

Projekt Umwelt und Gesundheit

Forschungsbericht FZKA-PUG

„Herstellung rekombinanten α_{S1} -Kaseins als Basis verbesserter diagnostischer und therapeutischer Verfahren bei Kuhmilch-Allergien“

von

K. Deichmann, P. Spürgin, J. Forster

Universitäts-Kinderklinik, Mathildenstrasse 1, 79106 Freiburg

Förderkennzeichen: PUG P 95004

Die Arbeiten des Projektes Umwelt und Gesundheit werden mit Mitteln des Landes Baden-Württemberg gefördert

Mai 1997

Herstellung rekombinanten α_{S1} -Kaseins als Basis verbesserter diagnostischer und therapeutischer Verfahren bei Kuhmilch-Allergien

K. Deichmann, P. Spürgin, J. Forster

Universitäts-Kinderklinik, Mathildenstraße 1, 79106 Freiburg

Zusammenfassung

Die Kuhmilch-Allergie ist die häufigste Allergie im Säuglings- und Kleinkindesalter. Die verfügbaren in vitro-Tests sind wenig aussagekräftig und Provokationsteste sind zeit- und kostenaufwendig. α_{S1} -Kasein stellt das hitzestabile Hauptallergen der Kuhmilch dar.

Ziel der Arbeit war es, ein definiertes, einfach und gefahrlos anzuwendendes sowie aussagekräftiges Diagnostikum zu entwickeln, das sowohl in vitro wie in vivo Anwendung finden kann.

Um die schwierige Auftrennung natürlichen α_{S1} -Kaseins aus Rohmilch zu umgehen, wurde die kodierende Sequenz des α_{S1} -Kaseins in einen Expressionsvektor kloniert und das Protein als Fusionsprotein mit dem maltosebindenden Protein (MBP) in Bakterienzellen exprimiert und aufgereinigt. Im Anschluß wurde das rekombinante Kasein mittels einer Protease vom Fusionsanteil abgespalten und abgetrennt. Die Identität des Proteins konnte über Aminosäuresequenzierungen nachgewiesen werden.

Die immunologische Vergleichbarkeit des rekombinanten mit dem nativen Kasein wurde im IgE- und IgG-Bindungsassay anhand von Patientenseren sowie mit Hilfe eines Phagemid-Systems nachgewiesen.

Gleichzeitig konnten wir die Wertigkeit der IgE-Bindungsassays auf rekombinantes wie natives α_{S1} -Kasein für die Diagnostik der Kuhmilchallergien nachweisen.

Die von uns für α_{S1} -Kasein etablierte rekombinante Proteinherstellung erlaubt auch die Expression von Fragmenten des Proteins, was sich als wertvolles Hilfsmittel bei der Erforschung der B- und T-Zell-Epitope des α_{S1} -Kaseins erweisen könnte.

Die spezifisch α_{S1} -Kasein erkennende Phagenpopulation erlaubt, ein kostengünstiges und einfach anzuwendendes Nachweisverfahren für die Anwesenheit versteckter Kuhmilchproteine in Nahrungsmitteln zu etablieren. Es ergibt sich dabei die Möglichkeit, auch geringste Mengen versteckten α_{S1} -Kaseins in Nahrungsmitteln aufzuspüren. Unspezifische Resultate des Phagemid-Systems ließen sich auf Unspezifitäten des Nachweisverfahrens zurückführen. Zur Optimierung des Verfahrens wurde rekombinantes, spezifisch α_{S1} -Kasein erkennendes Protein hergestellt. Der Nachweis der Wertigkeit dieses Systems steht noch aus.

Recombinant α S1-casein as basis for improved diagnostic and therapeutic procedures in cow's milk allergy.

K. Deichmann, P. Spürgin, J. Forster

University Children's Hospital, University of Freiburg, Mathildenstrasse 1, D 79106 Freiburg

Summary

Cow's milk allergy is the most common allergic disorder in very young children. At the moment in vitro testing is hardly predictive, whereas provocation tests are time consuming and expensive. α_{s1} -casein is the main heat resistant allergen of cow's milk.

This work aimed to develop a well defined, simple and safe to use predictive diagnostic tool.

To avoid difficult separation of α_{s1} -casein from raw milk, the coding sequence of α_{s1} -casein has been cloned in an expression vector and expressed as recombinant fusion-protein with the maltose binding protein (MBP) in bacterial hosts. Recombinant α_{s1} -casein was isolated following FXa protease digestion. The identity of the protein was tested by amino acid sequencing.

Comparable immunologic reactivity of native versus recombinant α_{s1} -casein has been tested by IgE and IgG binding assays using patients sera and by a phagemid display system.

The value of IgE binding assays was tested in groups of patients and healthy individuals.

Recombinant expression of defined fragments of α_{s1} -casein might serve as a useful tool in the investigation of B and T-cell epitopes of the whole protein.

The phagemid with specific binding to α_{s1} -casein allows to establish a quick and easy-to-use, low-cost, highly specific and sensitive method to detect hidden cow's milk proteins. Unspecific results in the binding experiments could be attributed to unspecificities of the phagemid detection system. To avoid these, recombinant protein with specific binding to α_{s1} -casein was produced. The value of this system still has to be shown.

1. Aufgabenstellung

Die Kuhmilchallergie ist die häufigste Allergie im Säuglings- und Kleinkindesalter (Ferguson & Watret (1988)). Sie umfaßt neben den teils lebensbedrohlichen IgE-vermittelten Soforttyp-Reaktionen, zu denen akute asthmatische Beschwerden und schwere Kreislaufreaktionen gehören, auch zellvermittelte Reaktionen vom verzögerten Typ wie beispielsweise die atopische Dermatitis (Neurodermitis).

Die verfügbaren *in vitro*-Tests zur Erkennung betroffener Individuen mit Kuhmilchsensibilisierung sind wenig aussagekräftig, Provokationsteste sind sehr zeit- und kostenaufwendig (Niggemann et al. (1995), Bahna & Gandhi (1983), Hill et al. (1988), Goldman et al. (1963a), Goldman et al. (1963b)).

Die Hauptallergene der Kuhmilch stellen das α_{S1} -Kasein sowie das β -Laktoglobulin dar, wobei das erste alleine ein Drittel der gesamten Proteinmasse ausmacht (Bleumink & Young (1968)). Beide Proteine konnten in Frauenmilch nicht nachgewiesen werden und sind deshalb bei der Erforschung der Kuhmilchallergien von besonderem Interesse (Brignon et al. (1985), Chtouron et al. (1985)).

Ziel der Arbeit war es, auf der Basis des α_{S1} -Kaseins ein einfach und gefahrlos anzuwendendes, aussagekräftiges Diagnostikum zu entwickeln, sowohl für die *in vitro*- wie die *in vivo*-Anwendung.

Um die mit konventionellen proteinchemischen Verfahren schwierige Auftrennung des α_{S1} - und des α_{S2} -Kaseins zu umgehen und definierte Proteine zu erhalten, sollte hierzu die kodierende Sequenz des α_{S1} -Kaseins in Bakterienzellen exprimiert und aufgereinigt werden (Hofnung & Charbit (1992), Baldo & Donovan (1988)). Dabei kam uns zugute, daß α_{S1} -Kasein keine definierte Raumstruktur eigen ist und damit wahrscheinlich alleine sequentielle Epitope für die IgE-vermittelten Reaktionen verantwortlich zeichnen (Ribadeau-Dumas (1988)). Mögliche konformationsabhängige Epitope, die eine Expression des Proteins in Eukaryontenzellen zur korrekten Faltung des reifen Proteins erfordern würden, waren beim α_{S1} -Kasein nicht zu erwarten.

Die immunologische Vergleichbarkeit des rekombinanten mit dem nativen Kasein sollte im IgE-Bindungsassay anhand von Patientenseren sowie mit Hilfe eines Phagemid-Systems geprüft werden (Marks et al. (1992)).

Da Kasein als Lebensmittelzusatz nicht deklarationspflichtig ist, stellt seine versteckte Präsenz in Nahrungsmitteln und Medikamenten eine latente Gefahr für Kuhmilchallergiker dar. Dies gilt in besonderem Maße für jene Allergiker, die Soforttypreaktionen auf Kuhmilchproteine aufweisen und somit vital gefährdet sind.

Zur Detektion geringster Spuren versteckten α_{S1} -Kaseins in Nahrungsmitteln sollte das Phagemid-System eingesetzt und gegebenenfalls optimiert werden (Marks et al. (1992)). Hierbei standen neben der Verlässlichkeit des Nachweissystems sowohl die einfache Anwendung als auch die Wirtschaftlichkeit im Vordergrund.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Die kodierende Sequenz des α_{S1} -Kaseins wurde 1984 erstmals publiziert (Stewart et al. (1984)), der Erstbeschreiber stellte uns eine cDNA-Probe des Proteins zur Verfügung mit

gleichzeitig einem schriftlichen Einverständnis, diese zur Durchführung dieser Arbeiten zu gebrauchen.

Zur rekombinanten Expression nutzten wir einen kommerziell erhältlichen Vektor, der das exprimierte Protein als Fusionsprotein mit dem maltosebindenden Protein verbindet und damit eine leichte Aufreinigung des Proteins über Amylosesäulen ermöglicht (pMAL™-c2, New England Biolabs).

Rekombinante Phagensysteme sind ebenfalls kommerziell erhältlich, wir nutzten das pSKAN Phagemid-Display-System der Firma MoBiTec, Göttingen (Marks et al. (1992)).

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

3.1 Expression von α_{S1} -Kasein

Das α_{S1} -Kasein wurde als Fusionsprotein mit dem Maltose-bindenden Protein (MBP) aus E.coli exprimiert. Der MBP-Anteil erlaubt eine einfache und spezifische Aufreinigung des Fusionsproteins über eine Amylose-Chromatographie. Die Abspaltung des MBP-Anteils ist über eine zwischen den Proteinen liegende Faktor Xa-Schnittstelle möglich. Das α_{S1} -Kasein-Gen wurde mittels der Restriktionsenzyme Stu I und Xmn I geschnitten und in den Expressionsvektor pMAL™-c2 (New England Biolabs) inkloniert, wobei lediglich die erste Aminosäure des α_{S1} -Kaseins deletiert wurde. Zum Erhalt der Faktor Xa-Schnittstelle mußte die zweite Aminosäure der α_{S1} -Kasein-Sequenz von Prolin zu Serin mutiert werden.

					↓ Stu I		
pB α_{S1} C184	...	GCT	AGG	CCT	AAA	...	
α_{S1} Kasein	...	Ala	Arg	Pro	Lys	...	
			↑ reifes Protein				
pAH9	<i>ATC</i>	<i>GAG</i>	<i>GGA</i>	<i>AGG</i>	TCT	AAA	...
MBP	Ile	Glu	Gly	Arg	Ser	Lys	...
			Faktor Xa			↑	
					↓ Xmn I		
pMAL-c2	<i>ATC</i>	<i>GAG</i>	<i>GGA</i>	<i>AGG</i>	<i>ATT</i>	<i>TCA</i>	...
MBP	Ile	Glu	Gly	Arg	Ile	Ser	...

Abb. 1: Darstellung der kodierenden Sequenzen des Kasein-cDNA-Ausgangsplasmids pB α_{S1} C184 mit Angabe des Beginns des reifen Proteins in der Aminosäure-Übersetzung, des Expressionsplasmids pMAL-c2 mit Übersetzung in das maltosebindende Protein sowie des zur Expression verwendeten Plasmids pAH9, jeweils mit Angabe des mutierten Kodons in **FETT**, des Plasmidanteils in *kursiv*, der für die Klonierung verwendeten Restriktionsenzym-schnittstellen StuI und XmnI sowie der Proteasen-Schnittstelle Faktor Xa zur Abspaltung des Fusionsanteils.

3.2 *Reinigung des rekombinanten α_{S1} -Kaseins*

Das nach einem Ultraschallaufschluß erhaltene Zell-Lysat wurde über ein Amylose-Säule gereinigt. Das erhaltene Fusionsprotein wurde mit Faktor Xa gespalten und dieser sowie das abgespaltene MBP über eine Ionenaustauscher-Chromatografie vom rekombinanten α_{S1} -Kasein abgetrennt

3.3 *Immunologischer Vergleich zwischen rekombinantem und nativem α_{S1} -Kasein*

Die Antikörper-Bindungseigenschaften des Fusionsproteins, des rekombinanten und des nativen α_{S1} -Kaseins wurden mittels IgE- und IgG-ELISA untersucht (Abb. 3). ELISA-Platten wurden mit identischen Mengen der Proteine geschichtet und mit Humansenen inkubiert. Es wurden Seren von drei Kollektiven untersucht: Patienten mit nachgewiesener Kuhmilchallergie (KMA, n=16); atopische Patienten (n=21) und gesunde Kontrollindividuen (n=21).

3.4 *Phagemid-Display*

Zum Nachweis von Allergenen wurde am Beispiel des α -Kaseins versucht, ein phagemid-basiertes Nachweissystem zu verwenden. Dadurch konnte auf die zeit- und kostenintensive Herstellung monoklonaler Antikörper sowie auf den Einsatz von Tierversuchen verzichtet werden. Wir haben das pSKAN Phagemid-Display-System der Firma MoBiTec verwendet (Marks et al. (1992)). Dieses System beruht auf einem Phagemid, dessen Genom das Gen für

ein Fusionsprotein enthält, das aus dem Hüllprotein pIII des Phagen und dem humanen pankreatischen Trypsininhibitor (PSTI) besteht. Dieser Trypsininhibitor wiederum trägt an seiner Oberfläche eine hypervariable Schleife, die mit anderen Proteinen in Wechselwirkung treten kann, analog den hypervariablen Schleifen eines Antikörpers. Das pSKAN Kit enthält drei verschiedene DNA-Bibliotheken für Phagemids mit hypervariablen Schleifen von 6, 7 und 8 Aminosäuren.. Jede Bibliothek umfaßt mehr als 30 Millionen Varianten der Schleife bzw. des Phagemids. Durch Bindung an ein spezifisches Protein kann ein Phage mit entsprechender Bindungs-Spezifität selektioniert werden. Das gebundene Phagemid wird mittels einem biotinylierten Anti-pIII-Antikörpers und einem Streptavidin-Peroxidase-Konjugat detektiert.

4. Resultate

4.1. Expression und Reinigung des rekombinanten α_{S1} -Kaseins

α_{S1} -Kasein konnte im oben beschriebenen Expressionsvektor als Fusionsprotein exprimiert werden. Die beste Expressionsausbeute wurde nach Induktion mit IPTG im E.coli-Stamm M15 erhalten und betrug etwa 40 mg/l Kultur.

Bei der Faktor Xa-Spaltung wurde das α_{S1} -Kasein teilweise nach Arginin-22 unspezifisch gespalten, eine Spaltung die in der Literatur bisher nicht beschrieben wurde und die zu einem verkürzten Proteinprodukt führte. Durch N-terminale Proteinsequenzierung wurde die Übereinstimmung der ersten 10 Aminosäuren mit der erwarteten Sequenz gezeigt.

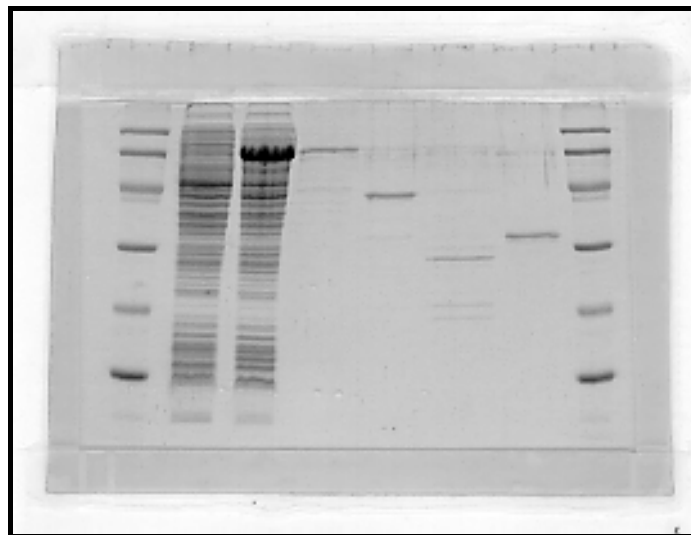


Abbildung 2: SDS-Polyacrylamidgel zur Reinigung des rekombinanten α_{S1} -Kaseins.

Bahn 1: Längenstandard; Bahn 2/3: Expression vor/nach Induktion in M15; Bahn 4: rekombinantes Fusionsprotein; Bahn 5: MBP; Bahn 6: abgespaltenes, rekombinantes α_{S1} -Kasein mit der oben beschriebenen Deletion; Bahn 7: aufgereinigtes, natürliches α_{S1} -Kasein; Bahn 8: Längenstandard

4.2 Immunologischer Vergleich zwischen rekombinantem und nativem α_{S1} -Kasein

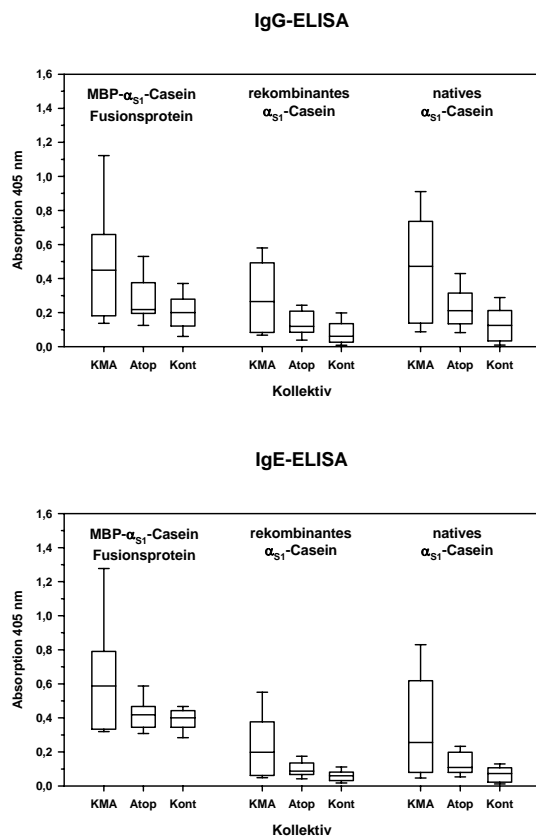


Abbildung 3: Auswertung der IgG- und IgE-ELISA Untersuchungen mit Fusionsprotein, rekombinantes und natives α_{S1} -Kasein. Untersucht wurden Kuhmilchallergiker (KMA), Atopiker (Atop) und gesunde Kontrollen (Kont). Gegeben sind die 10%-, 25%-, 75%- und 90%-Perzentilen, sowie der Median.

Im IgE-ELISA zeigt das Fusionsprotein einen deutlich erhöhten Background gegenüber den beiden anderen Proteinen. Im IgG-ELISA ist der Background beim Fusionsprotein kaum erhöht. Ursächlich sind hier unspezifische IgE-Bindungen wie eine mögliche Sensibilisierung der Individuen gegen E.coli-Proteine in Betracht zu ziehen. Die Absorptionswerte im IgE-ELISA sind beim rekombinantes α_{S1} -Kasein um etwa 20% niedriger als beim natives α_{S1} -Kasein. Im IgG-ELISA sind sie im Mittel etwa ein Drittel niedriger. Dies ist in beiden Fällen wahrscheinlich auf die unspezifische Spaltung des Fusionsproteins zurückzuführen, da hierbei mit den ersten 22 Aminosäuren auch ein Teil eines B-Zellepitops (Spuergin et al. (1996)) verloren geht. Sowohl beim natives wie auch beim rekombinantes α_{S1} -Kasein sind im IgE-ELISA die Unterschiede zwischen dem KMA- und dem Kontrollkollektiv signifikant. Das gleiche gilt auch für das Atopiker- und das Kontrollkollektiv. Beim Fusionsprotein sind die Unterschiede zwischen den Gruppen nicht signifikant. Im IgG-ELISA sind beim natives und rekombinantes α_{S1} -Kasein die Unterschiede zwischen allen drei Kollektiven signifikant. Beim Fusionsprotein unterscheiden sich dagegen nur das KMA- und das Kontrollkollektiv signifikant.

Diese Resultate unterstreichen die Wertigkeit der IgE-Bindungsassays auf rekombinantes wie natives α_{S1} -Kasein für die Diagnostik der Kuhmilchallergien.

4.3 Spezifisches Phagemid gegen α_{S1} -Kasein

Durch Bindung an das α_{S1} -Kasein konnte ein Phage entsprechender Spezifität selektioniert werden. Wie ein Screening mit synthetischen Peptiden (Geysen et al. (1984)) ergab, bindet das selektierte Phagemid spezifisch an die Aminosäuren 169-180 des bovinen α_{S1} -Kaseins. Im Immunoblot erwiesen sich der zur Detektion verwendete Antikörper und das Streptavidin-Konjugat als unspezifisch und zeigten Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen (Abb. 4). Ein weiterer Nachteil ist die enorme Größe der Phagemidpartikel, die nur eine geringe Bindungskapazität pro Flächeneinheit erlaubt. Dadurch wird die Empfindlichkeit des Nachweises stark reduziert.

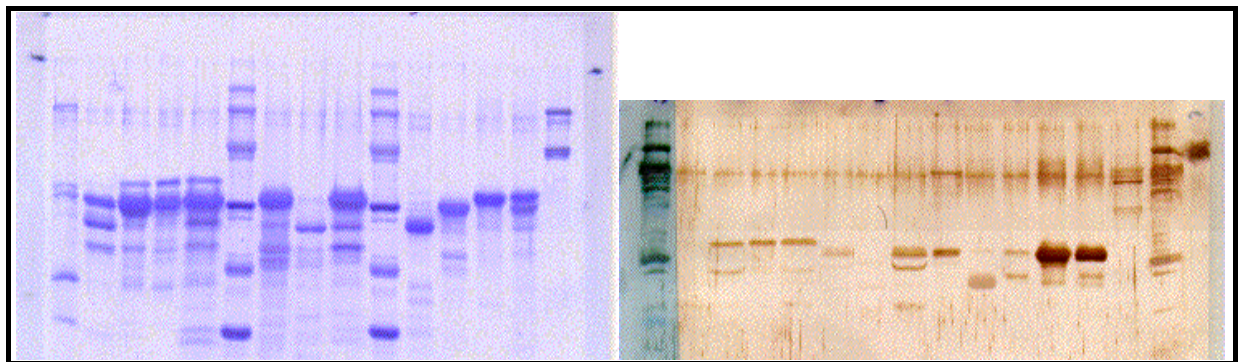


Abb. 4: **Western-blot verschiedener Proteinfractionen der Milchen dreier Tierpezies sowie rekombinanten α_{S1} -Kasein-Fusionsproteins (linkes Bild):** Bahn 1: hypoallergene Milchnahrung, Bahnen 6 und 10 = Marker; Bahnen 2-5 = Ziegenmilchproteine, Bahnen 7-9 = Schafsmilchproteine, Bahn 11 = κ -Kasein, Bahn 12 = β -Kasein, Bahn 13 = α_{S1} -Kasein, Bahn 14 = Kuh-Rohmilch, Bahn 15 = rekombinantes α_{S1} -Kasein-Fusionsprotein. **Detektion mit einem rekombinanten spezifisch α_{S1} -Kasein erkennenden Phagen (rechtes Bild):** Bahnen 1 und 15 = Marker, Bahnen 2-5 = Ziegenmilchproteine, Bahnen 6-8 = Schafsmilchproteine, Bahn 9 = hypoallergene Milchnahrung, Bahn 10 = κ -Kasein, Bahn 11 = β -Kasein, Bahn 12 = α_{S1} -Kasein, Bahn 13 = Kuh-Rohmilch, Bahn 14 = rekombinantes α_{S1} -Kasein-Fusionsprotein. Eine deutliche Markierung wird in den Bahnen 12 und 13 sichtbar, ein schmales positives Band zeigt sich ebenso auf Höhe des rekombinanten α_{S1} -Kasein. Die Schattenbanden der anderen Bahnen entsprechen der unspezifischen Bindung des Detektionssystems (s. Text).

Um diese Probleme zu umgehen, wurde der DNA-Abschnitt der die Information für das Fusionsprotein aus pIII und PSTI trägt mittels PCR aus dem Phagemidgenom isoliert und in einen Expressionsvektor umklontiert. Wir wählten hierzu den Vektor pQE-60 der Firma Qiagen, der direkt hinter dem zu exprimierenden Gen noch sechs Histidin-Reste anhängt. Über diesen sogenannten Histidin-tag ist eine einfache Aufreinigung des rekombinanten Proteins über eine Ni^{2+} -Chelatchromatografie möglich. Die Expression des pIII-PSTI-Fusionsproteins ergab gute Ausbeuten (Abb. 5). Wie sich jedoch im Verlauf der Reinigung des Proteins zeigte, wird ein erheblicher Teil des Proteins als sogenannte inclusion bodies in denaturierter Form in der Bakterienzelle abgelagert. Dieses denaturierte Protein muß nun erst renaturiert werden, bevor es für die Detektion von Kasein eingesetzt werden kann. Sind diese initial auftretenden

Schwierigkeiten aber erst einmal behoben, sollte sich das System einfach auf weitere pIII-PSTI-Fusionsproteine anderer Allergenspezifität übertragen lassen.

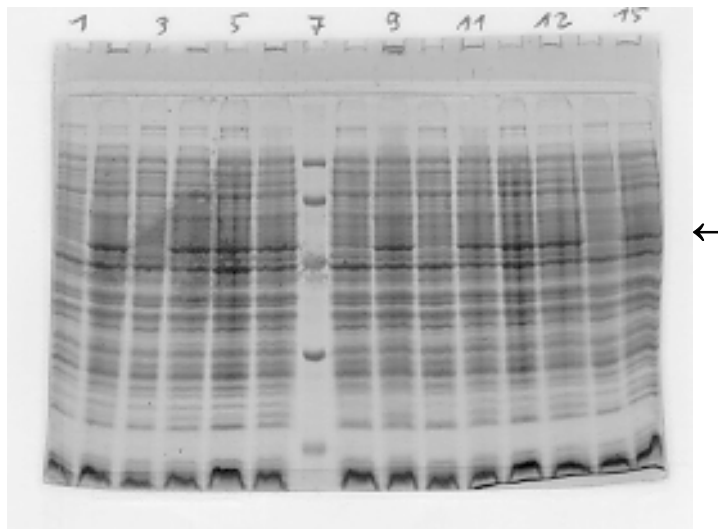


Abbildung 5: Expression des pIII-PSTI-Fusionsproteins, jeweils vor (linke Spur) und nach (rechte Spur) Induktion. Der Pfeil deutet die Spur des rekombinanten Proteins an.

5. Nutzen und Verwertbarkeit der Resultate

5.1. Rekombinantes α_{S1} -Kasein

Mit rekombinantem α_{S1} -Kasein, das dem hitzestabilen Hauptallergen der Kuhmilch entspricht, steht erstmals ein reines Kuhmilchprotein zur Verfügung. Schwierigkeiten in der proteinchemischen Abtrennung weiterer Kuhmilchproteinbestandteile, insbesondere des α_{S2} -Kaseins, entfallen.

Der Einsatz rekombinanten α_{S1} -Kaseins in der Diagnostik der Kuhmilchallergien erlaubt eine Standardisierung der Resultate bei verlässlicher Angabe der qualitativen und quantitativen Inhalte der Testextrakte. Kreuzreaktionen, die auf Verunreinigungen mit Resten anderer Kuhmilchbestandteile oder Aufreinigungschemikalien beruhen, sind ausgeschlossen. Es könnte somit eine deutliche Verbesserung der bisherigen Sensitivität wie Spezifität der Diagnostik bei vermuteter Kuhmilchallergie erfolgen, was Kuhmilchallergikern mit latenter Gefährdung zugute kommt.

Darüber hinaus erlaubt die rekombinante Proteinherstellung auch die Expression von Fragmenten des α_{S1} -Kaseins sowie von gezielten Mutanten. Dies kann sich als wertvolles Werkzeug bei der Erforschung der B- und T-Zell-Epitope des α_{S1} -Kaseins darstellen. Erst die Kenntnis solcher Proteinanteile, die der Entwicklung einer Sensibilisierung zugrunde liegen bzw. die Reaktionen auf das Allergen direkt auslösen, erlaubt gezielte präventive Maßnahmen. Es wäre damit möglich, hypoallergene Nahrungen anzustreben, die nicht nur aus Empirie gewonnen sondern gezielt durch Zerstörung allergen wirkender Epitope des Kuhmilchproteinbestandteils hergestellt werden.

5.2. Phagemid-Detektion von Allergenen

Die spezifisch α_{S1} -Kasein erkennende Phagenpopulation erlaubt, ein kostengünstiges und einfach anzuwendendes Nachweisverfahren für die Anwesenheit versteckter Kuhmilchproteine in Nahrungsmitteln zu etablieren. Tierversuche im Rahmen der Produktion monoklonaler Antikörper entfallen dabei, die zur Produktion nötige Laborausstattung ist deutlich weniger umfangreich und die Nachproduktion des Nachweismittels preiswerter, da der teure Unterhalt von Zellkulturen entfällt. Einfachheit in der Phagenselektion und begrenzte Produktionskosten erlauben darüber hinaus, auch für jene Allergene preiswerte Nachweisverfahren anzubieten, die in nur einem kleinen Kollektiv Betroffener bedeutsam sind.

Das Phagemid-Detektionssystem könnte damit generell ein wertvolles, preiswertes und einfach anzuwendendes Detektionsverfahren für Allergene darstellen und die bestehenden Verfahren wesentlich ergänzen.-

6. Publikationen

Deichmann, K., Müller, S., Forster, J. Herstellung rekombinanten alphaS1-Kaseins als Basis verbesserter diagnostischer und therapeutischer Verfahren bei Kuhmilch-Allergien. Forschungsbericht FZKA-PUG 22 1996: 273-280

Deichmann, K.A., Spuerger, P., Heinzmann, A., Mueller, H., Forster, J. Specific detection of proteins using recombinant phagemids. Abstract book of the Joint Meeting of the European Society of Pediatric Allergy and Clinical Immunology and the European Respiratory Society Paediatric Assembly, Odense, Dänemark, May 22.-25. 1996, p. 75

Es sind weiterhin Publikationen zu den Themen „**Rekombinantes und natives alpha_{S1}-Kasein im immunologischen Vergleich**“ und „**Einsatz eines Phagemid-Display-Systems zum Nachweis spezifischer Lebensmittel-Allergene**“ in Bearbeitung.

Literaturanhang:

Bahna, S.L., Gandhi, M.D. (1983) Milk hypersensitivity II. Practical aspects of diagnosis, treatment and prevention. *Allergy*, 50:295-301

Baldo, B.A., Donovan, G.R. (1988) The structural basis of allergenicity: recombinant DNA-based strategies for the studie of allergens. *Allergy* 43: 81-97

Bleumink, E., Young, E. (1968) Identification of the atopic allergen in cow's milk. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 34:521-543

Brignon, G., Chtouron, A., Ribadeau-Dumas, B. (1985) Does β -Lactoglobulin occur in human milk. *J. Dairy Res.* 52:249-254

Chtouron, A., Brignon, G., Ribadeau-Dumas, B. (1985) Quantification of β -casein in human milk. *J. Dairy Res.* 52:239-248

Ferguson, A., Watret, K.C. (1988) Milk Protein Allergy: clinical features, pathogenesis, and therapeutical implications. In *Barth, C.A., Schlimme, E. Milk Proteins. Springer-Verlag, 1988:261-269*

Geysen, H.M., Meloen, R.H., Barteling, S.J. (1984) Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci., 81:3998-4002*

Goldman, A.S., Anderson, D.W., Sellars, W.A., Halpern S.R., Furlow, T.E., Johnson, C.H. (1963a) Milk allergy I: oral challenge with milk and isolated milk proteins in allergic children. *Pediatrics 32:425-443*

Goldman, A.S., Sellars, W.A., Halpern S.R., Anderson, D.W., Furlow, T.E., Johnson, C.H. (1963b) Milk allergy II: Skin testing of allergic and normal children with purified milk proteins. *Pediatrics 32:572-579*

Hill, D.J., Ball, G., Hoskings, C.S. (1988) Clinical manifestations of cow's milk allergy in childhood. I. Association with in vitro cellular immune response. *Clin Allergy, 1:469-79*

Hofnung, M., Charbit, A. (1993) Expression of antigens as recombinant proteins. In: *Van Regenmortel, M.H.V. Structures of Antigens. CRC Press 1993:79-128*

Marks, J.D. et al. (1992) Molecular evolution of proteins on filamentous phage. *The Journal of Biological Chemistry 267(23): 16007-10*

Niggemann, B. et al. (1995) In vivo und in vitro Studien zur Optimierung diagnostischer Verfahren für Nahrungsmittelallergien bei Säuglingen und Kleinkindern mit atopischer Dermatitis. *4.Statuskolloquium des PUG am 15.-16. März 1995*

Ribadeau-Dumas, B. (1988) Structure and variability of milk proteins. In *Milk Proteins (Barth CA & Schlimme E, eds.) pp. 112-123, Steinkopff Verlag, Darmstadt*

Spuergin, P., Mueller, H., Walter, M., Schiltz, E. & Forster, J. (1996) Allergenic epitopes of bovine α_{S1} -casein recognized by human IgE and IgG. *Allergy 51: 306-312*

Stewart, A.F., Willis, I.M., Mackinlay, A.G. (1984) Nucleotide sequences of bovine α_{S1} - and κ -casein cDNAs. *Nucleic Acids Research 12(9): 3895-3907*