycin-Puffer, SDI-Puffer und Erhitzung vor, bzw. nach der Mischzeit (A: zuerst erhitzt und dann gemischt; B: zuerst gemischt und dann erhitzt).....	25
Tabelle 17: Extinktionen und Proteingehalt der Extraktionsversuche mit GPC-Puffer nach der variablen Mischzeiten und Erhitzungsvarianten (A: zuerst erhitzt und dann gemischt; B: zuerst gemischt und dann erhitzt).....	26
Tabelle 18: Proteingehalt des Gelbflossen-Thunfisches der Fraktion 1-O, bei verschieden Extraktionsgradienten der Ammoniumsulfatfällung (Daten s. Anhang 1, Tabelle 24).....	28

Tabelle 19: Daten der Extinktion nach Aufreinigung und Gelfiltration Versuch 1(Proteinfraktion nach 300 Zyklen)	30
Tabelle 20: Proteingehalt und Volumenänderung während der Einengung (Extinktionen s. Anlage 1, Tabelle 25).....	31
Tabelle 21: Verdünnungen für die Eichkurve nach Bradford (Ausgangslösung BSA 2mg/ml)	I
Tabelle 22: Messdaten der Eichkurve nach Bradford	I
Tabelle 23: Extinktionen und Proteingehalte des Gelbflossen-Thunfisches.....	I
Tabelle 24: Extinktionen des Gelbflossen-Thunfisches der Fraktion 1-O im Überstand und Pellet, bei verschiedenen Extraktionsgradienten der Ammoniumsulfatfällung	II
Tabelle 25: Extinktionen während der Einengung (Versuch 2).....	II
Tabelle 26: Herstellung von Ammoniumsulfatlösungen unterschiedlicher Sättigungen bei 0 C (Kleber et al., 1997)	III
Tabelle 27: Programmablauf für die Gefriertrocknung.....	III

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Gelbflossen-Thunfisch	10
Abbildung 2: Aufteilung des Thunfisches in Fragmente von 1 bis 6 und Rücken- Muskelfleisch (O), rotes Muskelfleisch (R), Bauch-Muskelfleisch (U)	12
Abbildung 3: Querschnitt des Gelbflossen-Thunfischfilet mit Rücken-Muskelfleisch (O), rotem Muskelfleisch (R) und Bauch-Muskelfleisch (U).....	12
Abbildung 4: Proteinmarker (Serva Electrohoresis, 2009)	19
Abbildung 5: Eichkurve nach Bradford (Daten s. Anlage 1, Tabelle 22).....	21
Abbildung 6: SDS-Gel des Thunfisch in Dosen M (Marker), 1-5 (Proben s. Tabelle 1).....	22
Abbildung 7: SDS-Gele des Thunfischfilets (T) im Vergleich mit Kabeljau (K), Pangasius (P), Rotbarsch (R), Alaska Seelachs (A S), Lachs (L) und Scholle (S); Marker (M)	23
Abbildung 8: SDS-PAGE der Thunfischfraktionen (Fraktionen s. Abbildung 2; M (Marker))	24
Abbildung 9: SDS-Gel Rohproteinextraktion mit 1 (GPC-Puffer), 2 (Tris/Glycin- Puffer), 3(SDI-Puffer) Mischzeiten 1,2,3 (keine Mischzeit), 1.1, 2.1,3.1 (Mischzeit 1 h), A (zuerst erhitzt, dann gemischt), B (zuerst gemischt, dann erhitzt).....	26
Abbildung 10: SDS-Gel der Extraktionsversuche von Thunfisch (2-U) mit GPC-Puffer unter Variablen Mischzeiten und Erhitzungsbedingungen (1: 1h Mischzeit; A: zuerst Erhitzt, dann gemischt; B: zuerst gemischt, dann erhitzt; M: Marker)	27
Abbildung 11: SDS-Gel der Ammoniumsulfatfällungen; Sättigung von 45 – 75 %; P (Pellet), Ü (Überstand)	28
Abbildung 12: SDS-Gel (Versuch1) der Ammoniumsulfat-fraktionen Ü3 (Überstand nach Dialyse und erneuter Zentrifugierung), P2 (Pellet nach Dialyse und Zentrifugierung gelöst in Wasser), M (Marker), Ü1 (Überstand nach der ersten fraktionierten Fällung), P1 (Pellet nach der ersten fraktionierten Fällung gelöst in Wasser), Ü2 (Überstand nach zweiter fraktionierter Fällung).....	29

Abbildung 13: SDS Gel (Versuch1) nach der Aufreinigung durch die Gelfiltration, M (Marker), PV1, PV2 (aufgereinigte Parvalbuminproben)	30
Abbildung 14: SDS-Gel (Versuch 2) Proteinfractionen nach der Gelfiltration.....	31
Abbildung 15: Kurve in Abhängigkeit von Zeit und Extinktion bei 280 nm während der Gelfiltration (Versuch 2)	32
Abbildung 16: SDS-Gel (Versuch 2) PV-Konzentrationen von 1 – 15 mg/ml nach der Gelfiltration, M (Marker), K (Muskeiflesch aus dem Kopfbereich)	33
Abbildung 17: SDS-PAGE der Thunfischfraktionen (Fraktionen s. Abbildung 2; M (Marker) , A.S. (Alaska Seelachs), K. (Kabeljau)).....	II

Anlagenverzeichnis

Anlage 1

Anlage 2

Anlage 3

Anlage 1

Tabelle 21: Verdünnungen für die Eichkurve nach Bradford (Ausgangslösung BSA 2mg/ml)

BSA (mg/ml)	Verdünnung	Proteinlösung	Pufferlösung
1,4	1:1,428	0,7	0,3
1	1:2	0,5	0,5
0,75	1:2,66	0,375	0,625
0,5	1:4	0,25	0,75
0,25	1:8	0,125	0,875
0,1	1:20	0,05	0,95

Tabelle 22: Messdaten der Eichkurve nach Bradford

BSA in mg/ml	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Mittelwert	Standardabweichung
1,4	0,8786	0,8739	0,8751	0,88	0,00244
1	0,6537	0,6695	0,6724	0,67	0,01006
0,75	0,5032	0,5093	0,5073	0,51	0,00311
0,5	0,3078	0,3107	0,3330	0,32	0,01379
0,25	0,1647	0,1728	0,1719	0,17	0,00444
0,1	0,0855	0,0821	0,0846	0,08	0,00176
Nullwert	0,0000	0,0089	0,0090		

Tabelle 23: Extinktionen und Proteingehalte des Gelbflossen-Thunfisches

Thunfischfraktionen	Extinktionen bei 594,7 nm		Mittelwert	Proteingehalt in mg/ml
1-O	0,3483	0,2946	0,3214	0,498
1-U	0,3137	0,2652	0,2894	0,449
3-O	0,2466	0,2557	0,2511	0,389
3-U	0,2485	0,2331	0,2408	0,373
6-O	0,2616	0,2421	0,2518	0,390
6-U	0,2421	0,2397	0,2409	0,373
3-R	0,2893	0,2533	0,2713	0,420
6-R	0,2949	0,2764	0,2856	0,443

Tabelle 24: Extinktionen des Gelbflossen-Thunfisches der Fraktion 1-O im Überstand und Pellet, bei verschiedenen Extraktionsgradienten der Ammoniumsulfatfällung

Extraktionsgrad in %	Fraktion	Extinktion bei 595 nm		Proteingehalt in mg/ml
45	Pellet	0,0818	0,0886	0,132
45	Überstand	0,1771	0,1694	0,269
55	Pellet	0,1299	0,1346	0,205
55	Überstand	0,1362	0,1277	0,205
65	Pellet	0,1851	0,1767	0,280
65	Überstand	0,1306	0,1297	0,202
75	Pellet	0,1941	0,2019	0,307
75	Überstand	0,0633	0,0704	0,104

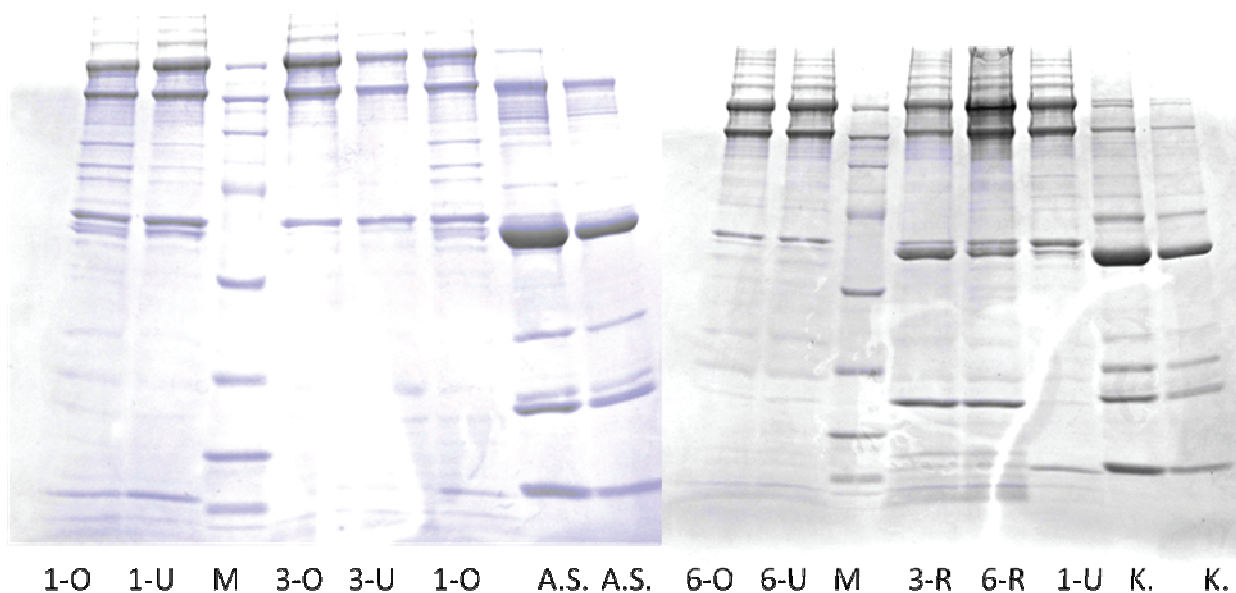


Abbildung 17: SDS-PAGE der Thunfischfraktionen (Fraktionen s. Abbildung 2; M (Marker), A.S. (Alaska Seelachs), K. (Kabeljau))

Tabelle 25: Extinktionen während der Einengung (Versuch 2)

Messung	Extinktion bei 595 nm	Volumen in ml
zu Beginn	0,2661	22
	0,2728	
zum Ende	0,4742	12
	0,4835	

Anlage 2

Tabelle 26: Herstellung von Ammoniumsulfatlösungen unterschiedlicher Sättigungen bei 0 °C (Kleber et al., 1997)

Die in der Tabelle aufgeführten Werte geben die Menge von festem Ammoniumsulfat (in Gramm) an, die bei 0 °C (1) und 25 °C (2) pro Liter Lösung zugegeben werden müssen, um eine Ammoniumsulfatlösung bestimmten Sättigungsgrades (in %) herzustellen.

Anfangskonzentration von Ammoniumsulfat (% Sättigung)	Werte für 0 °C																			
	Endkonzentration von Ammoniumsulfat (% Sättigung)																			
	10	15	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0	53	80	106	134	164	187	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697
10		28	53	81	109	133	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627
15			26	54	82	87	111	141	172	204	237	271	316	343	381	420	460	503	547	592
20				27	55	75	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557
25					27	46	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	488	522
30							28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488
33								40	70	101	133	166	200	235	271	309	347	387	429	472
35								28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453
40									29	58	89	120	153	182	212	258	296	335	376	418
45										29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383
50											30	60	92	125	159	194	230	268	308	348
55												30	61	93	127	161	197	235	273	313
60													31	62	95	129	164	201	239	279
65														31	63	97	132	168	205	244
70															32	65	99	134	171	209
75																32	66	101	137	174
80																	33	67	103	139
85																		34	68	105
90																			34	70
95																				35

Tabelle 27: Programmablauf für die Gefriertrocknung

Phasen	Temperatur in °C	Zeit in h	Druck in mbar
Einfrieren	-20	2,5	-
Vorbereiten	0	7	0,94
Haupttrocknung	15	9	0,94
Nachtrocknung	25	2	0,001

Anlage 3

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Diese Diplomarbeit entstand an der Hochschule Neubrandenburg University of Applied Sciences unter der Leitung von Prof. Dr. Christine Wittmann.

Besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Wittmann und Frau Dr. Albrecht für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit in der Arbeitsgruppe anzufertigen. Nicht zuletzt durch die freundliche und engagierte Betreuung hat mir diese Arbeit viel Freude bereitet.

Meinem Betreuer Stefan Hartwig danke ich, für die hilfreichen Anregungen und seine konstruktive Kritik bei der Erstellung dieser Arbeit.

Bei David Malowsky und Dirk Heymann möchte ich mich für das Korrekturlesen dieser Arbeit und für die hilfreichen Anmerkungen bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt abschließend meiner Frau, die mich bei meinem Berufswunsch unterstützt hat und mir stets helfend zur Seite stand.