



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
WIEN
Vienna University of Technology



Diplomarbeit

Kovalente Modifikation von Allergenen im Latex

Zur Erlangung des akademischen Grades

Diplom-Ingenieur der technischen Chemie

Unter der Leitung von

Ao.Univ.Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Simone Knaus

Institut für Angewandte Synthesechemie

Durchgeführt an der Universität für Bodenkultur Wien bei

Univ.Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Paul Kosma

Abteilung für Organische Chemie

Eingereicht an der Technischen Universität Wien

von

Michael Basas

Matrikel Nr. (Kennzahl)

0025892 (E800)

Bernatzikg.2/13/12

1190 Wien

Wien, Oktober 2015

Vorname Nachname



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
WIEN

Vienna University of Technology

Ich habe zur Kenntnis genommen, dass ich zur Drucklegung meiner Arbeit unter der Bezeichnung

Diplomarbeit

nur mit Bewilligung der Prüfungskommission berechtigt bin.

Ich erkläre weiters Eides statt, dass ich meine Diplomarbeit nach den anerkannten Grundsätzen für wissenschaftliche Abhandlungen selbstständig ausgeführt habe und alle verwendeten Hilfsmittel, insbesondere die zugrunde gelegte Literatur, genannt habe.

Weiters erkläre ich, dass ich dieses Diplomarbeitsthema bisher weder im In- noch Ausland (einer Beurteilerin/einem Beurteiler zur Begutachtung) in irgendeiner Form als Prüfungsarbeit vorgelegt habe und dass diese Arbeit mit der vom Begutachter beurteilten Arbeit übereinstimmt.

Wien, Oktober 2015

Vorname Nachname

Danksagung

Ich möchte mich als erstes recht herzlich bei Univ.Prof.DI.Dr. Paul Kosma für die Betreuung, die immer wieder neuen Anregungen und die fortwährende Unterstützung bedanken.

Bei Univ.Prof.DI.Dr Simone Knaus möchte ich mich für die formelle Betreuung der Diplomarbeit an der TU Wien bedanken.

Mein weiterer Dank gilt den Mitarbeitern der Semperit AG, vor allem Dr. Armin Holzner, Dr. Raimund Schaller, Dr. Sven Musser und Dr. Daniel Burtscher. Sowie den Mitarbeitern, Herr Bektas und Herr Schneider, die bei der Ausführung der praktischen Versuche mit helfender Hand zur Seite gestanden sind. Im gemeinsamen Gespräch kam es zu neuen Ideen, welche mir geholfen haben bei meiner Arbeit voranzukommen.

Herrn Prof.DI.Dr. Andreas Hofinger-Horvath möchte ich danken für die NMR-Messungen.

Außerdem möchte ich mich bei Frau DI. Elisabeth Lobner bedanken, die mir eine große Hilfe bei der Einschulung in die Gelelektrophorese war.

Des Weiteren gilt mein Dank Dr. Shi Yan, der mir bei den MALDI-TOF Messungen geholfen hat.

Für die Unterstützung im Labor bedanke ich mich bei Dr. Barbara Pokorny und Dr. Jean-Baptiste Farcet.

Vor allem aber möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Insbesondere bei meinem Vater, der mir mein Studium überhaupt erst ermöglicht hat und bei meiner Mutter für ihren geistigen Beistand.

Kurzfassung:

Die im Latex (Milchsaft) vom Kautschukbaum (*Hevea brasiliensis*) eingebetteten Proteine und Peptide zeigen sich bei sensibilisierten Personen als potente Allergene. Um die allergene Wirkung von Latex basierten Produkten herabzusetzen, können neue Herangehensweisen untersucht werden, welche sich auf die Immobilisierung und Quervernetzung der Proteinmatrix konzentrieren.

In dieser Diplomarbeit wird daher das allergene Potential von kovalent modifiziertem Latex Produkten studiert. Funktionale Gruppen die in der Lage sind die im Latex enthaltenen Allergene zu modifizieren, werden anhand von Modellreaktionen mit Cysteamin überprüft.

Im Speziellen werden die Produkte dabei zunächst mittels SDS-Page und MALDI-TOF auf den Rubber Elongation Factor (REF bzw. Hev b 1) und das Heveins (Hev b 6.02) getestet.

Die chemische Modifikation des Heveins wurde als Beispiel für die Reduktion des allergenen Potentials an Latexproteinen zugrunde gelegt. Der Latex wurde dabei mit unterschiedlichen Reagenzien behandelt. Zur Anwendung kamen Divinylsulfon, Cyanurchlorid, Dichlormethoxytriazin, Glutaraldehyd, Triacryloylhexahydrotriazin, Triallyltriazintron sowie Glucose und Fructose. Anschließend wurden mit modifiziertem Latex Prototypen hypoallergener Handschuhe gefertigt und das allergene Potential dieser Handschuhe untersucht. Eine erfolgreiche Modifikation trat bei Behandlung mit Divinylsulfon und Triacryloylhexahydrotriazin ein.

Abstract:

Proteins derived from the milky latex of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*) are a major source of allergens in sensitized individuals. In order to reduce the allergenic potential of latex-based products, new methodologies to modify latex proteins, based on immobilization and crosslinking of the protein matrix and the introduction of reactive and process-compatible functional groups were examined.

Precursors that are able to modify these allergens in a covalent manner were examined by carrying out model reactions with Cysteamine. Specifically, by utilizing SDS-PAGE and MALDI-TOF the modification of rubber elongation factor (REF or Hev b 1) and Hevein (Hev b 6.02) were characterised.

Chemical modifications of hevein were carried out in order to reduce the allergenicity of latex proteins. Specifically, modifications with Divinylsulfone, Cyanuric chloride, Dichlormethoxytriazine, Glutaraldehyde, Triacryloylhexahydrotriazine, Triallyltriazintron as well as Glucose and Fructose have been carried out. In the end modified hypoallergenic latex prototype gloves were produced. These were subsequently screened by various methods - such as the FITkit® method et al. - regarding their allergenicity. Successful modifications were obtained by using Divinylsulfone and Triacryloylhexahydrotriazine.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einleitung	6
1.1 Reduktion der Allergenität	9
1.2 Ziel der Arbeit.....	12
1.3 Grundlagen-/Theorieteil	12
1.3.1 Quervernetzer für Proteine und Peptide	12
1.3.2 Reaktive Gruppen:.....	13
2 Allgemeine Methodik	19
2.1 NMR Spektroskopie.....	19
2.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page)	19
2.2.1 Praktische Durchführung der Silberfärbung	20
2.2.2 Praktische Durchführung der Coomassie Färbung.....	20
2.2.3 Zugesezte Standards	20
2.3 Matrix Assistierte Laser Desorptions Ionisation (MALDI) Time of Flight (TOF) Massenspektrometrie	21
2.4 Proteinbestimmung nach Lowry	21
2.5 FITkit® Analyse	22
2.6 Hydrophile interaktions chromatographie (HILIC).....	22
3 Substanzklassen spezifische Methoden	23
3.1 Divinylsulfon (DVS)	23
3.1.1 DVS Modellreaktionen	23
3.1.2 DVS Elektrophorese.....	26
3.1.3 DVS MALDI-TOF	27
3.1.3.2 <i>BSA nach Behandlung mit DVS</i>	28
3.1.4 Herstellung von Fingerlingen	29
3.1.5 Herstellung von Handschuh Mustern	29
3.2 Cyanurchlorid	30
3.2.1 Cyanurchlorid Modellreaktionen	30
3.2.2 Cyanurchlorid Elektrophorese.....	31
3.2.3 Cyanurchlorid MALDI-TOF.....	31

3.3	2,4-Dichlor-6-methoxy-1,3,5-triazin (DMTZ).....	32
3.3.1	2,4-Dichlor-6-methoxy-1,3,5-triazin (DMTZ) Modellreaktionen.....	32
3.3.2	Dichlormethoxytriazin (DMTZ) MALDI-TOF.....	33
3.4	Glutardialdehyd (Ga).....	34
3.4.1	Glutardialdehyd (Ga) Modellreaktionen.....	34
3.4.2	Glutardialdehyd (Ga) Elektrophorese.....	35
3.4.3	Behandlung von Latexsaft mit Glutardialdehyd (Ga).....	35
3.5	Triacryloylhexahydro-1,3,5-triazin (TAT).....	36
3.5.1	Triacryloylhexahydro-1,3,5-triazin (TAT) Modellreaktionen.....	36
3.5.2	Triacryloylhexahydro-1,3,5-triazin (TAT) Elektrophorese.....	38
3.5.3	Triacryloylhexahydro-1,3,5-triazin (TAT) MALDI-TOF.....	38
3.5.4	Herstellung von Gummifilmen auf Glasplatten.....	40
3.5.5	Extraktion der Gummifilme.....	41
3.6	1,3,5-Triallyl-1,3,5-triazin-2,4,6-trion (TATATO).....	41
3.6.1	1,3,5-Triallyl-1,3,5-triazin-2,4,6-trion Modellreaktionen.....	41
3.6.2	Triallyl-1,3,5-triazin-2,4,6-trion (TATATO) MALDI-TOF.....	42
3.7	Glucose und Fructose.....	42
3.7.1	Glucose Elektrophorese.....	42
3.7.2	D-Fructose MALDI-TOF.....	43
4	Ergebnisteil.....	44
4.1	Divinylsulfon (DVS).....	44
4.1.1	DVS Modellreaktionen.....	44
4.1.2	DVS Elektrophorese.....	48
4.1.3	DVS MALDI-TOF.....	53
4.1.3.2	<i>BSA nach Behandlung mit DVS.....</i>	<i>54</i>
4.1.4	Ergebnisse der Aminosäureanalyse der Fingerlinge.....	54
4.1.5	Ergebnisse der FITkit® Analyse der Hanschuhmuster.....	55
4.2	Cyanurchlorid.....	56
4.2.1	Cyanurchlorid Modellreaktionen.....	56
4.2.2	Cyanurchlorid Elektrophorese.....	57
4.2.3	Cyanurchlorid MALDI-TOF.....	58
4.3	2,4-Dichlor-6-methoxy-1,3,5-triazin (DMTZ).....	59
4.3.1	2,4-Dichlor-6-methoxy-1,3,5-triazin (DMTZ) Modellreaktionen.....	59
4.3.2	Dichlormethoxytriazin (DMTZ) MALDI-TOF.....	60

4.4	Glutardialdehyd (Ga).....	61
4.4.1	Glutardialdehyd (Ga) Modellreaktionen.....	61
4.4.2	Glutardialdehyd (Ga) Elektrophorese.....	62
4.4.3	Glutardialdehyd (Ga) MALDI-TOF.....	63
4.5	Triacryloylhexahydro-1,3,5-triazin (TAT).....	63
4.5.1	Triacryloylhexahydro-1,3,5-triazin (TAT) Modellreaktionen.....	63
4.5.2	Triacryloylhexahydro-1,3,5-triazin (TAT) Elektrophorese.....	64
4.5.3	Triacryloylhexahydro-1,3,5-triazin (TAT) MALDI-TOF.....	65
4.5.4	TAT Bestimmung mittels HILIC.....	70
4.6	1,3,5-Triallyl-1,3,5-triazin-2,4,6-trion (TATATO).....	74
4.6.1	1,3,5-Triallyl-1,3,5-triazin-2,4,6-trion Modellreaktionen.....	74
4.6.2	Triallyl-1,3,5-triazin-2,4,6-trion (TATATO) MALDI-TOF.....	76
4.7	Glucose und Fructose.....	77
4.7.1	Glucose Electrophorese.....	77
4.7.2	D-Fructose MALDI-TOF.....	80
5	Diskussion und Fazit.....	81
5.1	Modellreaktionen:.....	81
5.2	SDS-Page:.....	81
5.3	MALDI-TOF:.....	82
5.4	FITkit® Tests und Aminosäuren Analyse.....	82
5.5	Getestete Reagentien.....	82
5.5.1	DVS.....	82
5.5.2	Cyanurchlorid.....	83
5.5.3	DMTZ.....	83
5.5.4	Glutaraldehyd.....	83
5.5.5	TAT.....	84
5.5.6	TATATO.....	84
5.5.7	Glucose und Fructose.....	84
6	Literaturverzeichnis.....	86
7	Anhang.....	89
7.1	Lowry Test Resultate.....	89
7.2	FITkit® Resultate.....	91
7.3	Aminosäuren Analyse.....	93

Abkürzungsverzeichnis

%	Gewichtsprozent
(v/v)%	Volums Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
c	Konzentration
Cc	Cyanurchlorid
d	Schichtdicke
d.h.	das heißt
DHAP	2,5-Dihydroxyacetophenon
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTZ	2,4-Dichlor-6-methoxy-1,3,5-triazin
DVS	Divinylsulfon
DTT	Dithiotreitol
EWG	Elektronen ziehende Gruppe
E_{λ}	Extinktion bei Wellenlänge λ
g	Gramm
Ga	Glutaraldehyd
H ₂ O	Wasser
HILIC	Hydrophile interaktions Chromatographie
IgE	Immunglobulin E
kDa	Kilo Dalton
MALDI-TOF	Matrix assistierte Laser Desorption Ionisierung mit nachgeschaltetem Time of Flight Massenspektrometer
mg	Milligramm
ml	Milliliter
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
NR	natural rubber
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen Aktivität
REF	rubber elongation factor
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
TAT	Triacryloylhexahydro-1,3,5-triazin
TATATO	Triallyl-1,3,5-triazin-2,4,6-trion
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
w.o.	wie oben
w.o.a.	wie oben angegeben
z.B.	zum Beispiel
ϵ_{λ}	molarer Extinktionskoeffizient bei Wellenlänge λ

1 Einleitung

Als Latex wird für gewöhnlich der Milchsaft des Kautschukbaums (*Hevea brasiliensis*) bezeichnet.

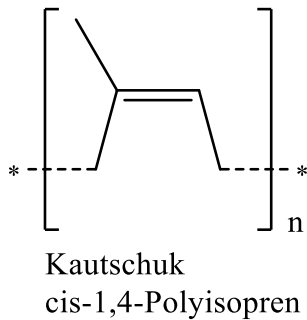


Abb.1 Struktur von Kautschuk

Der daraus gewonnene Naturgummi (engl. natural rubber Abk. NR) ist ein elastisches Polymer, welches auf dem 1,4-cis-Polyisopren (Abb.1) basiert. Nach der Entdeckung der Vulkanisation, 1839 durch Charles Goodyear, konnte aus dem Kautschuk viskoelastisches Gummi gewonnen werden. Durch die im Latex enthaltenen Proteine und Peptide kann es bei manchen Menschen zu allergischen Reaktionen kommen.

Die hierfür hauptverantwortlichen Allergene sind zum Beispiel das Hevein und Hevein-artigen-Domänen. Beide sind möglicherweise sogar für Kreuzallergien (Latex Frucht Syndrom) wie Bananen, Kiwi, Kastanien und Avocado verantwortlich. Diese strukturell ähnlichen Domänen nennt man dann Panallergene.

Der Latexsaft wird aus Milchröhren nach Anzapfung des Baumes als cytoplasmische kolloidale Suspension gewonnen. In dieser sind dann auch Organellen, Proteine, Serum und nicht-Gummi Partikel enthalten. Die Latexpartikel sind an der Oberfläche negativ geladen.¹

Eine ganze Reihe von Allergenen wurde durch das Allergen Nomenklatur Subkomitee im Latex anerkannt. Verantwortlich für das Auslösen einer Allergie ist wiederholter und langanhaltender Kontakt mit den im Latex enthaltenen Allergenen. Das allergene Potential hängt nicht nur von den einzelnen Allergenen ab, sondern auch von deren Konzentration und der Art der Exposition.²

Wichtig ist nicht nur die Messung der Allergene an der äußeren Oberfläche des fertigen Gummis, sondern im gesamten Endprodukt an sich; genauer gesagt der lösliche Anteil. Dazu eignet sich vor allem der FITkit®-Test, der ein eingetragenes Warenzeichen der Firma ICOSAGEN AS ist und die vier Hauptallergene, Hev b 1 (REF engl. rubber elongation factor), Hev b 3, Hev b 5 und Hev b 6.02 (Hevein) untersucht.

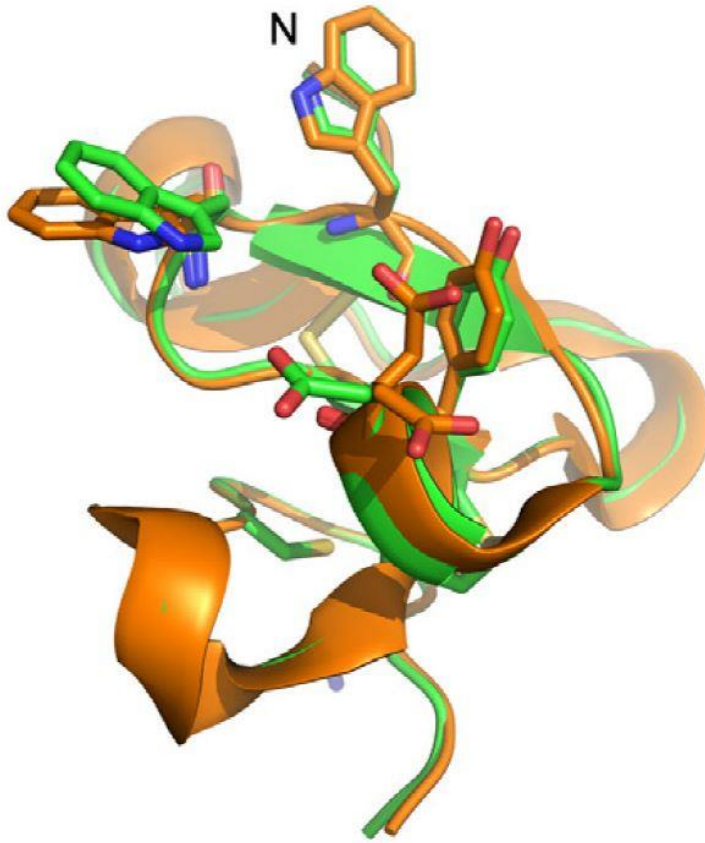


Abb.2 Hevein Struktur PDB Code 4WP4 und 1Q9B

Faltungsmotiv entsprechende Struktur mit eng angeordneten Disulfidbindungen. Damit zählt es zu der Gruppe der Chitin bindenden Abwehrproteine, wie auch das Lectin und die Endochitinasen. Untersuchungen mit Hevein, das aus frischer, mit Ammoniak versetzter Latexmilch gewonnen worden ist, konkretisieren und ergänzen das Ergebnis, dass Hevein ein Schutzprotein des Gummibaumes mit Chitin bindenden Eigenschaften ist. Somit ist es das erste Latexprotein, dessen Allergenität sowohl in vivo, als auch in vitro an einem größeren Kollektiv von Latexsensibilisierten Patienten untersucht worden ist. Die 3D-Struktur des Heveins ist durch vier Disulfidbrücken stabilisiert und enthält sowohl helikale, als auch β -Faltblattstrukturen. Löst man die Disulfidbrücken hat dies eine Änderung der räumlichen Struktur zur Folge, wodurch die Fähigkeit zur Antikörperbildung verloren geht.³ Hevein (Hev b 6.02) ist eines der Haupt IgE bindenden Allergene im Latex und Gummiprodukten. Allerdings gibt es keine Reaktion, wenn dieses modifiziert ist. Die allergene Wirkung ist sowohl strukturell, als auch funktionell bedingt und basiert somit auf einer biologischen Aktivität. Nichtsdestotrotz gibt es auch Isoformen des Heveins, welche in ihren Aminosäuren mutiert sind.⁴ Außerdem dient Hevein bei der spezifischen Immuntherapie zur Behandlung allergischer Patienten. Dabei werden anaphylaktische Nebenwirkungen durch Einsatz von Isoformen vermieden. Etwa 70% der Patienten, die auf Latex allergisch sind, reagieren auch auf das Hevein. Modifizierte Heveine weisen drastisch verringerte IgE Bindungsfähigkeiten auf, und sind somit geeignet für den Einsatz in der Immunotherapie.⁵ Es konnte gezeigt werden, dass Hevein sogar antimykotische bzw. antifungizide Eigenschaften besitzt.⁶ In der Tat ist Hevein an der Koagulation des Latex beteiligt.⁷ Indessen ähnelt Hevein

Das Hevein und seine Vorläufer, die *Hevein artigen Domänen*, sind die dominierenden Proteine in der Latexmilch. Hevein selbst entsteht durch Abspaltung aus dem 20 kDa großen Prohevein und ist aus 43 Aminosäuren aufgebaut, wobei acht davon Cystein sind. Letztere bilden dabei alle Disulfidbrücken aus. Die Tertiärstruktur wurde mittels Röntgenstrukturanalyse und NMR-Untersuchungen geklärt, und ermöglicht somit dessen Darstellung, wie in Abb. 2 ersichtlich wird. Das Hevein enthält eine dem *Toxin-Agglutinin-*

einem Lectin aus der Brennnessel und zeigt *in vitro* antifungale Eigenschaften, die extrem hitzebeständig sind. Es ist eines der Haupt Proteine in den Lutoiden, den kleinen Vakuolen Organellen. Auf Grund der Größe ist es dem Hevein möglich Plasmamembranen zu überwinden, und so über Quervernetzung an Chitin-Ketten zu binden.⁸ Es spielt somit für den Schutz der Pflanze vor Pilzbefall eine wichtige Rolle.⁹

Latexallergie ist ein ernstes Problem, dass präventive Maßnahmen erfordert durch Reduktion der Allergene, um die Sensibilisierung zu minimieren. Die Allergene sind dabei Antigene die eine Immunreaktion im Körper auslösen. Die Symptome reichen dann von harmlosem Juckreiz bis hin zu lebensbedrohlichen anaphylaktischen Schocks.¹⁰

Die Sensibilisierung auf Latex und dessen Endprodukte ist ein ernstes Gesundheitsproblem, vor allem im Gesundheitswesen, wo diese Produkte zum Einsatz kommen. Des Weiteren bei Patienten mit Spina bifida, einer neuronalen Fehlbildung am Wirbelspalt. Diese Patienten reagieren oft empfindlich auf den REF, der somit ein wichtiges Latexallergen darstellt.

Natürlicher Latex ist eine komplexe Mischung aus verschiedenen Substanzen wie Gummipartikel (30-40%), Proteinen (~3%) und Wasser (55-65%).¹¹ Bis dato wurden bereits 186 verschiedene Proteine im Gummi identifiziert.¹² Von den etwa 240 - durch zweidimensionale Gelelektrophorese separierbaren - Polypeptiden zeigen nur etwa 25% eine Reaktion mit IgE-Antikörpern. Demzufolge können bei einer Latexallergie eine Vielfalt an Proteinen beteiligt sein, die zu allergischen Reaktionen führen.¹³

Aber nicht nur der fertige Gummi an sich, sondern auch die an der Oberfläche zugesetzten Lubrikanzien, wie zum Beispiel Maisstärkepulver, enthalten die Allergene. Diese können dann auch als Aerosole auf die Schleimhäute und somit auch in die Lunge gelangen. Die Sensibilisierungswege sind sehr vielfältig und die genauen Ursachen bis dato ungeklärt.

Die im Gummi enthaltenen Proteine sind im Allgemeinen wasserunlöslich, werden aber durch die Stabilisierung mittels Ammoniak zum Teil löslich. Ein weiterer Effekt durch den Zusatz an Ammoniak ist das Aufbrechen der Organellen im Latex. Die vom Latex induzierten allergischen Reaktionen werden vor allem von wasserlöslichen Proteinen induziert. Die Proteine in ungelöster Form sind im fertigen Gummi allgegenwärtig, trotzdem sind diese durch Wasser oder Schweiß nicht übertragbar.

Durch den Zusatz von Ammoniak in der Produktion werden die Latex-Proteine in ihrer ursprünglichen Konformation geändert und es entstehen Fragmente. Ammoniak wird vor allem für die Stabilisierung des Latex verwendet. Durch diesen Zusatz werden einige der Allergene wasserlöslich, allerdings werden sie aber dann im Herstellungsprozess so hohen Temperaturen ausgesetzt, dass sie denaturieren. Die unlöslichen Proteine sind in fertigen Latexprodukten allgegenwärtig.¹⁰

Latex ist bisweilen noch immer der beste Rohstoff für Untersuchungshandschuhe auf Grund seiner ausgezeichneten Dehnbarkeit, seiner Barriere- und anderen physikalischen Eigenschaften. Eine wichtige Eigenschaft von Latex ist sein Koagulationsverhalten. Diese Eigenschaft besitzt er, weil die in ihm enthaltenen Proteine zueinander diffundieren und so aggregieren.¹⁴

1.1 Reduktion der Allergenität

Verbesserungen bei der Handschuhherstellung werden durch Latexmilch mit einem niedrigen Proteingehalt und einem Vorhärten beziehungsweise Nachhärten beim Leaching und chemischer oder enzymatischer Deproteinierung erreicht. Ungepuderte Handschuhe werden durch ein Polymercoating geölt und die Klebrigkeit durch Chlorinierung verhindert.¹⁵

Abhängig von ihrer molekularen Charakteristik, können Komponenten in: Inhalationsmittel, Nahrung, saisonal, genuin oder kreuz-reaktiv, heiß, pH und peptidasen beständig oder empfänglich, harmlos oder gefährlich, lokale oder systemische Effekte verursachend, usw. eingeteilt werden.¹⁶

Durch das Verstehen der Typ I Allergie wurden Verbesserungen von Latex Produkten, im speziellen bei Handschuhen, vor allem bei der Reduzierung und Entfernung der Proteine aus den Rückständen, welche die Allergene enthalten, unternommen. Obwohl eine Vielzahl an Versuchen und Studien im Gange sind, um diese Allergene zu identifizieren, ist es immer noch nicht klar, wie allergische Reaktionen in hypersensitiven Personen hervorgerufen werden und wie diese quantitativ mit den extrahierbaren Proteinen in Latex Produkten korrelieren. Bei der Typ I Hypersensibilisierung welche durch Latex Produkte hervorgerufen wird, ist nicht die Zusammensetzung der Additive - wie zum Beispiel Thiurame, Mercaptobenzothiazole und Carbamate - während der Herstellung entscheidend, sondern viel mehr die mit Wasser extrahierbaren Protein Rückstände, die in Latex Produkten enthalten sind. Der hohe Proteingehalt entsteht durch ein inadäquates Leaching während der Herstellung. Ein logischer Ansatz zur Überwindung des Allergie Problems würde daher die Minimierung der Rückstands Proteine in Latexerzeugnissen zu eliminieren sein. Zurzeit ist kein Niveau dieser Proteine unter der Reizschwelle von sensibilisierten Personen auszumachen. Das Ausmaß der Protein Reduktion in Latex Produkten ist daher von großem Interesse vor allem für die Hersteller. Daher wird viel unternommen um die Relation von extrahierbaren Proteinen in Latex Handschuhen und deren Resonanz bei sensibilisierten Personen zu untersuchen. Entscheidende Schritte bei der Produktion sind der des nassen Gels und der des trockenen Films nach der Vulkanisation bzw. nach dem Trocknen. Anschließend folgt der Schritt der Chlorierung. In jedem dieser Schritte verringert sich dabei die Menge an extrahierbarem Protein. Daher werden intensive Studien in verschiedenen Ländern durchgeführt um die allergenen Proteine im Latex zu untersuchen. Leider fehlen bisher noch eindeutige Informationen darüber, wie sich die allergenen Proteine vermeiden lassen. Diese lassen sich sehr genau detektieren und in unterschiedliche Molekulargewichts Fraktionen unterteilen und anhand unterschiedlicher Methoden identifizieren. Scheinbar werden Handschuhe mit einem größeren extrahierbaren Proteingehalt auch mit einer erhöhten Rate an allergischen Reaktionen in Verbindung gebracht. Im Gegensatz dazu ist bei Handschuhen mit einem geringen extrahierbaren Proteingehalt das Risiko einer allergischen Reaktion deutlich geringer. Es ist daher anzumerken, dass ein inadäquates Leaching bei Handschuhen sehr wahrscheinlich die Ursache für einen nicht gewollten hohen Proteingehalt darstellt. Unter geeigneten Bedingungen können daher Produkte gefertigt werden, die ein vernachlässigbares allergenes Potential aufweisen. Die Entwicklung von Hevea Latex bis zum trockenen Gummiprodukt unterscheidet sich von dem der Latex Produkte. Anstelle des Tauchens wird der Latex durch Säurekoagulation zum Stocken gebracht und die entstandenen Brocken in Wasser gewaschen und anschließend bei etwa 100 bis 130°C getrocknet. Der extrahierbare Proteingehalt

aus diesen Gummis ist relativ gering, weil das Koagulieren mit einem extensiven Waschen während des Prozesses verbunden ist. Daher betrifft das Allergiemproblem nicht alle Naturgummi Produkte. In der Folge sind Kampagnen gegen Naturgummi Produkte meist unberechtigt. Vor allem beim Fadenschneiden, bei dem meist noch mit einem Gewebe überzogen wird, ist der Hautkontakt nicht vorhanden und somit besteht keine Gefahr einer Allergie. Des Weiteren gibt es relativ wenig trockene Gummi Produkte die im Gesundheitswesen eingesetzt werden, wodurch die Prävalenz einer Latexsensibilisierung nicht gegeben ist. Ein geringer extrahierbarer Proteingehalt ist daher mit einer geringen sensibilisierungsrate gleichzusetzen. In klinischen Tests wurde auch bestätigt das diese Materialien eine zu vernachlässigende Sensibilisierung aufweisen.¹⁷

Die Haut bildet eine physikalische Barriere zwischen dem Organismus und seiner Umgebung. Als größtes Organ des menschlichen Körpers verhindert sie den Verlust von Wasser und schützt dessen Inneres vor äußeren Einflüssen. Neben der Funktion als Schranke ist die Haut auch immunologisch aktives Gewebe. Kontakt-Hypersensitivität und allergische Reaktionen auf bestimmte Chemikalien sind weit verbreitet. Kontakt Allergene sind generell Haptene, nieder molekulare Stoffe, die durch ihre Lipidlöslichkeit an körpereigene Trägerproteine binden und so eine Immunreaktion auslösen können. Für eine effektive Evaluierung der Allergene müssen diese identifiziert werden. Haut Kontakt mit kleinen Molekülen, Haptenen, induzieren eine zellvermittelte Sensibilisierung.¹⁸

Bei sensibilisierten Personen kann die Testung auf eine Latexallergie schwere systemische Reaktionen hervorrufen, bis hin zum anaphylaktischen Schock. Es ist denkbar, dass ein Teil des Risikos von der Schwierigkeit der Graduierung der stimulierenden Dosis herrührt. In den letzten Jahren zeigten sich zahlreiche hypersensitive Reaktionen bei Arbeitern im Gesundheitswesen und Handschuh Herstellern. Normalerweise wird eine Diagnose der Latex Allergie durch den Pricktest, oder den spezifischen Immunglobulin E (IgE) im Blutserum erstellt. Eine Alternative, aber weniger zufriedenstellende Lösung ist es, bei sensibilisierten Personen, keine Latexprodukte zu verwenden bzw. Unterziehhandschuhe zu verwenden, um den direkten Kontakt mit den allergenen Stoffen aus dem Latex zu vermeiden.¹⁹ Untersuchungen haben ergeben, dass diverse Proteinmoleküle auf die Maisstärke übertragen werden können. Auf Grund der geringen Größe der Maisstärke Partikel, bei gepuderten Handschuhen, sind diese respirabel und können dadurch in die Atemwege sensibilisierter Personen aufgenommen werden.²⁰ Es ist bekannt, dass Allergene im Naturgummilatax bei unterschiedlichen Marken erheblich variieren.²¹ Als protektive Maßnahme wird daher die Verwendung von nichtgepuderten oder niedrig allergenen Handschuhen vorgeschlagen.²² Die Entwicklung einer Sensibilisierung scheint von dem absoluten Gehalt an Latexallergenen bei einer sukzessiven Exposition abhängig zu sein.²³ Latexproteine und Allergene werden an Talk oder Maisstärke chemisch gebunden oder adsorbiert.²⁴ Latex birgt ein berufsbezogenes Allergierisiko mit sich und ist für asthmatische Zustände verantwortlich. Die Prävalenz liegt dabei in etwa bei 2,5 bis 10%.²⁵ Die Determinierung des allergenen Potentials von Latexprodukten verlangt eine Quantifizierung von allen klinisch relevanten Allergenen. Dies gestaltet sich jedoch in der Praxis schwierig, da wenig über das Spektrum von allergenen Proteinen und deren molekulare Charakteristik bekannt ist. Ein weiterer Punkt der dies kompliziert gestaltet, ist die Denaturierung der Allergene während des Vulkanisationsprozesses. Dadurch ist unklar wie viele Allergene noch immunologisch in ihrer aktiven Form vorliegen. Dies

stellt somit eine weitere Schwierigkeit bei der Beurteilung der vorhandenen Allergene im Ausgangsmaterial und des allergenen Potentials im fertigen Endprodukt dar.²⁶ In der Tat sind Handschuhe aus Latex bei klinischem Personal auf Grund ihrer besseren Flexibilität im Vergleich zu synthetischen Produkten viel beliebter. Die Einführung von nicht gepuderten Handschuhen bewirkte zu dem eine Reduktion des Aufkommens von Kontaktallergien. Verschiedene Chemikalien wie Beschleuniger, Aktivatoren, anti-Oxidanzien und vulkanisations-Agentien werden beim Herstellungsprozess verwendet. Der größte Teil dieser Chemikalien wird dann in der Produktion wieder beim Leachingprozess entfernt. Vor allem betrifft dies die wasserlöslichen Proteine. Heutzutage werden vor allem nicht gepuderte und chlorierte Produkte hergestellt, wodurch eine Aufnahme der Latexallergene über Aerosole vermindert ist. Produkte mit einem niedrig allergenen Potential sind die Folge.²⁷

Quantitative Untersuchungen haben ergeben, dass Hevein das wichtigste Allergen im Latex ist.²⁸

Es ist daher wichtig den Fokus auf neue Strategien zu richten, um während des Herstellungsprozess, entweder eine Protein Denaturierung, oder deren Elimination unter ökonomischen Bedingungen zu erreichen. Über die Identifikation und Sequenzierung der Latex Allergene konnten Ähnlichkeiten der Heveinstruktur in Domänen der Endochitinase in Avocados und somit die Auslösung von Kreuzallergien hergeleitet werden.²⁹ Die vier Hauptallergene im Latex lassen sich durch eine modifizierte Lowry Methode mit dem FITkit® Test analysieren. Das Wort Latex bezeichnet dabei den Saft des Baumes *Hevea brasiliensis* und wird bis heute verwendet. Vor allem bei der Herstellung von Schnullern und Saugflaschen für Säuglinge hat sich der Leachingprozess in den letzten 25 Jahren extrem verbessert.³⁰

1.2 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist eine Inaktivierung, beziehungsweise Modifikation, der im Latex enthaltenen Allergene durch kovalente Immobilisierung und Quervernetzung der Proteinmatrix. Dabei soll ein Endprodukt mit möglichst geringer Konzentration an Allergenen erhalten werden. Eine Evaluierung der dafür verantwortlichen Allergene findet nicht statt. Eine Möglichkeit der Charakterisierung der Allergene bietet dabei die Natrium-Dodecyl-Sulfat Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit anschließender Färbung durch Silber oder Coomassie blau. Des Weiteren kann eine Charakterisierung der im Latex enthaltenen Allergene auch über die Matrix assistierte Laser Desorption Ionisierung mit nachgeschaltetem Time of Flight; kurz MALDI-TOF Massenspektrometrie erfolgen.

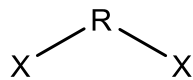
Die zwei Hauptallergene die dabei untersucht werden, sind zum einen der *rubber elongation factor* (REF), zum anderen das Hevein (Hev b 6.02). Dies sind die beiden wichtigsten allergieauslösenden Proteine im Latex. Diese können mittels SDS-PAGE und MALDI-TOF charakterisiert werden. Die Kombination dieser beiden Methoden gibt einen guten Aufschluss darüber ob eine Modifikation der beiden Hauptallergene stattgefunden hat. Ziel dieser Untersuchungen ist es durch den Einsatz von funktionellen Gruppen, den Proteingehalt im Endprodukt zu senken. Dabei ist anzumerken, dass ein Endprodukt mit nur 0,15 µg/g der vier Hauptallergene als wenig allergen einzustufen ist.³¹

Zur Findung geeigneter funktioneller Gruppen werden Reagentien anhand von Modellreaktionen mit Cysteamin untersucht und auf Prozesstauglichkeit überprüft.

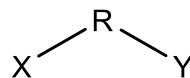
1.3 Grundlagen-/Theorieteil

1.3.1 Quervernetzer für Proteine und Peptide

Ein Quervernetzungsreagens für Proteine ist in jedem Fall ein bi- oder multifunktionelles Molekül; entweder homofunktional, sprich mit den gleichen funktionellen Gruppen, oder heterofunktional d.h. mit unterschiedlichen Gruppen:



homobifunktional



heterobifunktional

Abb.3 Bifunktionale Quervernetzer für Proteine

Wobei R der Abstandhalter (engl. spacer) und X bzw. Y die funktionellen Gruppen sind. Optional sind auch mehr als zwei funktionelle Gruppen zur Quervernetzung möglich. Für bifunktionelle Quervernetzer sind somit drei verschiedene Quervernetzungs-Produkte möglich:

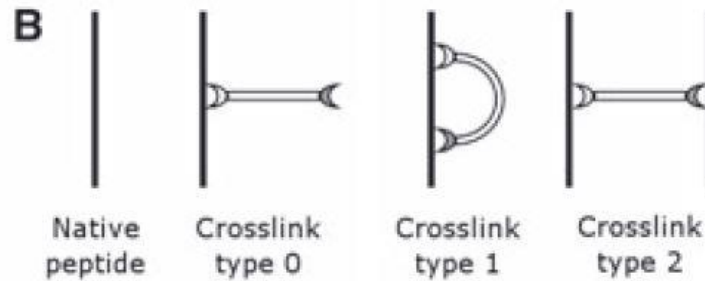


Abb.4 Quervernetzungsmöglichkeiten³²

Bei Typ 0 kommt es zu keiner Quervernetzung, sondern nur zur Beladung, Typ 1 entspricht einer intrapeptid Quervernetzung, und Typ 2 einer Interpeptid Quervernetzung. Hieraus wird auch schnell klar, dass zur Informationsgewinnung auf jeden Fall Typ 1 und 2 zu bevorzugen sind.³²

Ein weiterer Punkt für die erfolgreiche Quervernetzung ist somit die Auswahl des Linkers. Dieser sollte in jedem Fall an den funktionellen Gruppen reaktiv genug sein und spezifisch an bestimmte Strukturelemente binden (Chemoselektivität). Des Weiteren sollte er unter milden Reaktionsbedingungen reagieren um eine Denaturierung, oder Konformationsänderung der Proteine zu unterbinden. In Proteinen und Peptiden sind es vor allem die Thio- und Aminogruppen der Cystein und Lysin-Seitenketten, die als mögliche Andockstellen für Quervernetzungen dienen.

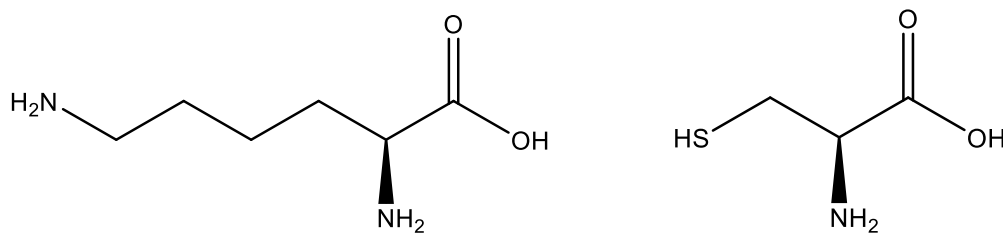


Abb.5 Struktur von Cystein und Lysin

1.3.2 Reaktive Gruppen:

Als homobifunktionale Gruppe hat sich dabei vor allem Divinylsulfon (DVS) etabliert. Mit seinen Vinylgruppen ist es in der Lage an nukleophilen Additionsreaktionen teilzunehmen, insbesondere mit funktionellen Gruppen (SH, NH₂) der Aminosäuren in den Proteinen:

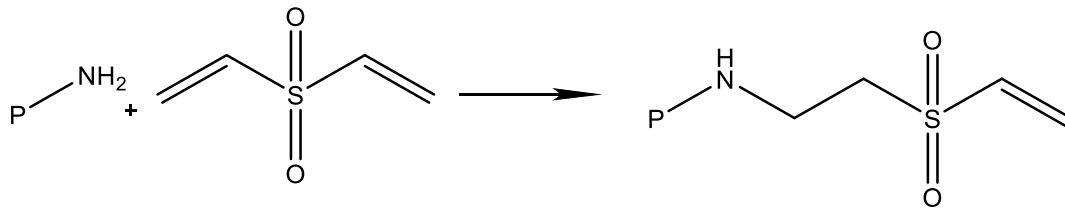


Abb.6 Reaktion von Divinylsulfon mit Aminen (P=Protein/Peptid)

Die Additionsreaktion von DVS an die Protein-Amino- und Thio-Gruppen verläuft auf Grund der hohen Reaktivität schnell (< 30 Minuten). Bevorzugte Angriffsstellen sind dabei die SH-Gruppen von Cystein, und die Aminogruppen von Histidin und Lysin. Bei pH Werten > 9 reagieren Vinylsulfone sehr schnell mit den endständigen Aminogruppen der Proteine und Peptide. Erhöht man die Basizität noch weiter, werden sogar Hydroxy-Gruppen angegriffen:

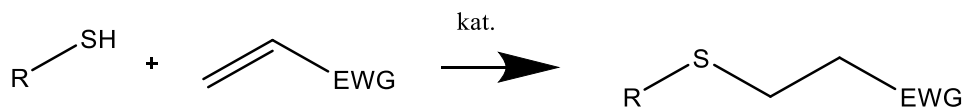


Abb.7 Reaktion von Thiolen mit aktivierten Vinylen (EWG=electron withdrawing group)

Der Mechanismus der Addition von Thioverbindungen verläuft im Sinne einer Michael-Addition nach folgendem Schema:³³

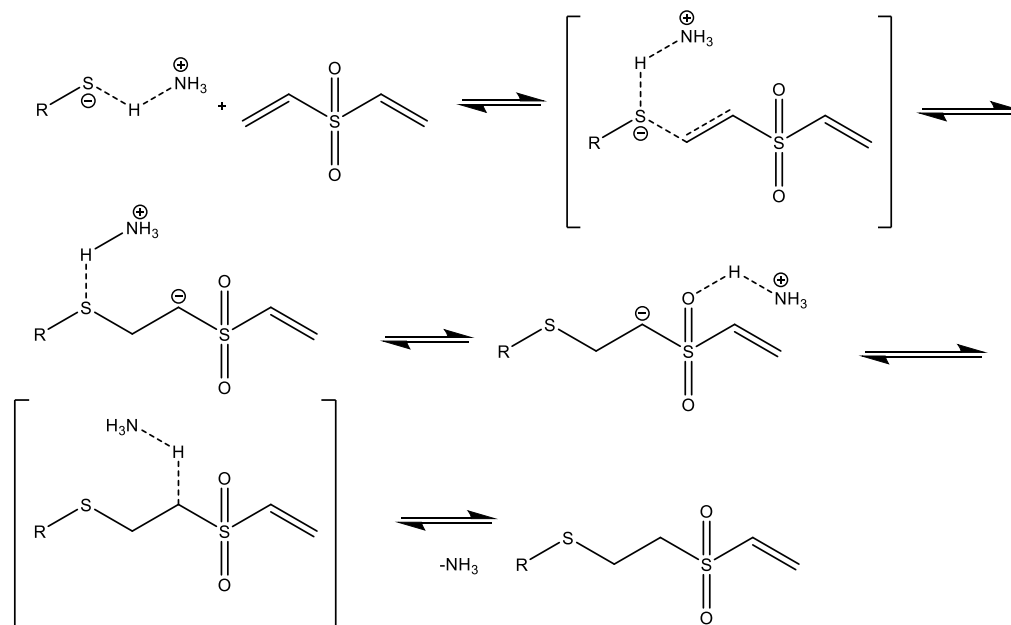


Abb.8 Michael-Addition von Thioverbindungen

Auf Grund der höheren Nucleophilie der Thiogruppe, wird der Angriff an die Cystein Gruppe bevorzugt. Die ε-Aminogruppe des Lysins, sowie die Aminogruppen von Histidin und Imidazol sind

weitere Angriffsstellen. Eine entscheidende Rolle für den Ablauf dieser Reaktionen spielt dabei der pH Wert. Cystein Gruppen reagieren schon rapide bei pH Werten von 7 bis 9, wohingegen bei Lysinen erst ab einem pH von 9,3 eine Reaktion stattfindet. Die Thiogruppen sind 280-fach reaktiver als Aminogruppen. Die Aktivierung der Moleküle über die Vinylsulfon-Funktionalisierung zeigt einen großen Spielraum in der Proteomik, der Wissenschaft von der Erforschung der Proteine.³⁴

Lysin ist die Aminosäure, die in Proteinen am einfachsten zur Reaktion gebracht werden kann. Einerseits auf Grund der ϵ -Aminogruppe, andererseits wegen der Zugänglichkeit an der Oberfläche. In diesem Zusammenhang sind auch die Michael-Additionen (siehe oben) von Vinylsulfonen eine attraktive Methode zur Konjugation. Im Gegensatz zur Reaktion mit Lysin-Domänen ist die Reaktion mit Cystein-Resten nicht pH-Wert gesteuert. Zusammenfassend bietet die Addition von Aminen und Thiolen im Sinne einer Michael-Addition ein weites Anwendungsgebiet.³⁵

Bifunktionelle Elektrophile sind Moleküle mit zwei elektrophilen Zentren und werden zur Untersuchung der Interaktion mit Proteinen wegen ihrer Möglichkeit zur Quervernetzung eingesetzt. Eines der wirksamsten Reagenzien dafür ist das Divinylsulfon. Es ist ungefähr sechs Mal so reaktiv wie das Ethylvinylsulfon. Bifunktionale Moleküle sind 10-fach so toxisch, wie ihre monofunktionellen Analoga. Vinylsulfone werden in irreversiblen Inhibitoren von spezifischen Enzymen, zum Beispiel bei Proteasen und Protein Tyrosin Phosphatasen eingebaut. Bei pH-Werten ≥ 9 reagieren sie mit den Aminogruppen aus den Proteinen. Als Quervernetzungsreagens wurde Divinylsulfon in mehreren Verfahren eingesetzt. Studien haben gezeigt, dass Divinylsulfon als Protein Quervernetzer die Toxizität in Zellen erhöht.³⁶

Die Reaktivität, Selektivität und Kinetik von Vinylsulfonen im Basischen wurde bei nukleophil katalysierten Thiol-Michael Additions-Reaktionen untersucht. Eine Steigerung der Reaktivität von Divinylsulfonen lässt sich durch Zusatz von Acrylaten erreichen. Die Thiol-Klick-Chemie lässt sich verwenden um funktionale Materialien unter einfachen Bedingungen herzustellen. Die Thiol-Vinyl-Reaktionen lassen sich durch unterschiedliche Spezies vermitteln. Trotzdem ist der Mechanismus der Thiol-Michael Additions-Reaktion noch nicht geklärt, da es auch zur Bildung von Nebenprodukten kommt und die Reaktion nicht kontrolliert verläuft. Die Untersuchungen bezüglich der Selektivität von Vinylsulfon-Gruppen und deren Thiol-Michael Addition sind bis heute sehr limitiert. Immerhin ist bekannt, dass Vinylsulfon hoch reaktive Vinylgruppen für die Thiol-Michael Reaktion bereitstellt. Die Reaktivität der Vinylgruppen kommt auf Grund des Elektronenmangels der Sulfonyl-Gruppen zu Stande.³⁷

Daher stellt DVS ein gutes Vernetzungsreagens für Reaktionen mit Proteinen dar.

Als multifunktionale funktionelle Gruppe dient auch das 2,4,6-Trichlor-1,3,5-triazin (Cyanurchlorid):

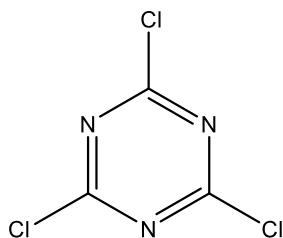


Abb.9 Struktur von Cyanurchlorid

1,3,5-Triazine kommen in der pharmazeutischen Industrie, Landwirtschaft und Materialchemie zum Einsatz und sind potente Inhibitoren von diversen Proteinen. Die symmetrische Natur des Triazins bietet ein optimales Gerüst um dieses Molekül mit einer Reihe an funktionellen Gruppen zu modifizieren. Im Gegensatz zu Benzen liegt das Triazin als irreguläres Hexagon vor und es kommt zu einer partiellen Ladungsumverteilung. Dadurch werden die Kohlenstoffatome angreifbar für Nucleophile und die Stickstoffatome für Elektrophile. Die nucleophile Addition an Triazinen führt allerdings zur Ringöffnung unter Bildung von aminomethylierten Cyanimiden. Um dieses Verhalten zu unterbinden wird daher oft Cyanurchlorid als Ausgangsmaterial eingesetzt. Dabei können die drei Chloratome sequentiell substituiert werden. Die einfache Funktionalisierung und strikte Kontrolle der Stöchiometrie der Substitution von Cyanurchlorid liefert eine vielseitig variierbare Grundstruktur. Dieses reagiert mit seinen Chloratomen vor allem mit N-, S- und O-Nucleophilen und ist somit sehr leicht zu funktionalisieren.³⁸

Analog dazu reagiert das 2,4-Dichlor-6-methoxy-1,3,5-triazin (DMTZ):

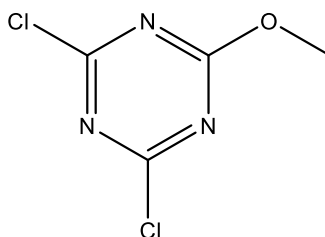


Abb.10 Struktur von 2,4-Dichlor-6-methoxy-1,3,5-triazin (DMTZ)

Eine weitere funktionelle Gruppe, die zur Quervernetzung der Proteine untersucht wurde, ist das Glutardialdehyd (Ga):

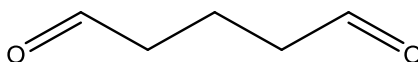


Abb.11 Struktur von Glutaraldehyd

Glutaraldehyd liegt in vielen verschiedenen Formen vor, wie die folgende Abbildung zeigt:

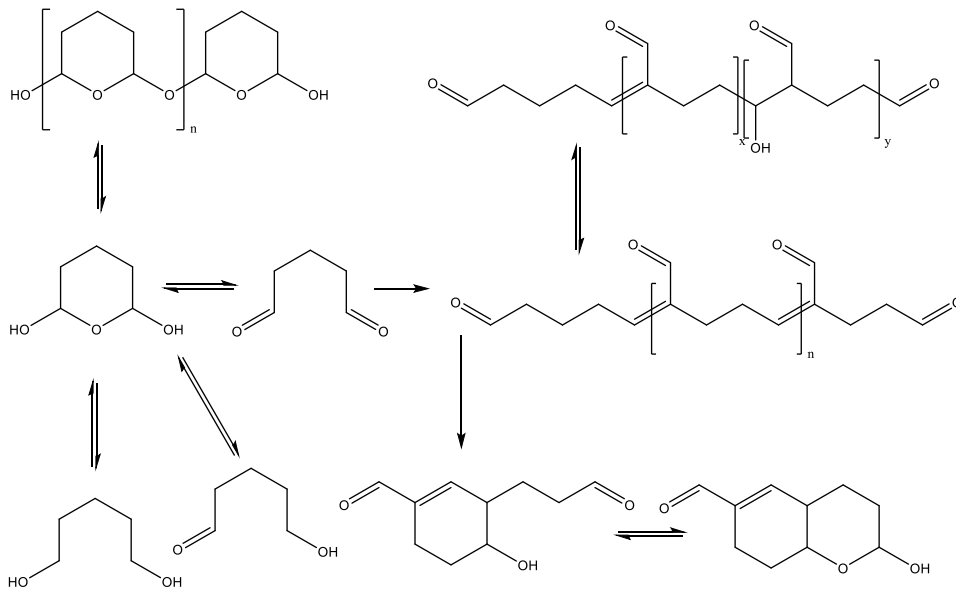


Abb.12 Formen von Glutaraldehyd

Demzufolge kann es auf unterschiedliche Art mit Aminen und Thiolen aus den Proteinen reagieren. Die Reaktionswege sind vielfältig und bis heute noch ungeklärt.³⁹

Weitere Moleküle die auf eine mögliche Quervernetzung mit Latexproteinen hin untersucht worden sind, waren Glucose und Fructose:

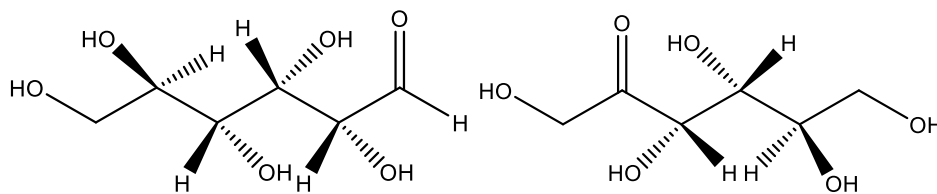


Abb.13 Struktur von Glucose (links) und Fructose (rechts)

Diese Verbindungen sind in der Lage mit Aminen eine Amadori Reaktion einzugehen, wie folgendes Reaktionsschema zeigt:

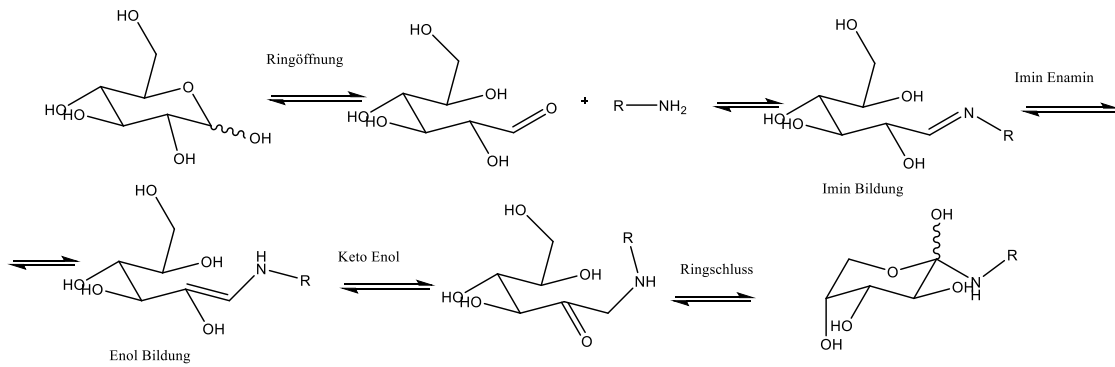


Abb.14 Amadori Mechanismus von Kohlenhydraten

Außerdem wurde das 1,3,5-Triacryloylhexahydro-1,3,5-triazin auf seine Reaktivität in Bezug auf Proteine untersucht.

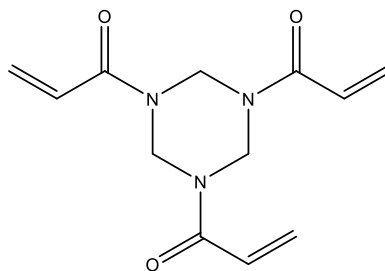


Abb.15 Struktur von 1,3,5-Triacryloylhexahydro-1,3,5-triazin

Dieses stellt mit seinen drei Acryloyl-Gruppen ein reaktives Edukt zur Proteinquervernetzung dar. Der Reaktionsmechanismus ist dabei derselbe wie beim DVS.

Ein weiteres Molekül, das untersucht worden ist, ist das Triallyl-1,3,5-triazin-2,4,6-trion:

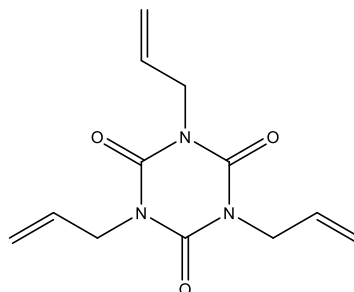


Abb.16 Struktur von Triallyl-1,3,5-triazin-2,4,6-trion

Dieses sollte mit seinen Allylgruppen ähnlich wie das DVS reagieren.

2 Allgemeine Methodik

Anhand von Modellreaktionen soll abgeklärt werden, ob eine Reaktion mit Thio-, sowie den Aminogruppen stattfindet. Auf eine Aufarbeitung der Reaktionsprodukte wird verzichtet. Es wird lediglich mittels NMR-Spektroskopie untersucht, ob eine Reaktion mit Cysteamin zu Stande kommt. Cysteamin-Hydrochlorid dient dabei als einfache Modellsubstanz, wobei der pH-Wert den ammoniakalischen Bedingungen im Latex angepasst wird.

2.1 NMR Spektroskopie

Die NMR Spektroskopie stellt für chemische Reaktionen heutzutage die wichtigste Methode zur Charakterisierung chemischer Verbindungen dar. Zur Untersuchung der Modellreaktionen ist sie Methode der Wahl um einen Eindruck zu erhalten, welche Verbindungen und Reaktionsprodukte entstehen. Die Methoden, die in dieser Arbeit Verwendung finden sind:

- $^1\text{H-NMR}$
- $^{13}\text{C-NMR}$
- $^1\text{H-COSY}$
- $^1\text{H-}^{13}\text{C-HSQC}$

Die NMR Spektren wurden auf einem Bruker DPX 300 und Bruker Avance III 600 aufgenommen. Als Referenz dienen dabei die Signale der deuterierten Lösungsmittel von DMSO (1H: δ 2.54 ppm, 13C: δ 40.45 ppm) und Deuteriumoxid (D_2O) (1H: δ 4.79 ppm).

2.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page)

Diese Trennmethode eignet sich zur Auftrennung von Proteinen und ermöglicht dabei eine Bestimmung des Molekulargewichts. Die Proteine werden hierbei durch ein Detergenz *Sodiumdodecylsulfat* (SDS) oder *Triton[®] X-100* bedeckt, sodass diese dann nach ihrer molaren Masse getrennt werden können. Es bildet sich somit ein Komplex aus Protein und Tensid, der im elektrischen Feld wandern kann. Die Trägermatrix besteht dabei aus Polyacrylamid. Durch das Anlegen eines Stromes fangen die Ionen im Feld zu wandern an. Nach Einstellung eines Gleichgewichtes ist ausschließlich die Größe für die Wanderungsgeschwindigkeit ausschlaggebend. Nachdem die Elektrophorese beendet ist und die Proteine ihrem Molekulargewicht nach getrennt worden sind, muss das erhaltene Gel noch angefärbt werden, damit die Proteinbanden sichtbar gemacht werden können. Dies kann zum einen durch *Silberfärbung*, zum anderen mittels *Coomassie Blau R250* erreicht werden. Die Ermittlung der Molekulargewichte erfolgt durch den Zusatz von Standardproteinen, wie in dieser Arbeit mit dem *Mark12[™] Unstained Standard* und dem *SeeBlue[®]Plus2 Pre-Stained Standard*.

2.2.1 Praktische Durchführung der Silberfärbung

Das Gel aus der Elektrophorese wird im ersten Schritt aus seiner Sichtverpackung befreit und in eine Fixierlösung bestehend aus Ethanol 70 (v/v)% und Eisessig für 30 Minuten inkubiert. Daraufhin wird es in einer Ethanol 70 (v/v)% Lösung mit Natriumthiosulfat (pentahydrat), Natriumacetat und einem Zusatz an Glutaraldehyd für weitere 15 Minuten behandelt. Anschließend wird das Gel drei Mal mit deionisiertem Wasser für jeweils fünf Minuten gewaschen. Hierauf folgt dann die Behandlung mit der Färbelösung die Silbernitrat und einen Zusatz an Formaldehyd enthält. Das Gel wird mit der Färbelösung fünfzehn Minuten behandelt. Danach wird es kurz mit deionisiertem Wasser gewaschen, worauf eine Behandlung mit der Entwicklungslösung folgt. Diese besteht aus Natriumcarbonat und einem Zusatz an Formaldehyd. Das Gel wird so lange in dieser Lösung entwickelt, bis die Proteinbanden sichtbar werden. Sobald dies der Fall ist wird das Gel mit einer stopp Lösung aus Ethylendiamintetraacetat (EDTA) behandelt; Einwirkungsdauer etwa 30 Minuten.

2.2.2 Praktische Durchführung der Coomassie Färbung

Das nach der Elektrophorese erhaltene Gel wird direkt mit einer Lösung aus *Coomassie Blau R250* für etwa 30 Minuten behandelt. Anschließend wird es mehrfach mit einer Lösung aus Ethanol, Essigsäure und Wasser (im Verhältnis 40/10/50) für etwa 20 bis 30 Minuten entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar zu erkennen sind.

2.2.3 Zugesezte Standards

Als Referenz dienen zugesezte Standardproteine, die in folgender Tabelle angegeben sind.

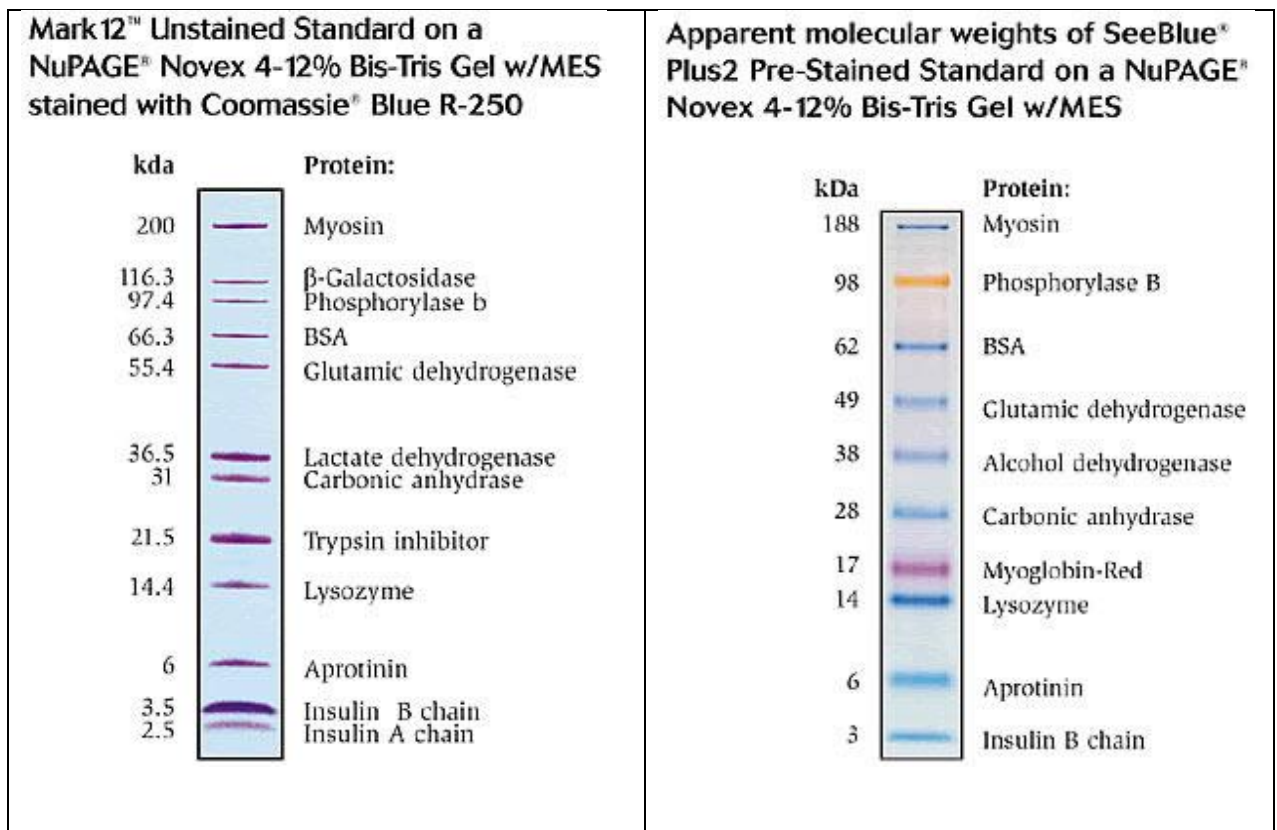


Tabelle 1. Zugesezte Standardproteine

2.3 Matrix Assistierte Laser Desorptions Ionisation (MALDI) Time of Flight (TOF) Massenspektrometrie

Die MALDI Spektrometrie ist neben der Kernmagnetresonanz (NMR) heutzutage eine der wichtigsten Methoden zur Charakterisierung chemischer Verbindungen. Das Grundprinzip ist dabei durch eine Laser-Anregung eine Ionisierung des Analyten aus einer Matrix zu erreichen und das erhaltene Ionisierte Molekülfragment im Vakuum so zu beschleunigen, dass es dann anhand der Flugzeit schließlich in ein Massenspektrum umgewandelt werden kann. Als Matrix wird in der vorliegenden Arbeit 2,5-Dihydroxyacetophenon mit Ammoniumcitrat verwendet. Die Matrix dient vor allem der Energieaufnahme durch den Laserimpuls und führt dann zur Verdampfung dieser und der in ihr enthaltenen Analyt Moleküle.

Hevein, ein 4,7 kDa Polypeptid, ist über die Matrix Assistierte Laser Desorptions Ionisation (MALDI-ToF) Massenspektrometrie charakterisierbar. Neben dem Prohevein und dem Rubber Elongation Factor (REF) stellt es eines der Hauptallergene im Latex dar. Latex ist nach wie vor der wichtigste Rohstoff bei der Herstellung von Gummiprodukten aller Art. Vor allem Patienten, die mehrfach operiert werden oder nach längerem Spitalsaufenthalt tritt eine Sensibilisierung häufig auf. Für das Auslösen der Allergie sind vor allem die Proteine an der Oberfläche von Latexerzeugnissen verantwortlich. Es wurden viele Versuche unternommen die dafür verantwortlichen Proteine zu isolieren und identifizieren; ein Beispiel dafür ist die Immunoblotting Methode⁴⁰.

2.4 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung nach Lowry ist eine photometrische Methode um die Konzentration löslicher und unlöslicher Proteine zu bestimmen. Im alkalischen Milieu findet in Anwesenheit von Proteinen mit Cu^{2+} eine Biuretreaktion statt. Anschließend erfolgt die Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch Oxidation aromatischer Aminosäuren, welche das Folin-Reagenz auch direkt reduzieren. Die Reduktion des Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz findet dann auch durch die Cu^{1+} Ionen statt.

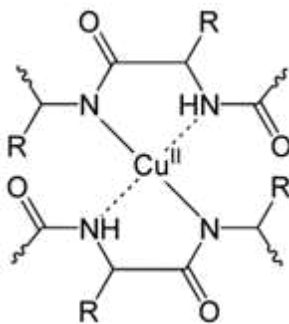


Abb.17 Kupferbiuretkomplex

Das Folin-Ciocalteu-Reagenz, bestehend aus Molybdophosphorsäure und Wolframatophosphorsäure, wird dabei von Oxidationsstufe VI auf IV reduziert und es entstehen dabei Mischoxide mit Oxidationszahlen zwischen VI und IV. Durch die Reduktion kommt es zu einem Farbumschlag von gelb nach blau. Diese Blaufärbung kann dann durch Messung der

Extinktion, nach dem Lambert-Beer'schen-Gesetz, zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration herangezogen werden.

$$E_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$$

E_{λ} ... Extinktion bei Wellenlänge λ

ε_{λ} ... molarer Extinktionskoeffizient bei Wellenlänge λ

c ... Konzentration

d ... Schichtdicke

Dafür wird bei mehreren Proben bekannter Proteinkonzentration die Extinktion ermittelt und diese als Funktion der Konzentration graphisch dargestellt. Der molare Extinktionskoeffizient kann dann aus dem Anstieg der Geraden ermittelt werden. Durch Einsetzen des Extinktionskoeffizienten kann man wiederum unter Anwendung des Lambert-Beer'schen-Gesetzes die Proteinkonzentration ermitteln.

2.5 FITkit® Analyse

Die FITkit® Analyse ist ein immunologischer Test zur Bestimmung der vier Hauptallergene im Latex. Gemessen werden die spezifischen Allergene: Hev b 1, Hev b 3, Hev b 5 und Hev b 6.02. Die Summe dieser vier Allergene zeigt das allergische Potential von Latexprodukten. Der Test beruht auf einem Enzym basierten Immunoassay und ist ein geschütztes Markenzeichen der Firma ICOSAGEN AS.

2.6 Hydrophile Interaktions Chromatographie (HILIC)

Die HILIC ist eine Variante der Flüssigkeitschromatographie. Technisch überschneidet sie sich mit der Ionen- und der Umkehrphasenchromatographie und benutzt dabei eine polare stationäre Phase mit einem Umkehrphaseneluenten; einer organischen Phase. Die mobile Phase in der HILIC ist meist Acetonitril mit einem Zusatz an Wasser. Dabei bildet sich ein wasserreicher Film auf der Oberfläche der stationären Phase, während die mobile Phase unter Wassermangel ein flüssig/flüssig Extraktionssystem darstellt. Der Analyt wird dabei zwischen diesen beiden Schichten verteilt, wobei verschiedene Hydrogen Donor Wechselwirkungen stattfinden. Daneben kommen auch schwache elektrostatische Mechanismen vor, was die HILIC damit von der Ionenaustauschchromatographie unterscheidet. Je polarer der Stoff, desto stärker die Interaktion mit der stationären wässrigen Schicht.

Die HILIC Chromatographie wurde auf einem Alltech 3300 ELSD mit einem Shimadzu Sil- 10 AD Autosampler durchgeführt und unter Verwendung von LabSolutions 5.42SP4 ausgewertet.

3 Substanzklassen spezifische Methoden

3.1 Divinylsulfon (DVS)

3.1.1 DVS Modellreaktionen

3.1.1.1 Reaktion von Divinylsulfon mit Cysteamin Hydrochlorid

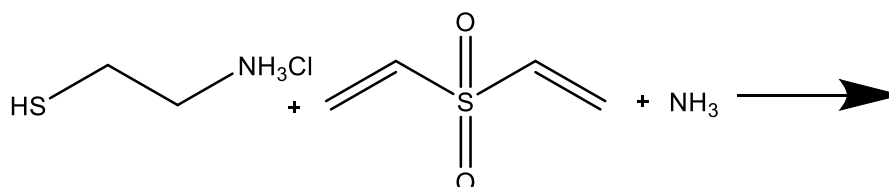


Abb.18 Reaktion von Divinylsulfon mit Cysteamin Hydrochlorid

Ansatz 1

bei RT	DVS	Cysteamin	NH ₃	Reaktionszeit
M	118,15 g/mol	113,61 g/mol	17,03 g/mol	17 Stunden
m	371,1 mg	241,7 mg	45 mg / 200 µl	
CAS	77-77-0	60-23-1	1336-21-6	
Mol	3,14 mmol	2,12 mmol	2,64 mmol	

Tabelle 2. Reaktionsansatz mit Reaktionszeit von 17 Stunden

Wie in Tabelle 2. beschrieben, wurden 241,7 mg Cysteaminhydrochlorid in 4 ml THF und 2 ml deionisiertem Wasser vorgelegt. Anschließend wurden 314,5 µl Divinylsulfon und 200 µl 25%iger Ammoniak zugegeben und für 17 Stunden bei pH~8 über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde dann am Rotavapor abgezogen und der Rückstand (392,7 mg) in DMSO-d₆ gelöst und mittels NMR-Spektroskopie gemessen.

Ansatz 2

bei RT	DVS	Cysteamin	NH ₃	Reaktionszeit
M	118,15 g/mol	113,61 g/mol	17,03 g/mol	21 Stunden
m	66,5 mg	217 mg	45 mg / 200 µl	
CAS	77-77-0	60-23-1	1336-21-6	
Mol	563 µmol	1,91 mmol	2,64 mmol	

Tabelle 3. Reaktionsansatz mit Reaktionszeit von 21 Stunden

Wie in Tabelle 3 beschrieben, wurden 217 mg Cysteaminhydrochlorid in 2 ml deionisiertem Wasser gelöst und anschließend 56,5 ml Divinylsulfon und 200 µl 25%iger Ammoniak zugegeben.

Bei pH ~10 wird für 21 Stunden bei RT gerührt und danach das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde dann in d₆-DMSO gelöst und mittels NMR-Spektroskopie gemessen.

Ansatz 3

bei RT	DVS	Cysteamin	NH ₃	Reaktionszeit
M	118,15 g/mol	113,61 g/mol	17,03 g/mol	23 Stunden
m	342 mg	328,9 mg	90 mg / 400 µl	
CAS	77-77-0	60-23-1	1336-21-6	
mol	2,9 mmol	2,9 mmol	5,28 mmol	

Tabelle 4. Reaktionsansatz mit Reaktionszeit von 23 Stunden

Wie in Tabelle 4. beschrieben, wurde Cysteaminhydrochlorid in 2 ml deionisiertem Wasser gelöst und mit 25%igem Ammoniak versetzt. Anschließend wurde DVS zu getropft und bei pH ~ 10 gerührt. Für eine bessere Durchmischung wurden zusätzlich 2 ml THF zugegeben. Nach 23 Stunden wurde das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt und der Rückstand mit Methylenchlorid und DMSO versetzt, wobei sich ein Niederschlag bildete. Dieser wurde abfiltriert und das Filtrat einrotiert. Von dem Filtrat wurde ein NMR-Spektrum in d₆-DMSO gemessen.

Ansatz 4

bei RT	DVS	Cysteamin	NH ₃	Reaktionszeit
M	118,15 g/mol	113,61 g/mol	17,03 g/mol	4 Stunden
m	368,16	353,3 mg	180 mg	
CAS	77-77-0	60-23-1	1336-21-6	
mol	3,1 mmol	3,1 mmol	10,57 mmol	

Tabelle 5. Reaktionsansatz mit Reaktionszeit von 4 Stunden

Wie in Tabelle 5. beschrieben, wurde Cysteaminhydrochlorid in 2ml deionisiertem Wasser gelöst und mit 2ml THF versetzt. Anschließend wurden 400µl 25%iger Ammoniak und das DVS zu getropft. Nach etwa einer Stunde wurden dann weitere 400µl 25%iger Ammoniak zugegeben und die Reaktionsmischung wurde für 4 Stunden bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotavapor entfernt und der Rückstand in d₆-DMSO gelöst. Von diesem wurde dann ein NMR-Spektrum gemessen.

Ansatz 5

bei RT	DVS	Cysteamin	NH ₃	Reaktionszeit
M	118,15 g/mol	113,61 g/mol	17,03 g/mol	67 Stunden
m	370,45 mg	354,8 mg	900 mg / 1ml	
CAS	77-77-0	60-23-1	1336-21-6	
mol	3,13 mmol	3,13 mmol	13,21 mmol	

Tabelle 6. Reaktionsansatz mit Reaktionszeit von 67 Stunden

Wie in Tabelle 6. beschrieben, wurde Cysteaminhydrochlorid mit 2ml THF und 2ml deionisiertem Wasser gelöst. Anschließend wurden unter Rühren 25%iger Ammoniak und das DVS zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde dann bei RT für 67 Stunden mit einem pH ~ 10 gerührt. Das Lösungsmittel wurde dann am Rotavapor entfernt. Das Rohprodukt wurde dann mittels Säulenchromatographie mit Methylchlorid/Hexan/Methanol (10/4/1) gereinigt und anschließend ein ¹H-NMR in d₆-DMSO davon aufgenommen.

Ansatz 6

bei RT	DVS	Cysteamin	NH ₃	Reaktionszeit
M	118,15 g/mol	113,61 g/mol	17,03 g/mol	15',30',45',60'
m	398,84mg/338µl	383,6mg	900mg/1ml	
CAS	77-77-0	60-23-1	1336-21-6	
mol	3,37 mmol	3,37 mmol	13,21 mmol	

Tabelle 7. Reaktionsansatz mit verschiedenen Reaktionszeiten

Wie in Tabelle 7. beschrieben, wurde Cysteamin in 2ml deionisiertem Wasser gelöst. Anschließend wurde 25%iger Ammoniak zugegeben und unter Rühren das DVS zu getropft. Der pH Wert lag hierbei ungefähr bei 11. Es wurden dann Proben nach 15', 30', 45' und 60' entnommen und mittels NMR-Spektroskopie analysiert.

Ansatz 7

bei RT	DVS	Cysteamin	KOH	Reaktionszeit
M	118,15 g/mol	113,61 g/mol	56,11 g/mol	15',30',45',60'
m	350,46mg/297µl	336,6mg	292 mg	
CAS	77-77-0	156-57-0	1310-58-3	
mol	2,97 mmol	2,96 mmol	5,2 mmol	

Tabelle 8. Reaktionsansatz mit verschiedenen Reaktionszeiten

Wie in Tabelle 8. beschrieben, wurde Kaliumhydroxid in einem Rundkolben in 1ml deionisiertem Wasser gelöst. Cysteaminhydrochlorid wurde ebenfalls in 1ml deionisiertem Wasser gelöst und in

den Rundkolben überführt. Anschließend wurde DVS zu getropft und bei pH ~14 gerührt. Mit Salzsäure wurde der pH Wert auf 10 eingestellt. Nach 48 Stunden wurden 2ml für die weitere Analyse mittels NMR in d_6 -DMSO entnommen.

3.1.2 DVS Elektrophorese

3.1.2.1 Elektrophorese von mit Divinylsulfon behandeltem Latexsaft

1 ml Latexsaft wurde mit 7,5 μ l; 1,5 μ l und 0,75 μ l Divinylsulfon behandelt und nach einer Stunde davon 100 μ l Proben für die Elektrophorese entnommen.

Anschließend wurden 100 μ l Latexsaft mit 900 μ l deionisiertem Wasser 1:10 verdünnt. Davon wurden anschließend 400 μ l für die Behandlung mit SDS und 400 μ l für die Behandlung mit *Triton*[®] X-100 entnommen. Zu den 400 μ l wurden dann jeweils 40 μ l 10%iges SDS bzw. 40 μ l 10%iges *Triton*[®] X-100 zugegeben. Anschließend wurden die so vorbereiteten Proben eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt und danach bei 12000 g für 5 Minuten zentrifugiert. Dabei koagulierte der Gummi und bildete einen Rückstand an der Oberfläche der Lösung. Mit einer Pipette wurden dann jeweils 15 μ l vom Filtrat aufgenommen und anschließend mit 5 μ l *LDS Sample Buffer 4x* von *Life technologies* 10 Minuten bei 70°C inkubiert.

Für den Elektrolyten wurden in einer Mensur 40ml MES-Puffer und 760 ml deionisiertem Wasser gemischt. Als Standard und Referenz wurde der *Mark 12 unstained standard* von *Life technologies* verwendet. Die Elektrophorese wurde anschließend nach Befüllen der Kammer bei 200 Volt für etwa eine Stunde durchgeführt. Die Proteine wurden anschließend mit Coomassie Blau oder Silberfärbung sichtbar gemacht.

3.1.2.2 Elektrophorese von DVS-aktiviertem BSA

Dazu wurde eine Stammlösung von BSA mit 10mg pro ml hergestellt. Es ist davon ausgegangen worden, dass ein Molekül BSA 35 zugängliche NH_3 -Gruppen besitze und somit in 1 ml BSA Stammlösung 5,31 μ mol zugängliche NH_3 -Gruppen vorhanden wären. Stammlösungen von jeweils 1 ml wurden dann mit 626 μ g, 62,6 μ g und 6,3 μ g DVS versetzt und nach 2 Stunden rühren unter alkalischen Bedingungen (pH ~10) jeweils 100 μ l für die weitere Untersuchung mittels SDS-PAGE entnommen. Die Probenaufbereitung für die Elektrophorese erfolgte wie bei der Elektrophorese von Latexproteinen mit dem Unterschied, dass auf das Zentrifugieren verzichtet wurde (siehe 3.1.2.1).

3.1.2.3 DVS Aktivierung für 2 Stunden mit Zusatz von Mercaptoethanol

Dazu wurden 100 μ l Latexsaft, die zuvor zwei Stunden mit DVS behandelt worden waren, mit 900 μ l deionisiertem Wasser 1:10 verdünnt. Davon wurden anschließend 400 μ l für die Behandlung mit *Triton*[®] X-100 entnommen. Zu den 400 μ l wurden dann jeweils in einer Probenserie 20 μ l Mercaptoethanol und 40 μ l 10%iges *Triton*[®] X-100 zugegeben; in der anderen Messreihe wurde das Mercaptoethanol weggelassen. Die Vorbereitungen und Elektrophorese erfolgten dann wie oben angegeben (siehe 3.1.2.1).

3.1.2.4 DVS Aktivierung für eine Stunde ohne Zusätze

Dazu wurden 100 µl Latexsaft, die zuvor eine Stunde mit DVS behandelt worden sind, mit 900 µl deionisiertem Wasser 1:10 verdünnt. Davon wurden anschließend 400 µl für SDS und 400 µl für die Behandlung mit *Triton*[®] X-100 entnommen. Zu den 400 µl wurden dann 40 µl 10%iges *Triton*[®] X-100 zugegeben. Die Vorbereitung und Trennung mittels Elektrophorese erfolgten dann wie oben angegeben (siehe 3.1.2.1).

3.1.2.5 DVS Aktivierung für eine Stunde und Trennung auf einem 18% Tris-Glycine-Gel

Dazu wurden 100 µl Latexsaft, die zuvor eine Stunde mit DVS behandelt worden sind, mit 400 µl deionisiertem Wasser 1:5 verdünnt. Davon wurden anschließend 400 µl für die Behandlung mit *Triton*[®] X-100 entnommen. Zu den 400 µl wurden dann jeweils 40 µl 10%iges *Triton*[®] X-100 zugegeben. Die weitere Probenvorbereitung erfolgte dann wie oben angegeben (siehe 3.1.2.1). Für den Elektrolyten wurden in einer Mensur 80ml Tris-Glycin-Puffer 10x mit 720 ml deionisiertem Wasser gemischt. Als Gel wurde ein *Novex 18% Tris-Glycine-Gel 1.0 mm, 15 well* verwendet.

2. Elektrophorese zur Doppelbestimmung

Dazu wurden 100 µl Latexsaft, die zuvor mit DVS behandelt worden sind, mit 400 µl deionisiertem Wasser 1:5 verdünnt. Zu den 500 µl wurden dann jeweils 50 µl 10%iges *Triton*[®] X-100 zugegeben. Anschließend wurden die so vorbereiteten Proben eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt und danach bei 12000 g für 5 Minuten zentrifugiert. Dabei koagulierte der Gummi und bildete einen Rückstand an der Oberfläche der Lösung. Mit einer Pipette wurden dann jeweils 30 µl vom Filtrat aufgenommen und anschließend mit 15 µl *LDS Sample Buffer 4x* von *Life technologies* 10 Minuten bei 70°C inkubiert.

Als Gel wurde ein *Novex 18% Tris-Glycine-Gel 1.0 mm, 15 well* verwendet.

Die weitere Probenvorbereitung erfolgte dann wie oben beschrieben (siehe 3.1.2.1).

3.1.3 DVS MALDI-TOF

3.1.3.1 Behandlung von Latexsaft mit Divinylsulfon (DVS)

Dazu wurden zu 1 ml Latexsaft jeweils

- 1) 30 µl (300 µmol) DVS
- 2) 25 µl (250 µmol) DVS
- 3) 20 µl (200 µmol) DVS
- 4) 15 µl (150 µmol) DVS
- 5) 10 µl (100 µmol) DVS
- 6) 5 µl (50 µmol) DVS

bei Raumtemperatur zugegeben und die Lösung mittels Magnetrührstäbchen für eine Stunde gerührt. Anschließend wurden jeweils 10 µl der so behandelten Proben mit 990 µl deionisiertem Wasser 1:100 verdünnt. Danach erfolgte eine weitere Verdünnung der so erhaltenen Proben im Verhältnis 1:20, sodass die Gesamtverdünnung 1:2000 betrug. Als Matrix wurde eine Mischung

aus 2,5-Dihydroxyacetophenon (DHAP) mit Ammoniumcitrat und 2%iger Trifluoressigsäure (TFA) eingesetzt. Jeweils 2 µl Probe wurden mit 2 µl DHAP und 2 µl TFA vermischt und davon 0,5 µl auf den Träger aufgetragen.

3.1.3.2 BSA nach Behandlung mit DVS

Wurden mit Rinder Serum Albumin (BSA) und DVS aktiviertem Latex durchgeführt.

Für die BSA Probenserie wurde eine Stammlösung von BSA mit 10 mg/ml hergestellt. Davon wurden dann jeweils 1 ml mit der entsprechenden Menge an DVS bezogen auf 35 zugängliche Aminogruppen umgesetzt:

Probe Nr.	Äquivalent	DVS	m	Vol
Referenz	1:0	-	-	-
1	1:1	5,31 µmol	626 µg	531 µl
2	1:0,1	0,53 µmol	62,6 µg	53,1 µl
3	1:0,01	53 nmol	6,27 µg	5,3 µl

Tabelle 9 Reaktionsansatz von DVS behandeltem BSA

Probenvorbereitung für die MALDI-TOF:

Die Referenz und Probe Nr. 3 konnten unverdünnt mit der Matrix aufgetragen werden.

Die anderen beiden Proben Nr. 2 und 3 wurden 1:100 verdünnt.

Als Matrix wurde eine Mischung aus 2,5-Dihydroxyacetophenon (DHAP), Ammoniumcitrat und Trifluoressigsäure (TFA) eingesetzt. Jeweils 2 µl Probe mit 2 µl der Matrix (DHAP und Ammoniumcitrat) und 2 µl TFA wurden vermischt und davon 0,5 µl auf den Träger aufgetragen.

3.1.4 Herstellung von Fingerlingen

Hierfür wurde die schon fertig vorvernetzte Hansa-Mischung mit 50 μmol Divinylsulfon pro ml Latexsaft versetzt und für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Zur Herstellung der Fingerlinge wurden Keramikformen verwendet.

Die Herstellung der Fingerlinge sowie der Handschuhmuster erfolgt nach folgendem Schema:

- Form vorheizen 5-10 min bei 120°C
- Koagulant tauchen 30 sec bei 75°C
- In die Latex Mischung tauchen 20 sec bei RT
- Film trocknen 60 sec bei 120°C
- Leaching im Wasserbad für 60 sec bei 60°C
- Film trocknen 15 min bei 120°C
- Abkühlen und mit Maisstärke pudern
- Fingerling von Form abziehen

Von dem unbehandelten und mit DVS behandelten Latex sind jeweils 12 Gramm Fingerlinge hergestellt worden, welche dann zur weiteren Untersuchung mittels Lowry-Test an das Technische Labor der Semperit in Ungarn gesendet wurden.

Die Abbildung zeigt die Apparatur mit der die Fingerlinge hergestellt werden können.

3.1.5 Herstellung von Handschuh Mustern

Auf die gleiche Weise, wie oben bei der *Herstellung von Fingerlingen* erwähnt, wurden Handschuhmuster an der Tauchanlage mit unterschiedlichen Konzentrationen an DVS hergestellt. Zum einen mit der schon fertig gereiften Hansa Mischung, zum anderen mit unbehandeltem Latex.

Diese Handschuhmuster wurden anschließend zur FITkit® Analyse eingesandt.



3.2 Cyanurchlorid

3.2.1 Cyanurchlorid Modellreaktionen

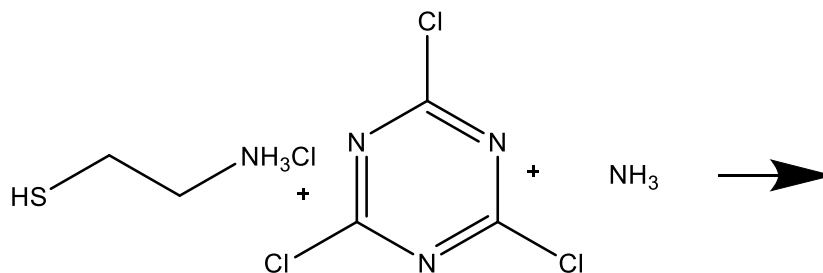


Abb.19 Reaktion von Cysteamin mit Cyanurchlorid

Ansatz 1

bei RT	Cyanurchlorid	Cysteamin	NH3	Reaktionszeit
M	184,4 g/mol	113,61 g/mol	17,03 g/mol	1 Stunde
m	32,1 mg	21,6 mg	7,4 mg / 33 µl	
CAS	77-77-0	60-23-1	1336-21-6	
mol	174,1 µmol	190,1 µmol	1,76 mmol	

Tabelle 10. Reaktionsansatz mit Reaktionszeit von 1 Stunde

Wie in Tabelle 10 angegeben, wurden Cysteaminhydrochlorid und Cyanurchlorid eingewogen und in deionisiertem Wasser gelöst. Anschließend wurden 33 µl 25%ige Ammoniaklösung zugegeben und dann für eine Stunde bei pH ~8 gerührt. Von den 0,7 ml Reaktionslösung wurde das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt und 29,6 mg Rohprodukt erhalten.

Ansatz 2

bei RT	Cyanurchlorid	Cysteamin	NH3	Reaktionszeit
M	184,4 g/mol	113,61 g/mol	17,03 g/mol	72 Stunden
m	20,2 mg	12,3 mg	49,6 mg / 220,5 µl	
CAS	77-77-0	60-23-1	1336-21-6	
mol	109,5 µmol	108,3 µmol	2,9 mmol	

Tabelle 11. Reaktionsansatz mit Reaktionszeit von 72 Stunden

Wie in Tabelle 11 ersichtlich ist, wurde Cyanurchlorid in einem 10 ml Rundkolben eingewogen und in 1 ml THF gelöst. Die angegebene Menge an Cysteaminhydrochlorid wurde in 1 ml deionisiertem Wasser gelöst und mit 220,5 µl 25%igem Ammoniak versetzt und sodann zur Cyanurchloridlösung zugegeben. Die Reaktionslösung wurde sodann für 72 Stunden gerührt und der Feststoff abfiltriert.

Ansatz 3

bei RT	Cyanurchlorid	Cysteamin	NH ₃	Reaktionszeit
M	184,4 g/mol	113,61 g/mol	17,03 g/mol	4 Stunden
m	28,3 mg	17,1 mg	90 mg / 400 µl	
CAS	77-77-0	60-23-1	1336-21-6	
mol	153,47 µmol	150,52 µmol	5,28 mmol	

Tabelle 12. Reaktionsansatz mit Reaktionszeit von 4 Stunden

Dazu wurde, wie in Tabelle 12. beschrieben, Cyanurchlorid in einem Rundkolben eingewogen und in 1 ml THF gelöst. Cysteaminhydrochlorid wurde in 1 ml deionisiertem Wasser gelöst und mit 400µl 25%igem Ammoniak versetzt. Die beiden Lösungen wurden vereint und bei pH~ 10 gerührt. Der Feststoff wurde mittels Spritzenfilter abfiltriert und die Reaktionslösung einrotiert. Der Rückstand wurde in d₆-DMSO gelöst und mittels NMR-Spektrometrie untersucht.

3.2.2 Cyanurchlorid Elektrophorese

Es wurde eine Stammlösung von 556 mg Cyanurchlorid in 1 ml THF hergestellt und anschließend damit eine Probenserie mit 300, 150, 75, 45, 30 und 15 µmol/ml Cyanurchlorid pro ml Latex vorbereitet. Diese wurde dann für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt, wobei die Proben mit 300 und 150 µmol bereits koagulierten. Bei den anderen Konzentrationen wurden jeweils 100 µl für die weitere Analyse mittels Gel Elektrophorese entnommen. Diese wurden dann mit 900 µl deionisiertem Wasser. 1:10 verdünnt. Davon wurden anschließend 400 µl für die Behandlung mit SDS entnommen.

Die weitere Probenvorbereitung erfolgte dann wie oben angegeben (siehe 3.1.2.1).

3.2.3 Cyanurchlorid MALDI-TOF

Dazu wurden 119,2 mg Cc in 1ml THF gelöst und folgende Volumina zu 1 ml Latexsaft

- 1) 100 µl (64,6 µmol) Cc
- 2) 75 µl (48,5 µmol) Cc
- 3) 50 µl (32,3 µmol) Cc
- 4) 25 µl (16,2 µmol) Cc

bei Raumtemperatur zugegeben und mittels Magnetrührstäbchen für eine Stunde gerührt. Anschließend wurden jeweils 10 µl der so behandelten Proben mit 990 µl deionisiertem Wasser 1:100 verdünnt. Als Matrix wurde eine Mischung aus 2,5-Dihydroxyacetophenon (DHAP) mit Ammoniumcitrat und 2%iger Trifluoressigsäure (TFA) eingesetzt. Jeweils 2 µl Probe mit 2 µl DHAP und 2 µl TFA wurden vermischt und davon 0,5 µl auf den Träger aufgetragen.

3.2.3.1 Behandlung von Latexsaft mit Cyanurchlorid (Cc)

Dazu wurden 556 mg Cc in 1ml THF gelöst und folgende Volumina zu 1 ml Latexsaft

- 4) 25 µl (75,4 µmol) Cc
- 5) 10 µl (30 µmol) Cc
- 6) 15 µl (45,2 µmol) Cc
- 7) 5 µl (15 µmol) Cc

bei Raumtemperatur zugegeben und mittels Magnetrührstäbchen für eine Stunde gerührt. Anschließend wurden jeweils 10 µl der so behandelten Proben mit 990 µl deionisiertem Wasser 1:100 verdünnt. Als Matrix wurde eine Mischung aus 2,5-Dihydroxyacetophenon (DHAP) mit Ammoniumcitrat und 2%iger Trifluoressigsäure (TFA) eingesetzt. Jeweils 2 µl Probe mit 2 µl DHAP/Ammon Citrat und 2 µl TFA wurden vermischt und davon 0,5 µl auf den Träger aufgetragen.

3.3 2,4-Dichlor-6-methoxy-1,3,5-triazin (DMTZ)

3.3.1 2,4-Dichlor-6-methoxy-1,3,5-triazin (DMTZ) Modellreaktionen

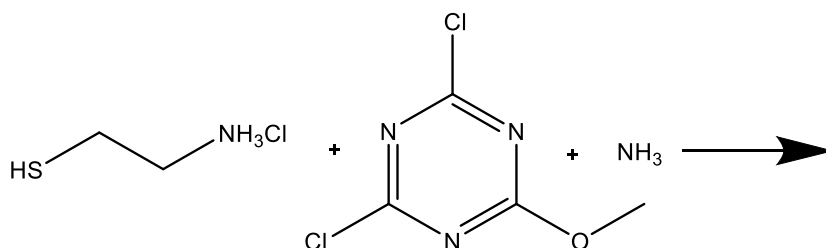


Abb.20 Reaktion von Cysteamin mit DMTZ

Ansatz 1

bei RT	DMTZ	Cysteamin	NH3	Reaktionszeit
M	179,99 g/mol	113,61 g/mol	17,03 g/mol	20 Stunden
m	39,6 mg	17 mg	37,5 mg / 167 µl	
CAS	3638-04-8	60-23-1	1336-21-6	
mol	220 µmol	149,6 µmol	8,81 mmol	

Tabelle 13. Reaktionsansatz mit verschiedenen Reaktionszeiten

Wie in Tabelle 13. beschrieben, wurden 39,6 mg DMTZ in 2 ml THF gelöst und 17 mg Cysteaminhydrochlorid in 1 ml deionisiertem Wasser. Die beiden Lösungen wurden vereint und 167 µl 25%ig Ammoniak hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur und einem pH~9 für 20 Stunden bei RT gerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels am Rotavapor und dem Auflösen des Rückstands in d₆-DMSO wurden NMR Spektren aufgenommen.

Ansatz 2

Reaktion bei 42°C	DMTZ	Cysteamin	NH3	Reaktionszeit
M	179,99 g/mol	113,61 g/mol	17,03 g/mol	67 Stunden
m	34,1 mg	14,6 mg	45 mg / 200 µl	
CAS	3638-04-8	60-23-1	1336-21-6	
mol	189,5 µmol	128,5 µmol	10,6 mmol	

Tabelle 14. Reaktionsansatz mit Reaktionszeit von 67 Stunden

Wie in Tabelle 14 angegeben, wurden 34,1 mg DMTZ in 2 ml THF und 14,6 mg Cysteaminhydrochlorid in 1 ml deionisiertem Wasser gelöst. Die beiden Lösungen wurden vereint und 200 µl 25%ig Ammoniak hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde bei 42°C und einem pH~9 für 67 Stunden gerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels am Rotavapor und dem Auflösen des Rückstands in d₆-DMSO wurden NMR Spektren aufgenommen.

Ansatz 3

bei RT	DMTZ	Cysteamin	NH ₃	Reaktionszeit
M	179,99 g/mol	113,61 g/mol	17,03 g/mol	72 Stunden
m	41,7 mg	89,7 mg	90 mg / 400 µl	
CAS	3638-04-8	60-23-1	1336-21-6	
mol	1,16 mmol	789,5 µmol	21,1 mmol	

Tabelle 15. Reaktionsansatz mit Reaktionszeit von 72 Stunden

Wie in Tabelle 15. ersichtlich, wurden 41,7 mg DMTZ in 2 ml THF gelöst und 89,7 mg Cysteaminhydrochlorid in 1 ml deionisiertem Wasser ebenso. Die beiden Lösungen wurden vereint und 400 µl 25%ig Ammoniak hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur und einem pH ~8 für 72 Stunden gerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels am Rotavapor und dem Auflösen des Rückstands in d₆-DMSO wurden NMR Spektren aufgenommen.

Ansatz 4

Reaktion bei 40°C	DMTZ	Cysteamin	NH ₃	Reaktionszeit
M	179,99 g/mol	113,61 g/mol	17,03 g/mol	16 Stunden
m	59,4 mg	37,7 mg	90 mg / 400 µl	
CAS	3638-04-8	60-23-1	1336-21-6	
mol	330,0 µmol	331,8 µmol	21,1 mmol	

Tabelle 16. Reaktionsansatz mit Reaktionszeit von 16 Stunden

Wie in Tabelle 16. beschrieben, wurden 59,4 mg DMTZ in 2 ml THF gelöst und 37,7 mg Cysteaminhydrochlorid in 1 ml deionisiertem Wasser. Beide Lösungen wurden vereint und 400 µl 25%ig Ammoniak hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde bei 40°C und einem pH ~8 für 16 Stunden gerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels am Rotavapor und dem Auflösen des Rückstands in d₆-DMSO wurden NMR Spektren aufgenommen.

3.3.2 Dichlormethoxytriazin (DMTZ) MALDI-TOF

Dazu wurden 109,6 mg DMTZ in 1ml THF gelöst und zu 1 ml Latexsaft

- 1) 100 µl (60,8 µmol) DMTZ
- 2) 75 µl (45,7 µmol) DMTZ
- 3) 50 µl (30,5 µmol) DMTZ
- 4) 25 µl (15,2 µmol) DMTZ
- 5) 10 µl (6,1 µmol) DMTZ

bei Raumtemperatur zugegeben und mittels Magnetrührstäbchen für eine Stunde gerührt. Anschließend wurden jeweils 10 µl der so behandelten Proben mit 990 µl deionisiertem Wasser 1:100 verdünnt.

Als Matrix wurde eine Mischung aus 2,5-Dihydroxyacetophenon (DHAP) mit Ammoniumcitrat und 2%iger Trifluoressigsäure (TFA) eingesetzt. Jeweils 2 µl Probe mit 2 µl DHAP und 2 µl TFA wurden vermischt und davon 0,5 µl auf den Träger aufgetragen.

3.4 Glutardialdehyd (Ga)

3.4.1 Glutardialdehyd (Ga) Modellreaktionen

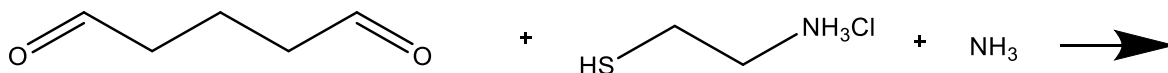


Abb.21 Reaktion von Cysteamin mit Glutaraldehyd

bei RT	Glutaraldehyd	Cysteamin	NH3	Reaktionszeit
M	100,12 g/mol	113,61 g/mol	17,03 g/mol	1 Std
m	29,31 mg /53 µl	33,3 mg	199,35 mg/ 886 µl	
CAS	111-30-8	156-57-0	1336-21-6	
mol	292,74 µmol	293,13 µmol	11,73 mmol	

Tabelle 17. Reaktionsansatz nach 1 Stunde Reaktionszeit

Wie aus Tabelle 17. ersichtlich, wurde Cysteaminhydrochlorid in 1ml deionisiertem Wasser gelöst und der Glutaraldehyd zugegeben. Anschließend wurde 25%iger Ammoniak zu getropft. Nach einer Stunde wurde eine Probe a 500µl für die NMR Untersuchung entnommen.

3.4.1.1 Reaktion von Glutardialdehyd in Ammoniak

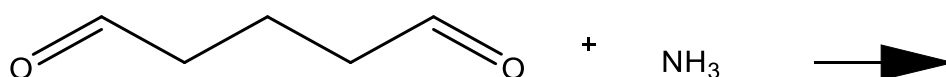


Abb.22 Reaktion von Glutaraldehyd mit Ammoniak

bei RT	Glutaraldehyd	NH ₃	Reaktionszeit
M	100,12 g/mol	17,03 g/mol	1,5 Std
m	29,86 mg /54 µl	203,18 mg/ 903 µl	
CAS	111-30-8	1336-21-6	
mol	298,27 µmol	11,93 mmol	

Tabelle 18. Reaktionsansatz nach 1,5 Stunden Reaktionszeit

Wie in Tabelle 18. angegeben, wurde Glutardialdehyd in 1ml deionisiertem Wasser vorgelegt und anschließend 25%iger Ammoniak zugegeben. Nach 1,5 Stunden Reaktionszeit wurde eine 500µl Probe zur NMR Untersuchung entnommen.

3.4.2 Glutardialdehyd (Ga) Elektrophorese

Dazu wurden 100 µl Latexsaft, die zuvor mit DVS behandelt worden sind, mit 900 µl deionisiertem Wasser 1:10 verdünnt. Zu 800 µl wurden dann jeweils 80 µl 10%iges *Triton*[®] X-100 zugegeben. Anschließend wurden die so vorbereiteten Proben eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt und danach bei 12000 g für 5 Minuten zentrifugiert. Dabei koagulierte der Gummi und bildete einen Rückstand an der Oberfläche der Lösung. Mit einer Pipette wurden dann jeweils 30 µl vom Filtrat aufgenommen und anschließend mit 10 µl *LDS Sample Buffer 4x* von *Life technologies* 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Das Gel war dabei ein *Novex 18% Tris-Glycine Gel 1.0 mm, 15 well*. Die weitere Vorgehensweise erfolgte dann wie oben angegeben (siehe 3.1.1.1).

3.4.3 Behandlung von Latexsaft mit Glutardialdehyd (Ga)

Glutardialdehyd wurde als Vernetzungsreagens für Proteine eingesetzt und reagierte insbesondere mit den Aminogruppen von Lysin.

Dazu wurde eine 50%ige Ga-Lösung in Wasser zu 1 ml Latexsaft

- 1) 54 µl (298 µmol) Ga
- 2) 36 µl (198 µmol) Ga
- 3) 27 µl (149 µmol) Ga
- 4) 18 µl (99 µmol) Ga
- 5) 9 µl (49 µmol) Ga
- 6) 4,5 µl (24,9 µmol) Ga

bei Raumtemperatur zugegeben und mittels Magnetrührstäbchen für eine Stunde gerührt. Anschließend wurden jeweils 10 µl der so behandelten Proben mit 990 µl deionisiertem Wasser 1:100 verdünnt. Als Matrix wurde eine Mischung aus 2,5-Dihydroxyacetophenon (DHAP) mit Ammoniumcitrat und 2%iger Trifluoressigsäure (TFA) eingesetzt. Jeweils 2 µl Probe mit 2 µl DHAP und 2 µl TFA wurden vermischt und davon 0,5 µl auf den Träger aufgetragen.

In einem zweiten Ansatz wurde versucht, das Ergebnis aus dem ersten Ansatz zu reproduzieren.

Dazu wurde eine 50%ige Ga-Lösung in Wasser zu 1 ml Latexsaft mit folgenden Konzentrationen

- 1) 54 μl (298 μmol) Ga
- 2) 36 μl (198 μmol) Ga
- 3) 27 μl (149 μmol) Ga
- 4) 18 μl (99 μmol) Ga
- 5) 9 μl (50 μmol) Ga

bei Raumtemperatur mittels Magnetrührstäbchen für eine Stunde gerührt. Anschließend wurden jeweils 20 μl der so behandelten Proben mit 980 μl deionisiertem Wasser 1:50 verdünnt. Als Matrix wurde eine Mischung aus 2,5-Dihydroxyacetophenon (DHAP) mit Ammoniumcitrat und 2%iger Trifluoressigsäure (TFA) eingesetzt. Jeweils 2 μl Probe wurden mit 2 μl DHAP und 2 μl TFA vermischt und davon 0,5 μl auf den Träger aufgetragen.

3.5 Triacryloylhexahydro-1,3,5-triazin (TAT)

3.5.1 Triacryloylhexahydro-1,3,5-triazin (TAT) Modellreaktionen

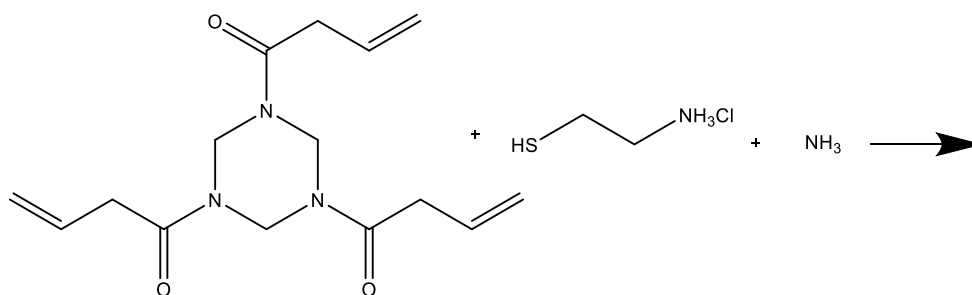


Abb.23 Reaktion von Cysteamin mit TAT

Ansatz 1

bei RT	TAT	Cysteamin	NH3	Reaktionszeit
M	249,27 g/mol	113,61 g/mol	17,03 g/mol	90 Minuten / 71 Stunden
m	96 mg	134,6 mg	1,06 mg/1,18 ml	
CAS	959-52-4	156-57-0	1336-21-6	
mol	385,12 μmol	1,17 mmol	15,63 mmol	

Tabelle 19. Reaktionsansatz mit verschiedenen Reaktionszeiten

Wie in Tabelle 19. angegeben, wurde TAT in 10ml und Cysteaminhydrochlorid in 1ml deionisiertem Wasser gelöst. Die beiden Lösungen wurden vereint und 25%iger Ammoniak zugegeben. Nach 1,5 und 71 Stunden wurden dann Proben à 5ml für die NMR Untersuchung gezogen.

Ansatz 2

bei RT	TAT	NH3	Reaktionszeit
M	249,27 g/mol	17,03 g/mol	90 Minuten
m	97,4 mg	270 mg/1,2 ml	
CAS	959-52-4	1336-21-6	
mol	390,74 μ mol	15,86 mmol	

Tabelle 20. Reaktionsansatz mit Reaktionszeit von 90 Minuten

Wie in Tabelle 20. Ersichtlich, wurde TAT in einen 25ml Rundkolben eingewogen und in 10 ml deionisiertem Wasser gelöst. Anschließend wurde 25%iger Ammoniak zugegeben, sodass der pH bei 11,5 war. Nach 1,5 Stunden wurden 5ml von der Reaktionslösung für die NMR-Analyse entnommen.

Ansatz 3

bei RT	TAT	Cysteamin	NH3	Reaktionszeit
M	249,27 g/mol	113,61 g/mol	17,03 g/mol	90 Minuten / 71 Stunden
m	94 mg	129,8 mg	1,04 g/ 1,16 ml	
CAS	959-52-4	156-57-0	1336-21-6	
mol	377,1 μ mol	1,13 mmol	15,3 mmol	

Tabelle 21. Reaktionsansatz mit verschiedenen Reaktionszeiten

Wie in Tabelle 21. beschrieben, wurde TAT in 10ml und Cysteaminhydrochlorid in 1ml deionisiertem Wasser gelöst. Die beiden Lösungen wurden vereint und 25%iger Ammoniak zugegeben. Nach 2 Stunden wurde eine Probe für die NMR Untersuchung entnommen.

Ansatz 4

bei RT	TAT	NH3	Reaktionszeit
M	249,27 g/mol	17,03 g/mol	120 Minuten
m	93,8 mg	256,3 mg/1,4 ml	
CAS	959-52-4	1336-21-6	
mol	376,3 μ mol	15,05 mmol	

Tabelle 22. Reaktionsansatz mit Reaktionszeit von 120 Minuten

Wie in Tabelle 22. beschrieben, wurde TAT in einen 25ml Rundkolben eingewogen und in 10 ml deionisiertem Wasser gelöst. Anschließend wurde 25%iger Ammoniak zugegeben, sodass der pH bei 11,5 war. Nach 2 Stunden wurde von der Reaktionslösung eine Probe für die NMR-Analyse entnommen.

Ansatz 5

bei RT	TAT	NH3	Reaktionszeit
M	249,27 g/mol	17,03 g/mol	90 Minuten / 71 Stunden
m	92,3 mg	0,25 g/ 1,12 ml	
CAS	959-52-4	1336-21-6	
mol	370,28 μ mol	14,81 mmol	

Tabelle 23. Reaktionsansatz mit verschiedenen Reaktionszeiten

Wie in Tabelle 23. ersichtlich, wurde TAT in einem 25ml Rundkolben eingewogen und in 10ml deionisiertem Wasser gelöst. Anschließend wurde 25%iger Ammoniak zugegeben und bei RT für 71 Stunden gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotavapor entfernt und der Rückstand in D₂O gelöst. Die so vorbereitete Probe wurde dann mittels NMR untersucht.

3.5.2 Triacryloylhexahydro-1,3,5-triazin (TAT) Elektrophorese

Dazu wurden 100 μ l Latexsaft, die zuvor mit TAT behandelt worden sind, mit 900 μ l deionisiertem Wasser 1:10 verdünnt. Zu 400 μ l wurden dann jeweils 40 μ l 10%iges *Triton*[®] X-100 bzw. 40 μ l SDS zugegeben. Die weitere Vorgehensweise wurde bereits oben beschrieben (siehe 3.1.2.1). Das verwendete Gel war dabei ein *Novex 18% Tris-Glycine Gel 1.0 mm, 15 well*.

3.5.3 Triacryloylhexahydro-1,3,5-triazin (TAT) MALDI-TOF

Vorversuch

Dazu wurden 373,2 mg TAT in 2ml DMSO gelöst und folgende Volumina zu 1 ml Latexsaft zugegeben

- 1) 200 μ l (149,7 μ mol) TAT
- 2) 100 μ l (74,9 μ mol) TAT
- 3) 75 μ l (56,14 μ mol) TAT
- 4) 50 μ l (37,43 μ mol) TAT
- 5) 25 μ l (18,71 μ mol) TAT

und bei Raumtemperatur mittels Magnetrührstäbchen für eine Stunde gerührt. Anschließend wurden jeweils 10 μ l der so behandelten Proben mit 990 μ l deionisiertem Wasser 1:100 verdünnt. Als Matrix wurde eine Mischung aus 2,5-Dihydroxyacetophenon (DHAP) mit Ammoniumcitrat und 2%iger Trifluoressigsäure (TFA) eingesetzt. Jeweils 2 μ l Probe wurden mit 2 μ l DHAP und 2 μ l TFA vermischt und davon 0,5 μ l auf den Träger aufgetragen.

3.5.3.1 Behandlung von Latexsaft mit Triacryloylhexahydro-1,3,5-triazin (TAT)

Dazu wurde TAT als Feststoff eingewogen und

- 1) 50,1 mg (200,99 μmol) TAT
- 2) 37,5 mg (150,44 μmol) TAT
- 3) 24,8 mg (99,5 μmol) TAT
- 4) 18,8 mg (75,4 μmol) TAT
- 5) 12,2 mg (48,9 μmol) TAT

bei Raumtemperatur mittels Magnetrührstäbchen für eine Stunde mit 1ml Latex gerührt. Anschließend wurden jeweils 20 μl der so behandelten Proben mit 980 μl deionisiertem Wasser 1:50 verdünnt. Als Matrix wurde eine Mischung aus 2,5-Dihydroxyacetophenon (DHAP) mit Ammoniumcitrat und 2%iger Trifluoressigsäure (TFA) eingesetzt. Jeweils 2 μl Probe wurden mit 2 μl DHAP und 2 μl TFA vermischt und davon 0,5 μl auf den Träger aufgetragen.

3.5.3.2 Behandlung von Latexsaft mit Triacryloylhexahydro-1,3,5-triazin (TAT)

Dazu wurde TAT als Feststoff eingewogen und

- 1) 1,45 mg (5,8 μmol) TAT
- 2) 0,57 mg (2,29 μmol) TAT
- 3) 0,19 mg (762 nmol) TAT
- 4) 2,1 mg (8,4 μmol) TAT
- 5) 2,8 mg (11,23 μmol) TAT
- 6) 4,3 mg (17,25 μmol) TAT

bei Raumtemperatur mittels Magnetrührstäbchen die Proben 4 bis 6 eine Stunde, die Proben 1 bis 3 25 Stunden in 1ml Latex gerührt. Anschließend wurden jeweils 20 μl der so behandelten Proben mit 980 μl deionisiertem Wasser 1:50 verdünnt. Als Matrix wurde dabei eine Mischung aus 2,5-Dihydroxyacetophenon (DHAP) mit Ammoniumcitrat und 2%iger Trifluoressigsäure (TFA) eingesetzt. Jeweils 2 μl Probe wurden mit 2 μl DHAP und 2 μl TFA vermischt und davon 0,5 μl auf den Träger aufgetragen.

3.5.3.3 Behandlung von Latexsaft mit Triacryloylhexahydro-1,3,5-triazin (TAT) in β -Cyclodextrin

Dazu wurden TAT und β -Cyclodextrin als Feststoff eingewogen und davon 2 Stammlösungen hergestellt. Stammlösung I enthielt 11,5 mg (46 μmol) TAT und 52,6 mg (46,2 μmol) β -Cyclodextrin in 2ml deionisiertem Wasser gelöst. Stammlösung II enthielt 31,8 mg (127,6 μmol) TAT und 145,9 mg (128,6 μmol) β -Cyclodextrin in 5ml deionisiertem Wasser gelöst.

Die jeweils angegebene Menge an Stammlösung

- 1) 500 μl Stammlösung I (11,5 μmol) TAT
- 2) 600 μl Stammlösung I (13,8 μmol) TAT
- 3) 700 μl Stammlösung I (16,2 μmol) TAT
- 4) 700 μl Stammlösung II (17,9 μmol) TAT
- 5) 800 μl Stammlösung II (20,4 μmol) TAT
- 6) 900 μl Stammlösung II (22,96 μmol) TAT

wurde bei Raumtemperatur mit 1 ml Latex vermischt und mittels Magnetrührstäbchen gerührt. Die Proben 4 bis 6 für eine Stunde, die Proben 1 bis 3 für 25 Stunden. Anschließend wurden jeweils 20 μl der so behandelten Proben mit 980 μl deionisiertem Wasser 1:50 verdünnt. Als Matrix wurde eine Mischung aus 2,5-Dihydroxyacetophenon (DHAP) mit Ammoniumcitrat und 2%iger Trifluoressigsäure (TFA) eingesetzt. Jeweils 2 μl Probe werden mit 2 μl DHAP und 2 μl TFA vermischt und davon 0,5 μl auf den Träger aufgetragen.

3.5.3.4 Behandlung von Latexsaft mit Triacryloylhexahydro-1,3,5-triazin (TAT) in α -Cyclodextrin

Dazu wurden TAT und α -Cyclodextrin als Feststoff eingewogen und davon eine Stammlösung hergestellt. Die Stammlösung enthielt 32,2 mg (129,5 μmol) TAT und 126,2 mg (129,7 μmol) α -Cyclodextrin gelöst in 5ml deionisiertem Wasser. Die jeweils angegebene Menge

- 1) 400 μl Stammlösung (10,33 μmol) TAT
- 2) 600 μl Stammlösung (15,5 μmol) TAT
- 3) 800 μl Stammlösung (20,67 μmol) TAT
- 4) 1000 μl Stammlösung (25,83 μmol) TAT

wurde bei Raumtemperatur mittels Magnetrührstäbchen für zwei, vier und 24 Stunden mit 1ml Latex gerührt. Anschließend wurden jeweils 20 μl der so behandelten Proben mit 980 μl deionisiertem Wasser 1:50 verdünnt. Als Matrix wurde eine Mischung aus 2,5-Dihydroxyacetophenon (DHAP) mit Ammoniumcitrat und 2%iger Trifluoressigsäure (TFA) eingesetzt. Jeweils 2 μl Probe wurden mit 2 μl DHAP und 2 μl TFA vermischt und davon 0,5 μl auf den Träger aufgetragen.

3.5.4 Herstellung von Gummifilmen auf Glasplatten

Dazu wurden 75,2 mg TAT (15,08 μmol) in 20 ml Latex (521.700T Semperit) gelöst. Die Glasplatten wurden auf 120°C im Ofen erhitzt und danach in den Koagulant (521.759A Semperit) bei 85°C getaucht. Anschließend wurde die mit dem Koagulant benetzte Glasplatte in den Latex getaucht und langsam herausgezogen, sodass sich ein dünner Film auf der Glasplatte bildete. Dieser wurde sodann im Ofen bei 120°C vulkanisiert. Zum Vergleich wurden – auf dieselbe Weise – auch Gummifilme ohne Zusatz an TAT hergestellt.

3.5.5 Extraktion der Gummifilme

Zur Extraktion, der w.o.a. hergestellten Gummifilme, wurden 153,8 mg in 10ml Acetonitril vom TAT behandelten Muster für 20 Stunden mazeriert. Vom unbehandelten Gummifilm wurden 119,5 mg in Acetonitril ebenfalls für 20 Stunden mazeriert. Von den so hergestellten Extrakten wurden dann 1 ml zur weiteren Analyse mittels HILIC Chromatographie entnommen.

3.6 1,3,5-Triallyl-1,3,5-triazin-2,4,6-trion (TATATO)

3.6.1 1,3,5-Triallyl-1,3,5-triazin-2,4,6-trion Modellreaktionen

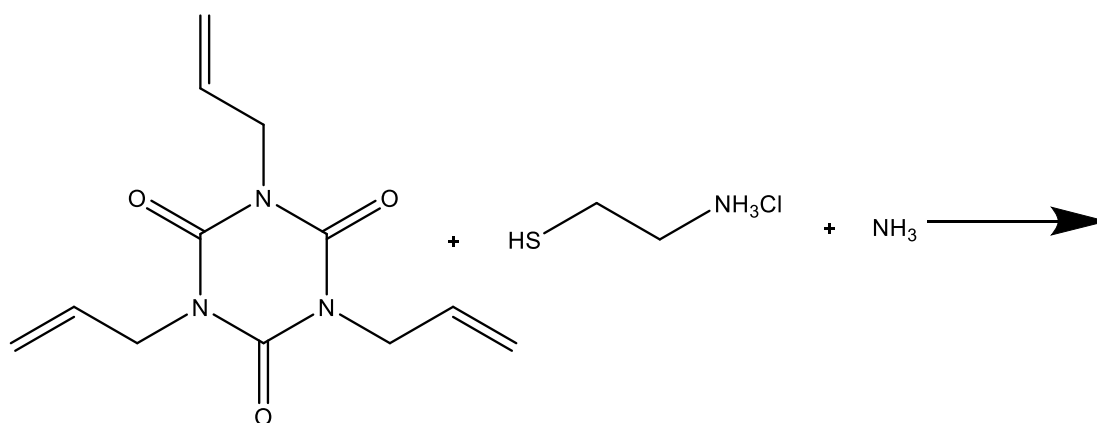


Abb.24 Reaktion von TATAO mit Cysteamin

Ansatz 1

bei RT	TATATO	Cysteamin	NH3	Reaktionszeit
M	249,27 g/mol	113,61 g/mol	17,03 g/mol	60'
m	203,98 mg/176 µl	93,7 mg	565,5 mg / 2,5 ml	
CAS	1025-15-6	156-57-0	1336-21-6	
mol	818,33 µmol	817,55 mmol	33,03 mmol	

Tabelle 24. Reaktionsansatz mit 1 Stunde Reaktionszeit

Wie in Tabelle 24. beschrieben, wurde das Cysteaminhydrochlorid hierfür in 10ml deionisiertem Wasser gelöst. Anschließend wurde 25%iger Ammoniak zugegeben und bei pH~ 11 gerührt. Zu der so vorbereiteten Reaktionslösung wurde dann das TATATO zugegeben und für eine Stunde gerührt. Anschließend wurden 2 ml jeweils nach einer Stunde und nach 20,5 Stunden entnommen und das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. Der Rückstand wurde dann in d₆-DMSO gelöst und anschließend NMR-Spektren gemessen.

Ansatz 2

bei RT	TATATO	Cysteamin	NH ₃	Reaktionszeit
M	249,27 g/mol	113,61 g/mol	17,03 g/mol	60´
m	207,49 mg/ 179 µl	95,4 mg	562,5 mg / 2,5 ml	in THF
CAS	1025-15-6	156-57-0	1336-21-6	
mol	832,38 µmol	832,38 mmol	33,03 mmol	

Tabelle 25. Reaktionsansatz mit 1 Stunde Reaktionszeit

Wie in Tabelle 25. angegeben, wurde das Cysteaminhydrochlorid hierfür in 10ml THF gelöst. Anschließend wurde 25%iger Ammoniak zugegeben und bei pH ~ 11 gerührt. Zu der so vorbereiteten Reaktionslösung wurde dann das TATATO zugegeben und für eine Stunde gerührt. Anschließend wurden 2 ml der Reaktionslösung nach einer Stunde entnommen und das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. Der Rückstand wurde dann in d₆-DMSO gelöst und anschließend NMR-Spektren gemessen.

3.6.2 Triallyl-1,3,5-triazin-2,4,6-trion (TATATO) MALDI-TOF

Dazu wurde TATATO mit einer Mikropipette als Flüssigkeit in eine Küvette pipettiert und anschließend 1 ml Latex zugegeben.

- 1) 50 µl (232 µmol) TATATO
- 2) 40 µl (186 µmol) TATATO
- 3) 30 µl (139,5 µmol) TATATO
- 4) 20 µl (93 µmol) TATATO
- 5) 10 µl (46,5 µmol) TATATO

Dieser wurde bei Raumtemperatur mittels Magnetrührstäbchen für eine bzw. für 24 Stunden gerührt. Anschließend wurden jeweils 20 µl der so behandelten Proben mit 980 µl deionisiertem Wasser 1:50 verdünnt. Als Matrix wurde eine Mischung aus 2,5-Dihydroxyacetophenon (DHAP) mit Ammoniumcitrat und 2%iger Trifluoressigsäure (TFA) eingesetzt. Jeweils 2 µl Probe wurden mit 2 µl DHAP und 2 µl TFA vermischt und davon 0,5 µl auf den Träger aufgetragen.

3.7 Glucose und Fructose

3.7.1 Glucose Electrophorese

Es wurde eine Stammlösung mit 274,5 mg Alpha-D-Glucose in 1 ml H₂O hergestellt. Jeweils 1 ml Latex wurde dann für eine Stunde mit unterschiedlichen Konzentrationen an Glucose behandelt. Davon wurden anschließend 400 µl für die Behandlung mit *Triton*[®] X-100 entnommen. Zu den 400 µl wurden dann jeweils 40 µl 10%iges *Triton*[®] X-100 zugegeben. Die weitere Probenvorbereitung erfolgte dann wie oben (siehe 3.1.2.1). Für den Elektrolyten wurden in einer Mensur 80ml Tris-Glycin-Puffer 10x und 720 ml deionisiertem Wasser gemischt. Als Gel wurde ein *Novex 18% Tris-Glycine Gel 1.0 mm, 15 well* verwendet.

3.7.1.1 D-Glucose (DGc) MALDI-TOF

Reduzierende Kohlenhydrate reagieren mit Proteinen im Sinne einer Maillardreaktion und führen zu einer nicht-enzymatischen Glykosylierung von Lysin-Resten („Glycation“).

Dazu wurden 274,8 mg in 1ml deionisiertem Wasser gelöst und zu 1 ml Latexsaft folgende Mengen:

- 1) 200 μ l (305 μ mol) DGc
- 2) 100 μ l (152 μ mol) DGc
- 3) 75 μ l (114 μ mol) DGc
- 4) 50 μ l (76 μ mol) DGc
- 5) 25 μ l (38 μ mol) DGc

bei Raumtemperatur zugegeben und mittels Magnetrührstäbchen für eine Stunde gerührt. Anschließend wurden jeweils 20 μ l der so behandelten Proben mit 980 μ l deionisiertem Wasser 1:50 verdünnt. Als Matrix wurde eine Mischung aus 2,5-Dihydroxyacetophenon (DHAP) mit Ammoniumcitrat und 2%iger Trifluoressigsäure (TFA) eingesetzt. Jeweils 2 μ l Probe mit 2 μ l DHAP und 2 μ l TFA wurden vermischt und davon 0,5 μ l auf den Träger aufgetragen.

Zur Überprüfung des Ergebnisses, wurde dieser Versuch mit einer längeren Reaktionsdauer von 72 Stunden erneut durchgeführt.

3.7.2 D-Fructose MALDI-TOF

Dazu wurden 275,7 mg Fructose in 1ml H₂O gelöst und folgende Volumina zu 1 ml Latexsaft zugegeben.

- 1) 200 μ l (303,06 μ mol) Fructose
- 2) 100 μ l (153,03 μ mol) Fructose
- 3) 75 μ l (114,77 μ mol) Fructose
- 4) 50 μ l (76,52 μ mol) Fructose
- 5) 25 μ l (38,26 μ mol) Fructose

Diese wurden dann bei Raumtemperatur mittels Magnetrührstäbchen für 24 Stunden gerührt. Anschließend wurden jeweils 20 μ l der so behandelten Proben mit 980 μ l deionisiertem Wasser 1:50 verdünnt. Als Matrix wurde eine Mischung aus 2,5-Dihydroxyacetophenon (DHAP) mit Ammoniumcitrat und 2%iger Trifluoressigsäure (TFA) eingesetzt. Jeweils 2 μ l Probe wurden mit 2 μ l DHAP und 2 μ l TFA vermischt und davon 0,5 μ l auf den Träger aufgetragen.

4 Ergebnisteil

4.1 Divinylsulfon (DVS)

4.1.1 DVS Modellreaktionen

DVS Modellreaktionen, wie in Kapitel 3 beschrieben, wurden ausgeführt um festzustellen ob eine Umsetzung von Cysteamin mit DVS erfolgt.

Das Spektrum aus dem ersten Ansatz ist in folgender Abbildung zu sehen:

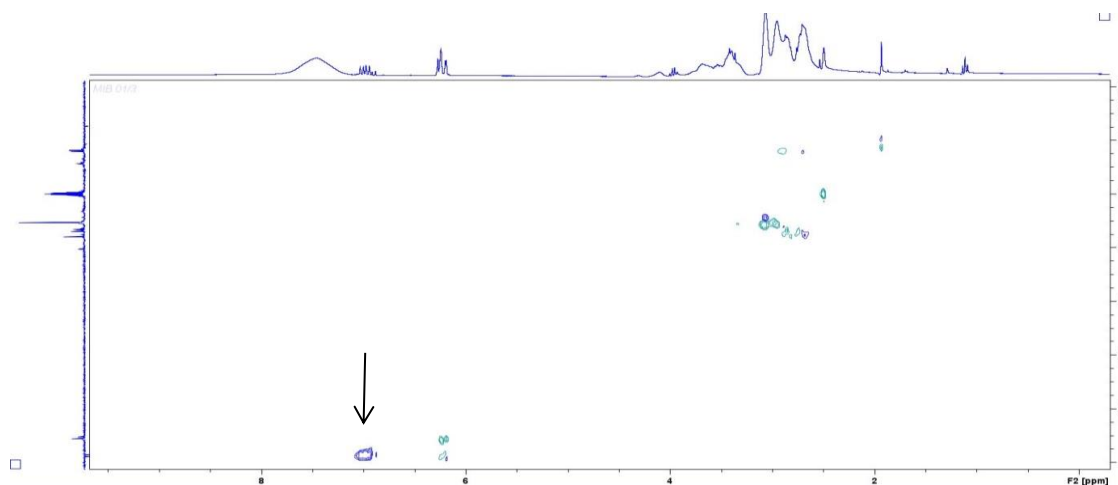


Abb.25 HSQC-Spektrum des Reaktionsgemisches von DVS mit Cysteamin

Der Stoffmengenanteil des Cysteamins betrug dabei 67,5 % bezogen auf DVS. Aus dem HSQC-Spektrum war ersichtlich, dass keine vollständige Umsetzung erfolgte, da noch Signale der Vinylgruppen im Tieffeldbereich (^1H : 6-7ppm, ^{13}C : 130-140 ppm) zu sehen waren.

Das Spektrum aus dem zweiten Ansatz zeigt die folgende Abbildung:

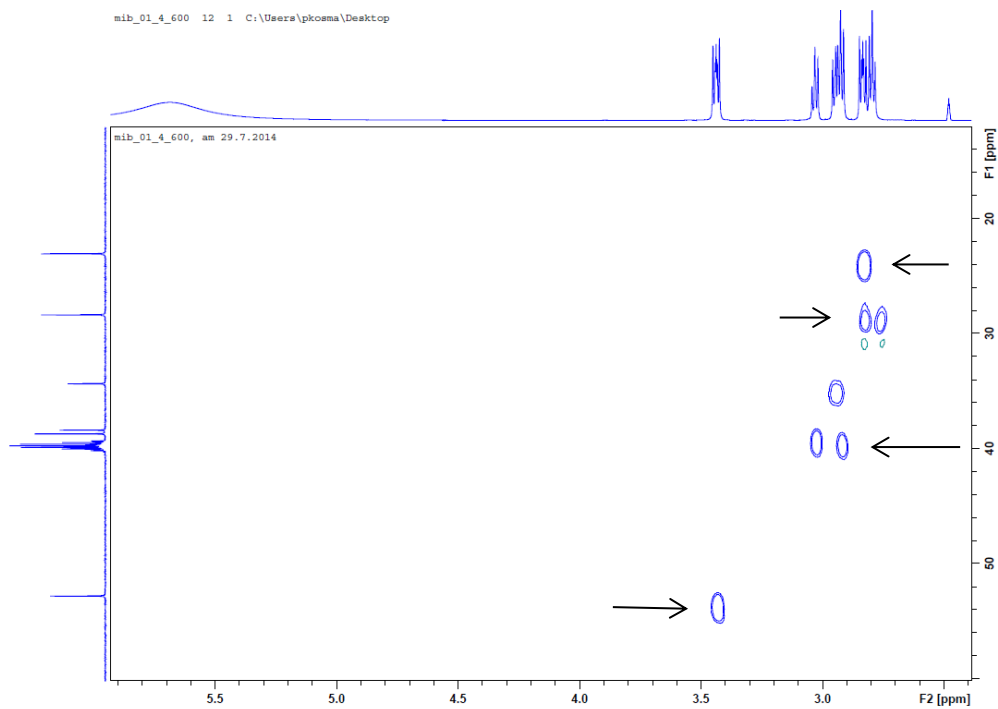


Abb.26 HSQC_Spektrum des Reaktionsgemisches DVS mit Cysteamin

Der Stoffmengenanteil des DVS betrug dabei 47,3% bezogen auf das Cysteamin. Das Signal bei 52.67/3.43 ppm entsprach der $\text{SO}_2\text{-CH}_2$ - Gruppe, während die Signalgruppen bei 29.07 und 23.26/2.8 ppm den S-CH_2 , und die bei 38.4/2.91 ppm den N-CH_2 Gruppen entsprachen.

Das Spektrum aus dem dritten Ansatz ist in folgender Abbildung zu sehen:

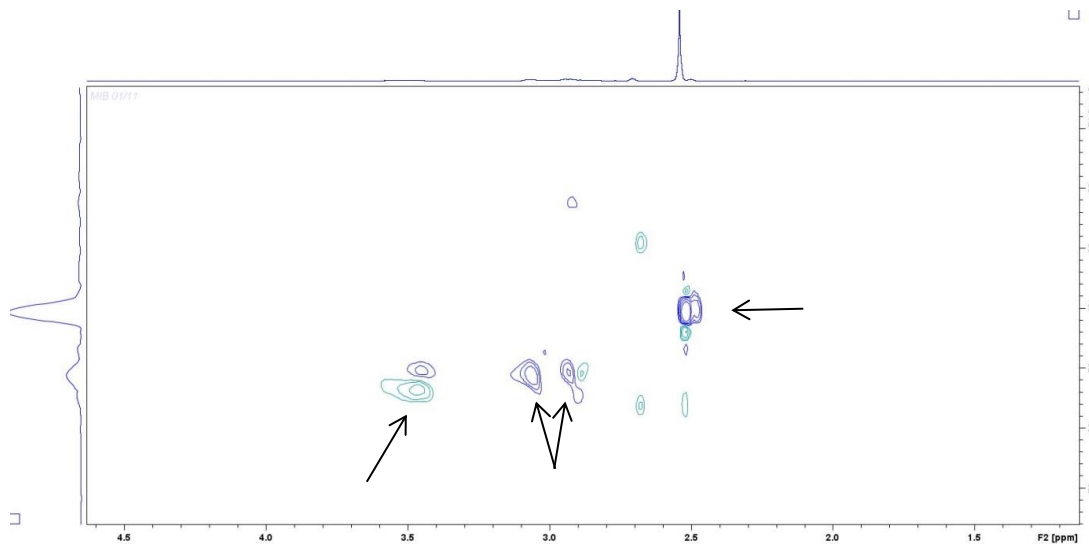


Abb.27 HSQC Spektrum des Reaktionsgemisches DVS mit Cysteamin

Im dritten Ansatz wurden äquimolare Mengen von DVS und Cysteamin eingesetzt. Es zeigte sich ein Spektrum in dem keine freien Vinylgruppen mehr vorhanden waren. Im Bereich von 5,4/3,46 ppm erschienen die Sulfonyl gebundenen $\text{SO}_2\text{-CH}_2$ -Gruppen. Daneben im Hochfeld bei 5,1/3,07 und 2,93 ppm die $\text{R-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_2$ -Gruppen. Die Signale bei 4,0/2,5 ppm entsprachen den Methylengruppen aus dem Cysteamin-Addukt.

Im vierten Ansatz glich das Spektrum dem aus Ansatz 3.

Es wurde im fünften Ansatz untersucht, wie sich eine längere Reaktionszeit von 67 Stunden auf die Reaktionsprodukte auswirkt, was in folgender Abbildung zu sehen ist:

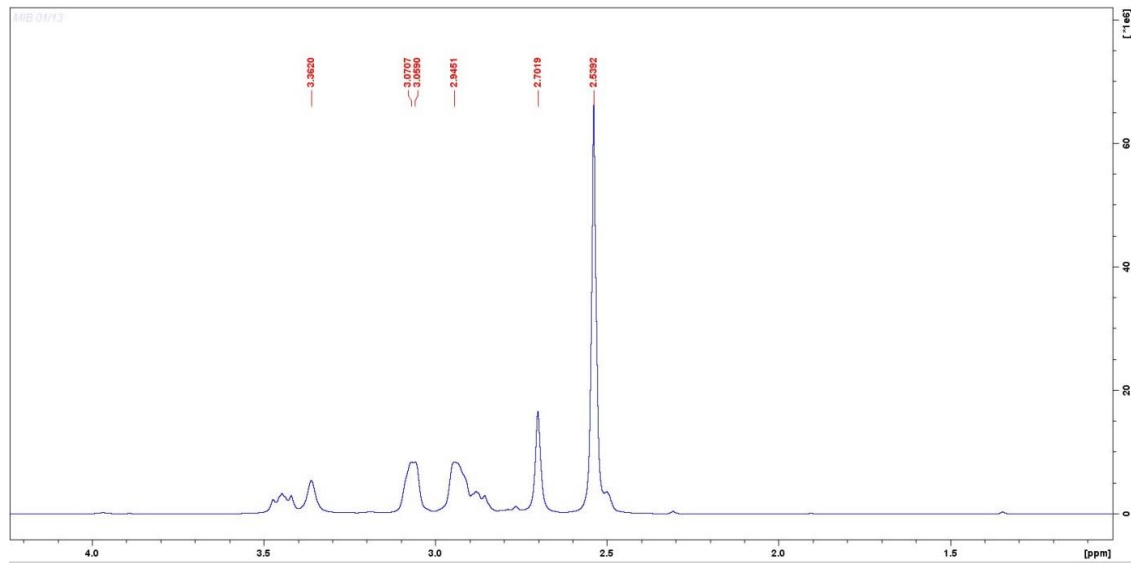


Abb.28 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Reaktionsgemisches DVS mit Cysteamin

Die Peaks bei 2,54 und 2,7 ppm entsprechen den $\text{-SO}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S}$ Methylengruppen. Bei 2,95 ppm kamen die endständigen $\text{HS-CH}_2\text{-CH}_2$ Methylengruppen des Cysteaminaddukts. Der Peak bei 3,06 ppm entsprach dem thiogebundenen Methylen aus dem Cysteamin ($\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$). Bei 3,36 ppm waren die sulfonylgebundenen Methylengruppen sichtbar ($\text{-SO}_2\text{-CH}_2$ - Fragment).

Im sechsten Ansatz wurde der Reaktionsverlauf nach unterschiedlichen Zeiten (15', 30', 45' und 60') analysiert. Exemplarisch für die Reaktion wird das Spektrum nach einer Stunde in der

folgenden Abbildung gezeigt:

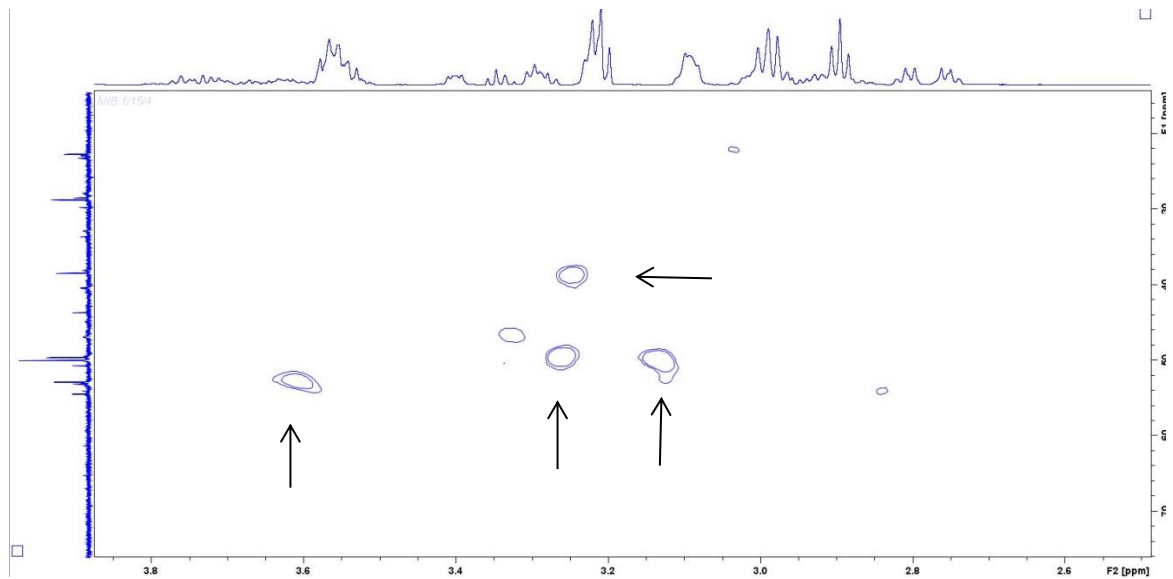


Abb.29 HSQC-Spektrum der Reaktionsmischung nach einer Stunde Reaktionszeit

Bei 53/3,6 und 50/3,26 ppm erscheinen die $\text{SO}_2\text{-CH}_2$ -Gruppen. Bei 38,6/3,25 ppm erscheinen die Stickstoff gebundenen Methylengruppen ($\text{H}_2\text{N-CH}_2$). Bei 50/3,1 ppm erscheinen die $\text{SO}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S}$ methylengruppen.

Beim siebenten Ansatz wurde der Versuch mit Kaliumhydroxid anstelle von Ammoniak als Base durchgeführt. Das Protonenspektrum glich im Wesentlichen dem aus Ansatz 5. Es entstanden allerdings mehr Nebenprodukte, als mit Ammoniak.

4.1.2 DVS Elektrophorese

Vorversuche

In Vorversuchen, wurde zunächst die Elektrophorese ohne Zusatz an DVS durchgeführt um das Laufverhalten der Proteine im Latex zu untersuchen.

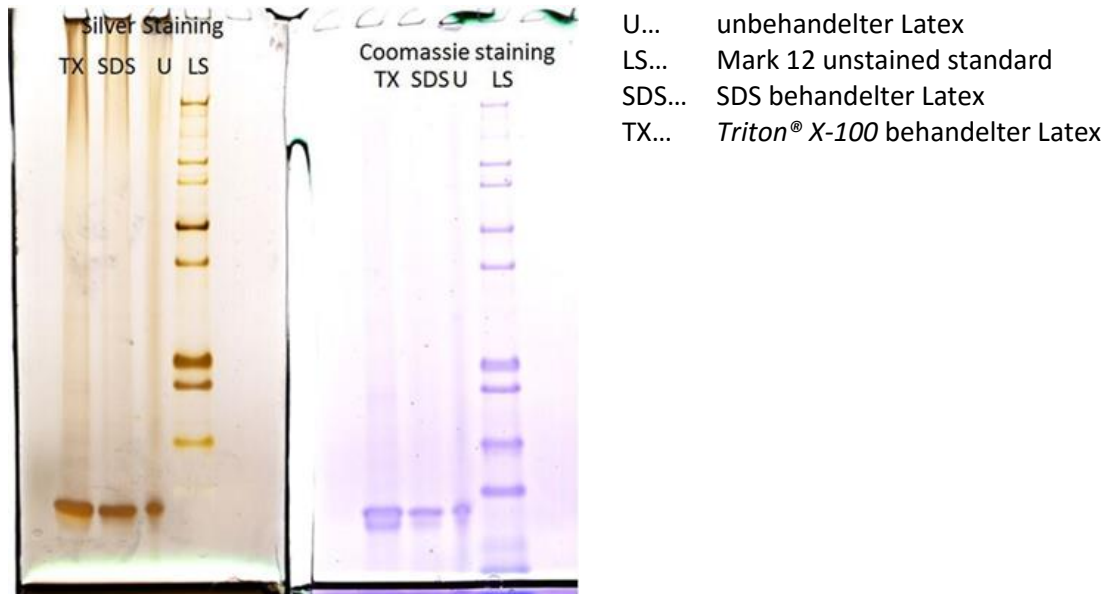
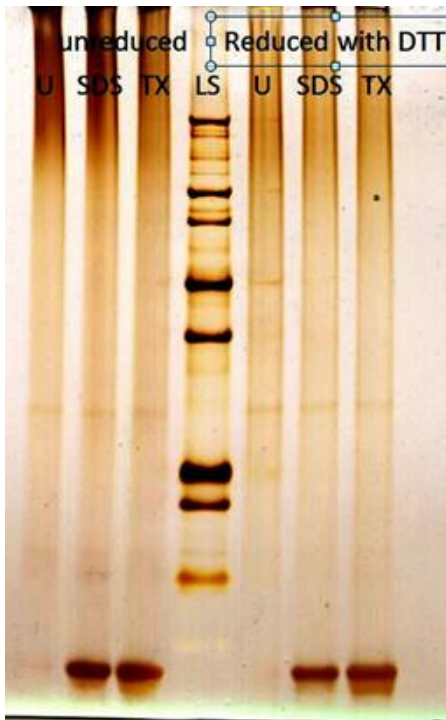


Abb.30 SDS-Page 4-12% Bis-Tris-Gel

In dem Gel wurde durch die Färbung mit Coomassie Blau bzw. mittels Silber (nach 2.2.1 bzw. 2.2.2) der Rubber Elongation Factor auf dem Gel sichtbar gemacht.

Anschließend wurde untersucht, ob sich das Laufverhalten durch den Zusatz an Dithiotreitol (DTT) ändert. Dies wird in folgendem Gel ersichtlich.



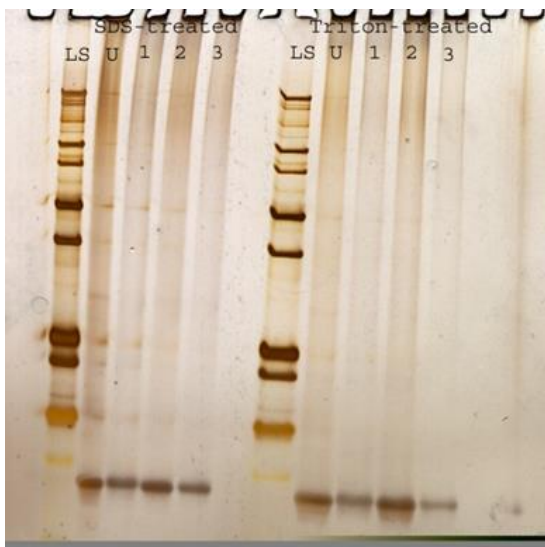
U... unbehandelter Latex
 LS... Mark 12 unstained standard
 SDS... SDS behandelter Latex
 TX... Triton® X-100 behandelter Latex

Abb.31 SDS-Page 4-12% Bis-Tris Gel

Es zeigte sich jedoch kein Unterschied im Laufverhalten des Rubber Elongation Factors durch den Zusatz an DTT.

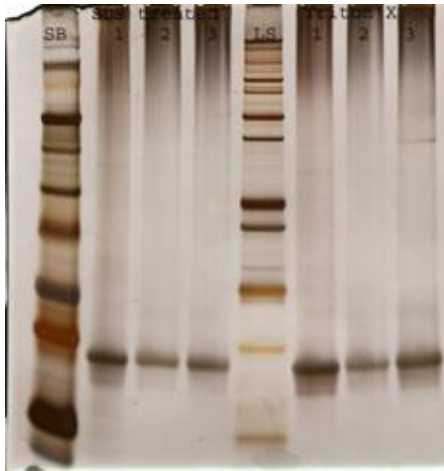
4.1.2.1 Elektrophorese von mit Divinylsulfon behandeltem Latexsaft

Daher wurde anschließend der Latex für eine Stunde mit DVS behandelt und zwei Gel Elektrophoresen mit dem so behandelten Latex auf einem 4-12% Bis-Tris-Gel durchgeführt. Einerseits mit SDS, andererseits mit Triton® X-100 als Detergenz.



LS... Mark 12 unstained standard
 U... unbehandelter Latex
 1... Latex mit 7,5 µl (74 µmol) DVS
 2... Latex mit 1,5 µl (14,9 µmol) DVS
 3... Latex mit 0,75 µl (7,4 µmol) DVS

Abb.32 SDS-Page 4-12% Bis-Tris-Gel



- SB ... SeeBlue® Standard
- LS... Mark 12™ unstained standard
- 1... Latex mit 14,9 µl (149 µmol) DVS
- 2... Latex mit 7,5 µl (74,5 µmol) DVS
- 3... Latex mit 1,5 µl (15 µmol) DVS

Abb.33 SDS-Page 4-12% Bis-Tris Gel

Es zeigte sich in diesen Gelen eine leichte Veränderung im Laufverhalten bei der höchsten eingesetzten Menge an DVS in Spalte 1 des Gels im ersten Versuch. Diese konnte jedoch im zweiten Gel nicht eindeutig reproduziert werden. Man kann daher nicht ohne weiteres auf eine Modifikation durch DVS am Rubber Elongation Factor schließen. Zur Überprüfung dieses Ergebnisses wurde eine weitere Elektrophorese mit Latex durchgeführt; diesmal mit einer Einwirkdauer des DVS von 1,5 Stunden.



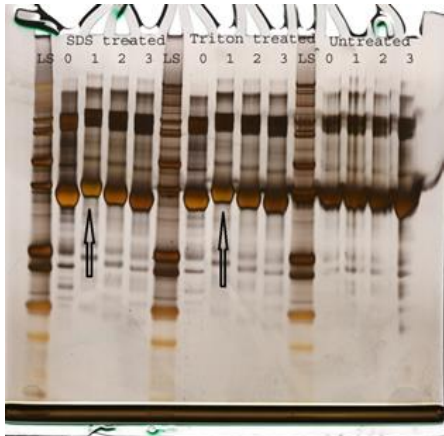
- LS... Mark 12 unstained standard
- U... unbehandelter Latex
- 1... Latex mit 7,5 µl (74 µmol) DVS
- 2... Latex mit 1,5 µl (14,9 µmol) DVS
- 3... Latex mit 0,75 µl (7,4 µmol) DVS

Abb.34 SDS-Page 4-12 % Bis-Tris Gel

Wie aus dem Gel ersichtlich wird zeigte sich hierbei dasselbe Laufverhalten, wie aus dem ersten Gel mit DVS. Der REF ist in diesem Gel in der ersten Spalte zu einem höheren Molekulargewicht verschoben.

4.1.2.2 *Elektrophorese von DVS-aktiviertem BSA*

Rinderserum Albumin wurde hierfür mit DVS behandelt, um herauszufinden, ob eine Modifikation des Proteins durch die Behandlung stattfand.

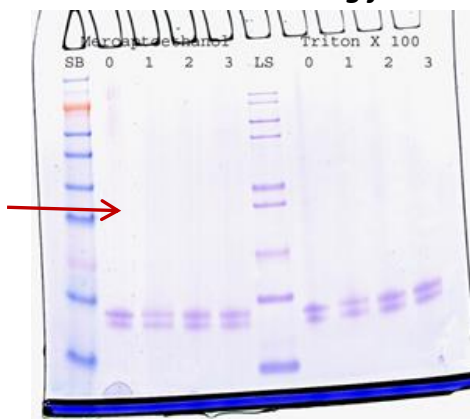


- LS...Mark 12 unstained standard
- 0... unbehandeltes BSA
- 1... BSA mit 626 µg (5,3 µmol) DVS
- 2... BSA mit 62,6 µg (530 nmol) DVS
- 3... BSA mit 6,3 µg (53 nmol) DVS

Abb.35 SDS-Page 4-12% Bis-Tris Gel

Wie aus dem Gel ersichtlich wurde, zeigte sich bei der höchsten eingesetzten Menge von 5,3 µmol DVS in der ersten Spalte eine deutliche Abweichung vom unbehandelten BSA. Hieraus konnte daher geschlossen werden, dass es mit DVS möglich ist Proteine zu modifizieren, sodass diese ein höheres Molekulargewicht aufwiesen. Dieses Ergebnis wird sich, wie später noch gezeigt werden wird, auch mittels der MALDI-TOF bestätigen.

4.1.2.3 *DVS Aktivierung für 2 Stunden mit Zusatz von Mercaptoethanol*



- SB ... SeeBlue® Standard
- LS... Mark 12™ unstained standard
- 0... reiner Latex
- 1... Latex mit 30 µl (298 µmol) DVS
- 2... Latex mit 6 µl (60 µmol) DVS
- 3... Latex mit 3 µl (30 µmol) DVS

Abb.36 SDS-Page 4-12% Bis-Tris Gel

Man erkennt in diesem Gel deutlich zwei Protein Banden im Bereich von 14 kDa. Es gab jedoch keinen Unterschied zwischen dem mit DVS behandelten und dem unbehandelten Latex. Die Denaturierung mit Hilfe von Mercaptoethanol hatte offenbar keine Auswirkung auf das Laufverhalten der Proteine.

4.1.2.4 DVS Aktivierung für eine Stunde ohne Zusätze

Ein weiteres Gel wurde ohne andere Zusätze hergestellt, um festzustellen, ob die doppelten REF Banden in 4.1.2.3 aufgrund des Mercaptoethanol zustande kamen.

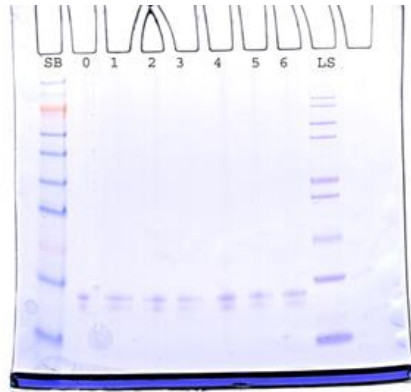


Abb.37 SDS-Page 4-12% Bis-Tris Gel

- SB ... SeeBlue® Standard
- LS... Mark 12™ unstained standard
- 0... reiner Latex
- 1... Latex mit 30 µl (298 µmol) DVS
- 2... Latex mit 25 µl (249 µmol) DVS
- 3... Latex mit 20 µl (199 µmol) DVS
- 4... Latex mit 15 µl (149 µmol) DVS
- 5... Latex mit 10 µl (99,6 µmol) DVS
- 6... Latex mit 5 µl (49,8 µmol) DVS

Wie hier ersichtlich wurde, waren die doppelten REF Banden keine Folge aus dem Zusatz an Mercaptoethanol. Diese Banden wurden auch ohne weitere Zusätze durch eine saubere Trennung im Gel sichtbar.

4.1.2.5 DVS Aktivierung für eine Stunde und Trennung auf einem 18% Tris-Glycine-Gel

Die Trennung auf einem 18%igem Tris-Glycine-Gel wurde durchgeführt, um zu untersuchen, ob dieses eine bessere Trennung im niedermolekularen Bereich aufweist. Zur Überprüfung des Ergebnisses wurden zwei Gele hergestellt.

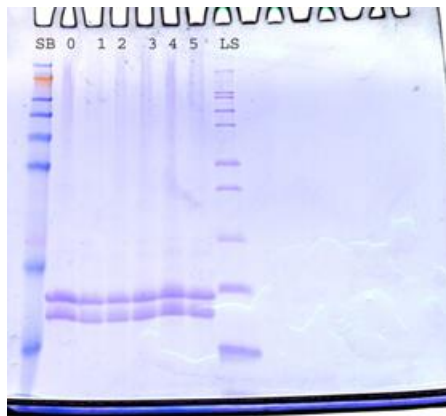


Abb.38 SDS-Page 18% Tris-Glycin-Gel

- SB ... SeeBlue® Standard
- LS... Mark 12™ unstained standard
- 0... reiner Latex
- 1... Latex mit 30 µl (298 µmol) DVS
- 2... Latex mit 25 µl (249 µmol) DVS
- 3... Latex mit 20 µl (199 µmol) DVS
- 4... Latex mit 15 µl (149 µmol) DVS
- 5... Latex mit 10 µl (99,6 µmol) DVS

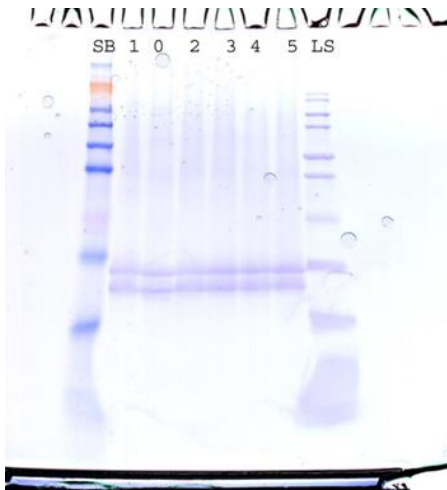


Abb.39 SDS-Page 18% Tris-Glycin-Gel

- SB ... SeeBlue® Standard
- LS... Mark 12™ unstained standard
- 0... reiner Latex
- 1... Latex mit 30 µl (298 µmol) DVS
- 2... Latex mit 25 µl (249 µmol) DVS
- 3... Latex mit 20 µl (199 µmol) DVS
- 4... Latex mit 15 µl (149 µmol) DVS
- 5... Latex mit 10 µl (100 µmol) DVS

Aus beiden Gelen wurde ersichtlich, dass sich bei dem 18%igem Gel eine Trennung des REF und - durch Abspaltung – die eines Fragments ergab. Eine Trennung der Latexproteine war somit bei der Gelelektrophorese nur beschränkt möglich. Ferner waren Modifikationen durch Reagenzien nur dann erkennbar, wenn sich das Molekulargewicht ausreichend änderte.

4.1.3 DVS MALDI-TOF

4.1.3.1 Behandlung von Latexsaft mit Divinylsulfon (DVS)

MALDI-TOF Untersuchungen wurden mit DVS behandeltem Latex, wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben durchgeführt, um den Einfluss von DVS auf die Latexproteine zu untersuchen. Dabei konnte folgendes Spektrum aufgenommen werden:

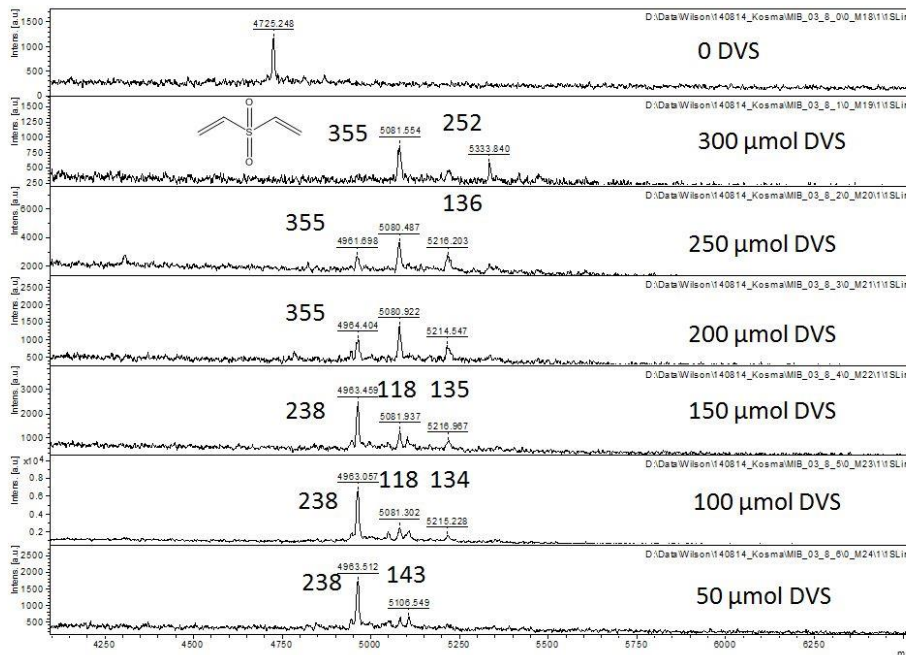


Abb.40 MALDI-TOF Spektrum von DVS behandeltem Latex

Man erkannte deutlich, dass DVS reaktiv genug war, um Hevein zu modifizieren. Bei einem Einsatz von 50 bis 150 μmol DVS lagerten sich 2-4 DVS-Gruppen an das Hevein an und ab einer Konzentration von 200 bis 300 μmol 3-5 Gruppen.

4.1.3.2 BSA nach Behandlung mit DVS

Es sollte hierbei untersucht werden, ob eine Behandlung von Rinder Serum Albumin mit DVS eine Veränderung des Molekulargewichts zur Folge hatte; dies wird in folgenden Spektren ersichtlich:

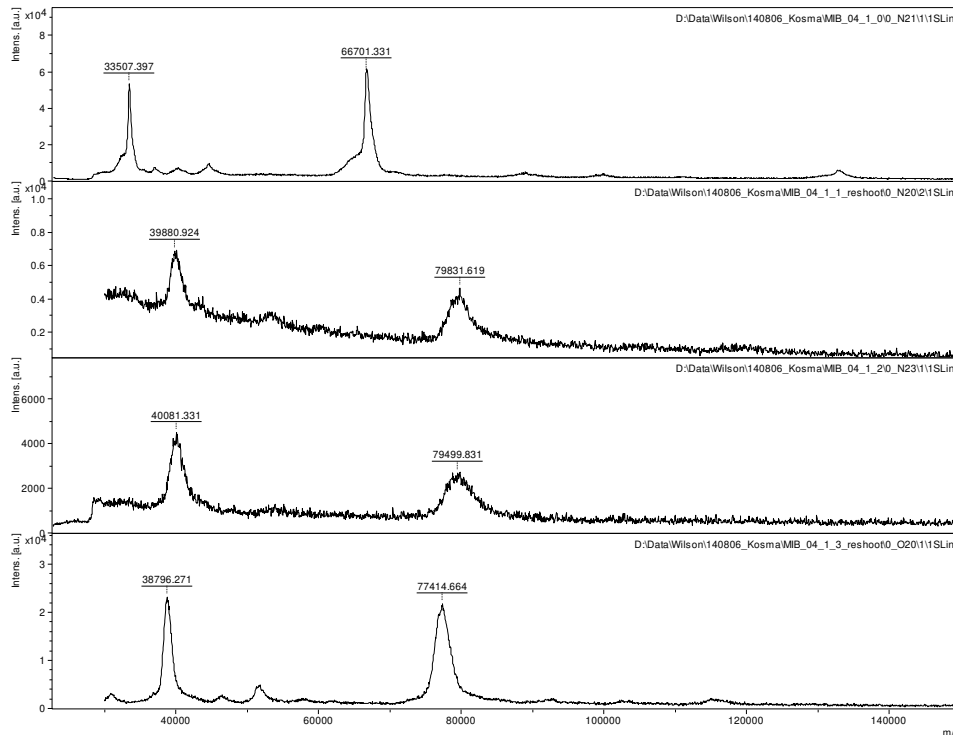


Abb.41 MALDI-TOF Spektrum von DVS behandeltem BSA

Der zweite Peak (Referenz) im ersten Spektrum entsprach dem von reinem Rinder Serum Albumin, der erste stellte ein Fragment des BSA dar. Aus den Spektren zwei bis vier (Proben Nr. 1 bis 3) wurde deutlich, dass eine Beladung mit DVS stattgefunden hat. BSA wurde bei der höchsten Konzentration an DVS (Probe Nr. 1) mit 110 Gruppen beladen, was im zweiten Spektrum ersichtlich wurde. Bei der niedrigsten Konzentration an DVS (Probe Nr. 3) waren es immerhin noch 90 DVS Gruppen die an das BSA addiert wurden.

4.1.4 Ergebnisse der Aminosäureanalyse der Fingerlinge

Bei der Doppelbestimmung der Fingerlinge ohne DVS ergaben sich Messwerte von 85,94 $\mu\text{g/g}$ und 84,18 $\mu\text{g/g}$ an Protein. Die mit DVS behandelten Fingerlinge wiesen hingegen eine sehr viel höhere Konzentration an Proteinen im Lowry Test auf. Diese lagen bei 1284,88 $\mu\text{g/g}$ und 1362,53 $\mu\text{g/g}$ Protein in der Doppelbestimmung.

Aus dem Ergebnis konnte geschlossen werden, dass die nachträgliche Entfernung (Wäsche) der im fertigen Produkt enthaltenen Proteine durch die Vorbehandlung mit DVS erheblich verbessert werden konnte.

Zur Überprüfung dieses Ergebnisses wurden auch die reinen DVS Extrakte in Wasser und Ammoniak mittels Lowry Test gemessen. Es zeigte sich dabei, dass diese Nebenprodukte einen Lowry-Wert im Bereich von 100-150 µg/g aufweisen, und somit nur ein kleiner Anteil von etwa 10% auf das Reagens zurückzuführen war.

4.1.5 Ergebnisse der FITkit® Analyse der Hanschuhmuster

Die Testergebnisse aus dem Versuch mit der fertig vorvernetzten Hansa Mischung zeigt die folgende Grafik:

Test Results

Icosagen code	Sample code (as provided by customer)	Hev b 1 µg/g	Hev b 3 µg/g	Hev b 5 µg/g	Hev b 6.02 µg/g	Total µg/g
LAT14133	Reference	UQ	UQ	0.05	0.16	0.21
LAT14134	HS KTA 19	UQ	UQ	0.04	0.22	0.26
LAT14135	+10 mL DVS	UQ	UQ	UQ	0.12	0.12
LAT14136	+20 mL DVS	UQ	UQ	UQ	0.11	0.11
LAT14137	+40 mL DVS	UQ	UQ	UQ	0.12	0.12

UQ – Unquantifiable

Limits of quantitation:
 Hev b 1 < 0.050 µg/g; Hev b 3 < 0.050 µg/g; Hev b 5 < 0.025 µg/g; Hev b 6.02 < 0.025 µg/g

Tabelle 26. (QA14-0142_Semperit_03.11.2014) siehe Anhang 7.2

Man sah deutlich, dass es bei dem mit DVS behandelten Latex zu einer Reduktion der allergieauslösenden Proteine gekommen war.

Das Hev b 5 wurde dabei um 50% unter die Nachweisgrenze reduziert. Bei Hev b 6.02 erfolgte eine Reduktion um ca. 25%. Selbst mit der geringsten eingesetzten Menge an DVS betrug die Gesamtreduktion der Proteinkonzentration ca. 42% bezogen auf die Referenzprobe und ca. 53% bezogen auf das Muster aus der Produktion. Der Einsatz der doppelten bzw. Vierfachen Menge an DVS bewirkte allerdings keine weitere Senkung des Allergengehalts.

Zusätzlich wurde auch eine zweite Testreihe mit der noch nicht vorvernetzten Latexmischung unter Behandlung mit DVS und anschließender Reifung unternommen. Eingesetzte Konzentrationen dabei waren 12,5 und 25 µmol/ml DVS pro Latexsaft. Die Ergebnisse aus diesem Versuch finden sich in folgender Grafik:

Test Results

Icosagen code	Sample code (as provided by customer)	Hev b 1 µg/g	Hev b 3 µg/g	Hev b 5 µg/g	Hev b 6.02 µg/g	Total µg/g
LAT14146	KTA 19 Kurant TWA1 (23.10.2014)	UQ	UQ	0.06	0.25	0.31
LAT14147	Reifung NK + 0,26phr DVS; Reifung 21.10.2014; TWA1 23.10.2014	UQ	UQ	0.03	0.21	0.24
LAT14148	Reifung NK + 0,5phr DVS; Reifung 20.10.2014; TWA1 22.10.2014	UQ	UQ	UQ	0.09	0.09

UQ – Unquantifiable

Limits of quantitation:

Hev b 1 < 0.050 µg/g; Hev b 3 < 0.050 µg/g; Hev b 5 < 0.025 µg/g; Hev b 6.02 < 0.025 µg/g

Tabelle 27. (QA14-0151_Semperit_21.11.2014) siehe Anhang 7.2

Beim unbehandelten Latex wurde Hev b 5 durch den Einsatz von DVS mit einer Konzentration von 12,5 mmol/l um 50% reduziert. Bei Hev b 6.02 erfolgte eine Reduktion um nur 16%. Der Einsatz der doppelten Menge an DVS (25 mmol/l) bewirkte eine Senkung des Hev b 5 unter die Nachweisgrenze. Das Hev b 6.02 wurde dabei um 64% im Vergleich zum Muster aus der Produktion reduziert.

4.2 Cyanurchlorid

4.2.1 Cyanurchlorid Modellreaktionen

Diese Reaktion musste mehrmals wiederholt werden, bis eine geeignete Methode gefunden wurde, um die Reaktionsprodukte mittels NMR zu untersuchen. Im ¹H-COSY Spektrum wurden Hydrolyse Derivate als wesentliche Reaktionsprodukte sichtbar, was im Spektrum aus dem dritten Ansatz zu sehen ist:

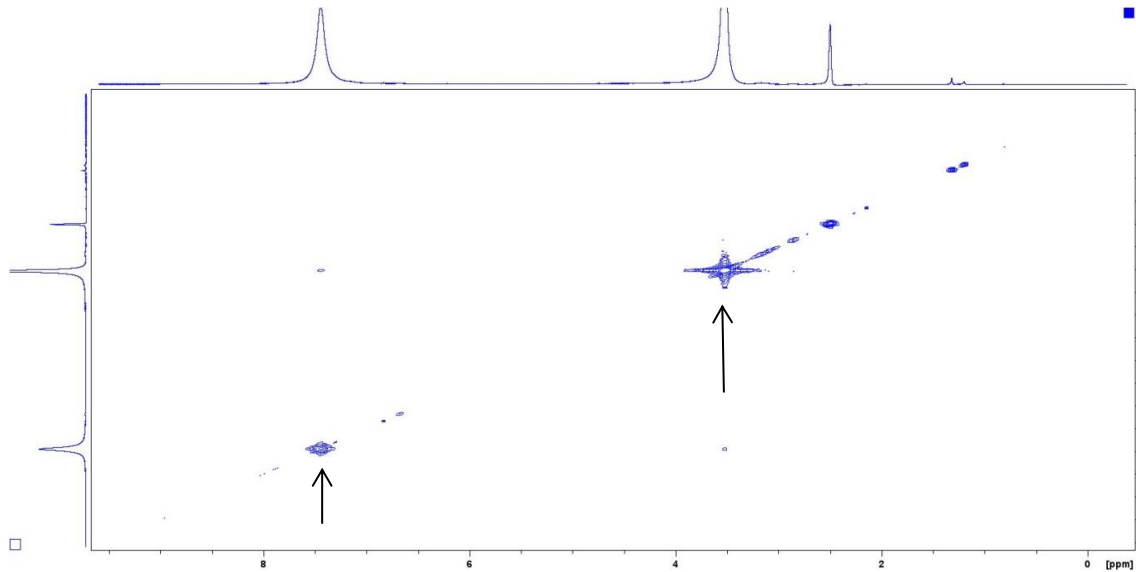


Abb.42 ^1H COSY Spektrum des Reaktionsgemisches Cyanurchlorid mit Cysteamin

Die NMR-Daten zeigten, dass neben dem erwarteten Addukt auch Hydrolyse Derivate entstehen. Diese waren bei 7,5 ppm sichtbar. Die Cysteamin Methylengruppen lagen bei 3,5 ppm. Auf Grund des vorliegenden Ergebnisses ist daher davon auszugehen, dass Cyanurchlorid im alkalischen Milieu seine Chloratome unter Bildung von Hydrolyse Derivaten teilweise abspaltet.

4.2.2 Cyanurchlorid Elektrophorese

Die Trennung von Cyanurchlorid behandeltem Latex wurde auf einem 18% Tris-Glycin Gel durchgeführt, um das Laufverhalten des REF zu untersuchen.

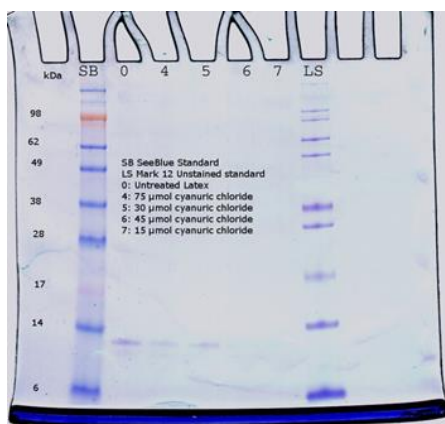


Abb.43 SDS-Page 18% Tris-Glycin Gel

- SB ... SeeBlue® Standard
- LS... Mark 12™ unstained standard
- 0... reiner Latex
- 4... Latex mit 75,4 μmol Cyanurchlorid
- 5... Latex mit 30 μmol Cyanurchlorid
- 6... Latex mit 45,2 μmol Cyanurchlorid
- 7... Latex mit 15 μmol Cyanurchlorid

Bei diesem Gel war die Konzentration an REF (14 kDa-Bande) nicht in jeder Bahn sichtbar. Es ergab sich insgesamt aber kein Unterschied im Laufverhalten im Vergleich zu den anderen Versuchen.

4.2.3 Cyanurchlorid MALDI-TOF

Die MALDI-TOF Massenspektrometrie wurde mit Cyanurchlorid behandeltem Latex durchgeführt, um Änderungen an der Heveinstruktur durch die Behandlung zu untersuchen.

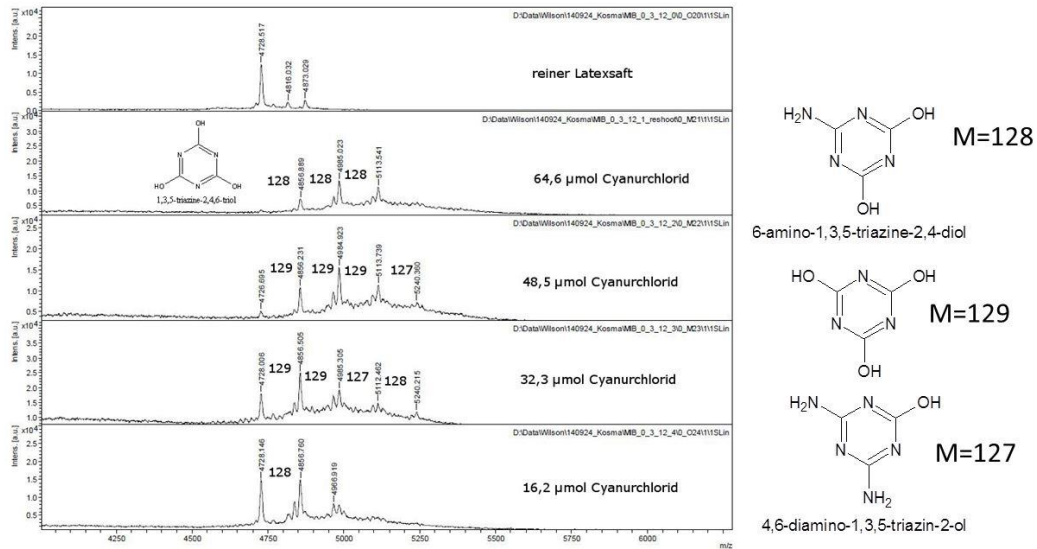


Abb.44 MALDI-TOF Spektrum von Cyanurchlorid behandeltem Latex

Bei der geringsten Konzentration von 16,2 µmol Cc zeigte sich nur ein geringer Anteil an modifiziertem Hevein. Bei höherem Einsatz an Quervernetzer sah man eine deutliche Modifikation des Latexproteins. Auffällig war dabei, dass die Addukte durch Hydrolyse bzw. Ammonolyse der verbleibenden Chlorsubstituenten chlorfrei sind (Δm 127, 128 und 129)

Dieses Ergebnis war in einem zweiten Versuch bestätigt worden, wie das folgende Massenspektrum zeigte:

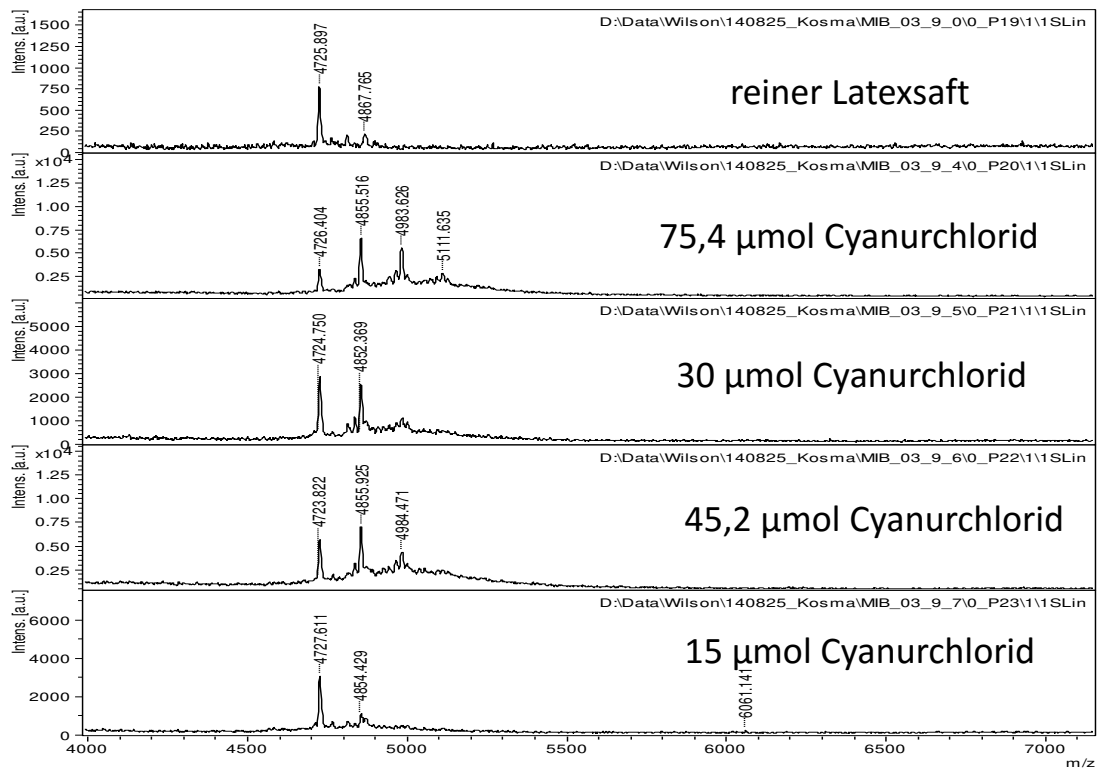


Abb.45 MALDI-TOF Spektrum von Cyanurchlorid behandeltem Latex

Auch in diesem Spektrum betragen die wesentlichen Massenunterschiede Δm 128 und 129, was auf dieselben Addukte wie in Abb. 44 schließen ließ.

4.3 2,4-Dichlor-6-methoxy-1,3,5-triazin (DMTZ)

4.3.1 2,4-Dichlor-6-methoxy-1,3,5-triazin (DMTZ) Modellreaktionen

Die Modellreaktionen mit DMTZ wurden durchgeführt, um zu überprüfen, wie sich die Einführung der Methoxy Gruppe bei der Reaktion mit dem Modellmolekül Cysteamin auswirkt. Das ^1H COSY Spektrum aus dem ersten Ansatz gleicht dabei dem aus 4.2.1, weshalb die Bildung von Hydrolyse Derivaten auch in diesem Fall nicht ausblieb. Das HSQC Spektrum aus dem zweiten Ansatz mit erhöhter Temperatur, war für diese Reaktion exemplarisch:

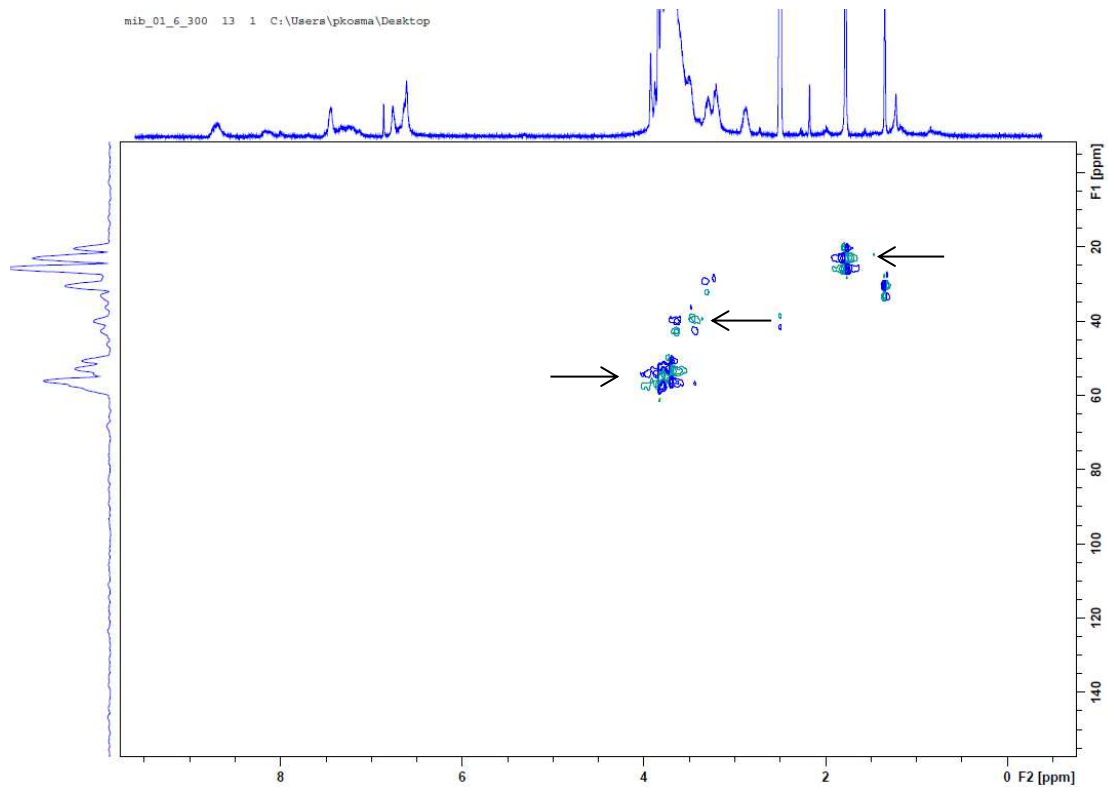


Abb.46 HSQC Spektrum der Reaktion von DMTZ mit Cysteamin

Es zeigte sich hierbei ein heterogenes Produktprofil. Die Peaks bei 60/4 ppm entsprachen der Methoxygruppe des DMTZ. Im Hochfeld bei 30/1,5 ppm kamen die HS-CH₂- Gruppen. Die Peaks bei 40/3,5 ppm entsprachen den gebundenen Cystein -CH₂-CH₂- Fragmenten.

4.3.2 Dichlormethoxytriazin (DMTZ) MALDI-TOF

Das MALDI-TOF Spektrum von DMTZ behandeltem Latex zeigte ein ähnliches Verhalten wie der mit Cyanurchlorid behandelte Latex (Abb.47).

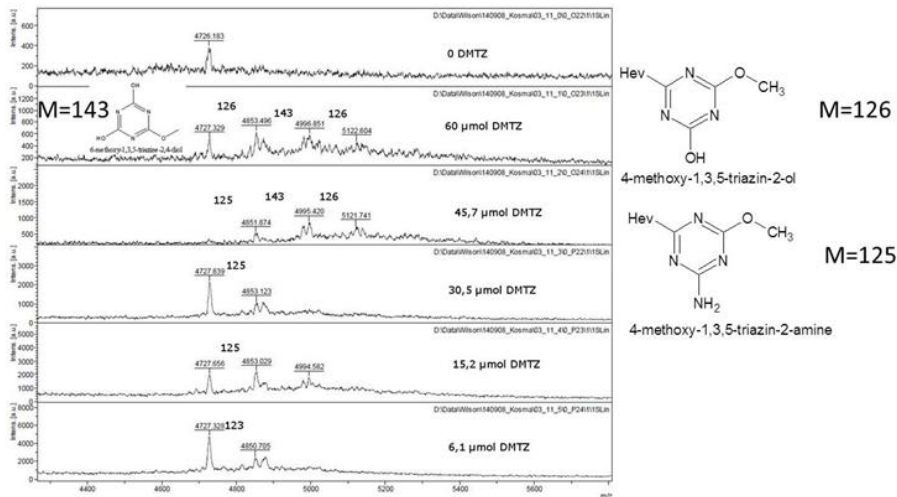


Abb.47 MALDI-TOF Spektrum von DMTZ behandeltem Latex

Bei der geringsten Konzentration von 6,1 μmol DMTZ zeigte sich fast keine Modifikation. Bei höherem Einsatz an Quervernetzer um ca. 50 μmol sah man eine deutliche Modifikation des Latexproteins. Auffällig war dabei wieder, dass in den Produkten die chlorfreien Triazine enthalten waren.

4.4 Glutardialdehyd (Ga)

4.4.1 Glutardialdehyd (Ga) Modellreaktionen

Die Modellreaktion mit Glutardialdehyd wurde durchgeführt, um die Reaktionsprodukte mit Cysteamin mittels NMR zu untersuchen.

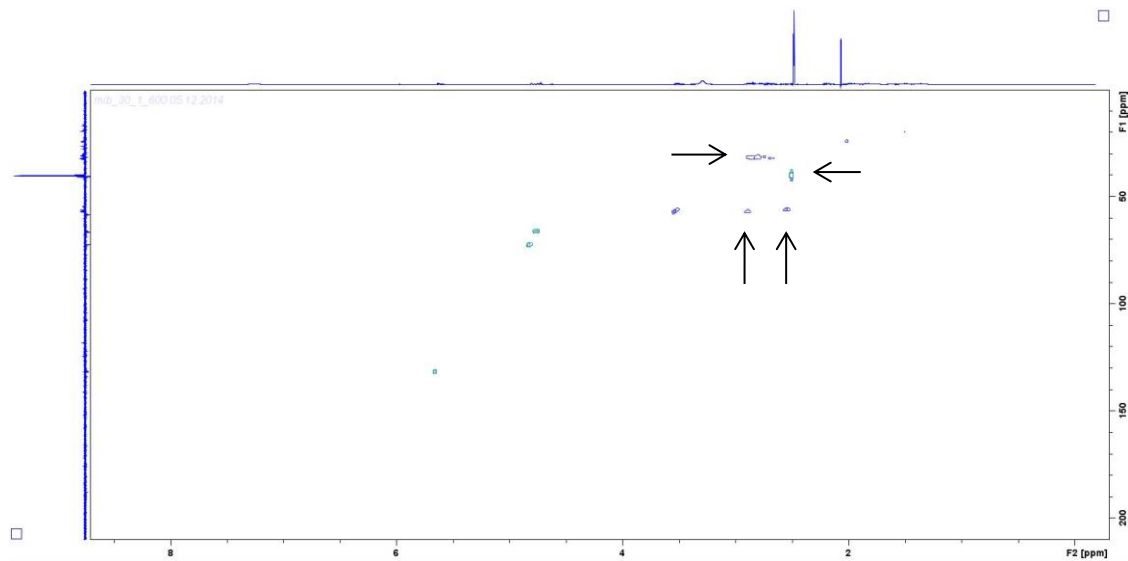
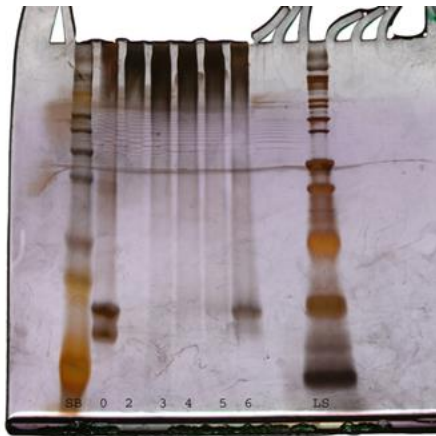


Abb.48 HSQC Spektrum des Reaktionsgemisches Glutardialdehyd mit Cysteamin

Die Peaks bei 56/2,89 ppm und 31/2,83 ppm entsprachen dabei den Methylengruppen des Cysteamins. Der Peak bei 56/2,54 ppm entsprach einer $-C=N-CH_2-$ Gruppe und war somit ein Anzeichen eines Konjugationsprodukts. Die Peaks bei 40/2,5 ppm entsprachen den Methylengruppen des Glutaraldehyds. Es zeigte sich somit ein heterogenes Reaktionsprofil.

4.4.2 Glutardialdehyd (Ga) Elektrophorese

Auf Grund des Ergebnisses aus dem Modellversuch wurde auch eine Elektrophorese mit Glutardialdehyd behandeltem Latex durchgeführt. Diese sollte zeigen welche Auswirkungen auf den REF durch die Behandlung mit Glutardialdehyd zu Stande kommen.



- SB ... SeeBlue® Standard
- LS... Mark 12™ unstained standard
- 0... reiner Latex
- 2... Latex mit 36 μ l (198 μ mol) Glutaraldehyd
- 3... Latex mit 27 μ l (149 μ mol) Glutaraldehyd
- 4... Latex mit 18 μ l (99 μ mol) Glutaraldehyd
- 5... Latex mit 9 μ l (49,7 μ mol) Glutaraldehyd
- 6...Latex mit 4,5 μ l (24,9 μ mol) Glutaraldehyd

Abb.49 SDS-Page 18% Tris-Glycin Gel

Bei diesem Gel sah man, dass mit zunehmender Konzentration an Glutaraldehyd die 14 kDa-Banden deutlich schwächer und bei den Ansätzen 2 bis 4 nicht mehr sichtbar sind. Die Banden des REF waren also bei einer Behandlung mit höheren Konzentrationen (50 μ mol/ml Latex) an Glutardialdehyd nicht mehr sichtbar. Daher wurden Anschließend MALDI-TOF Untersuchungen mit Glutardialdehyd behandeltem Latex ausgeführt, um zu untersuchen wie sich diese Behandlung auf das Hevein auswirkte.

4.4.3 Glutardialdehyd (Ga) MALDI-TOF

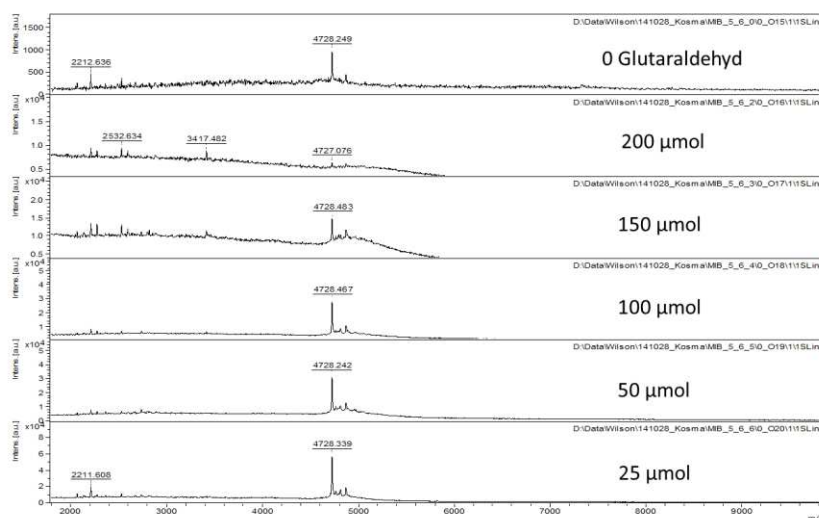


Abb.50 MALDI-TOF Spektrum von Latex behandelt mit Glutardialdehyd

Eine Modifikation des Heveins war nicht erkennbar, allerdings nahm die Intensität des Heveinsignals mit zunehmender Konzentration des Glutardialdehyds ab. Dies bestätigte somit das Ergebnis aus der Elektrophorese und zeigte somit eine Verringerung der im Latex enthaltenen Proteine durch den Einsatz an Glutardialdehyd. Das Spektrum aus dem zweiten Versuch bestätigte dieses Resultat, daher wird es hier nicht zusätzlich gezeigt.

4.5 Triacryloylhexahydro-1,3,5-triazin (TAT)

4.5.1 Triacryloylhexahydro-1,3,5-triazin (TAT) Modellreaktionen

Im Ersten Versuch sollte abgeklärt werden, wie lange es dauert, bis sich die Acryloylgruppen mit dem Cysteamin umsetzen. Die zugehörige $^1\text{H-NMR}$ Messung zeigt das folgende Spektrum:

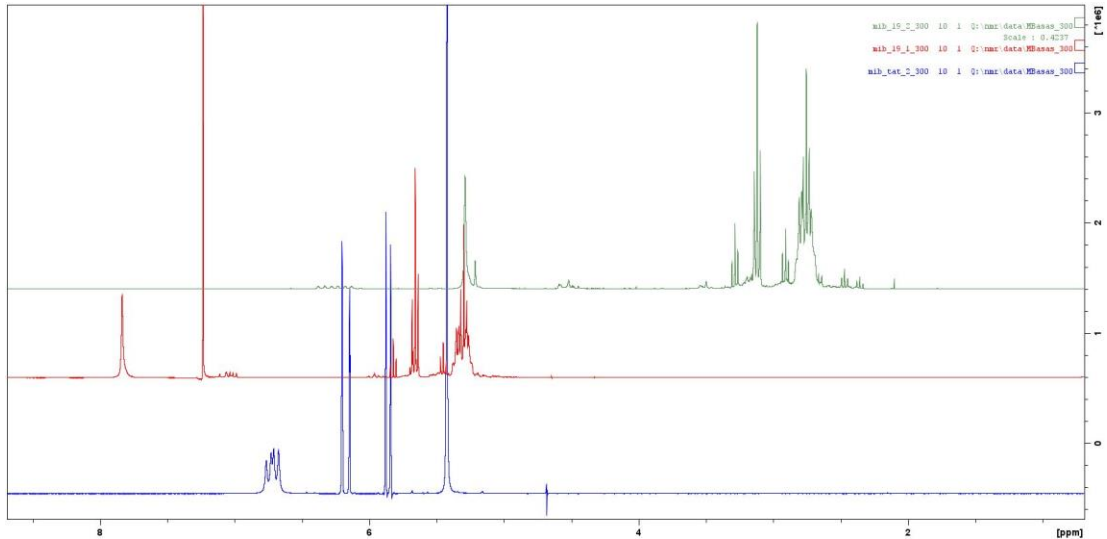


Abb.51 ^1H -NMR Spektren von reinem TAT (blau), Reaktion nach 1,5 Stunden (rot) und nach 71 Stunden (grün)

Es zeigte sich bei dieser Reaktion, dass nach 1,5 Stunden noch Acryloylgruppen vorhanden waren. Nach 71 Stunden waren die Acryloyl-Gruppen vollständig umgesetzt worden und nur noch aliphatische Gruppen vorhanden.

4.5.2 Triacryloylhexahydro-1,3,5-triazin (TAT) Elektrophorese

Anhand der Elektrophorese von TAT behandeltem Latex, sollte der Einfluss der Chemikalie auf den REF eruiert werden.

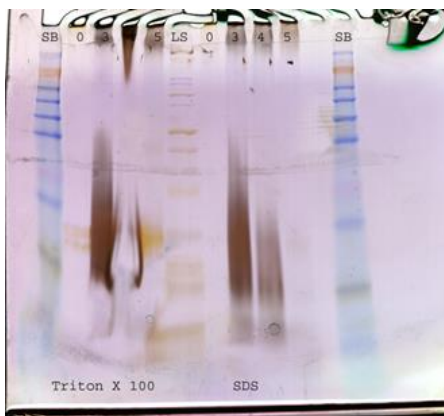


Abb.52 SDS-Page 18% Tris-Glycin Gel

- SB ... SeeBlue® Standard
- LS... Mark 12™ unstained standard
- 0... reiner Latex
- 3... Latex mit 13,99 mg (56,14 μmol) TAT
- 4... Latex mit 9,33 mg (37,43 μmol) TAT
- 5... Latex mit 4,67 mg (18,71 μmol) TAT

Dieses Gel zeigte deutlich unscharfe Banden im Bereich von etwa 10 bis 20 kDa. Daher war davon auszugehen, dass eine Modifikation am REF stattgefunden hatte. Diese zeigte sich allerdings in Form einer Polymerisationsreaktion des vorhandenen Proteins. Zur besseren Beurteilung dieses Ergebnisses wurde sodann die MALDI-TOF Analyse ausgeführt.

4.5.3 Triacryloylhexahydro-1,3,5-triazin (TAT) MALDI-TOF

4.5.3.1 Behandlung von Latexsaft mit Triacryloylhexahydro-1,3,5-triazin (TAT)

Die Analyse von TAT behandeltem Latex wurde in drei unterschiedlichen Varianten durchgeführt. Zunächst wurde die Behandlung mit reinem TAT mittels MALDI-TOF untersucht.

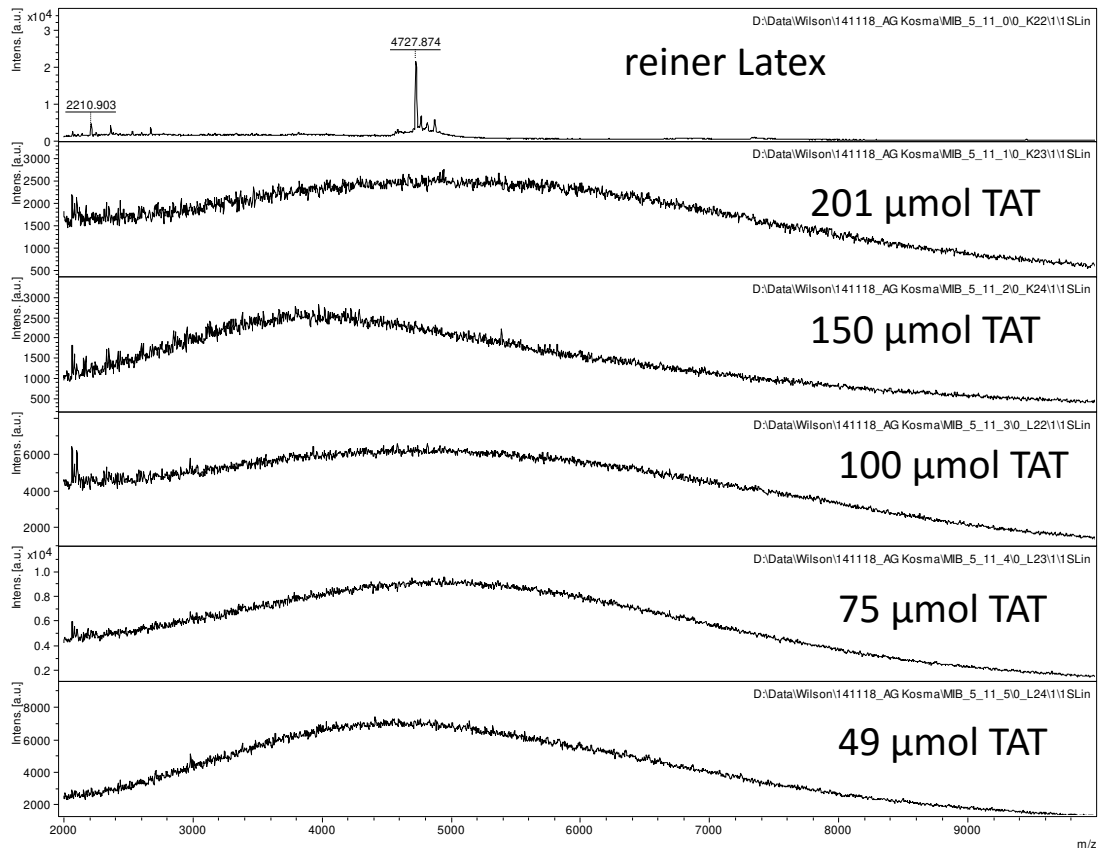


Abb.53 MALDI-TOF Spektrum von TAT behandeltem Latex

Man sah hier in jeder getesteten Konzentration an TAT die Auflösung des Heveinpeaks. Dies ließ darauf schließen, dass bei einer Behandlung des Latex mit TAT eine Polymerisation der im Latex enthaltenen Proteine stattgefunden hatte.

4.5.3.2 Behandlung von Latexsaft mit Triacryloylhexahydro-1,3,5-triazin (TAT)

Um die wirksame Grenzkonzentration zu ermitteln, wurde dieser Versuch erneut mit geringeren Konzentrationen an TAT durchgeführt.

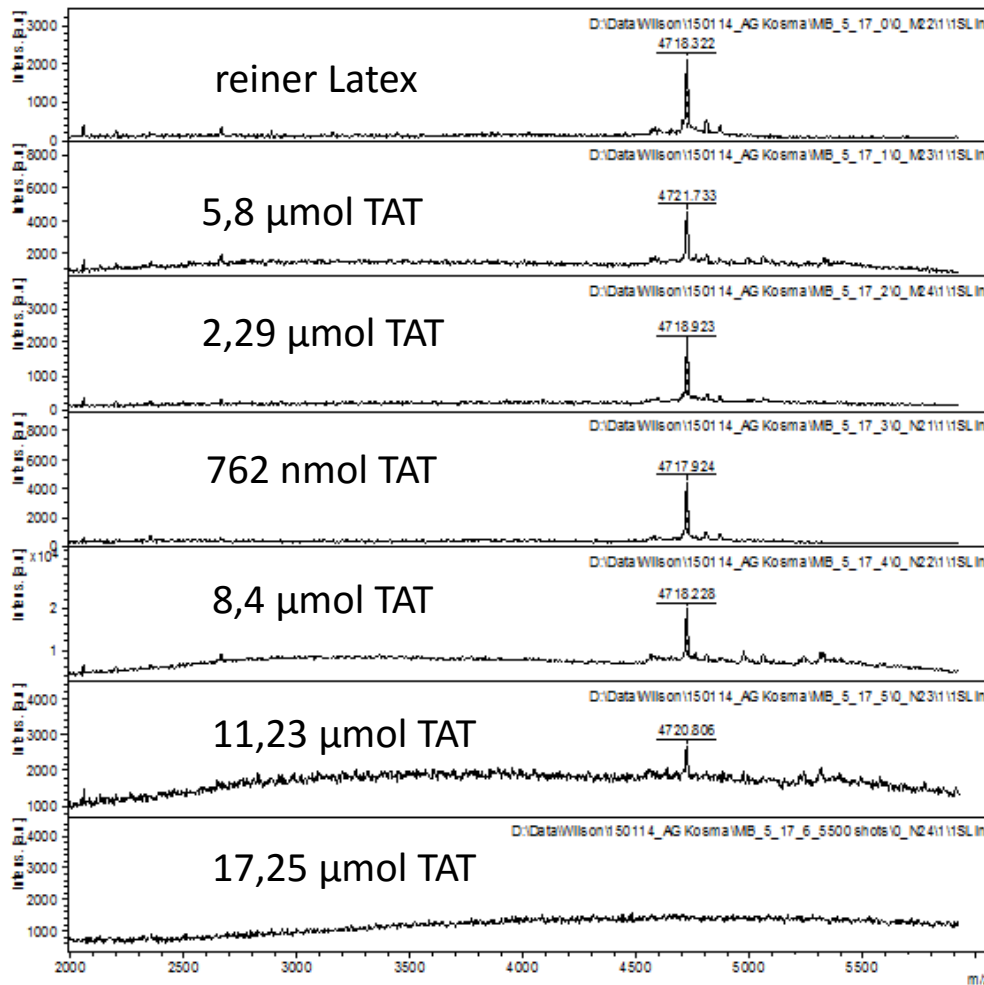


Abb.54 MALDI-TOF Spektrum von TAT behandeltem Latex

Man sah, dass eine Modifikation am Hevein stattfand. Diese hing hauptsächlich von der zugesetzten Menge an TAT ab. Bei der Konzentration der Probe 5) kam es zu einer leichten Peak Verkleinerung und bei Probe 6) verschwand der Heveinpeak komplett. Aus dem Spektrum wurde ersichtlich, dass ab einer Konzentration von 17,25 µmol ein komplettes Verschwinden des Heveinpeaks eintrat. Bereits ab 11,23 µmol fand eine Reduktion des Heveins statt.

4.5.3.3 Behandlung von Latexsaft mit Triacryloylhexahydro-1,3,5-triazin (TAT) in β -Cyclodextrin

In einem weiteren Versuch sollte abgeklärt werden, wie die Behandlung von TAT unter Zusatz von β -Cyclodextrin verlief.

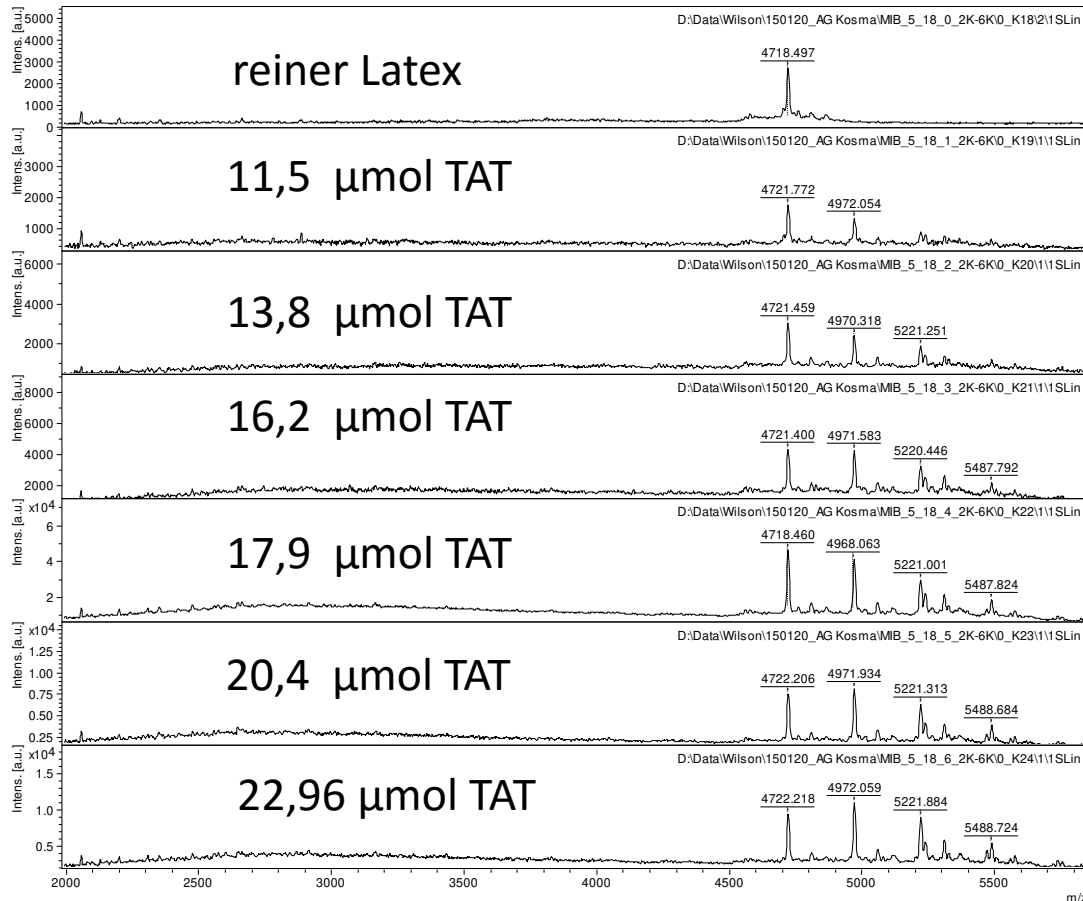


Abb.55 MALDI-TOF Spektrum von TAT behandeltem Latex unter Zusatz an β -Cyclodextrin

Es zeigte sich, dass durch den Zusatz an β -Cyclodextrin ein deutlich milderer Reaktionsverlauf stattgefunden hatte. Der Heveinpeak blieb jedoch in jeder der eingesetzten Konzentrationen erhalten. Nichtsdestotrotz kam es in allen Fällen zu einer Modifikation des Heveins. Die Unterschiede im Molgewicht lagen dabei in etwa um 250 Masse zu Ladungseinheiten (m/z), was genau dem Molekulargewicht von TAT entsprach. Es fand also eine Beladung mit TAT statt. Man sah daher, dass es unabhängig von der Konzentration an TAT zu einer deutlich kontrollierteren Reaktion, als ohne den Einsatz an β -Cyclodextrin gekommen war.

4.5.3.4 Behandlung von Latexsaft mit Triacryloylhexahydro-1,3,5-triazin (TAT) in α -Cyclodextrin

In einem weiteren Versuch sollte abgeklärt werden, wie sich der Zusatz von α -Cyclodextrin auf den Reaktionsverlauf nach unterschiedlichen Zeiten auswirkt. Das folgende Spektrum zeigt den Reaktionsverlauf nach zwei Stunden.

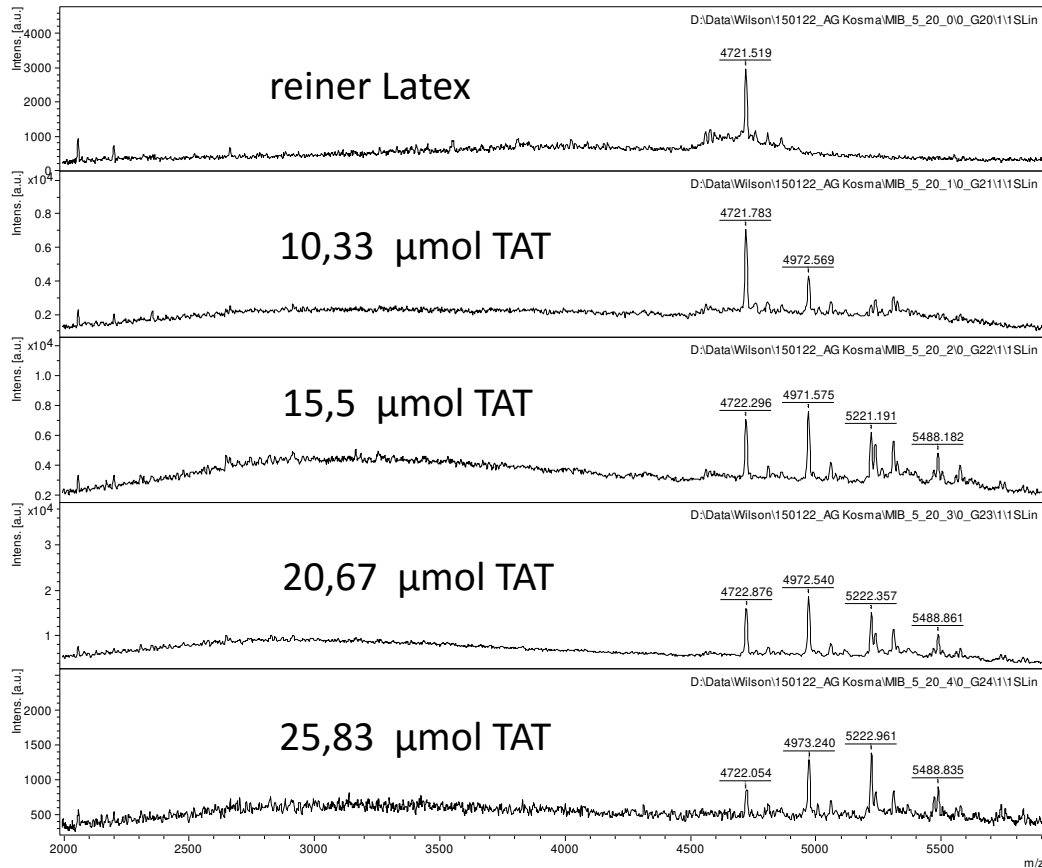


Abb.56 MALDI-TOF Spektrum von TAT behandeltem Latex unter Zusatz an α -Cyclodextrin

Auch in diesem Spektrum betragen die Molgewichtsdifferenzen in etwa 250 Masse zu Ladungseinheiten. Es ließ sich daher die Reaktion des Heveins mit dem TAT nachvollziehen. Zur weiteren Überprüfung wurden auch Spektren nach vier und 24 Stunden aufgenommen (Abb.57 und 58).

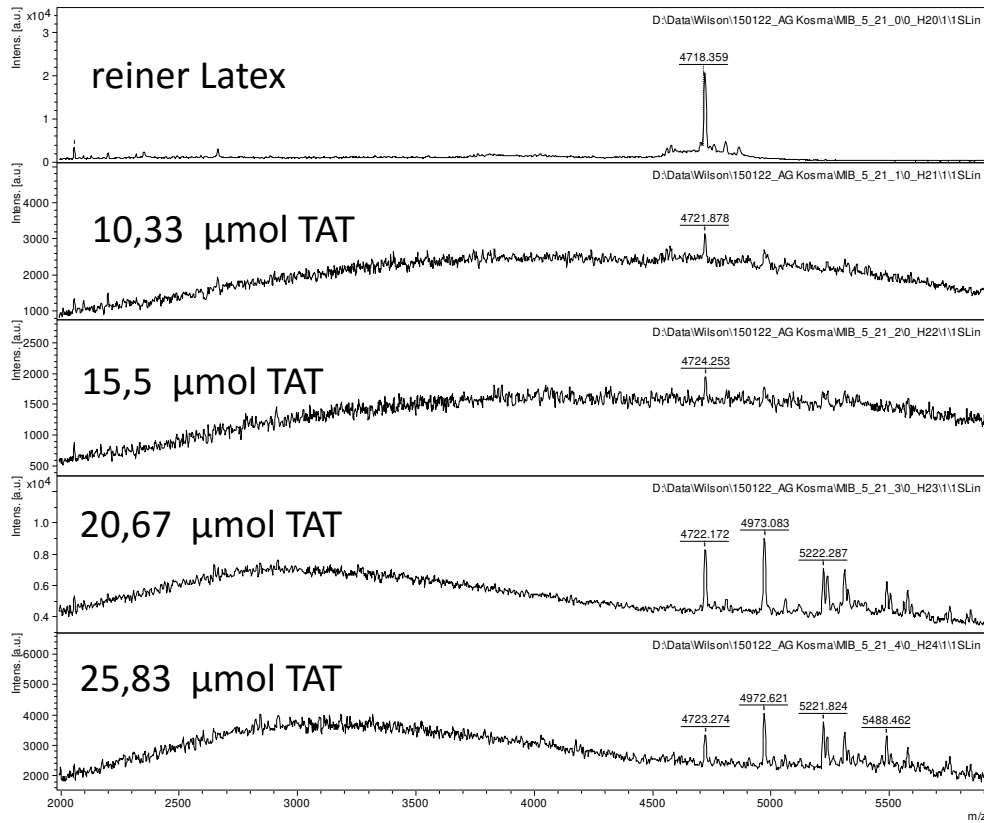


Abb.57 MALDI-TOF Spektrum von TAT behandeltem Latex unter Zusatz von α -Cyclodextrin nach 4 Stunden

Nach vier Stunden Reaktionszeit zeigte sich in den geringeren Konzentrationen von 10,33 und 15,5 μmol ein ähnliches Produktprofil wie bei der Behandlung mit reinem TAT.

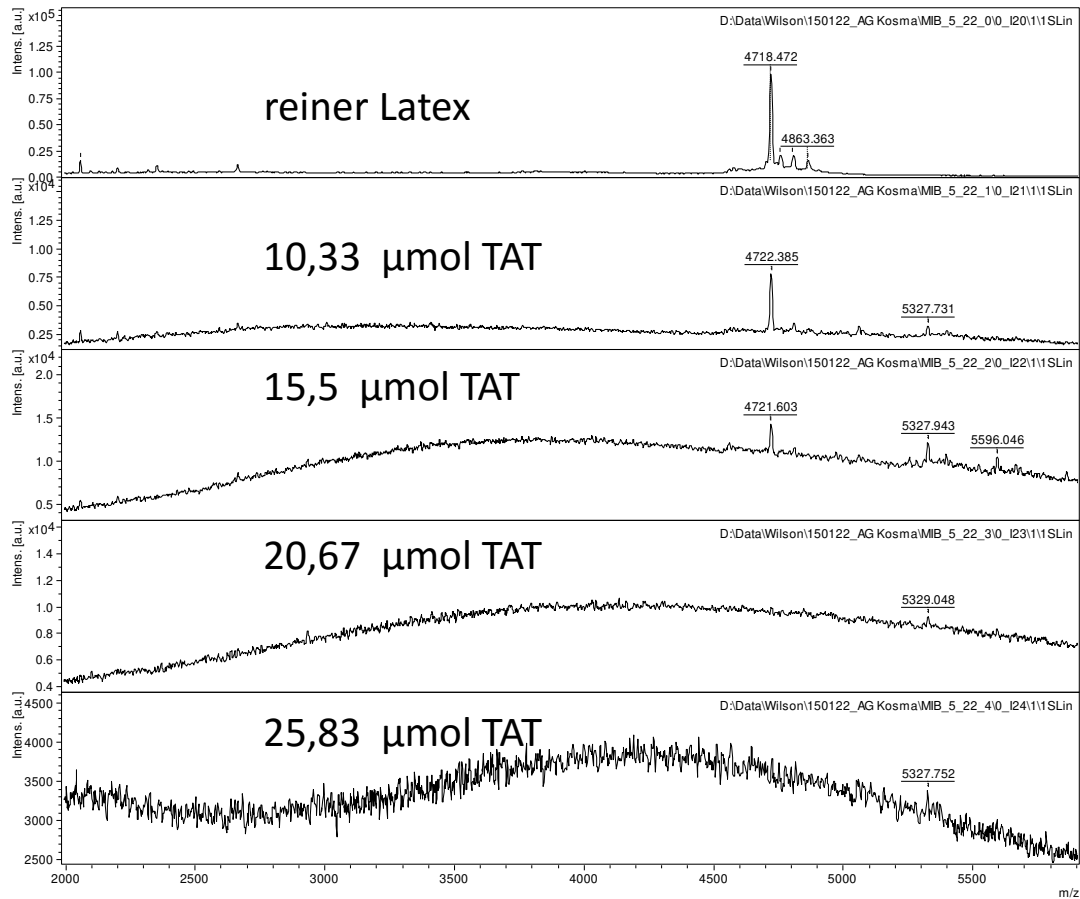


Abb.58 MALDI-TOF Spektrum von TAT behandeltem Latex unter Zusatz von α -Cyclodextrin nach 24 Stunden

Das Spektrum nach 24 Stunden Reaktionszeit ähnelte dem aus 4.5.3.1 mit reinem TAT. Daraus ließ sich schließen, dass der Zusatz an α -Cyclodextrin eine längere Reaktionsdauer zur Folge hatte und die Reaktion somit milder verlief.

4.5.4 TAT Bestimmung mittels HILIC

Für die Bestimmung von TAT mittels HILIC wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt und gemessen. Es ergab sich ein Detektionslimit von etwa 16 μg pro ml Acetonitril. Dabei betrug der Gradient von Acetonitril und Wasser 95:40, wobei Einspritzmengen von 10 bis 50 μl verwendet wurden.

Die Kalibrationskurve aus der Verdünnungsreihe wird in der folgenden Grafik (Abb.59) gegeben:

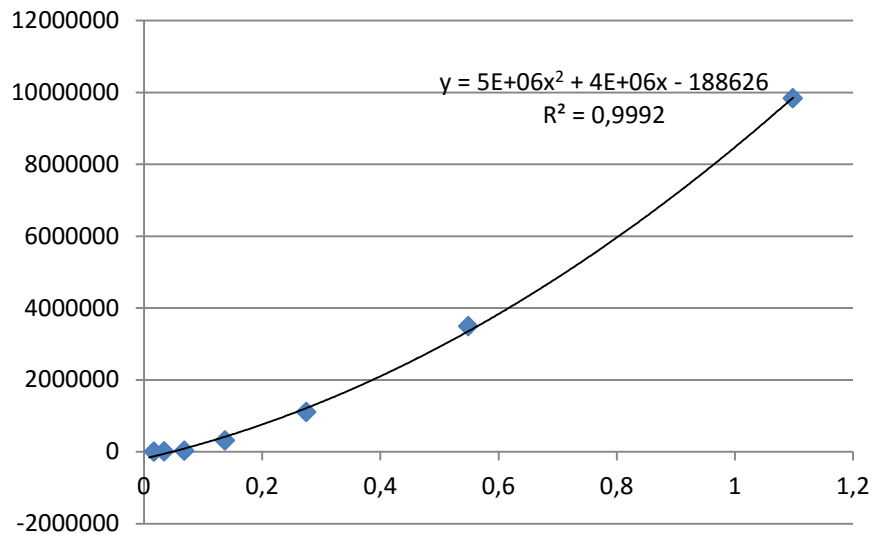


Abb. 59 Kalibrationskurve HILIC

4.5.4.1 Die Bestimmung von TAT in Acetonitril

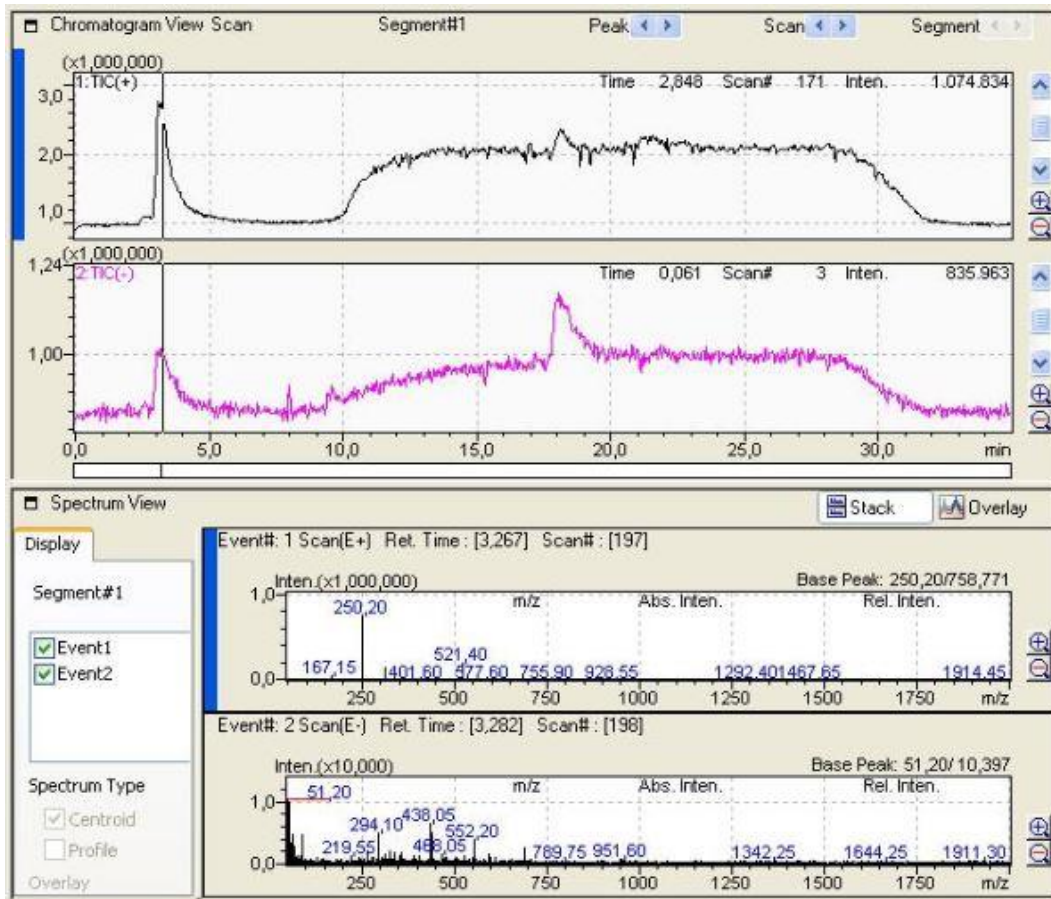


Abb.60 Ergebnis der HILIC Messung

Der Peak bei 250,2 m/z war eindeutig dem TAT zuzuordnen. $t_R=3,1$ min

4.5.4.2 Der Extrakt von unbehandeltem Latexfilm

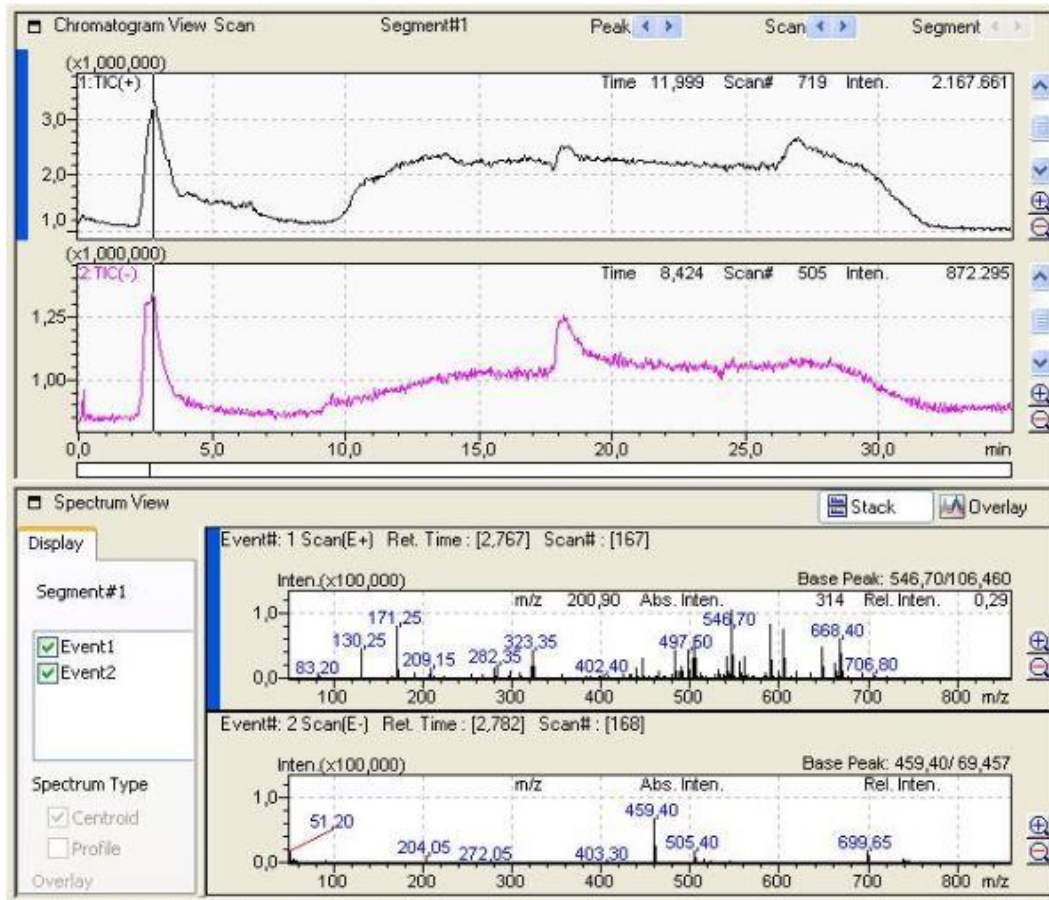


Abb.61 Ergebnis der HILIC Messung

Retentionszeit $t_R=2,833$ min

Wie aus dem Spektrum der Masse zu Ladung zu entnehmen, waren sowohl der TAT Peak als auch seine Fragmente nicht vorhanden. Dieses Ergebnis war bei unbehandeltem Latex zu erwarten. Die relevanten Peaks sind in den Produktmassen aufgelistet.

Produktmassen: 83,2; 130,25; 171,25; 209,15; 282,35; 323,35; 402,4; 497,60; 546,70; 668,40; 706,80 m/z

4.5.4.3 Mit TAT behandelter Latex

Im Vergleich wurde der Acetonitril Extrakt (siehe 3.5.5) von TAT behandeltem Latex auf dieselbe Weise mittels HILIC untersucht. Das Ergebnis ist in folgendem Spektrum sichtbar.

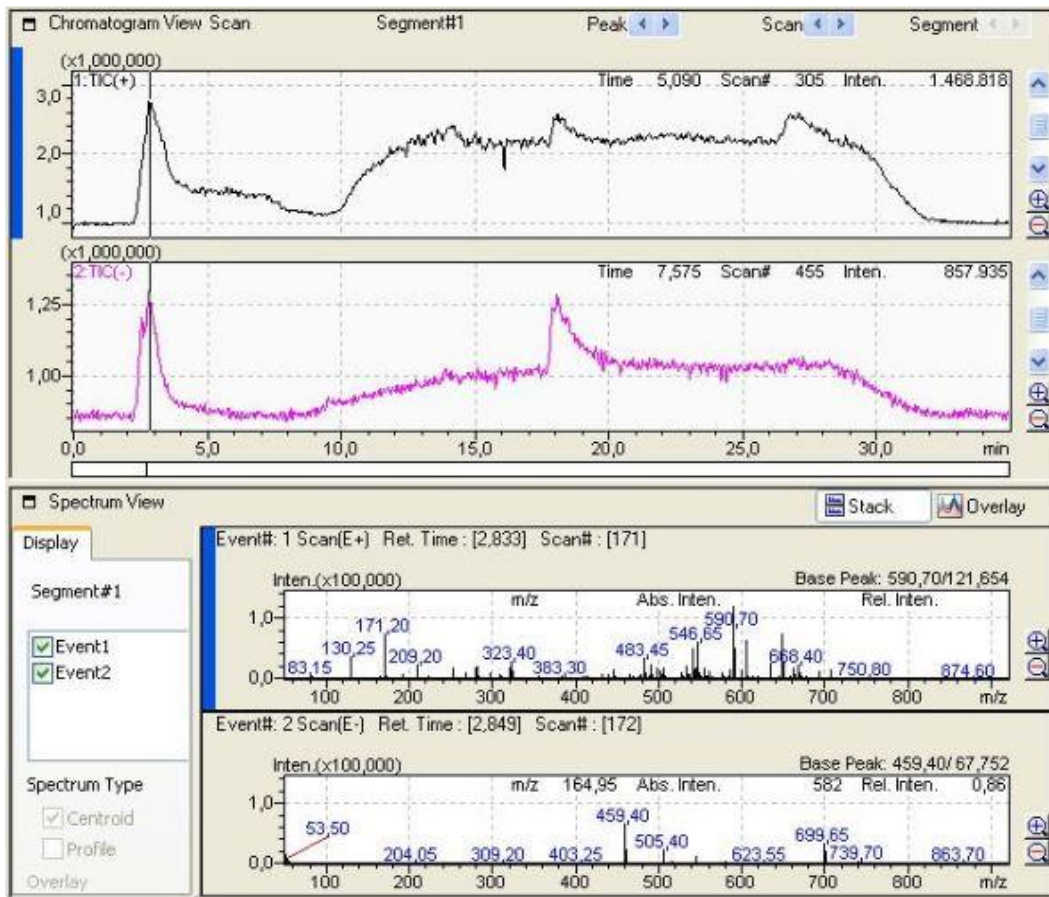


Abb.62 Ergebnis der HILIC Messung

Retentionszeit $t_R=2,833$ min

Produktmassen: 83,2; 130,25; 171,25; 209,20; 323,35; 383,3; 483,45; 546,65; 590,7; 668,4; 750,80 m/z

Sowohl die Chromatogramme aus 4.5.4.2 und 4.5.4.3, als auch die Spektren zeigten bei beiden Extrakten ein ähnliches Bild. TAT erschien im Extrakt nicht und lag somit unter der Nachweisgrenze von 16 µg/ml.

4.6 1,3,5-Triallyl-1,3,5-triazin-2,4,6-trion (TATATO)

4.6.1 1,3,5-Triallyl-1,3,5-triazin-2,4,6-trion Modellreaktionen

Modellreaktionen mit TATATO wurden durchgeführt, da dieses Molekül strukturelle Ähnlichkeiten mit dem aus Kapitel 4.5 verwendeten TAT aufweist. Es sollte herausgefunden werden, ob sich Allylgruppen für Modifikationen an Latexproteinen eignen. Das Spektrum nach 20,5 Stunden glich im Wesentlichen dem Ergebnis nach einer Stunde, weshalb nur dieses mit reinem TATATO verglichen wird, was in folgender Abbildung zu sehen ist.

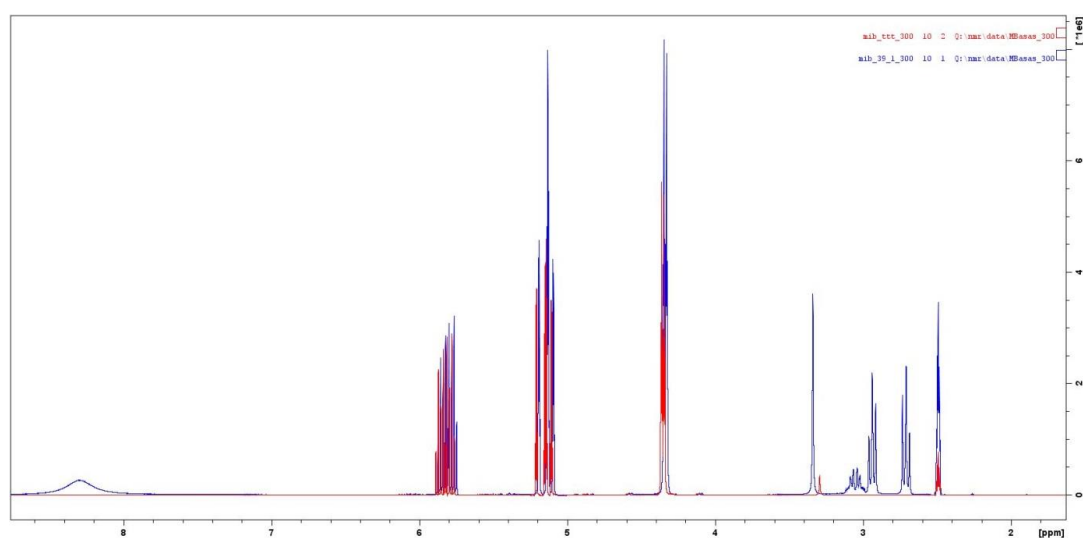


Abb.63 Überlagerung der ¹H-NMR Spektren von reinem TATATO und des Reaktionsgemisches

Es erfolgte keine Umsetzung mit dem Cysteamin, wie die Überlagerung des Protonen Spektrums von reinem TATATO mit der Reaktionslösung zeigte. Zur Kontrolle dieses Ergebnisses wurde dieselbe Reaktion in einem anderen Lösungsmittel (THF) erneut durchgeführt. Es wurde ebenfalls nach einer Stunde ein NMR Spektrum von dieser Reaktionslösung aufgenommen (Abb.64).

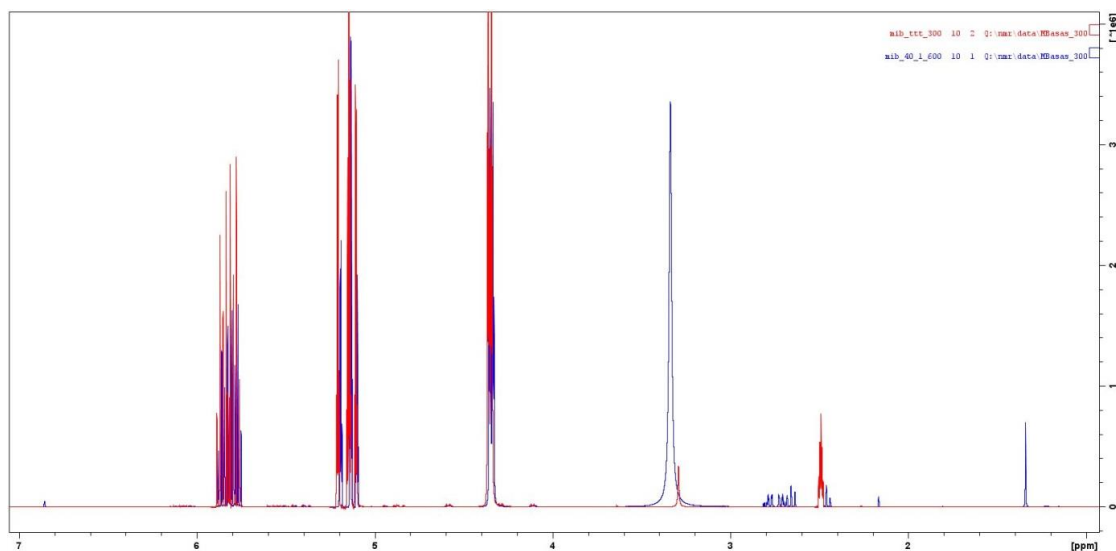


Abb.64 Überlagerung von ¹H-NMR Spektren von reinem TATATO und des Reaktionsgemisches

Das erhaltene Spektrum glich dem aus dem Versuch der Umsetzung in Wasser. Daher war davon auszugehen, dass die Allylgruppen nicht reaktiv genug waren, um eine Reaktion mit Proteinen einzugehen.

4.6.2 Triallyl-1,3,5-triazin-2,4,6-trion (TATATO) MALDI-TOF

Zur Überprüfung der Ergebnisse aus den Modellversuchen, wurde daher eine Behandlung mit TATATO am Latex ausgeführt. Da sich auch in diesem Versuch das Ergebnis nach 24 Stunden nicht von dem nach einer Stunde Reaktionszeit unterschied, wird hier exemplarisch für die Reaktion nur das Spektrum nach einer Stunde Reaktionszeit gezeigt.

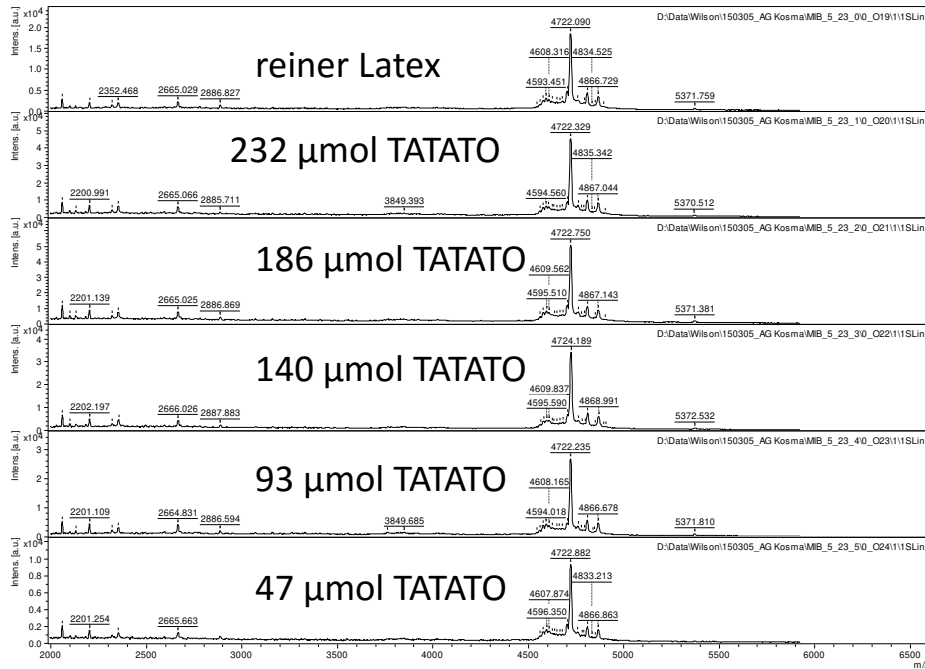


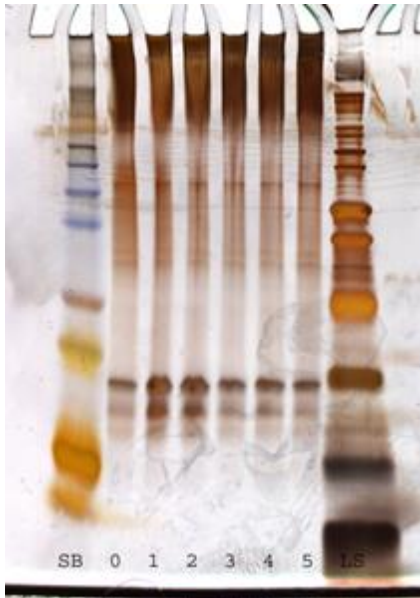
Abb.65 MALDI-TOF Spektrum von TATATO behandeltem Latex

Das Spektrum zeigte, dass es zu keiner Modifikation am Hevein aus dem Latex gekommen war. Dies war unabhängig von der eingesetzten Konzentration an TATATO. Aus beiden erhaltenen Resultaten, sowohl den Modellreaktionen als auch der MALDI-TOF Untersuchung, konnte geschlossen werden, dass die Allylgruppen nicht reaktiv genug waren, um Latexproteine zu modifizieren.

4.7 Glucose und Fructose

4.7.1 Glucose Electrophorese

Zunächst wurde die Gelelektrophorese von dem mit Glucose behandelten Latex durchgeführt. Diese sollte in der Lage sein, gröbere Veränderungen am REF zu detektieren. Das Ergebnis ist in folgender Abbildung sichtbar.



SB ... SeeBlue® Standard

LS... Mark 12™ unstained standard

0... reiner Latex

1... Latex mit 200 µl (304,7 µmol) Glucose

2... Latex mit 100 µl (152,4 µmol) Glucose

3... Latex mit 75 µl (114,3 µmol) Glucose

4... Latex mit 50 µl (76,2 µmol) Glucose

5... Latex mit 25 µl (38,1 µmol) Glucose

Abb.66 SDS-Page 18% Tris-Glycin Gel

Das Gel zeigte in den ersten beiden Spalten des mit Glucose behandelten Latex etwas breitere Banden im Vergleich zur Referenz mit reinem Latex (Spalte 0). Diese Bandenverbreiterung könnte allerdings auch durch eine Veränderung des Laufverhaltens durch die zugesetzten Kohlenhydrate zu Stande gekommen sein. Da die Elektrophorese nur bedingt Aufschluss über kleinere Modifikationen an Proteinen geben kann, wurde die Behandlung von Latex mit Kohlenhydraten auch mittels MALDI-TOF untersucht.

4.7.1.1 D-Glucose (DGc) MALDI-TOF

Die einstündige Behandlung des Latex mit Glucose lieferte in der MALDI-TOF Messung folgendes Spektrum:

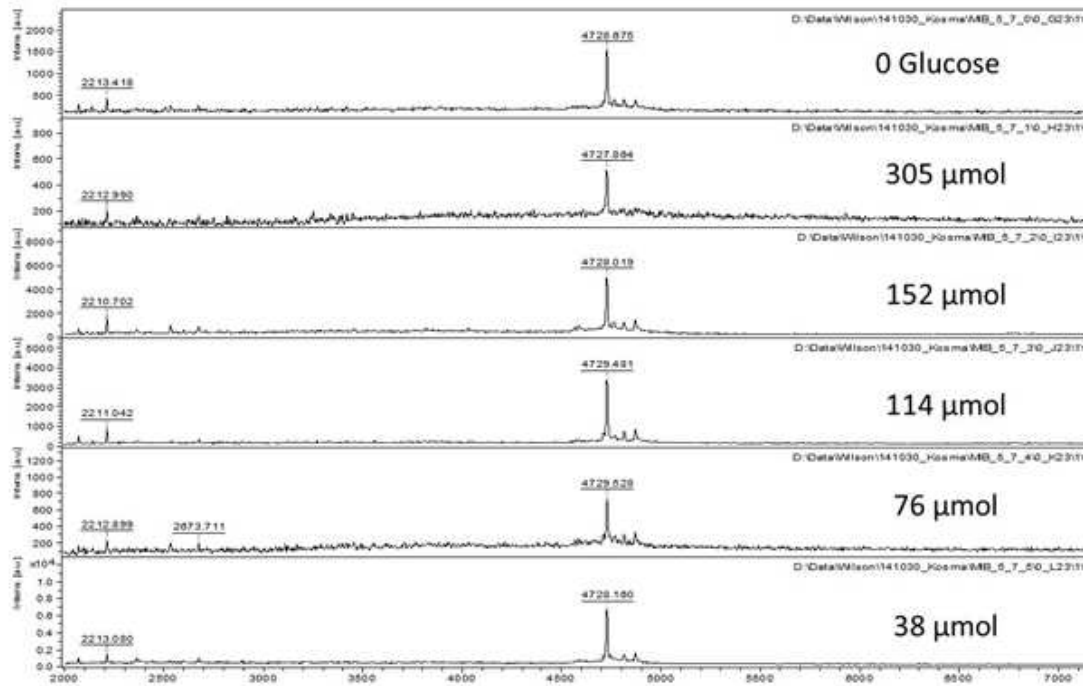


Abb.67 MALDI-TOF Spektrum von Latex mit Glucose

Es zeigte sich, dass keine Veränderung im Bereich des Heveins von 4,7 kDa auftrat. Es war daher anzunehmen, dass die Bandenverbreiterung aus der Elektrophorese nur durch ein anderes Laufverhalten ausgelöst wurde. Wie sich im MALDI-TOF Spektrum zeigte, war die Glucose nicht in der Lage Hevein zu modifizieren. Dieses Ergebnis sollte daher auch auf den REF zutreffen.

Um dieses Ergebnis zu überprüfen, wurde in einem zweiten Versuch der Latex für 72 Stunden einer Behandlung mit Glucose ausgesetzt. Das Ergebnis ist in Abbildung 68 sichtbar.

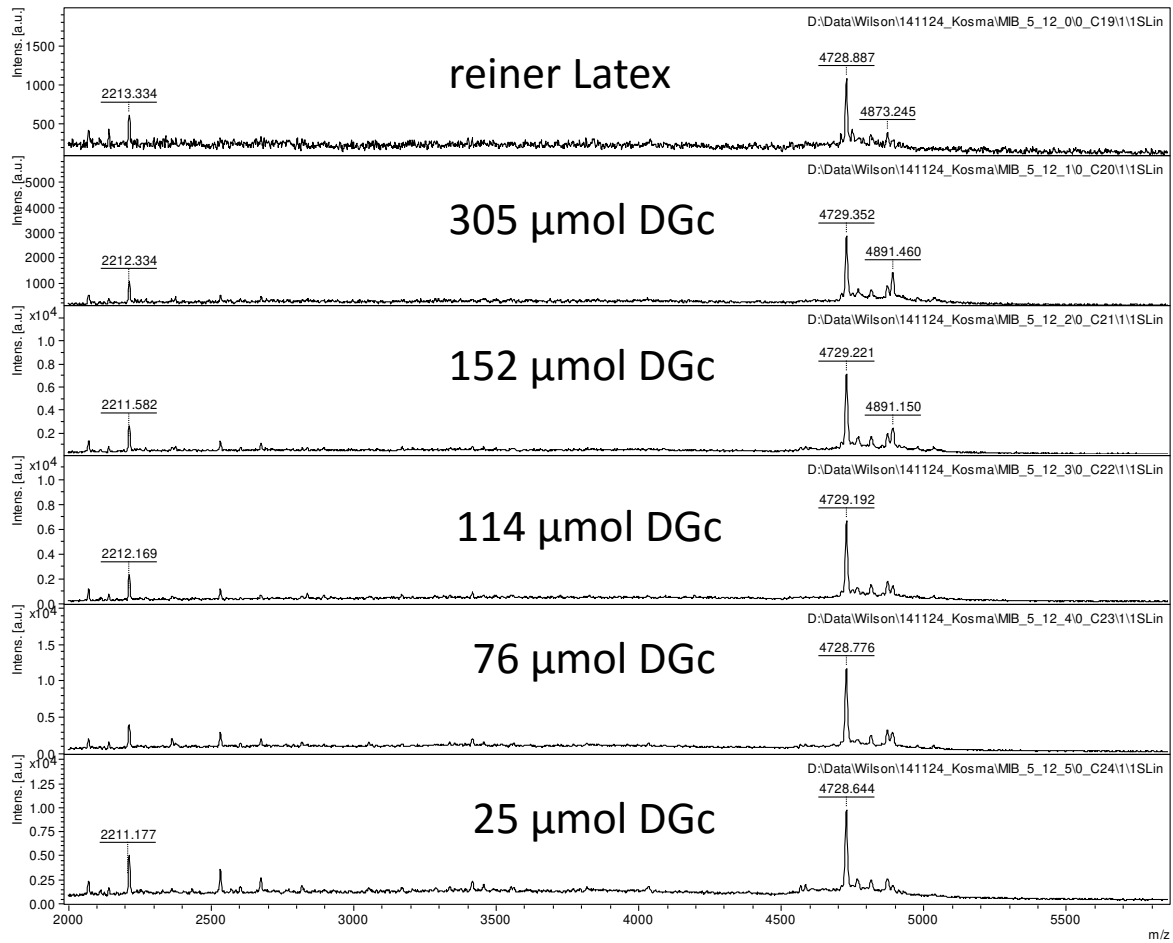


Abb.68 MALDI-TOF Spektrum von Latex behandelt mit Glucose für 24 Stunden

Es zeigte sich bei dem Einsatz der beiden höchsten Konzentration an Glucose (305 und 152 µmol) eine partielle Modifikation mit einer Glucose Einheit. Die Einwirkungsdauer war dabei allerdings so lange, dass der Latex bereits von sich aus koagulierte, weshalb diese Art der Behandlung keine günstige Option der Modifikation von Latexproteinen darstellt.

4.7.2 D-Fructose MALDI-TOF

Das Ergebnis aus dem Spektrum nach eintägiger Behandlung des Latex mit Fructose wird in folgender Abbildung sichtbar:

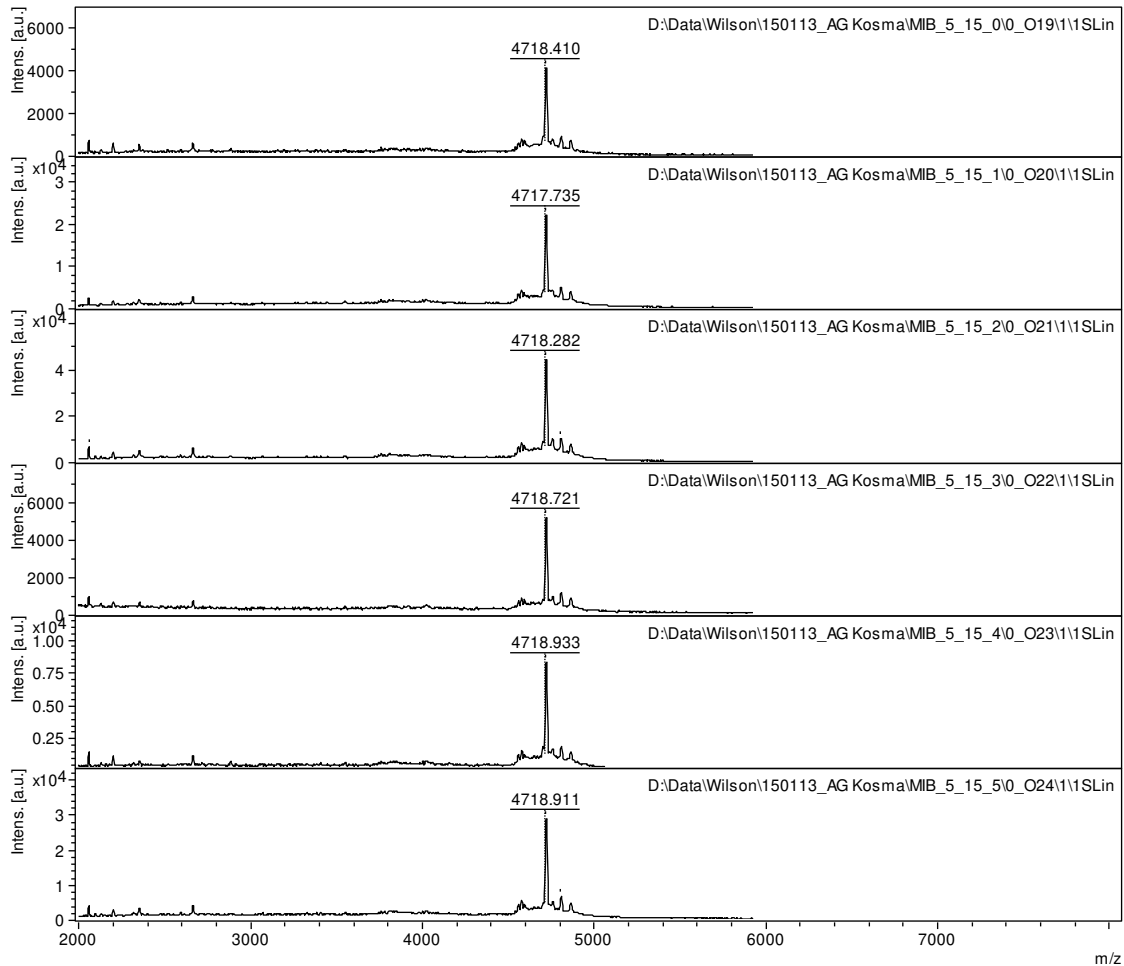


Abb.69 MALDI-TOF Spektrum von Latex mit Fructose

Es zeigt sich, dass bei der Behandlung mit Fructose keinerlei Modifikation nach 24 Stunden am Hevein stattfindet.

5 Diskussion und Fazit

Bei der Suche nach neuen Molekülen, die für den Einsatz sowohl an unbehandeltem, als auch behandeltem Latex geeignet sind, konnten einige Verbindungen gefunden werden, die den Anforderungen der Herabsetzung des allergenen Potentials im fertigen Gummiprodukt, gerecht werden. Durch den Einsatz von Gelelektrophorese und MALDI-TOF konnte gezeigt werden, ob und wie eine Modifikation stattgefunden hat. Die Auswertung der ermittelten Daten konnte eine Prognose abgeben, ob und wie weit eine Modifikation durch eine funktionelle Gruppe an Latexallergenen stattgefunden hat. Dies erweist sich vor allem in Zukunft als wichtig, da es durch diese Methoden erheblich erleichtert wird neue Moleküle zu finden, welche den geforderten Ansprüchen gerecht werden.

Im Detail deckt die Messung mit Hilfe der Gelelektrophorese dabei den Bereich größerer Moleküle (<10 kDa) gut ab. Die Messgenauigkeit für die Modifikation mit kleinen Molekülen ist dabei allerdings nur dann gegeben, wenn die Veränderungen am Molekulargewicht so groß sind, dass sie mittels Elektrophorese sichtbar gemacht werden. Dies konnte anhand des Beispiels der Modifikation von BSA mit DVS gezeigt werden.

Im Gegensatz dazu liefert die MALDI-TOF eine viel genauere Auflösung und kann auch bei höheren Molekulargewichten (> 10 kDa) noch eingesetzt werden. Die Analyse mittels MALDI-TOF hat zudem auch den Vorteil, dass sie auch Modifikationen mit kleinen Molekülen (<10 kDa), selbst bis hin zu Molekülfragmenten erkennbar macht.

5.1 Modellreaktionen:

Durch die Modellreaktionen mit Cysteamin konnte im Vorfeld abgeklärt werden, wie die funktionellen Gruppen mit den Amino- und Thiogruppen reagieren. Dabei konnte mit Hilfe der NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden welche Reaktionsprodukte entstehen können. Durch den Einsatz des bifunktionalen Mercaptoethylamins konnte gezeigt werden, dass es bevorzugt die Thiogruppen sind, die eine Reaktion mit den eingesetzten Reagenzien eingehen. Der Einsatz von Cyanurchlorid als funktionelle Gruppe, lieferte Hydrolyse Produkte unter alkalischen Bedingungen. Dasselbe gilt für den Einsatz von DMTZ. Die Reaktion mit DVS zeigte eine hohe Reaktivität mit den Thiogruppen im Sinne einer Michael Addition. Ein ähnliches Verhalten hat das TAT bei der Reaktion mit Cysteamin gezeigt. Hierbei reagieren die Acryloylgruppen mit den Thiogruppen des Cysteamins. Im Gegensatz dazu reagierte TATATO mit seinen Allylgruppen mit dem Cysteamin nicht.

5.2 SDS-Page:

Bei den Polyacrylamidgelelektrophoresen hat sich gezeigt, dass die Banden des REF sichtbar gemacht werden können. Ein Zusatz an Reduktionsmitteln wie etwa DTT oder Mercaptoethanol brachte keine Verbesserung der Auflösung der Banden. Bei der Behandlung des Latex mit DVS konnten keine Unterschiede im Laufverhalten des REF festgestellt werden. DVS zeigte allerdings bei der Behandlung von BSA eine deutliche Modifikation. Dies erklärt sich, da im BSA 35 zugängliche Aminogruppen vorhanden sind, und diese somit modifiziert werden können. Auch bei den anderen funktionellen Gruppen wie Cyanurchlorid, Glucose und DMTZ ist die Modifikation des REF so gering, dass kein Unterschied im Gel zum unbehandelten REF festzustellen ist.

Allerdings kommt es beim Einsatz von TAT zu einer deutlichen Bandenverbreiterung, was auf eine Polymerisation des REF schließen lässt.

5.3 MALDI-TOF:

Die Behandlung von BSA mit DVS hat gezeigt, dass es möglich ist die zur Verfügung stehenden Aminogruppen zu modifizieren. Daher führte die Behandlung von Latex mit DVS auch zu einer Modifikation des im Latex enthaltenen Heveins. Hierbei wurde eine Beladung von zwei bis fünf DVS-Gruppen erreicht. Bei dem mit Cyanurchlorid behandelten Latex entstanden Hydrolyse Produkte und es konnte eine Beladung mit bis zu vier dieser Gruppen erreicht werden. Ein ähnliches Verhalten zeigte auch das DMTZ. Der Glutaraldehyd konnte hingegen das Hevein nicht modifizieren. Auch bei der Behandlung mit Glucose und Fructose kam es zu keiner Modifikation des Heveins. Durch den Einsatz des TAT konnte das Hevein komplett polymerisiert werden. Bei der Behandlung des Latex mit TATATO konnte keine Modifikation erzielt werden.

5.4 FITkit® Tests und Aminosäuren Analyse

Die mit DVS hergestellten Handschuh Muster haben deutlich gezeigt, dass es durch den Zusatz der Chemikalie zu einer Reduktion der allergieauslösenden Proteine im fertigen Produkt gekommen war. Dabei konnte das Hev b 5 unter die Nachweisgrenze von 0,025 µg/g reduziert werden. Hevein selbst konnte bei Behandlung der Hansamischung mit DVS um etwa 25% reduziert werden. Bei der DVS Zugabe zum unbehandelten Latex zeigte sich ein ähnliches Verhalten. Bei geringer Zugabe von 12,5 mmol/l konnte das Hev b 5 um die Hälfte reduziert werden. Durch Zusatz der doppelten Menge an DVS kam es zur Reduktion des Hev b 5 unter die Nachweisgrenze und eine Verringerung von Hevein um 64%.

Die Aminosäuren Analyse lieferte hingegen keine einheitlichen bzw. vorhersehbaren Ergebnisse. So zeigte sich bei der mit DVS behandelten Hansamischung bei der höchsten eingesetzten Menge von 50 mmol/l eine relativ hohe Löslichkeit an Proteinen von 58,9 µg/g. Bei den geringeren DVS Konzentrationen zeigte sich hingegen keine deutlich abweichende Löslichkeit der Proteine im Vergleich zu dem hergestellten Muster aus der Produktion.

5.5 Getestete Reagentien

5.5.1 DVS

Das DVS stellte sich, durch seine aktivierten Vinylgruppen, als potentes Reagens zur Modifikation von Latexproteinen und Peptiden heraus. Dieses war auf Grund seiner Reaktivität ein probates Mittel um Latexproteine zu modifizieren. Die zunächst durchgeführten Modellreaktionen bestätigten die Annahme, dass eine Reaktion mit den Thio- und Aminogruppen des Cysteamins stattfand. Auf Grund der hohen Reaktivität entstanden in den Modellversuchen heterogene Produkte, daher wurden diese mittels SDS-Page weiter untersucht. Es wurde abgeklärt, ob ein Zusatz an DTT und Mercaptoethanol in der Elektrophorese eine bessere Trennung zur Folge hatte. Nachdem dies nicht der Fall war, wurde anhand der Gele eine leichte Veränderung im Laufverhalten durch die Behandlung mit DVS festgestellt. Da diese Veränderungen am Molekulargewicht der Proteine nur gering waren, konnten sie allerdings nicht bei allen Gelen nachvollzogen werden. Allerdings lieferte der Versuch mit BSA ein eindeutiges Ergebnis, welches die erfolgreiche Modifikation verdeutlichte.

In der Folge wurden daher genauere Untersuchungen mittel MALDI-TOF unternommen, die eine Modifikation an Hevein deutlich sichtbar machten. Diese Modifikationen waren nicht nur an den Latexproteinen zu erkennen, sondern auch an BSA. Das DVS wurde anschließend als Additiv, sowohl im unbehandelten Latex, wie auch in der fertigen Hansa-Mischung zugesetzt. Auf diese Weise wurde die Chemikalie auf ihre Prozesstauglichkeit hin überprüft, indem hypoallergene Handschuhmuster gefertigt wurden. Wie in Tabelle 26. und 27. gezeigt, konnte dadurch eine Reduktion der Hauptallergene im Latex erreicht werden. Unter Einhaltung der *R- und S-Sätze*, sowie dem Umgang mit der Chemikalie und der Einhaltung der Sicherheitsinformationen gemäß dem *Global harmonisiertem System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien*, könnte DVS als Additiv in der Produktion von Latexprodukten zum Einsatz kommen. Die Handhabung sollte dabei durch chemisch geschultes Personal erfolgen. Dabei müssen die staatlichen Vorgaben für wassergefährdende Substanzen eingehalten werden.

5.5.2 Cyanurchlorid

Das Cyanurchlorid lieferte auf Grund seiner Struktur und den alkalischen Bedingungen Hydrolyse Produkte. Dieses Verhalten konnte auf Grund der Modellreaktionen nachvollzogen werden. In der SDS-Page zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede im Laufverhalten der Proteine, weshalb diese mittels MALDI-TOF weiter untersucht wurden. Unter diesen Umständen konnte eine erfolgreiche Modifikation am Hevein bestätigt werden. (Allerdings nicht durch das ursprünglich eingesetzte Cyanurchlorid, sondern vielmehr durch dessen Hydrolyse Derivate). Die enthaltenen Chloratome wurden dabei im ammoniakalischen Milieu durch Amino- und Hydroxygruppen substituiert. Es ist daher notwendig die Prozesstauglichkeit dieses Stoffes noch weiter zu untersuchen. Bei der Handhabung des Stoffes sollten auf Grund seiner irritierenden Eigenschaften - auf Haut, Augen und Lunge - Handschuhe und Schutzmaske getragen werden.

5.5.3 DMTZ

Das DMTZ lieferte auf Grund seiner strukturellen Ähnlichkeit mit dem Cyanurchlorid ähnliche Ergebnisse. Die Chlorsubstituenten wurden im wässrigen Medium substituiert, wohingegen die Methoxygruppe erhalten blieb. Auf eine Untersuchung mittels SDS-Page wurde daher verzichtet. Die MALDI-TOF Untersuchung lieferte, wie auch schon bei Cyanurchlorid, eine Modifikation durch die Hydrolyse Produkte. Für den Einsatz von DMTZ gelten im Wesentlichen dieselben Bestimmungen wie für das Cyanurchlorid. Ein wichtiger Punkt bei der Handhabung ist die Vermeidung von Staub, da dieser eine Gefährdung der Atemwege und der Haut zur Folge hat.

5.5.4 Glutaraldehyd

Der Glutaraldehyd wurde eingesetzt, da er in unterschiedlichen Formen in Lösung vorliegt und somit viele Reaktionsmöglichkeiten vorhanden sein sollten. Die Modellreaktion bestätigte dabei, dass Konjugationsprodukte mit dem Cysteamin entstanden sind. Daher wurde anschließend versucht, dies anhand der SDS-Page zu verifizieren. Diese lieferte bei Konzentrationen $> 49 \mu\text{mol} / \text{ml}$ Latex ein vollständiges Verschwinden der REF Banden. Damit konnte gezeigt werden, dass Glutaraldehyd reaktiv genug ist, um Latexproteine zu modifizieren. In der Folge wurden Untersuchungen mittels MALDI-TOF durchgeführt, welche speziell auf Modifikationen am Hevein abzielten. Es stellte sich dabei heraus, dass der Glutaraldehyd, je nach eingesetzter Menge, das Hevein zwar nicht modifizieren, sondern die vorhandenen Mengen im Latex reduzieren konnte. Dieses Verhalten zeigt eine Ähnlichkeit mit dem TAT, was in 5.5.5 gezeigt wird. Da der

Glutaraldehyd als wässrige Lösung vertrieben wird, sollten beim Einsatz der Chemikalie Verdünnungseffekte berücksichtigt werden. Bei der Handhabung sollten Schutzkleidung und Handschuhe, sowie eine Schutzbrille getragen werden. Der Arbeitsbereich sollte dabei über eine ausreichende Belüftung verfügen und der Umgang mit der Chemikalie nur durch geschultes Personal erfolgen. Die Deaktivierung des Wirkstoffes kann entweder durch Verdünnung, oder durch Zusatz an Natriumbisulfit bzw. Natronlauge erreicht werden. Dabei sollte die Entsorgung der Abwässer den nationalen Vorschriften entsprechen.

5.5.5 TAT

Durch den Einsatz des Triacryloylhexahydrotriazin konnte eine Reaktion mit dem Cysteamin im Modellversuch bestätigt werden. Die Acryloylgruppen sind dabei reaktiv genug um eine Reaktion mit den Thio- und Aminogruppen des Cysteamins einzugehen. Daher wurde der Einfluss der Chemikalie auf den Latex mittels SDS-Page überprüft. Es zeigte sich dabei, dass der REF polymerisierte, was sich in breiten Banden äußerte. Um die Frage zu klären, wie sich der Einsatz des TATs auf das Hevein auswirkte, wurden anschließend Untersuchungen mittels MALDI-TOF durchgeführt. Dabei wurde sowohl reines TAT, als auch ein Zusatz an α - sowie β -Cyclodextrin verwendet. Es konnte festgestellt werden, dass ab einer Konzentration von 17,25 μmol TAT pro ml Latex, eine Polymerisation des Heveins bereits nach einer Stunde stattgefunden hat. Bei den Versuchen mit den Cyclodextrinen herrschten jedoch deutlich mildere Reaktionsbedingungen, weshalb unter diesen Umständen die Polymerisation ausblieb und stattdessen eine Modifikation stattfand. Durch eine Verlängerung der Reaktionszeit kam es schließlich, auch mit dem Zusatz an Cyclodextrinen, zur Polymerisation. Bei der Extraktion der mit TAT hergestellten Gummifilme zeigte sich, dass die eingesetzten wirksamen Mengen im Endprodukt unter der mittels HILIC detektierbaren Nachweisgrenze lagen. TAT bringt somit ein interessantes Potential bei der Reduktion der Latexproteine mit sich. Bei der Handhabung in der Produktion müssen auf Grund der Toxizität des Stoffes Vorsichtsmaßnahmen ergriffen werden. Nicht nur Schutzhandschuhe, Schutzkleidung, Augenschutz und Gesichtsschutz sind anzuraten, sondern bei größeren Mengen auch ein vollständiger Chemieschutzanzug. Nicht umgesetzte Mengen der Chemikalie sind einem anerkannten Entsorgungsunternehmen zuzuführen. Untersuchungen zur Bioverträglichkeit im Endprodukt sind in jedem Fall vor dem Vertrieb der Produkte unerlässlich.

5.5.6 TATATO

Mit Hilfe von TATATO konnte, trotz struktureller Ähnlichkeiten zum TAT, keine Reaktion mit Cysteamin erreicht werden. Dieses Ergebnis wurde auch mittels MALDI-TOF, bei Behandlung des Latex, bestätigt. Die Allylgruppen des TATATOs waren nicht reaktiv genug um Modifikationen an Proteinen zu erzielen. Diese Substanz ist daher für den Einsatz bei der Erzeugung hypoallergener Latexprodukte ungeeignet.

5.5.7 Glucose und Fructose

Die Untersuchung der Glucose mittels SDS-Page lieferte kein aussagekräftiges Ergebnis in Bezug auf die Modifikation der im Latex enthaltenen Proteine. In der MALDI-TOF Untersuchung zeigte sich, dass durch dessen Einsatz keine Modifikation am Hevein innerhalb einer Stunde erreicht werden konnte. Erst bei einer längeren Reaktionsdauer von 72 Stunden traten leichte Modifikationen am Hevein auf. Trotzdem ist der Einsatz der Glucose nicht sinnvoll, da der Latex durch die in ihm enthaltenen Proteine zur Koagulation neigt. Bei der Fructose stellte sich ebenfalls

nach einem Tag Reaktionszeit keine Modifikation des Heveins ein. Beide Stoffe sind chemisch unbedenklich und bedürfen keiner besonderen Handhabung. Nichtsdestotrotz sind sie zur Modifikation der Latexproteine ungeeignet.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Berthelot, K.; Lecomte, S.; Estevez, Y.; Zhendre, V.; Henry, S.; Thevenot, J.; Dufourc, E. J.; Alves, I. D.; Peruch, F. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1838* (1 Pt B), 287-99.
- [2] Tomazic-Jezic, V. J.; Lucas, A. D. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **2002**, *110* (2 Suppl), S40-6.
- [3] Baur, X.; Chen, Z.; Posch, A.; Rihs, H.-P.; Raulf-Heimsoth, M.; Allmers, H. *Deutsches Ärzteblatt* **1997**, *94* (22).
- [4] Reyes-López, C. A.; Hernández-Santoyo, A.; Pedraza-Escalona, M.; Mendoza, G.; Hernández-Arana, A.; Rodríguez-Romero, A. *BBRC* **2004**, *314* (1), 123-130.
- [5] Karisola, P.; Mikkola, J.; Kalkkinen, N.; Airene, K. J.; Laitinen, O. H.; Repo, S.; Pentikäinen, O. T.; Reunala, T.; Turjanmaa, K.; Johnson, M. S.; Palosuo, T.; Kulomaa, M. S.; Alenius, H. *J. Immunol.* **2004**, *172* (4), 2621-2628.
- [6] Lee, Y. K.; Lay, L. K.; Mahsufi, M. S.; Guan, T. S.; Elumalai, S.; Thong, O. M. *PJPS* **2012**, *25* (3), 645-50.
- [7] Asensio, J. L.; Canada, F. J.; Bruix, M.; Rodriguez-Romero, A.; Jimenez-Barbero, *FEBS J.* **1995**, *230* (2), 621-33.
- [8] Van Parijs, J.; Broekaert, W. F.; Goldstein, I. J.; Peumans, W. J. *Planta* **1991**, *183* (2), 258-64.
- [9] Broekaert, I.; Lee, H. I.; Kush, A.; Chua, N. H.; Raikhel, N. *PNAS* **1990**, *87* (19), 7633-7.
- [10] Yeang, H. Y.; Cheong, K. F.; Sunderasan, E.; Hamzah, S.; Chew, N. P.; Hamid, S.; Hamilton, R. G.; Cardosa, M. J. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **1996**, *98* (3), 628-39.
- [11] Peixinho, C.; Tavares-Ratado, P.; Tomas, M. R.; Taborda-Barata, L.; Tomaz, C. T. *Br BJD* **2008**, *159* (1), 132-6.
- [12] Dai, L.; Kang, G.; Li, Y.; Nie, Z.; Duan, C.; Zeng, R. *Plant Mol Biol* **2013**, *82* (1-2), 155-68.
- [13] Raulf-Heimsoth, M.; Chen, Z.; Liebers, V.; Allmers, H.; Baur, X. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **1996**, *98* (3), 640-651.
- [14] Agrawal, A. A.; Konno, K. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **2009**, *40*, 311-331.
- [15] Ranta, P. M.; Ownby, D. R. *Clin. Infect. Dis.* **2004**, *38* (2), 252-256.
- [16] Melioli, G.; Spenser, C.; Reggiardo, G.; Passalacqua, G.; Compalati, E.; Rogkakou, A.; Riccio, A. M.; Di Leo, E.; Nettis, E.; Canonica, G. W. *World Allergy Organ J.* **2014**, *7* (1), 15-15.
- [17] Esah Yip, K. T., K. P. Ng and K. L. Mok. *J. nat. Rubb. Res.* **1994**, (9(2)), 79-86.
- [18] van Och, F. M. M. Assesment of the sensitizing potency of low molecular weight chemicals. Universiteit Utrecht, **2002**.
- [19] Pisati, G.; Baruffini, A.; Bernabeo, F.; Stanizzi, R. *Eur. Respir. J.* **1994**, *7* (2), 332-6.

- [20] Tomazic, V. J.; Shampaine, E. L.; Lamanna, A.; Withrow, T. J.; Adkinson, N. F., Jr.; Hamilton, R. G. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **1994**, *93* (4), 751-8.
- [21] Ylitalo, L.; Makinen-Kiljunen, S.; Turjanmaa, K.; Palosuo, T.; Reunala, T. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **1999**, *104* (1), 177-80.
- [22] Allmers, H.; Schmengler, J.; John, S. M. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **2004**, *114* (2), 347-351.
- [23] Mazón, A.; Nieto, A.; Estornell, F.; Nieto, A.; Reig, C.; García-Ibarra, F. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **1997**, *99* (5), 600-604.
- [24] Lundberg, M.; Wrangsjö, K.; Johansson, S. G. *Allergy* **1997**, *52* (12), 1222-8.
- [25] Cabanes, N.; Igea, J. M.; de la Hoz, B.; Agustin, P.; Blanco, C.; Dominguez, J.; Lazaro, M.; Lleonart, R.; Mendez, J.; Nieto, A.; Rodriguez, A.; Rubia, N.; Tabar, A.; Beitia, J. M.; Dieguez, M. C.; Martinez-Cocera, C.; Quirce, S.; Committee of Latex, A.; Seaic. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* **2012**, *22* (5), 313-30; quiz follow 330.
- [26] Palosuo, T.; Reinikka-Railo, H.; Kautiainen, H.; Alenius, H.; Kalkkinen, N.; Kulomaa, M.; Reunala, T.; Turjanmaa, K. *Allergy* **2007**, *62* (7), 781-786.
- [27] Palosuo, T.; Antoniadou, I.; Gottrup, F.; Phillips, P. *Int. Arch. Allergy. Immunol.* **2011**, *156* (3), 234-46.
- [28] Palosuo, T.; Makinen-Kiljunen, S.; Alenius, H.; Reunala, T.; Yip, E.; Turjanmaa, K. *Allergy* **1998**, *53* (1), 59-67.
- [29] Cremer, R.; , H.-P. R.; Raulf-Heimsoth, a. M. Natural Rubber Latex Allergy in Pediatric Patients.
http://www.researchgate.net/publication/228641550_Natural_Rubber_Latex_Allergy_in_Pediatric_Patients (accessed 5.8.2015).
- [30] Peter P W Weiss MSc., P., C.Chem., FRSC. Natural Rubber Latex Protein Allergy: A literature review and a survey of the major allergens in household products taken from the German retail market. <http://www.icmrs.org/project/latex-report/> (accessed 5.8.2015).
- [31] Yagami, A.; Suzuki, K.; Saito, H.; Matsunaga, K. *Allergol Int* **2009**, *58* (3), 347-55.
- [32] Paramelle, D.; Miralles, G.; Subra, G.; Martinez, J. *Proteomics* **2013**, *13* (3-4), 438-56.
- [33] Wang, C.; Qi, C. *Tetrahedron* **2013**, *69* (26), 5348-5354.
- [34] Lopez-Jaramillo, F. J.; Hernandez-Mateo, F.; Santoyo-Gonzalez, F. *Vinyl Sulfone: A Multi-Purpose Function in Proteomics*. INTECH Open Access Publisher: **2012**.
- [35] Morales-Sanfrutos, J.; Lopez-Jaramillo, J.; Ortega-Munoz, M.; Megia-Fernandez, A.; Perez-Balderas, F.; Hernandez-Mateo, F.; Santoyo-Gonzalez, F. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8* (3), 667-675.
- [36] West, J. D.; Stamm, C. E.; Brown, H. A.; Justice, S. L.; Morano, K. A. *Chem. Res. Toxicol.* **2011**, *24* (9), 1457-1459.

- [37] Chatani, S.; Nair, D. P.; Bowman, C. N. *Polym. Chem.* **2013**, *4* (4), 1048-1055.
- [38] Banerjee, R.; Brown, D. R.; Weerapana, E. *Synlett* **2013**, *24* (13), 1599-1605.
- [39] Migneault, I.; Dartiguenave, C.; Bertrand, M. J.; Waldron, K. C. *Biotechniques* **2004**, *37* (5), 790-6, 798-802.
- [40] Chen, Z.; Posch, A.; Lohaus, C.; Raulf-Heimsoth, M.; Meyer, H. E.; Baur, X. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **1997**, *99* (3), 402-406.

7 Anhang

7.1 Lowry Test Resultate

.....

09.10.2018 Simon Peters

Protein	Sample	Ext. 280 nm	A ₂₈₀	A ₂₈₀ / A ₂₁₅	A ₂₁₅	A ₂₁₅ / A ₂₈₀	Ext. 215 nm	Ext. 215 nm / A ₂₈₀	Ext. 215 nm / A ₂₁₅	Ext. 215 nm / A ₂₈₀ / A ₂₁₅	Ext. 215 nm / A ₂₈₀ / A ₂₁₅ / A ₂₈₀
01.10.2018	100% H ₂ O	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
02.10.2018	100% H ₂ O	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
03.10.2018	100% H ₂ O	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
04.10.2018	100% H ₂ O	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

350

10-5-13

Protokoll-Nr.	Lot-Nr.	Vend (l)	d	k	Gleichung	ABS	Protein-Gehalt (µg/ml)	Bemerkung	Name
27.10.2014	MIB 248:3 reif - Embryonalhuhn in Wasser	1	0,0121	0,0074	$y=C(0074x+C(0,0121)$	0,017	0,66		H. Hans
27.10.2014	MIB 248:3 reif - Embryonalhuhn in Wasser	1	0,0121	0,0074	$y=C(0074x+C(0,0121)$	0,016	0,62		H. Hans
27.10.2014	MIB 248:3 reif - Embryonalhuhn in Wasser	1	0,0121	0,0074	$y=C(0074x+C(0,0121)$	0,017	0,66		H. Hans
27.10.2014	MIB 248:4 reif - Embryonalhuhn in Wasser	1	0,0121	0,0074	$y=C(0074x+C(0,0121)$	0,014	0,26		H. Hans
27.10.2014	MIB 248:4 reif - Embryonalhuhn in Wasser	1	0,0121	0,0074	$y=C(0074x+C(0,0121)$	0,015	0,36		H. Hans
27.10.2014	MIB 248:4 reif - Embryonalhuhn in Wasser	1	0,0121	0,0074	$y=C(0074x+C(0,0121)$	0,015	0,36		H. Hans
27.10.2014	MIB 102:1 & reif - Embryonalhuhn in Wasser mit Antikörper	3	0,0121	0,0074	$y=C(0074x+C(0,0121)$	0,360	140,64		H. Hans
27.10.2014	MIB 102:1 & reif - Embryonalhuhn in Wasser mit Antikörper	3	0,0121	0,0074	$y=C(0074x+C(0,0121)$	0,306	132,50		H. Hans
27.10.2014	MIB 102:1 & reif - Embryonalhuhn in Wasser mit Antikörper	3	0,0121	0,0074	$y=C(0074x+C(0,0121)$	0,398	144,26		H. Hans
27.10.2014	MIB 92:1 Reaktionssatz Div. 92J mit Antikörper	3	0,0121	0,0074	$y=C(0074x+C(0,0121)$	0,281	109,07		H. Hans
27.10.2014	MIB 92:1 Reaktionssatz Div. 92J mit Antikörper	3	0,0121	0,0074	$y=C(0074x+C(0,0121)$	0,250	99,46		H. Hans
27.10.2014	MIB 92:1 Reaktionssatz Div. 92J mit Antikörper	3	0,0121	0,0074	$y=C(0074x+C(0,0121)$	0,281	109,07		H. Hans
27.10.2014	MIB 92:1 Reaktionssatz Div. 92J mit Antikörper in reinem Wasser	1	0,0121	0,0074	$y=C(0074x+C(0,0121)$	0,014	0,26		H. Hans

27.10.2014 Hans

7.2 FITkit® Resultate



CERTIFICATE OF ANALYSIS FITkit® TESTING SERVICES

No QA14-0142

Customer: **Semperit Technische Produkte Gesellschaft mbH**
 Triester Bundesstraße 26,
 A-2632 Wimpassing, Austria

Description of samples: gloves
 Arrival date: 20 October 2014
 Testing method: Capture enzyme immunoassay method (EIA; IEMA)
 Compliant with: EN 455-3:2006; ASTM D7427 - 08

Test Results


Icosagen code	Sample code (as provided by customer)	Hev b 1 µg/g	Hev b 3 µg/g	Hev b 5 µg/g	Hev b 6.02 µg/g	Total µg/g
LAT14133	Reference	UQ	UQ	0.05	0.16	0.21
LAT14134	HS KTA 19	UQ	UQ	0.04	0.22	0.26
LAT14135	+10 mL DVS	UQ	UQ	UQ	0.12	0.12
LAT14136	+20 mL DVS	UQ	UQ	UQ	0.11	0.11
LAT14137	+40 mL DVS	UQ	UQ	UQ	0.12	0.12

UQ – Unquantifiable

Limits of quantitation:

Hev b 1 < 0.050 µg/g; Hev b 3 < 0.050 µg/g; Hev b 5 < 0.025 µg/g; Hev b 6.02 < 0.025 µg/g

03 November 2014



 Dagny Krinka
 Quality Manager

Note:

The results relate only to the tested items.
 The test certificate shall not be reproduced except in full, without written approval of Icosagen AS laboratory.

Icosagen AS



Eerika tee 1, Össu küla, Ülenurme vald 51713 Tartu maakond
 Phone +372 737 7080, Fax +372 737 7077, info@icosagen.ee
 Reg No: 10565884, VAT No: EE100533055



CERTIFICATE OF ANALYSIS
FITkit® TESTING SERVICES

No QA14-0151

Customer: **Semperit Technische Produkte Gesellschaft mbH**
Triester Bundesstraße 26,
A-2632 Wimpassing, Austria

Description of samples: gloves
Arrival date: 07 November 2014
Testing method: Capture enzyme immunoassay method (EIA; IEMA)
Compliant with: EN 455-3:2006; ASTM D7427 - 08

Test Results

Icosagen code	Sample code (as provided by customer)	Hev b 1 µg/g	Hev b 3 µg/g	Hev b 5 µg/g	Hev b 6.02 µg/g	Total µg/g
LAT14146	KTA-15 Kurant TWA1 (23.10.2014)	UQ	UQ	0.06	0.25	0.31
LAT14147	Reifung NK + 0,26phr DVS; Reifung 21.10.2014; TWA: 23.10.2014	UQ	UQ	0.03	0.21	0.24
LAT14148	Reifung NK + 0,5phr DVS; Reifung 20.10.2014; TWA1 22.10.2014	UQ	UQ	UQ	0.09	0.09

UQ – Unquantifiable

Limits of quantitation:

Hev b 1 < 0.050 µg/g; Hev b 3 < 3.050 µg/g; Hev b 5 < 0.070 µg/g; Hev b 6.02 < 0.075 µg/g

21 November 2014


Dagny Krinka
Quality Manager

Note:

The results related only to the tested item.

The test result shall not be reproduced except in full, without written approval of Icosagen AS laboratory.

Icosagen AS



Eerika tee 1, Össu küla, Ülenurme vald 61713 Tartumaa
Phone +372 737 7000, Fax +372 737 7077, info@icosagen.ee
Reg No: 10565884, VAT No: EE100573055
www.icosagen.ee

7.3 Aminosäuren Analyse

Universitätsklinikum
Erlangen



Hautklinik Ulmenweg 78 91054 Erlangen

Semperit
Technische Produkte GmbH
Segment Sempermed
Herr Daniel Stocker
Triester Bundesstraße 26

A – 2632 Wimpassing

Hautklinik am DNZ
Universitätsklinikum Erlangen
Direktor: Prof. Dr. med. univ. Gerold Schuler
Abteilung: Testlabor für Latexprodukte
Ansprechpartner: Dr. Mirko Kummer
Tel.: 09131/85 45834
Fax: 09131/85 33152
e-mail: mirko.kummer@uk-erlangen.de

Erlangen, 24. Februar 2015

Testprotokoll Proteinbestimmung

Messdatum: 18.11.2014 (mod. Lowry), 24.02.2015 (Aminosäurenanalyse, HPLC)
Probe: **Referenz-Handschuhe**
Lot: Muster
Analysen-Nr.: 10140501

Extraktion: Doppelhandschulmethode mit 0,1 M TES pH 7,4 (nach EN 455-3)

Messmethode: **Lowry modifiziert (nach EN 455-3):**
Farbentwicklung: Bio-Rad DC Protein Assay
Aminosäurenanalyse (HPLC):
Hydrolyse: 6 N Salzsäure 100°C, 48 h
Analyse: Trennung der Aminosäuren über HPLC nach
Vorsäulenderivatisierung mit o-Phthal-dialdehyd und
Quantifizierung im Fluoreszenzspektrometer.

Ergebnisse:

	Lowry (mod.) µg Protein / g Handschuh	Aminosäurenanalyse µg Protein / g Handschuh
Extraktion rechts	20,3	21,3
Extraktion links	24,6	
Mittelwert	22,5	21,3


Dr. Mirko Kummer



Hautklinik Ulmenweg 18 91054 Erlangen

Semperit
Technische Produkte GmbH
Segment Sempermed
Herr Daniel Stocker
Triester Bundesstraße 26

A – 2632 Wimpassing

Hautklinik am INZ
Universitätsklinikum Erlangen
Direktor: Prof. Dr. med. univ. Gerold Schuler
Abteilung: Testlabor für Latexprodukte
Ansprechpartner: Dr. Mirko Kummer
Tel.: 09131/85 45834
Fax: 09131/85 33152
e-mail: mirko.kummer@uk-erlangen.de

Erlangen, 24. Februar 2015

Testprotokoll Proteinbestimmung

Messdatum: 18.11.2014 (mod. Lowry), 24.02.2015 (Aminosäurenanalyse, HPLC)
Probe: **Handschuhe KTA 19**
Lot: Muster
Analysen-Nr.: 10140502

Extraktion: Doppelhandschuhmethode mit 0,1 M TES pH 7,4 (nach EN 455-3)

Messmethode: **Lowry modifiziert (nach EN 455-3):**
Farbentwicklung: Bio-Rad DC Protein Assay
Aminosäurenanalyse (HPLC):
Hydrolyse: 6 N Salzsäure 100°C, 48 h
Analyse: Trennung der Aminosäuren über HPLC nach
Vorsäulenderivatisierung mit o-Phthal-dialdehyd und
Quantifizierung im Fluoreszenzspektrometer.

Ergebnisse:

	Lowry (mod.) µg Protein / g Handschuh	Aminosäurenanalyse µg Protein / g Handschuh
Extraktion rechts	29,5	33,8
Mittelwert	29,5	33,8


Dr. Mirko Kummer



Hautklinik Ulmenweg 18 91054 Erlangen

Semperit
Technische Produkte GmbH
Segment Sempermed
Herr Daniel Stocker
Triester Bundesstraße 26

Hautklinik am INZ
Universitätsklinikum Erlangen
Direktor: Prof. Dr. med. univ. Gerold Schuler
Abteilung Testlabor für Latexprodukte
Ansprechpartner: Dr. Mirko Kummer
Tel. 09131/85 45884
Fax 09131/85 33162
e-mail: mirko.kummer@uk-erlangen.de

A 2632 Wimpassing

Erlangen, 24. Februar 2015

Testprotokoll Proteinbestimmung

Messdatum: 18.11.2014 (mod. Lowry), 24.02.2015 (Aminosäurenanalyse, HPLC)
Probe: **Handschuhe KTA 19 plus 10ml DVS**
Lot: Muster
Analysen-Nr.: 10140503

Extraktion: Doppelhandschulmethode mit 0,1 M TES pH 7,4 (nach EN 455-3)

Messmethode: **Lowry modifiziert (nach EN 455-3):**
Farbentwicklung: Bio-Rad DC Protein Assay
Aminosäurenanalyse (HPLC):
Hydrolyse: 6 N Salzsäure 100°C, 48 h
Analyse: Trennung der Aminosäuren über HPLC nach
Vorsäulenderivatisierung mit o-Phthalaldehyd und
Quantifizierung im Fluoreszenzspektrometer.

Ergebnisse:

	Lowry (mod.) µg Protein / g Handschuh	Aminosäurenanalyse µg Protein / g Handschuh
Extraktion rechts	24,5	29,7
Mittelwert	24,5	29,7


Dr. Mirko Kummer



Hautklinik Ulmenweg 18 91054 Erlangen

Semperit
Technische Produkte GmbH
Segment Sempermed
Herr Daniel Stocker
Triester Bundesstraße 26

A – 2632 Wimpassing

Hautklinik am INZ
Universitätsklinikum Erlangen
Direktor: Prof. Dr. med. univ. Gerold Schuler
Abteilung: Testlabor für Latexprodukte
Ansprechpartner: Dr. Mirko Kummer
Tel.: 09131/85 45834
Fax: 09131/85 33152
e-mail: mirko.kummer@uk-erlangen.de

Erlangen, 24. Februar 2015

Testprotokoll Proteinbestimmung

Messdatum: 18.11.2014 (mod. Lowry), 24.02.2015 (Aminosäurenanalyse, HPLC)
Probe: **Handschuhe KTA 19 plus 20ml DVS**
Lot: Muster
Analysen-Nr.: 10140504

Extraktion: Doppelhandschuhmethode mit 0,1 M TES pH 7,4 (nach EN 455-3)

Messmethode: **Lowry modifiziert (nach EN 455-3):**
Farbentwicklung: Bio-Rad DC Protein Assay
Aminosäurenanalyse (HPLC):
Hydrolyse: 6 N Salzsäure 100°C, 48 h
Analyse: Trennung der Aminosäuren über HPLC nach
Versäulenderivatisierung mit o-Phthal-dialdehyd und
Quantifizierung im Fluoreszenzspektrometer.

Ergebnisse:

	Lowry (mod.) µg Protein / g Handschuh	Aminosäurenanalyse µg Protein / g Handschuh
Extraktion rechts	28,9	25,7
Mittelwert	28,9	25,7


Dr. Mirko Kummer



Hautklinik Ulmenweg 18 91054 Erlangen

Semperit
Technische Produkte GmbH
Segment Sempermed
Herr Daniel Stecker
Triester Bundesstraße 26

A – 2632 Wimpassing

Hautklinik am INZ
Universitätsklinikum Erlangen
Direktor: Prof. Dr. med. univ. Gerold Schuler
Abteilung: Testlabor für Latexprodukte
Ansprechpartner: Dr. Mirko Kummer
Tel.: 09131/85 45884
Fax: 09131/85 33162
e-mail: mirko.kummer@uk-erlangen.de

Erlangen, 24. Februar 2015

Testprotokoll Proteinbestimmung

Messdatum: 18.11.2014 (mod. Lowry), 24.02.2015 (Aminosäurenanalyse, HPLC)
Probe: **Handschuhe KTA 19 plus 40ml DVS**
Lot: Muster
Analysen-Nr.: 10140505

Extraktion: Doppelhandschuhmethode mit 0,1 M TES pH 7,4 (nach EN 455-3)

Messmethode: **Lowry modifiziert (nach EN 455-3):**
Farbentwicklung: Bio-Rad DC Protein Assay
Aminosäurenanalyse (HPLC):
Hydrolyse: 6 N Salzsäure 100°C, 48 h
Analyse: Trennung der Aminosäuren über HPLC nach
Vorsäulenderivatisierung mit o-Phthal-dialdehyd und
Quantifizierung im Fluoreszenzspektrometer.

Ergebnisse:

	Lowry (mod.) µg Protein / g Handschuh	Aminosäurenanalyse µg Protein / g Handschuh
Extraktion rechts	58,9	30,6
Mittelwert	58,9	30,6


Dr. Mirko Kummer



Hautklinik Ulmenweg 18 91054 Erlangen

Semperit
Technische Produkte GmbH
Segment Sempermed
Herr Daniel Stocker
Triester Bundesstraße 26

A – 2632 Wimpassing

Hautklinik am INZ
Universitätsklinikum Erlangen
Direktor: Prof. Dr. med. univ. Gerold Schuler
Abteilung Testlabor für Latexprodukte
Ansprechpartner: Dr. Mirko Kummer
Tel.: 09131/85 45884
Fax: 09131/85 33162
e-mail: mirko.kummer@uk-erlangen.de

Erlangen, 24. Februar 2015

Testprotokoll Proteinbestimmung

Messdatum: 18.11.2014 (mod. Lowry), 24.02.2015 (Aminosäurenanalyse, HPLC)
Probe: **Kurant KTA 19 - 23.10.2014**
Lot: Muster
Analysen-Nr.: 11140191

Extraktion: Doppelhandschulmethode mit 0,1 M TES pH 7,4 (nach EN 455-3)

Messmethode: **Lowry modifiziert (nach EN 455-3):**
Farbentwicklung: Bio-Rad DC Protein Assay
Aminosäurenanalyse (HPLC):
Hydrolyse: 6 N Salzsäure 100°C, 48 h
Analyse: Trennung der Aminosäuren über HPLC nach
Vorsäulenderivatierung mit o-Phthal-dialdehyd und
Quantifizierung im Fluoreszenzspektrometer.

Ergebnisse:

	Lowry (mod.) µg Protein / g Handschuh	Aminosäurenanalyse µg Protein / g Handschuh
1. Extraktion rechts	33,2	36,8
1. Extraktion links	31,5	
2. Extraktion links	34,0	
Mittelwert	32,9	36,8


Dr. Mirko Kummer



Hautklinik Ulmenweg 18 51054 Erlangen

Semperit
Technische Produkte GmbH
Segment Sempermed
Herr Daniel Stocker
Triester Bundesstraße 26

Hautklinik am INZ
Universitätsklinikum Erlangen
Direktor: Prof. Dr. med. univ. Gerold Schuler
Abteilung: Testlabor für Latexprodukte
Ansprechpartner: Dr. Mirko Kummer
Tel.: 09131/85 45884
Fax: 09131/85 33162
e-mail: mirko.kummer@uk-erlangen.de

A – 2632 Wimpasing

Erlangen, 24. Februar 2015

Testprotokoll Proteinbestimmung

Messdatum: 18.11.2014 (mod. Lowry), 24.02.2015 (Aminosäurenanalyse, HPLC)
Probe: **Reifung NK plus 0,26phr DVS - 21.10.2014**
Lot: Muster
Analysen-Nr.: 11140102

Extraktion: Doppelhandschuhmethode mit 0,1 M TBS pH 7,4 (nach EN 455 3)

Messmethode: **Lowry modifiziert (nach EN 455-3):**
Farbentwicklung: Bio-Rad DC Protein Assay
Aminosäurenanalyse (HPLC):
Hydrolyse: 6 N Salzsäure 100°C, 48 h
Analyse: Trennung der Aminosäuren über HPLC nach
Vorsäulenderivatisierung mit o-Phthal-dialdehyd und
Quantifizierung im Fluoreszenzspektrometer.

Ergebnisse:

	Lowry (mod.) µg Protein / g Handschuh	Aminosäurenanalyse µg Protein / g Handschuh
Extraktion rechts	32,2	45,0
Extraktion links	44,7	
Mittelwert	38,5	45,0


Dr. Mirko Kummer



Hautklinik Ulmenweg 18 91054 Erlangen

Semperit
Technische Produkte GmbH
Segment Sempermed
Herr Daniel Stecker
Triester Bundesstraße 26

Eauklinik am INZ
Universitätsklinikum Erlangen
Direktor: Prof. Dr. med. univ. Gerold Schuler
Abteilung: Testlabor für Latexprodukte
Ansprechpartner: Dr. Mirko Kummer
Tel.: 09131/85 45884
Fax: 09131/85 33162
e-mail: mirko.kummer@uk-erlangen.de

A – 2632 Wimpassing

Erlangen, 24. Februar 2015

Testprotokoll Proteinbestimmung

Messdatum: 18.11.2014 (mod. Lowry), 24.02.2015 (Aminosäurenanalyse, HPLC)
Probe: **Reifung NK plus 0,5phr DVS - 21.10.2014**
Lot: Muster
Analysen-Nr.: 11140133

Extraktion: Doppelhandschuhmethode mit 0,1 M TES pH 7,4 (nach EN 455-3)

Messmethode: **Lowry modifiziert (nach EN 455-3):**
Farbentwicklung: Bio-Rad DC Protein Assay
Aminosäurenanalyse (HPLC):
Hydrolyse: 6 N Salzsäure 100°C, 48 h
Analyse: Trennung der Aminosäuren über HPLC nach
Vorsäulenderivatisierung mit o-Phthal-dialdehyd und
Quantifizierung im Fluoreszenzspektrometer.

Ergebnisse:

	Lowry (mod.) µg Protein / g Handschuh	Aminosäurenanalyse µg Protein / g Handschuh
1. Extraktion rechts	20,8	26,1
2. Extraktion rechts	46,0	
1. Extraktion links	25,5	
Mittelwert	30,8	26,1

Dr. Mirko Kummer