

# Proteine im Wein

Untersuchungen zur Proteinzusammensetzung  
von deutschen Rot- und Weißweinen

Dissertation zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität  
in Mainz

Petra Wigand  
geb. in Lindenfels (Odw)

Mainz, 2008







# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Wein.....	1
1.1.1	Die Weinrebe.....	1
1.1.2	Geschichte des Weins.....	2
1.1.3	Weinherstellung.....	3
1.1.4	Weininhaltsstoffe.....	5
1.2	<b>Proteine im Wein.....</b>	<b>10</b>
1.2.1	Zusammensetzung der Weinproteine.....	10
1.2.2	Einfluss der Proteine auf die Qualität des Weines.....	11
1.2.3	Herkunft der Proteine im Wein.....	12
1.2.4	Proteingehalt und Einflussfaktoren auf den Proteingehalt im Wein.....	13
1.3	<b>Pathogenese bezogene Proteine.....</b>	<b>15</b>
1.4	<b>Nahrungsmittelallergie.....</b>	<b>17</b>
1.5	<b>Allergenes Potential der weineigenen Proteine.....</b>	<b>18</b>
1.6	<b>Ziele der Arbeit.....</b>	<b>21</b>
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>23</b>
2.1	Geräte.....	23
2.2	Ge- und Verbrauchsmittel.....	25
2.3	Chemikalien.....	26
2.4	Wein, Most und Trauben.....	29
2.5	Puffer und Lösungen.....	30
2.6	Methodenübersicht.....	36
2.7	<b>Aufreinigung der Proteine aus dem Wein.....</b>	<b>37</b>
2.7.1	Dialyse.....	37
2.7.2	Gefriertrocknung.....	37
2.7.3	Fällung der Proteine.....	38
2.8	<b>Aufreinigung der Proteine aus der Weinbeere.....</b>	<b>41</b>
2.9	<b>Absorptionsspektroskopie.....</b>	<b>42</b>
2.9.1	Proteinbestimmung.....	42
2.10	<b>Polyacrylamid – Gelelektrophorese (PAGE).....</b>	<b>43</b>
2.10.1	Denaturierende SDS-PAGE.....	43
2.10.2	Gradientengel.....	45

2.10.3	Zweidimensionale Gelelektrophorese .....	45
2.10.4	Coomassie-Färbung .....	46
2.10.5	Silberfärbung .....	47
<b>2.11</b>	<b>Isoelektrische Fokussierung .....</b>	<b>47</b>
<b>2.12</b>	<b>Glykoproteinbestimmung .....</b>	<b>48</b>
2.12.1	Perjodsäure-Färbung .....	48
2.12.2	Lektinblot .....	49
<b>2.13</b>	<b>Chromatographische Methoden .....</b>	<b>51</b>
2.13.1	Ionenaustausch-Chromatographie .....	51
2.13.2	Größenausschluss-Chromatographie .....	51
<b>2.14</b>	<b>Massenspektrometrie .....</b>	<b>52</b>
<b>2.15</b>	<b>Proteinsequenzanalyse und Sequenzalignments .....</b>	<b>52</b>
<b>2.16</b>	<b>Proteinmodellierung .....</b>	<b>53</b>
<b>2.17</b>	<b>Immunologische Methoden .....</b>	<b>53</b>
2.17.1	Western Blot .....	53
2.17.2	Proliferationstest .....	54
2.17.3	Zytokinproduktion .....	55
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>57</b>
<b>3.1</b>	<b>Konzentrierung der Proteine .....</b>	<b>57</b>
<b>3.2</b>	<b>Proteingehalt von Wein, Most und Weinbeeren .....</b>	<b>57</b>
<b>3.3</b>	<b>Absorptionsspektren/Absorptionsspektrometrie .....</b>	<b>65</b>
<b>3.4</b>	<b>Proteinzusammensetzung von Weißwein, Roséwein und Rotwein .....</b>	<b>67</b>
3.4.1	Weißwein .....	67
3.4.2	Rotwein .....	74
3.4.3	Weißherbst .....	86
3.4.4	Vergleich der Proteinzusammensetzung zwischen Weißwein, Weißherbst und Rotwein .....	88
<b>3.5</b>	<b>Herkunft der Proteine im Wein .....</b>	<b>90</b>
3.5.1	Traubenextraktion .....	90
3.5.2	Proteinzusammensetzung der Weinbeere .....	91
3.5.3	Proteinzusammensetzung von Most .....	93
3.5.4	Vergleich der Proteinzusammensetzung Wein, Most und Weinbeere .....	94
<b>3.6</b>	<b>Aufreinigung und Isolierung der Weinproteine .....</b>	<b>95</b>
3.6.1	Aufreinigung der Proteine aus Weißwein .....	95
3.6.2	Aufreinigung der Proteine aus Rotwein .....	100
<b>3.7</b>	<b>Untersuchungen zum allergenen Potential von Weinproteinen .....</b>	<b>104</b>
3.7.1	Sequenzvergleich der Weinproteine mit bekannten Allergenen .....	104

3.7.2	Western Blots .....	116
3.7.3	Klinische Tests .....	118
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>121</b>
4.1	Weinanbaugebiete und Weinsorten .....	121
4.2	Proteine im Wein .....	122
4.3	Herkunft der Proteine im Wein .....	123
4.3.1	Einfluss der Rebsorte und der Weinherstellung auf die Proteinzusammensetzung im Wein .....	124
4.4	Identifizierung und Charakterisierung der Proteine im Wein .....	126
4.4.1	Entfernung von Proteinen im Laufe der Weinbereitung .....	128
4.4.2	Proteinzusammensetzung im Wein .....	128
4.4.3	Aufreinigung der Weinproteine .....	136
4.5	Glykosylierung der Weinproteine .....	142
4.6	Stabilisierung der Proteine im Wein .....	144
4.7	Allergenes Potential der Weinproteine .....	146
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>158</b>
<b>6.</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>159</b>
<b>7.</b>	<b>Verzeichnisse .....</b>	<b>173</b>
7.1	Abkürzungsverzeichnis .....	173
7.2	Abbildungsverzeichnis .....	175
7.3	Tabellenverzeichnis .....	177
<b>8.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>179</b>
8.1	Protokolle der FPLC .....	179
8.2	Sequenzalignments .....	181
8.2.1	Sequenzalignment LTP zu Tabelle 21 .....	181
8.2.2	Sequenzalignment TLP zu Tabelle 22 .....	182
8.2.3	Sequenzalignment Chitinase zu Tabelle 23 .....	183
<b>9.</b>	<b>Veröffentlichungen .....</b>	<b>184</b>
<b>10.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
<b>11.</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>



# 1. Einleitung

## 1.1 Wein

### 1.1.1 Die Weinrebe

Die Weinrebe *Vitis vinifera* ist der Gattung *Vitis*, der Familie der *Vitaceae* (Weinrebengewächse) sowie der Ordnung der *Rhamnáles* untergeordnet (Abbildung 1). Diese wiederum zählen zur Klasse der *Dicotyledoneae* (Zweikeimblättrige) und zur Abteilung der *Spermatophyta* (Samenpflanzen). Die Art *Vitis vinifera* L. ist in Europa mit nur zwei Unterarten verbreitet. *Vitis vinifera sylvestris*, die Wildrebe, ist im Mittelmeergebiet, in Kleinasien sowie in der Region von Russland bis zum Hindukusch heimisch, wobei die Nordgrenze in der Oberrheinischen Tiefebene und im Donautal liegt. Die Kulturform *Vitis vinifera vinifera* ist aus der Wildrebe entstanden. Ihre Hauptanbaugebiete liegen im Mittelmeerraum, am Schwarzen Meer sowie in Kalifornien und Südafrika [SCHÜTT ET AL 2002, SCHMEIL/FITSCHEN 1996].

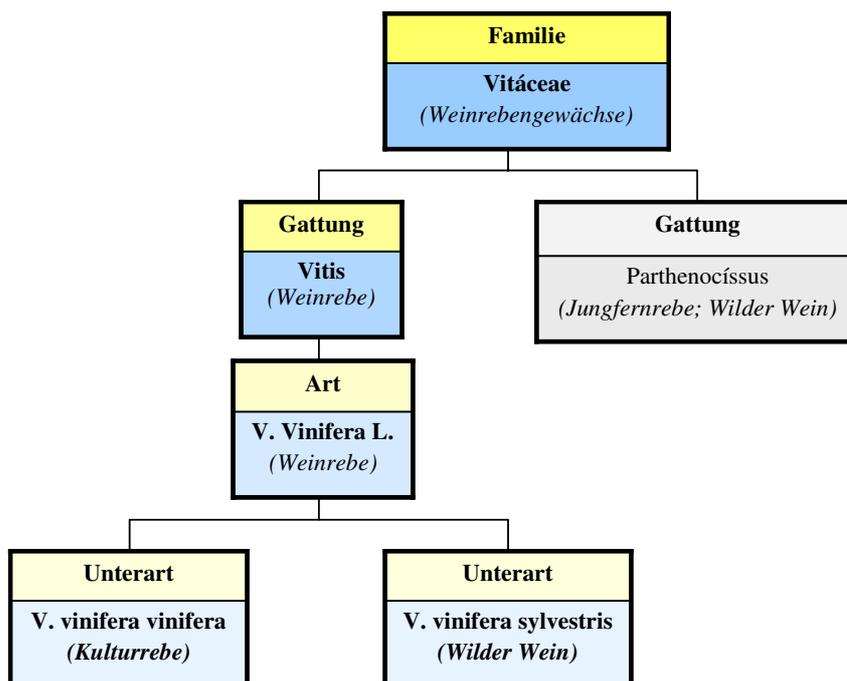


Abbildung 1: Systemische Einordnung der Weinrebe [nach SCHMEIL/FITSCHEN 1996, BERGNER/LEMPERLE 2001]

### 1.1.2 Geschichte des Weins

Die ersten Hinweise auf Wein als Bestandteil der menschlichen Kultur gehen bis 5400 v. Chr. in den nördlichen Iran zurück. Von dort ging aller Wahrscheinlichkeit nach ca. 4000 v. Chr. die Domestizierung von *Vitis vinifera* aus der wilden Traube *Vitis sylvestris* aus, die sich über den Nordosten Afghanistans zu den südlichen Grenzregionen des Schwarzen Meers und zum Kaspischen Meer vollzog. Von dort nahm die Verbreitung weiter ihren Weg über Syrien, Ägypten und Mesopotamien bis in den Mittelmeerraum. Seit dieser Zeit hat der Wein in allen Kulturen große Bedeutung. So gab es bei einigen Völkern einen Weingott, der Wein wurde als das Getränk der Götter angesehen [MCGOVERN ET AL 1996, ARADHYA ET AL 2003, SOLEAS 1997].

Auch in der Bibel spielt Wein eine Rolle. So begann die menschliche Landwirtschaft im ersten Buch Mose mit der Pflanzung eines Weinberges von Noah nach der Sintflut. Auch weiter zieht sich der Wein durch die Bibel und wird hier sowohl im negativen (Mittel zur Vergiftung, Trunkenheit) als auch als im positiven Licht (Genussmittel, Vergebung der Sünden im Abendmahl) betrachtet.

Im Römischen Reich war der Weinkonsum über alle gesellschaftlichen Schichten verbreitet, viele Hinweise auf den Wein und der Weinbau finden sich aus dieser Zeit. Ein gesundheitlicher Nutzen ist bei Hippokrates (460 bis 377 v. Chr.), der häufig als der Vater der Medizin bezeichnet wird, beschrieben. So wurde Wein als Heilmittel verschiedenster Erkrankungen eingesetzt, jedoch wurde in entsprechenden Situationen auch vom Genuss abgeraten.

Auf das 17. Jahrhundert werden erste moderne Ausprägungen der Weinbereitung datiert, wie beispielsweise die Schwefelbehandlung im Fass zur Erzielung einer besseren Qualität und längeren Lagerung. Im 19. Jahrhundert wurden zunehmend die chemischen Prozesse der Weinbereitung verstanden und auf dieser Grundlage wissenschaftliche Methoden angewendet, um Weine mit gewünschten Eigenschaften gezielt herzustellen. So zeigt sich eine stetige Entwicklung in der Weinherstellung von damals bis heute, die beispielsweise durch den Einsatz von Vollerthern, Stahltanks sowie Reinzuchthefer, die unter anderem auch einen steigenden Alkoholgehalt ermöglichen, gekennzeichnet ist.

Ab Mitte des 20. Jahrhunderts wird die Wirkung von Wein bei verschiedenen Erkrankungen wissenschaftlich untersucht, wobei insbesondere in den 80er und 90er Jahren eine Fülle von Artikeln schwerpunktmäßig zur Wirkung von Wein bei Herz-Kreislaufkrankungen erschienen sind. Neben Probandenstudien stehen Erklärungsansätze zu den molekularen Mechanismen im Fokus der Wissenschaftler von heute [SOLEAS 1997, JAKOB 1997, DE LANGE 2007].

### 1.1.3 Weinherstellung

Wein ist das Erzeugnis, das ausschließlich durch vollständige oder teilweise alkoholische Gärung der frischen, auch eingemaischten Weintrauben oder des Traubenmostes gewonnen wird [nach VO(EWG)Nr.822/87].

Die Grundprinzipien der Weinbereitung stellen das Einmaischen, Keltern, Vergären, Klären und Lagern dar. Diese werden unter dem Begriff der Kellerbehandlung zusammengefasst [BERGER/LEMPERLE 2001].

Im ersten Schritt der Weinherstellung, der allen Weinarten gemein ist, wird die Maische gewonnen. Hierzu wird das Lesegut, nach Mengen- und Qualitätsermittlungen, über eine Abbeermaaschine und eine Traubemühle von den Kämmen entfernt und zur Maische gepresst. In der Regel wird bereits die Maische leicht geschwefelt, um das Wachstum von Mikroorganismen zu unterdrücken und Oxidationsvorgängen entgegenzuwirken.

Da sich die folgenden Schritte der Weinherstellung für Weißwein, Rotwein und Roséwein unterscheiden, werden sie getrennt voneinander betrachtet.

#### Weißweinherstellung

Die Maische wird direkt abgkeltert und in den Most und den Trester getrennt. Im Most findet bereits eine Vorklämung (durch Absitzenlassen, Zentrifugation, Filtration und Flotation) statt und in der Regel werden weitere Behandlungsmaßnahmen wie Schwefelung<sup>1</sup>, Mostoxidation oder Gerbstoffreduzierung durchgeführt. Eine Mostbehandlung ist über alle Weinsorten hinweg verbreitet. Die direkt anschließende Gärung wird heute meist durch die Zugabe von sulfuresistenten Reinzuchtheften mit kontrolliertem Verhalten initiiert, die Spontangärung durch Wildhefen ist in den Hintergrund gerückt.

#### Rotweinherstellung

Bei der Rotweinherstellung werden die Weinbeeren auf der Maische vergoren. Dies hat zur Folge, dass in der Beerenhaut enthaltene Inhaltsstoffe wie Phenole, insbesondere die farbgebenden Anthocyane, in den Wein freigesetzt werden. Der Einsatz pektolytischer Enzyme fördert die enzymatische Freisetzung. Häufig wird die Extraktion auch durch eine Wärmebehandlung der Maische erhöht.

---

<sup>1</sup> Die Schwefelung mit Schwefeldioxid oder schwefeliger Säure zur Most- und/oder Weinbehandlung erfolgt aufgrund der antimikrobiellen, antioxidativen und enzymhemmenden Wirkung zur Verbesserung der Haltbarkeit und der Qualität sowie der Abbindung von Carbonylverbindungen zur Geschmacksverbesserung [JAKOB 1997].

## Roséweinherstellung

Roséwein wird aus roten Beeren gewonnen, die nach einer kurzen Maischestandzeit abgekeltert werden. Die Gärung erfolgt wie bei der Weißweinherstellung auf dem Most.

Die Bezeichnung Weißherbst wird verwendet, wenn der Wein aus nur einer roten Rebsorte gewonnen wird und es sich um einen Qualitätswein handelt.

Bei allen Weinsorten schließt sich der Hauptgärung eine Nachgärung an. Diese ist durch den biologischen Säureabbau gekennzeichnet und es wird noch verbleibender Zucker umgesetzt. Nach der darauf folgenden Klärung erfolgt der erste Abstich, dem sich der Ausbau des Jungweins anschließt. Der Wein entwickelt seine Eigenart und Qualität. Verschiedene Behandlungsmaßnahmen wie die Beseitigung von Weinfehlern und die Schönung kommen in dieser Phase zum Einsatz. Nach einem zweiten Abstich erfolgt die Flaschenabfüllung [BERGNER/LEMPERLE 2001].

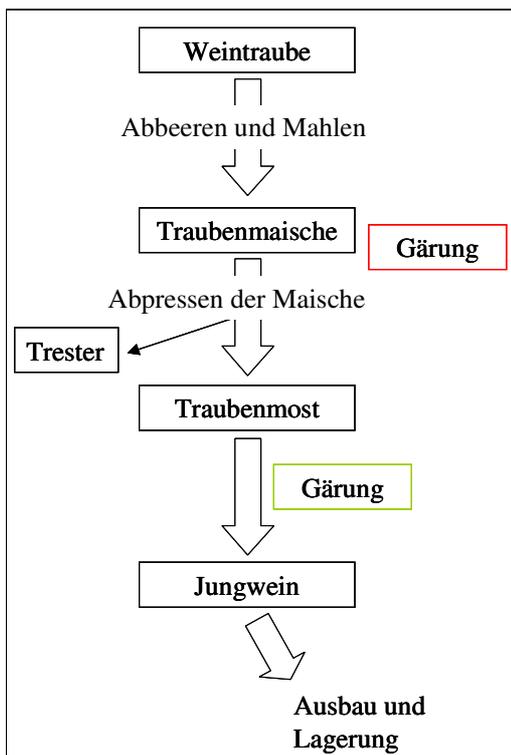


Abbildung 2: Schritte der Weinbereitung.

Während bei Rotwein die Gärung auf der Maische erfolgt, wird beim Weißwein der Most vergoren.

## Schönungsmittel

Schönungsmittel sind definiert als „Klärungsmittel zur Entfernung störender, meist trübender Stoffe<sup>2</sup> durch chemische oder kolloidale Ausfällung oder Adsorption“ [BERGNER/LEMPERLE 2001]. Als Schönungsmittel eingesetzt werden vor allem Bentonit, Aktivkohle, Tannin sowie die eiweißhaltigen Schönungsmittel Gelatine, Hausenblase, Hühnereiweiß und Kasein. Die folgende Tabelle liefert eine Übersicht über wichtige Behandlungsmaßnahmen mit den daran geknüpften Zielen.

**Tabelle 1: Ziele des Einsatzes von Schönungs- und Behandlungsmitteln in Most und Wein [modifiziert nach JAKOB 1997]**

Maßnahme	Ziel
Selektive Entfernung einzelner Verbindungen	Verbesserung von Geschmack und Geruch
Abtrennen von Verbindungen, die zur Ausfällung kommen könnten	Stabilität während der Lagerung
Entstabilisierung von Trubstoffen	Beschleunigung bzw. Ermöglichen der Klärung

### 1.1.4 Weininhaltsstoffe

Wein stellt eine sehr komplexe Flüssigkeit mit mehr als 500 verschiedenen Inhaltsstoffen dar. Durch die Weiterentwicklung verschiedener Analysemethoden in den vergangenen Jahrzehnten wurde das Wissen rund um die Weininhaltsstoffe stark erweitert. Im Wein spielen sowohl die Inhaltsstoffe, die aus der Traube in den Wein gelangen eine Rolle, als auch jene, die durch die Aktivität der Hefe während der Gärung entstehen [SOLEAS 1997].

#### Alkohole

Der **Ethanolgehalt** im Wein schwankt in der Regel zwischen 10 % und 13 %. Er ist abhängig vom Zuckergehalt, der Temperatur, der Traubenreife sowie dem Hefestamm und trägt entscheidend zur qualitativen Beurteilung eines Weines bei. Der Anstieg des Ethanolgehaltes im Laufe der Gärung inhibiert das Wachstum vieler Mikroorganismen, nicht jedoch das der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, die den Prozess der Gärung somit dominiert. Des Weiteren spielt Ethanol bei der Lagerung und Haltbarkeit eine Rolle sowie als Lösungsmittel, insbesondere von Phenolen bei Rotweinen. Geschmacklich trägt Ethanol zur Schwere eines Weines bei [SOLEAS 1997, RIBEREAU-GAYON ET AL 2006].

---

<sup>2</sup> Gemeint sind hier vor allem Proteine.

**Methanol** ist im Wein nur in sehr geringen und gesundheitlich unbedenklichen Mengen enthalten. Es entsteht primär beim enzymatischen Abbau von Pektin und hat keinen Einfluss auf die sensorischen Eigenschaften des Weins. Der Methanolgehalt ist bei Botrytisbefall der Trauben leicht erhöht. In Rotweinen ist Methanol durch den Kontakt mit den Beerenhäuten in höheren Mengen enthalten als im Weißwein [SOLEAS 1997, RIBEREAU-GAYON ET AL 2006, BERGNER/LEMPERLE 2001].

**Höhere Alkohole** entstehen als Nebenprodukt der Hefegärung. Ihr Gehalt variiert je nach Temperatur, Sauerstoffverfügbarkeit und eingesetztem Hefestamm zwischen 150 mg/l und 550 mg/l. Diese Alkohole und ihre Ester entfalten intensive Gerüche und beeinflussen das Weinaroma [SOLEAS 1997, RIBEREAU-GAYON ET AL 2006]

### **Kohlenhydrate**

In der Traube ändert sich das Verhältnis von Glukose und Fruktose, die durch die Hydrolyse der Saccharose entstehen, reifeabhängig mit ansteigendem Anteil der Fruktose bis beide Zucker etwa in gleichen Anteilen vorliegen. Der Gehalt insgesamt liegt im Bereich von 150 g/l bis 250 g/l im Traubensaft. Nach der Gärung reduziert sich der Zuckergehalt bei trockenen, durchgegorenen Weinen meist auf unter 1,5 g/l. Liebliche Weine, mit einem Zuckergehalt größer 10 g/l, enthalten das Zwei- bis Vierfache an Fruktose im Vergleich zur Glukose, was die Süße des Weines maßgeblich beeinflusst.

Pentosen wie Arabinose, Rhamnose und Xylose kommen im Wein in geringen Mengen (0,3 g/l bis 2 g/l) vor und tragen nur geringfügig zum süßen Geschmack bei.

Polysaccharide sind nur in sehr geringen Mengen enthalten (einige 100 mg bis einige g pro l). Sie gelangen nicht nur aus der Traube in den Wein, sondern werden auch von Mikroorganismen freigesetzt [SOLEAS 1997, RIBEREAU-GAYON ET AL 2006]

### **Säuren**

Organische Säuren liefern einen wichtigen Beitrag zur Zusammensetzung, Stabilität und den organoleptischen Eigenschaften eines Weines, insbesondere bei Weißweinen. Der Säuregehalt im Wein wird über die „Gesamtsäure“, den „pH-Wert“ sowie die „flüchtigen Säuren“ beschrieben. Die Gesamtsäure, auch als „titrierbare Säure“ bezeichnet, bildet die Menge aller Säuren im Wein ab. Die separate Betrachtung der „flüchtigen Säure“, die quantitativ gesehen nur einen geringen Teil ausmacht, ist für die Qualität, insbesondere den Geschmack, von Bedeutung. Der pH-Wert des Weins, der maßgeblich durch die nicht-flüchtigen Säuren wie

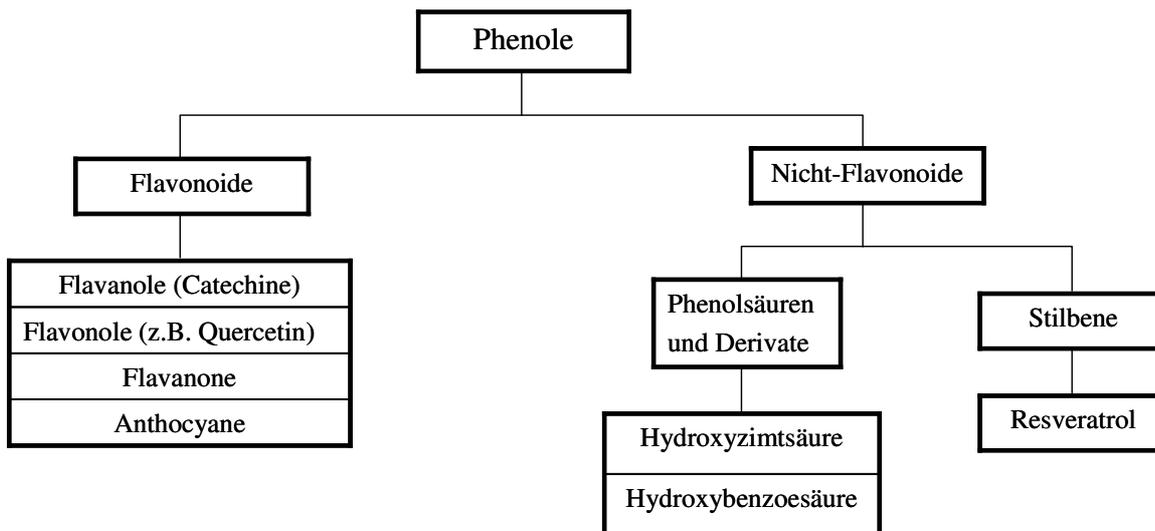
Weinsäure, Äpfelsäure, Milchsäure, Oxalsäure, Zitronensäure und Fumarsäure beeinflusst wird, variiert zwischen 2,8 und 4,0 und trägt zur mikrobiologischen und physikochemischen Stabilität bei [SOLEAS 1997, RIBEREAU-GAYON ET AL 2006].

### **Phenole**

Der Phenolgehalt ist stark von der Weinsorte abhängig und betont den Unterschied zwischen Weiß- und Rotweinen, wobei sowohl die Menge als auch die Zusammensetzung der Phenole variiert. Rotweine enthalten ca. zehn-/ bis zwanzigmal mehr Phenole als Weißweine.

Als Hauptgruppen der Phenole sind die Flavonoide und die Nicht-Flavonoide zu nennen (Abbildung 3). Die Flavonoide, von welchen die gelben Flavonole die am weitesten verbreitete Untergruppe darstellen, liegen entweder in freier Form oder polymerisiert mit anderen Flavonoiden, Nicht-Flavonoiden oder Zuckern vor. Farbgebende Pigmente im Rotwein sind vor allem die roten Anthocyane, wobei von den fünf im Rotwein identifizierten das Malvidin in monoglykosidischer Form die Grundlage der Farbgebung bildet. Die Konzentration ist stark von der Weinsorte und dem Alter des Weins abhängig.

Als Procyanidine werden Polymerisationsprodukte aus Flavanolen sowie Catechinen und Epicatechinen bezeichnet. Diese Polymere sind in der Lage über ihre unkonjugierte Hydroxy-Phenolgruppe Proteine zu binden und bilden die Strukturbasis für Tannine. Als Tannine werden komplexe Mischungen hochmolekularer Phenol-Oligomere oder /-Polymere bezeichnet, die in der Lage sind mit Proteinen und anderen Pflanzenpolymeren wie beispielsweise den Polysacchariden stabile Komplexe zu formen. In hohen Mengen sind sie in Rotweinen, deren Lagerung im Holzfass erfolgt, zu finden [WATERHOUSE 2002, RIBEREAU-GAYON ET AL 2006, SOLEAS 1997].



**Abbildung 3: Klassifizierung der im Wein enthaltenen Phenole** [modifiziert nach POUR NIKFARDJAM 2001, GERMAN ET AL 2000, WATERHOUSE 2002]

In der Traube sind die Flavonoide vor allem in der Schale (Flavanole, Anthocyanine) oder in den Kernen und Stielen (Flavanole) zu finden. Die Menge der in den Wein übergehenden Phenole wird durch eine Vielzahl von Faktoren der Weinbereitung beeinflusst, wie Temperatur, Dauer des Schalenkontaktes, Material des Gärbottichs, Ethanolkonzentration, Hefestamm und pH-Wert. Die Nicht-Flavonoide hingegen befinden sich vorwiegend in der Zellvakuole und gehen beim Quetschen der Trauben in den Most über. Von den Nicht-Flavonoiden wurden bislang sieben Hydroxybenzoessäuren sowie vier Hydroxyzimtsäuren im Wein gefunden [RIBEREAU-GAYON ET AL 2006, SOLEAS 1997].

Eine weitere Gruppe vor allem in Rotwein vorkommender Phenole sind die Stilbene, von welchen das Resveratrol (trans-3,5,4-Trihydroxystilben) das Bedeutendste darstellt. Der Resveratrolgehalt im Wein ist sorten- und lagenabhängig und liegt bei deutschen Weißweinen im Bereich von 0,06 bis 0,63 mg/l und bei deutschen Rotweinen bei 0,70 bis 3,42 mg/l [WAMHOFF 1997 (schriftliche Mitteilung), BAUR ET AL 2006, TOMERA 1999, DE LA LASTRA/VILLEGAS 2007, CHEN 2007, KAUR ET AL 2007, RUSSO ET AL 2001, FUKAO ET AL 2004, HORVATH ET AL 2007].

Die gesamte Gruppe der Polyphenole spielt bei der Diskussion um die gesundheitsfördernden Wirkungen von Wein eine entscheidende Rolle. Ihnen werden antioxidative, antikanzerogene, immunmodulatorische, antimikrobielle, antithrombotische, entzündungshemmende, blutdruckregulierende, cholesterinspiegelsenkende, blutglukoseregulierende sowie verdauungsfördernde Eigenschaften zugesprochen [TOMERA 1999, WATERHOUSE 2002, WALLERATH ET

AL 2002, WALLERATH ET AL 2003, RUF 2004, WALLERATH ET AL 2005, ZERN ET AL 2005, SCALBERT ET AL 2005, CORDER ET AL 2006, SHIMIZU ET AL 2006, OPIE/LECOUR 2007, ROMEO ET AL 2007, KAUR ET AL 2007, RATHEL ET AL 2007, ERLUND ET AL 2008].

Auch die sensorischen Eigenschaften wie die Adstringenz und die Farbintensität von Wein werden von der Zusammensetzung der Phenole, insbesondere der Tannine, beeinflusst [WATERHOUSE 2002, SCHNEIDER 1999].

Der Gesamtphenolgehalt ist stark abhängig von der Weinsorte und liegt im Bereich von 900 bis 2700 mg/l bei Rotweinen und von 190 bis 290 mg/l in Weißweinen. Neben dem Phenolgehalt unterscheidet sich auch die Zusammensetzung der Phenole zwischen Rot- und Weißweinen maßgeblich. Während im Rotwein die Flavonoide mit 750 bis 1060 mg/l im Vergleich zu den Nicht-Flavonoiden mit 240 bis 500 mg/l klar dominieren, überwiegt im Weißwein der Anteil der Nicht-Flavonoide mit 160 bis 260 mg/l dem der Flavonoide mit 25 bis 30 mg/l [GERMAN/WALZEM 2000, LANDRAULT ET AL 2001].

### **Aromastoffe**

Das komplexe Weinaroma setzt sich aus vielen hundert verschiedenen flüchtigen Komponenten zusammen. Der Bildung der Aromastoffe liegt eine Vielzahl verschiedener Mechanismen zugrunde, die vom Traubenstoffwechsel (Einflussfaktoren: Traubensorte, Klima, Standort, Weinausbautechniken), über biochemische Prozesse (wie Oxidation und Hydrolyse) bei der Extraktion des Traubensaftes und dem Stoffwechsel der Mikroorganismen während der Gärung bis zu chemischen und enzymatischen Reaktionen während der Lagerung reichen.

Bislang sind über 900 verschiedene Aromakomponenten im Wein identifiziert worden. Der quantitativ größte Anteil dieser sind höhere Alkohole, flüchtige Säuren und Fettsäureester. In geringer Mengen enthalten, jedoch auch von großer Bedeutung für das Aroma, sind Carbonyle, Phenole, Lactone, Terpene, Acetale, Kohlenwasserstoffe, Schwefel- und Stickstoffkomponenten. Während sich die Aromakomponenten in den verschiedenen Weinsorten kaum unterscheiden, sind es die Kombination und die Konzentration der vielfältigen Aromastoffe, die das individuelle Weinaroma definieren [SOLEAS 1997, RIBEREAU-GAYON ET AL 2006].

## 1.2 Proteine im Wein

Noch immer stellen Proteine eine der am wenigsten bekannten Fraktionen in Most und Wein dar, was vor allem durch die schwierige Isolierung aus einer komplexen Matrix wie Wein und die Komplexbildung der Proteine mit anderen Weininhaltsstoffen zu erklären ist [MORENO-ARRIBAS ET AL 2002, SANTORO 1995].

Traubenproteine wurden erstmals Ende der 50er Jahre von KOCH UND SAJAK (1959) untersucht. Sie konnten bereits zeigen, dass die Proteine in verschiedene Fraktionen unterteilt werden können, der Proteingehalt je nach Rebsorte variiert und dieser eine negative Korrelation mit der Lagerstabilität zeigt. Ziel der Analysen zur Proteinzusammensetzung im Wein war in den darauf folgenden Jahren primär die Verbesserung der Stabilität des Weines, da Proteine die Hauptkomponenten sind, die Trübungen im Wein verursachen können und somit einen Einfluss auf die Stabilität des Weins ausüben [KOCH/SAJAK 1959, HSU/HEATHERBELL 1987B, HSU/HEATHERBELL 1987C, WATERS 1992, WATERS 1995A]. Es erfolgt das Testen von Methoden zur Bestimmung des Proteingehalts im Wein sowie die Analyse der Proteine anhand ihres Molekulargewichtes und isoelektrischen Punktes [YOKOTSUKA ET AL 1977, BAYLY/BERG 1967, TYSON ET AL 1981, MESROB ET AL 1983, MURPHEY ET AL 1989A], auch in Abhängigkeit des Reifegrades der Trauben [MURPHEY ET AL 1989B], der Temperatur [LAMIKANTRA 1988] und der Adsorption durch Bentonit [BLADE 1988].

Bis heute wurden immer wieder Proteine mit verschiedenen Methoden im Wein nachgewiesen [MORENO-ARRIBAS/POLO 2002, LUGUERA ET AL 1998, CANALS 1998, WATERS 1992, WATERS 1995, DAMBROUCK ET AL 2003] und einige Ansätze zur Identifizierung unternommen, die jedoch keine vollständigen und einheitlichen Ergebnisse zeigen [FERREIRA ET AL 2000, WEISS ET AL 1998, DORRESTEIN ET AL 1995, FLAMINI/DE ROSSO 2006]. Durch KWON (2004) wurde erstmals in größerem Rahmen die Zuordnung der Proteine im Wein durchgeführt und zwanzig Proteine eines Sauvignon Blanc Weißweins identifiziert, weitere Untersuchungen folgten [OKUDA ET AL 2006, CILINDRE ET AL 2008]. Eine Identifizierung der Proteine im Rotwein ist meiner Kenntnis nach noch nicht durchgeführt worden.

### 1.2.1 Zusammensetzung der Weinproteine

Der Hauptanteil der Proteine im Wein liegt zwischen 20 und 30 kDa, wobei weitere Proteine im Bereich ab 14 bis größer 100 kDa zu finden sind. Als Hauptproteine im Wein sind Thaumatin-ähnliche Proteine und Chitinasen identifiziert worden, die der Gruppe der PR (Pathogenese bezogenen)-Proteine zugeordnet werden (siehe Abschnitt 1.3) [MORENO-

ARRIBAS/POLO 2002, LUGUERA ET AL 1998, FERREIRA ET AL 2000, DORRESTEIN ET AL 1995, WEISS ET AL 1998 DAMBROUCK ET AL 2003, RUIZ-LARREA ET AL 1998, CANALS ET AL 1998, RIBEREAU-GAYON ET AL 2006, MONTEIRO ET AL 1999, MURPHEY ET AL 1989, SANTORO 1995]. Ein Großteil der Weinproteine wird den Glykoproteinen zugeordnet, wobei die Aussagen über den Anteil glykosylierter Weinproteine sehr widersprüchlich sind [YOKOTSUKA ET AL 1991, YOKOTSUKA ET AL 1994, YOKOTSUKA ET AL 1997, HSU/HEATHERBELL 1987, DAMBROUCK ET AL 2003, WATERS ET AL 1995, FERREIRA ET AL 2002].

### **Mannoproteine**

Unter dem Begriff Mannoproteine werden aus der Zellwand von Hefen stammende Glykoproteine mit einem hohen Kohlenhydratanteil, der sich durch einen mindestens 95%igen Manno-gehalt auszeichnet, zusammengefasst. In den Wein freigesetzt werden sie, abhängig vom eingesetzten Hefestamm und den Gärbedingungen, während der Fermentation sowie der Reifung [WATERS ET AL 1996, GONCALVES ET AL 2002, CARIDI 2006].

Weintechnologisch sind Mannoproteine in vielfältiger Weise von Bedeutung. Einerseits üben sie bei Verfahren der Membranfiltration durch die Verschmutzung von Membranen und somit einer herabgesetzten Flussrate einen negativen Effekt aus. Andererseits zeichnen sie sich durch eine Vielzahl von positiven Effekten hinsichtlich technologischer und qualitativer Eigenschaften aus. So tragen sie zur Weinstabilität bei, sowohl durch die Stabilisierung der Weinsäure als auch durch die Reduktion von Trübungserscheinungen durch Proteine [WATERS ET AL 1994, DUPIN ET AL 2000A, DUPIN ET AL 2000B, GONCALVES ET AL 2002]. Weiterhin diskutiert werden die Schaumstabilisierung bei Schaumweinen, ein Einfluss auf die Aroma- und Farbstabilität sowie ein verbessertes Mundgefühl [MARCHAL ET AL 1996, DUPIN ET AL 2000A, DUPIN ET AL 2000B, GONZALEZ-RAMOS/GONZALEZ 2006].

### **1.2.2 Einfluss der Proteine auf die Qualität des Weines**

Obwohl Proteine nur in vergleichsweise geringen Mengen im Wein enthalten sind, beeinflussen sie die Qualität maßgeblich.

**Positive Effekte** üben einige Proteine, insbesondere Mannoproteine aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, was im vorhergehenden Abschnitt beschrieben wurde.

Andererseits sind Proteine auch für **negative Erscheinungen** wie Trübungen verantwortlich, die zu einer Minderung von Produktqualität und Verbraucherakzeptanz führen. Hervorgerufen wird die Entstehung von Trübungen oder Ablagerungen vor allem im abgefüllten Wein im

Laufe der Lagerung, insbesondere bei hohen Temperaturen, durch Proteine, die unlöslich werden oder aggregieren und in der Folge ausfallen und ausflocken können [DAMBROUCK ET AL 2003, MONTEIRO ET AL 1999, MONTEIRO ET AL 2001, MORENO-ARRIBAS 2000, LABORDE ET AL 2006, CANALS ET AL 1998, FLAMINI/ROSSO 2006, WATERS ET AL 1995, FERREIRA ET AL 2002].

### 1.2.3 Herkunft der Proteine im Wein

Mögliche Quellen der Weinproteine sind - neben der Weinbeere selbst - Hefen, Bakterien und Pilze, die durch Autolyse während der Weinbereitung Proteine freisetzen, sowie möglicherweise proteinhaltige Schönungsmittel wie Kasein und Gelatine (Abbildung 4). Ob eine Einbringung von Proteinen durch Schönungsmittel nachweislich erfolgt, wurden aufgrund der geänderten Kennzeichnungspflicht für potentielle Allergene in Lebensmitteln national sowie international untersucht. Eine aktuelle Studie zeigt, dass in deutschen Weinen keine Rückstände der Schönungsmittel Hausenblase, Fischgelatine und Kasein enthalten sind, während Lysozym und Eiweiß in sehr geringen Mengen als Rückstände im Wein gefunden werden [WEBER ET AL 2007].

Während auf der einen Seite Proteine durch die beschriebenen Mikroorganismen in den Wein eingebracht werden können, gelangen auf der anderen Seite nicht alle in der Weinbeere enthaltenen Proteine in den Wein. Einige Proteine werden unlöslich und bei den Klärungs- und Schönungsmaßnahmen beseitigt, andere werden durch die proteolytische Aktivität von Hefeproteasen hydrolysiert [FERREIRA ET AL 2000, CANALS ET AL 1998, DAMBROUCK AL 2003].

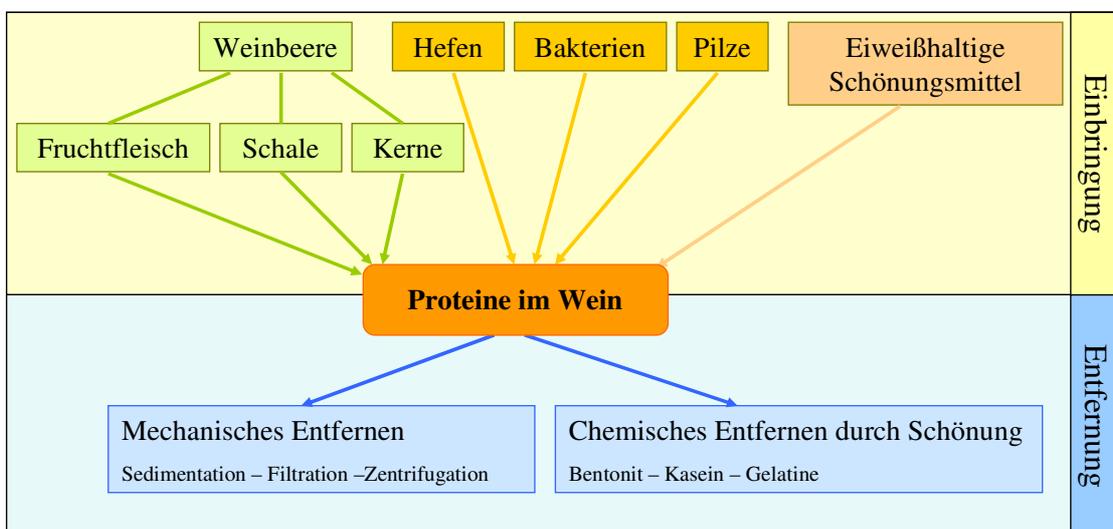


Abbildung 4: Mögliche Quellen der Einbringung und Entfernung von Proteinen im Wein

Untersuchungen mittels immunologischer Methoden zeigen, dass der Großteil der im Wein enthaltenen Proteine aus der Traube stammt. [FERREIRA ET AL 2000, DAMBROUCK ET AL 2003, FUKUI/YOKOTSUKA 2003]. KWON (2004), dem als ersten eine umfassende Identifizierung von Proteinen eines Weißweins (Sauvignon Blanc) gelingt, findet fünf Proteine aus der Traube, zwölf Proteine aus der Hefe, zwei Proteine aus Bakterien und ein Protein aus einem Pilz. Die geringe Anzahl der Traubenproteine erklärt KWON durch unvollständige Datenbanken in diesem Bereich.

#### **1.2.4 Proteingehalt und Einflussfaktoren auf den Proteingehalt im Wein**

Die Angaben zum Proteingehalt im Wein schwanken je nach Weinsorte und insbesondere je nach Bestimmungsmethode und der Art der Aufreinigung im Labor. Bei Weißweinen liegen die Proteingehalte zwischen 0,1 und 500 mg/l [YOKOTSUKA ET AL 1977, TYSON ET AL 1982, DORRESTEIN ET AL 1995, CANALS ET AL 1998, FERREIRA ET AL 2000, MESQUITA ET AL 2001, MONTEIRO ET AL 2001, FERREIRA ET AL 2002, FUKUI ET AL 2002, DAMBROUCK ET AL 2003, FUKUI/YOKOTSUKA 2003, KWON 2004, VINCENZI ET AL 2005].

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass im Rotwein keine Proteine enthalten sind, da sie an Tannine, die während der Fermentation durch Haut und Kerne freigesetzt werden, binden. Eine Untersuchung von YOKOTSUKA ET AL widerlegt dies bereits 1994, wobei selbst spätere Veröffentlichungen an dieser These festhalten.

Der Proteingehalt im Wein ist abhängig von der Rebsorte sowie dem Reifegrad der Trauben, wobei die Konzentration der Proteine mit der Reifung zunimmt. Außerdem können der Boden, das Klima sowie maßgeblich die Methoden der Weinherstellung den Proteingehalt und die Proteinzusammensetzung beeinflussen. Hierbei spielen das Pressen der ganzen oder entrappten Trauben, die Dauer des Schalenkontaktes (Maischestandzeit) und die Maischeerhitzung, die Zugabe von Schwefel sowie die Zugabe von Bentonit und anderer Schönungsmittel eine Rolle (Abbildung 5). Verschiedene Proteine sind durch diese Verfahren in unterschiedlichem Ausmaß betroffen [KOCH/SAJAK 1959, MURPHEY 1989, FERREIRA ET AL 2002, VINCENZI ET AL 2005, RIBEREAU-GAYON ET AL 2006].

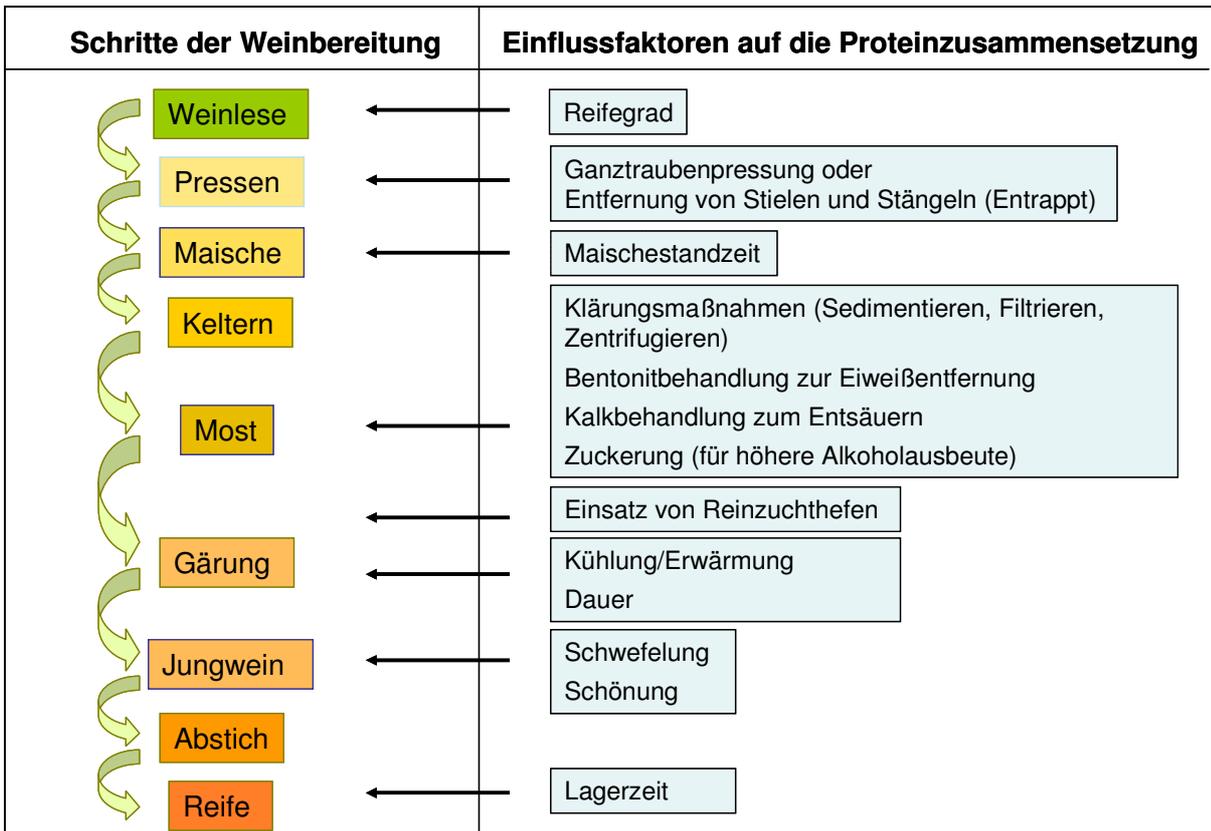


Abbildung 5: Einflussfaktoren auf die Proteinzusammensetzung im Verlauf der Weinbereitung

Bei der Betrachtung des Proteingehaltes im Verlauf der Weinbereitung erfolgt zunächst eine Reduktion des Proteingehaltes durch das Filtrieren und Zentrifugieren. Bei der alkoholischen Gärung und nach Zugabe der Hefe steigt der Proteingehalt wieder an, um nach der Schönung erneut eine Reduktion zu erfahren [FUKUI/YOKOTSUKA 2003]. Sowohl die Menge als auch die Zusammensetzung der Proteine ändert sich im Laufe der Weinbereitung. Der Proteingehalt reduziert sich von der Weinbeere bis zum Most auf ca. ein Fünftel und vom Most bis zum Wein auf ca. ein Drittel [YOKOTSUKA ET AL 1977, SANTORO ET AL 1995, CANALS ET AL 1998]. Dieser Abfall ist teilweise auf eine Reduktion der Proteinkonzentrationen und teilweise auf das komplette Entfernen der Proteine zurückzuführen, wobei insbesondere Proteine mit positiver Ladung abgetrennt werden, da diese vorzugsweise durch Bentonit entfernt werden [CANALS ET AL 1998]. Die Proteine, die im fertigen Wein gefunden werden, sind durch ihre Stabilität bei sauren pH-Werten und ihre Resistenz gegenüber Proteolyse gekennzeichnet [WATERS ET AL 1992, WATERS ET AL 1995].

## **Einfluss von Bentonit**

Bentonit, ein aufbereitetes Aluminiumsilikathydrat-Mineral, wird seit einigen Jahrzehnten zur Reduktion von Eiweißtrübungen sowie Kupfertrübungen aus dem Wein eingesetzt. Im Wein bildet sich eine Dispersion mit negativ geladenen Partikeln, die vor allem die positiv geladenen Weinproteine mit einem isoelektrischen Punkt (pI) größer 5,8 über elektrostatische Wechselwirkungen adsorbieren. Bei hohen Dosen werden auch Proteine mit niedrigerem pI adsorbiert. Die Bentonit-Proteinverbindungen koagulieren und können durch Abstich, Zentrifugation oder Filtration entfernt werden. Aber auch nach einer Bentonitbehandlung verbleibt, abhängig von der Rebsorte, etwa die Hälfte der löslichen Proteine im Wein.

Die Menge zugegebenen Bentonits ist von ca. 20 g/hl bis 40 g/hl aufgrund veränderter Weinberg- und Weinbereitungstechniken auf heute 80 g/hl bis über 120 g/hl angestiegen. In hohen Dosierungen (>80 g/hl) kann Bentonit den Geschmack und die Farbe beeinträchtigen, da neben den Proteinen auch weitere positiv geladene Komponenten wie Anthocyanine, Tannine und Polysaccharide entfernt werden [MILLER ET AL 1985, HSU/HEATHERBELL 1987, BLADE/BOULTON 1988, CANALS 1998, FUKUI/YOKOTSUKA 2003, RIBEREAU-GAYON ET AL 2006].

### **1.3 Pathogenese bezogene Proteine**

Pathogenese bezogene Proteine (PR-Proteine) werden von der Pflanze während dem Reifeprozess der Beeren produziert. Die Produktion kann durch Stress, Angriffe von Pathogenen wie Pilzen, Bakterien und Viren sowie abiotische Faktoren gesteigert werden [TATTERSALL ET AL 1997, DERCKEL 1998, WATERS ET AL 1998, VAN LOON/STRIEN 1999, JACOBS ET AL 1999, ROBINSON/DAVIES 2000, FERREIRA ET AL 2002, MONTEIRO ET AL 2003, FLAMINI/DE ROSSO 2006, MONTEIRO ET AL 2006, MONTEIRO ET AL 2007, CASTRO ET AL 2008].

Unterteilt werden PR-Proteine in vierzehn nicht verwandte Proteinfamilien, welchen ihre Funktion im Abwehrsystem der Pflanze gemein ist. Sie sind gekennzeichnet durch ihre hohe Stabilität bei niedrigen pH-Werten sowie gegenüber proteolytischer Aktivität. Viele PR-Proteine sind als Allergene bekannt. 25 % aller Allergien, die durch Pflanzen ausgelöst werden und in der offiziellen Allergen-Datenbank der International Union of Immunological Societies gelistet sind, werden durch PR-Proteine hervorgerufen [HOFFMANN-SOMMERGRUBER 2002, WATERS ET AL 1996, BREITENEDER 2000].

### **Thaumatococcus-ähnliche Proteine**

Ihren Namen erlangen die Thaumatococcus-ähnlichen Proteine (TLP) durch die Sequenzhomologie zu Thaumatococcus, einem intensiv süß schmeckenden Protein, welches aus *Thaumatococcus danii* Benth, einer westafrikanischen Frucht, isoliert wurde [VAN DER WEL/LOEVE 1972].

Thaumatococcus-ähnliche Proteine werden der PR-5 Familie untergeordnet. Die Resistenz der Thaumatococcus-ähnlichen Proteine gegenüber Proteasen und pH-/ oder hitzeverursachter Denaturierung ist vor allem auf das Vorhandensein von sechzehn konservierten Cysteinen zurückzuführen, die acht Disulfidbrücken ausbilden [BREITENEDER 2000]. Durch ihre hohe Stabilität überstehen sie auch den Prozess der Weinbereitung und lassen sich im Endprodukt Wein nachweisen [WATERS ET AL 1996, TATTERSALL 1997, KWON 2004, OKUDA ET AL 2006, CLINDRE ET AL 2008].

### **Chitinasen**

Pflanzenchitinasen spielen im Abwehrsystem der Pflanzen gegen Phytopathogene eine wichtige Rolle. Sie werden nach Angriffen von Pilzen oder Kontakt mit Substanzen, die in der Pflanze spezifische Abwehrreaktionen auslösen, verstärkt gebildet und inhibieren das Pilzwachstum. Die antimykotische Wirkung entfalten sie vor allem durch ihre Aktivität gegenüber Chitin, einer Hauptstrukturkomponente vieler Pilzzellen [WATERS ET AL 1996, WATERS ET AL 1998, ANO ET AL 2003].

### **Lipid-Transfer-Proteine**

Lipid Transfer Proteine (LTP) sind im Pflanzenreich weit verbreitete kleine, basische Proteine. Im Rahmen der pflanzlichen Abwehr spielen sie gegenüber Pilzen und Bakterien sowie als Bestandteile von Cutin und Suberin gegenüber abiotischem Stress eine wichtige Rolle. In den Pflanzen sind die Lipid Transfer Proteine in großen Mengen vor allem in der Haut und der Schale lokalisiert. Entsprechend ihrer Funktion werden sie der Familie 14 der PR-Proteine zugeordnet [GUERBETTE ET AL 1999, SALCEDO ET AL 2004, BREITENEDER/MILLS 2005A, GOMÈS ET AL 2003].

## 1.4 Nahrungsmittelallergie

Eine Allergie ist definiert als „eine Krankheit, die durch eine Immunreaktion gegenüber einem ansonsten harmlosen Antigen ausgelöst wird“ [JANEWAY ET AL 2002]. Gegen dieses Antigen erzeugt der Organismus Immunglobulin E (IgE) Antikörper, so dass bei einem erneuten Kontakt mit diesem eine allergische Reaktion auftritt. Allergene werden meist durch Einatmen oder oral in den Körper aufgenommen. Neben den Inhalationsallergien stellen Nahrungsmittelallergien in zunehmendem Maß ein Gesundheitsproblem, sowohl für Kinder als auch für Erwachsene in unserer Gesellschaft dar. In der deutschen Bevölkerung wird die Prävalenz einer Nahrungsmittelallergie für die erwachsene Bevölkerung auf 2,6 % geschätzt [ZUBERBIER ET AL 2004], wobei ein Großteil der Allergiker hierbei nicht erfasst wird. Die Diagnose von Nahrungsmittelallergien gestaltet sich nach wie vor schwierig. Allergische Reaktionen infolge einer Nahrungsmittelallergie können im gesamten Bereich des Körpers auftreten, wobei das Verdauungssystem, die Haut sowie das Atmungssystem am häufigsten betroffen sind. Symptome reichen von gastrointestinalen Beschwerden wie Durchfall und Erbrechen über Urticaria (Nesselsucht) bis zum anaphylaktischen Schock [OZOL/METE 2008, SICHERER ET AL 2006, HOFFMANN-SOMMERGRUBER 2000, JANEWAY ET AL 2002].

In den vergangenen Jahren ist eine Vielzahl von Proteinen, die eine allergische Reaktion auslösen, isoliert und identifiziert worden. Pflanzenallergene beschränken sich auf eine begrenzte Anzahl an Proteinfamilien. Dies sind vor allem Speicherproteine, strukturgebende Proteine oder Proteine, die in das Abwehrsystem der Pflanze einbezogen sind (PR-Proteine) [HOFFMANN-SOMMERGRUBER 2000].

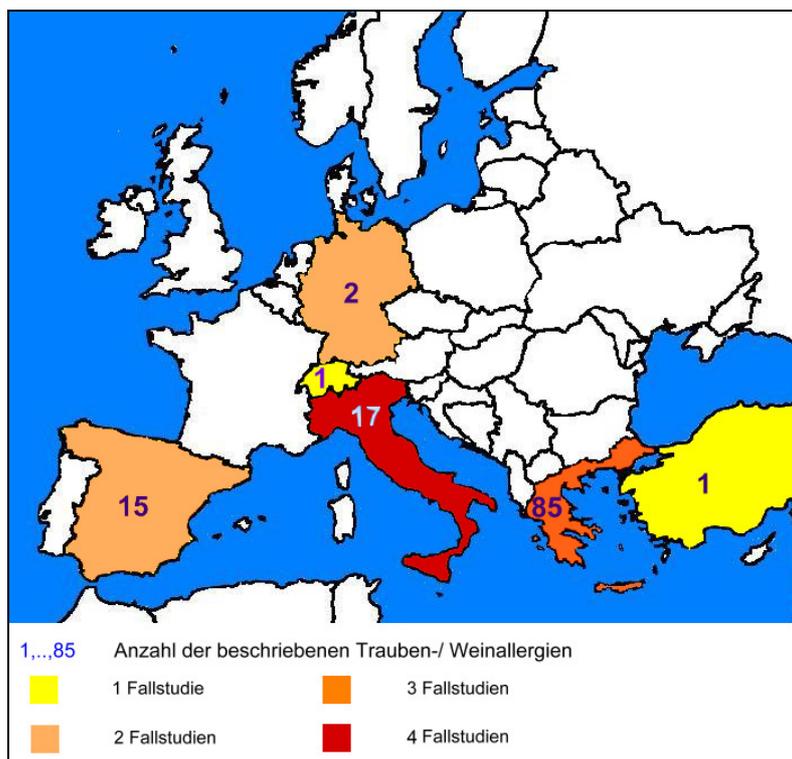
Beim Auslösen einer Nahrungsmittelallergie spielt neben den Eigenschaften des Allergens selbst auch die Exposition gegenüber dem Nahrungsmittel eine entscheidende Rolle [JENKINS ET AL 2005]. Sowohl die Struktur als auch die Funktion und die Stabilität eines Proteins sind für dessen Wirkung als Allergen von Bedeutung. Als charakteristische Eigenschaften sind thermische Stabilität und Resistenz gegenüber Proteolyse zu nennen. Strukturelle Eigenschaften sind stabilitätsgebende Disulfidbrücken, verbunden mit posttranslationalen Modifikationen wie N-Glykosylierungen. Enzymatische und proteolytische Aktivitäten sind bei vielen Allergenen zu beobachten. Bislang sind jedoch keine gemeinsamen strukturellen Motive oder Sequenzeigenschaften bekannt, die den als allergen eingestuften Proteinen in Nahrungsmitteln gemein ist, so dass es nicht möglich ist, von der Sequenz oder Struktur eines Proteins auf dessen allergenes Potential zu schließen. Auch der Herstellungszustand des Nahrungsmittels, Wechselwirkungen des Allergens mit der Nahrungsmittelmatrix, Wechselwirkungen der Nahrungskomponenten mit dem Immunsystem sowie genetische Faktoren scheinen beim Auslö-

sen einer allergischen Reaktion von Bedeutung zu sein [BREITENEDER/MILLS 2005, BREDEHORST/DAVID 2001, VIETHS 2004].

## **1.5 Allergenes Potential der weineigenen Proteine**

Während Unverträglichkeitsreaktionen gegenüber im Wein enthaltenen biogenen Aminen sowie Sulfid bekannt sind, sind echte allergische Reaktionen noch wenig erforscht. Bisher wird nur von sehr wenigen Fällen mit allergischen Reaktionen gegenüber Trauben berichtet. Studien über den Zusammenhang zwischen Wein und allergischen Reaktionen sind seltener und beruhen fast ausschließlich auf Fallstudien [CLAYTON/BUSSE 1980, GIANNOCCARO ET AL 1998, VASWANI ET AL 1999, BIRCHER ET AL 1999, KARAKAYA/KALYONCU 2000, RODRIGUEZ ET AL 2001, SENNA ET AL 2001, PASTORELLO ET AL 2003, RODRIGUEZ ET AL 2004, BORGHEAN ET AL 2004, KALOGEROMITROS ET AL 2004, KALOGEROMITROS ET AL 2005, SCHÄD ET AL 2005, KALOGEROMITROS ET AL 2006, SBORNIK ET AL 2007].

Einen Überblick über die Verbreitung der Wein-/ und Traubenallergie nach aktuellem Stand ist in Abbildung 6 dargestellt. Diese zeigt, dass in Mittelmeerländern wie Italien, Spanien und Griechenland am häufigsten von Wein-/ bzw. allergien berichtet wird, während in Deutschland beispielsweise aktuell nur zwei Fallstudien publiziert sind. Ein Grund hierfür könnte in der Epidemiologie liegen: während in Griechenland beispielsweise Wein- und Traubenallergiker für die Durchführung entsprechender Untersuchungen rekrutiert wurden [KALOGEROMITROS ET AL 2006], gibt es nach meinem Wissensstand bislang keine einzige epidemiologische Untersuchung in Deutschland. Weitere mögliche Gründe für die unterschiedliche Allergieprävalenz werden in der Diskussion erörtert (siehe Abschnitt 4.7).



**Abbildung 6: Verbreitung der Wein-/ und Traubenallergie in Europa**

Bei Traubenallergikern wird häufig eine Kreuzreaktivität mit anderen Früchten, insbesondere der *Rosaceae*-Familie beobachtet, wofür das Lipid-Transfer-Protein (LTP) verantwortlich gemacht wird [BALLMER-WEBER 2002, PASTORELLO ET AL 2003, KALOGEROMITROS ET AL 2006, VASSILOPOULOU ET AL 2007].

Bisher stellt das LTP das einzige in der offiziellen Datenbank geführte Allergen aus *Vitis vinifera* dar, wobei PASTORELLO ET AL (2003) bereits zwei weitere potentielle Allergene aus der Traube beschrieben haben. Neben dem Lipid-Transfer-Protein zeigen ein Thaumatin-ähnliches Protein mit 24 kDa sowie eine Klasse IV Endochitinase mit 30 kDa immunologische Eigenschaften, wobei Weinallergiker nur auf die Endochitinase reagieren und eine Reaktion nur bei jungem Rotwein und Fragolino beobachtet wird. Im Gegensatz zu PASTORELLO ET AL wird in der Untersuchung von VASSILOPOULOU ET AL (2007B) eine allergische Reaktion weder auf die Endochitinase noch auf das Thaumtin-ähnliche Protein beobachtet. Hingegen wurden das Expansin (28 kDa), ein Polygalacturonase-inhibierendes Protein (37,5 kDa), die  $\beta$ -1,3-Glucanase (39 kDa) und ein nicht weiter identifiziertes Protein mit einem Molekulargewicht von 60 kDa als potentielle Allergene benannt.

Diese widersprüchlichen Ergebnisse zeigen deutlich, dass aktuell noch ein großer Forschungsbedarf zur Identifizierung von Allergenen im Wein bzw. in der Traube besteht.

### **Lebensmittelkennzeichnung**

Die EU-Richtlinie 2003/89/EG beinhaltet eine Liste an Lebensmitteln und Zutaten, die als Auslöser von Allergien bekannt sind und bei der Etikettierung von Lebensmitteln aufgeführt werden müssen. Hiervon sind auch alkoholische Getränke, insbesondere Wein, betroffen. Beim Wein müssen Schwefeldioxid und Sulfite ab einer Konzentration von mehr als 10 mg/kg auf dem Etikett mit dem Hinweis „Enthält Sulfite“ oder „Enthält Schwefeldioxid“ deklariert werden. Ebenso bezieht sich die Kennzeichnungspflicht auf als Schönungsmittel eingesetzte Proteine.

Die Richtlinie 2007/68/EG der Kommission vom 27. November 2007 zur Änderung von Anhang IIIa (Liste von Lebensmittelzutaten, die auf der Etikettierung von Lebensmitteln angegeben werden müssen, da sie bei empfindlichen Personen wahrscheinlich unerwünschte Reaktionen hervorrufen) der Richtlinie 2003/89/EG des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich bestimmter Lebensmittelzutaten besagt, dass Fischgelatine oder Hausenblase, die als Klärhilfsmittel in Bier und Wein verwendet wird, von der Deklarierungspflicht ausgenommen wird. Aus Ei gewonnene Klärungsmittel wie Lysozym und Albumin sind ebenso kennzeichnungspflichtig wie die aus Milcherzeugnissen gewonnenen Klärungsmittel wie Kasein. Die Kennzeichnungspflicht gilt verbindlich für Produkte, die nach dem 31. Mai 2009 in den Handel kommen.

## 1.6 Ziele der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Analyse der Proteinzusammensetzung sowie des Proteingehalts von Weißwein, Roséwein und Rotwein aus südwestdeutschen Anbaugebieten.

Hierbei sollen die folgenden Fragen beantwortet werden:

- Wie unterscheidet sich die Proteinzusammensetzung von Weiß-, Rosé- und Rotwein?
- Welche Proteine sind in allen Weinsorten enthalten, welche sind charakteristisch für bestimmte Rebsorten?
- Sind bereits beschriebene Proteine in südländischen Weinen auch in deutschen Weinen enthalten?
- Welcher Herkunft entstammen die Proteine im Wein (Trauben, Hefen, Bakterien, Pilze)?
- Welche potentiell allergenen Proteine sind im Wein enthalten?

Im Mittelpunkt der Arbeit steht somit die Isolierung, Charakterisierung und Identifizierung von Proteinen regionaler Weine. Aufgrund der sich stetig verbessernden Methodik wurden in den vergangenen Jahren erstmalig umfassende Identifizierungen von Sauvignon Blanc sowie Chardonnay Weißweinen publiziert [KWON 2004, OKUDA ET AL 2006, CILINDRE ET AL 2008]. Es bedarf jedoch weiterer Untersuchungen, um Aussagen darüber treffen zu können, welche Proteine universell im Wein vorkommen und welche nur in speziellen Weinsorten enthalten sind. Die Identifizierung von Proteinen eines Rotweins ist bislang noch nicht publiziert, obwohl gerade ein Vergleich zwischen Weiß- und Rotwein aufgrund der unterschiedlichen Herstellungsverfahren interessant erscheint. Auch ein Vergleich mit Roséwein fehlt bislang vollständig. Die Auswahl regionaler Weine wird bei der Überprüfung des Vorhandenseins potentieller Allergene im Rotwein um eine Auswahl ausländischer Weine ergänzt, um einen Vergleich auch mit Weinen außerhalb Deutschlands ziehen zu können.

Die Kenntnis der Proteinzusammensetzung der Weine stellt die Grundlage weiterführender Untersuchungen zur Stabilität des Weins und des allergischen Potentials weineigener Proteine dar.

Die Untersuchung potentiell allergener Proteine im Wein ist auch Gegenstand dieser Arbeit. Es sind einige Fallstudien von Trauben- und Weinallergien beschrieben, zur molekularen Charakterisierung der entsprechenden Proteine ist jedoch vergleichsweise wenig bekannt, obwohl dies die Grundlage für eine gute Diagnostik darstellt. So wird in der vorliegenden Arbeit

das Vorkommen potentieller Allergene im Wein überprüft, die klinische Relevanz soll in weiteren Tests an der Hautklinik der Mainzer Universitätsklinik untersucht werden.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Geräte**

#### **Blot-Apparatur**

Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (BioRad, München)

#### **Eismaschine**

ZBE 30-10 (Ziegra-Eismaschinen, Isernhagen)

#### **FPLC**

BioLogic HR Workstation (Bio-Rad, München)

Auto-Injection Valve AV 7-3

Fraction Collector Model 2128

Software: BioLogic HR 2.1

BioLogic DuoFlow Workstation (Bio-Rad, München)

Auto-Injection Valve AV 7-3

Fraction Collector BioFrac

Software: Biologic DuoFlow 5.0

#### **Gefriertrocknung**

ALPHA 1-4 LSC (Martin CHRIST Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode)

Inklusive Vakuumpumpe RZ-2

#### **Geldokumentation**

Scanner: GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad, München)

Software: Quantity One v4.5.2 (Bio-Rad, München)

#### **Geltrocknungsanlage**

Vakuum-Geltrockner (von Keutz Laborgeräte, Reiskirchen)

#### **Heizblock**

TK 10 (HLC BioTech, Bovenden)

**Kältebad**

Kältebad mit Umwälzthermostat F34-ED (JULABO Labortechnik, Seelbach)

**Magnetrührer**

RCT basic (IKA Labortechnik, Staufen)

**Massenspektrometer**

Q-TOF Premier Massenspektrometer mit nano-UPLC (Waters, Eschborn)

**Photometer**

Cary 300 (Varian, Darmstadt)

**pH-Meter**

766 Calimatic (Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co KG, Berlin)

**Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Minigel-Laufkammer (von Keutz Laborgeräte, Reiskirchen)

Große Laufkammern (Hölzel, Dorfen)

**Reagenzglasschüttler**

VM3 (IKA Labortechnik, Staufen)

**Reinstwasseranlage**

Milli-Q Plus PF (Millipore, Eschborn)

Milli-Q Advantage (Millipore, Eschborn)

**Rotationsverdampfer**

RE-11 (Büchi Laboratoriums-Technik AG, Flawil, Schweiz)

**Schlauchpumpe**

Minipuls 2 (Gilson, Limburg-Offheim)

**Schüttler**

Mini Rocking Platform (Biometra GmbH, Göttingen)

Schüttler Duomax 1030 (Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Kelheim)

**Spannungsquellen**

Power Supply Model 200/2.0 (Bio-Rad, München)

Power-Pac 3000 (Bio-Rad, München)

**Vakuumpumpe**

MZ 2C (Vakuubrand GmbH, Wertheim)

**Waagen**

A 200S (Sartorius GmbH, Göttingen)

MJ 3000 (YMC Co. Ltd., Kyoto, Japan)

**Zentrifugen**

Universal 16R (Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen)

Universal 32R (Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen)

L7 Ultrazentrifuge (Beckmann Coulter, Krefeld)

Typ 60 Ti Rotor

**Zweidimensionale Gelelektrophorese**

IEF-Gelelektrophoreseapparatur IPGphor (Amersham Pharmacia, Schweden)

Hoefler Electrophorese Unit SE600 (Amersham Pharmacia, Schweden)

**2.2 Ge- und Verbrauchsmittel**

**Blotting-Filterpapier:** Blotting Papers BG002 (Schleicher und Schuell, Dassel)

**Dialyseschlauch:** Regenerierte Cellulose; MWCO 3,5 kDa; Spectra/Por® (Roth, Karlsruhe)

**Einmalküvetten:** Volumen: 1,5 ml; Schichtdicke: 1 cm (Roth, Karlsruhe)

**FPLC-Säulen:**

Anionentauscher UNO Q-12 (Bio-Rad, München)

Anionentauscher UNO Q-1 (Bio-Rad, München)

Kationentauscher UNO S-6 (Bio-Rad, München)

Größenausschluss säule HiPrep® Sephacryl S-100 (Pharmacia Biotech, Erlangen)

**IEF-Gele:** SERVALYT® PreNets® (Serva, Heidelberg)

**IPG-Streifen:** pH 3-10 (GE Healthcare, München)

**Membran Filter:** Supor®-200; 0,2 µm (Pall GmbH, Dreieich)

**Nitrocellulosetransfermembran:** Protran® BA 83; 0,2 µm (Schleicher und Schuell, Dassel)

**PVDF-Membran:** Sequi-Blot™PVDFMembran, 0,2 µm (BioRad, München)

**Quarzküvette:** Suprasil® (Hellma, Müllheim)

**Spritzenfilter:** Rotilabo®-Spritzenfilter steril; 0,22µm; Polyethersulfon (PES) (Pall GmbH, Dreieich)

## 2.3 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien werden in *pro analysis* Qualität bezogen.

### Puffer

Citronensäure	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Kalziumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumazid	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween 20	Roth, Karlsruhe

**Gelelektrophorese (inklusive Färbemethoden)**

Acrylamidlösung Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue G-250	BioRad, München
DTT	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Iodoacetamid	Sigma-Aldrich, Steinheim
IPG-Puffer, pH 3-10	GE Healthcare, München
Methanol	Roth, Karlsruhe
<i>o</i> -Phosphorsäure	Roth, Karlsruhe
Presicion Plus Protein Standard	BioRad, München
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe
$\beta$ -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg

**Isoelektrische Fokussierung**

IEF-Anodenlösung	Serva, Heidelberg
IEF-Kathodenlösung	Serva, Heidelberg
IEF-Marker	Serva, Heidelberg
Serva Violett	Serva, Heidelberg

**Glykoproteinbestimmung**

4-Chloro-1-naphtol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Albumin Fraktion V	Roth, Karlsruhe
Avidin Peroxidase	Sigma-Aldrich, Steinheim
Concanavalin A	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaleidoskop Prestained Standard Marker	BioRad, München
Mangansulfat	Fluka, Neu-Ulm
Perjodsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Schiff's Reagenz	Roth, Karlsruhe

Wasserstoffperoxid (30%)

Fluka, Neu-Ulm

**Western Blot**

Anti-Chicken IgG

Acris Antibodies, Hiddenhausen

Anti-Thaumatococcus (Plant), Polyclonal IgY Antibodies

GenWay Biotech, San Diego CA, USA

Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-  
p-toluidinsalz (BCIP)

Roth, Karlsruhe

Dimethylformamid (DMF)

Sigma-Aldrich, Steinheim

Magermilchpulver Sucofin

TSI GmbH, Zeven

p-Nitrobluetetrazolium (NBT)

Roth, Karlsruhe

Ponceau S

Roth, Karlsruhe

Sulfosalicylsäure

Merck, Darmstadt

Trichloressigsäure

Serva, Heidelberg

**Proteinkonzentrationsbestimmung**

Bio-Rad Protein Assay

BioRad, München

Bovines Serum Albumin (BSA)

Sigma-Aldrich, Steinheim

Micro BCA™ Reagenz A

Pierce, Rockford, IL, USA

Micro BCA™ Reagenz B

Pierce, Rockford, IL, USA

Micro BCA™ Reagenz C

Pierce, Rockford, IL, USA

Modified Lowry Protein Assay

Pierce, Rockford, IL, USA

**Proteinfällung**

Ethanol

Roth, Karlsruhe

Polyclar® AT

Serva, Heidelberg

**Absorptionsmessung**

Quercetin-Dihydrat

Sigma, Steinheim

## 2.4 Wein, Most und Trauben

Für die Versuche werden regionale Weinsorten aus den Weinanbaugebieten Rheinhessen, Rheingau und Pfalz eingesetzt. Die Sorten Weißer Riesling, Sauvignon Blanc, Dornfelder und Spätburgunder aus Rheinhessen werden von dem Weingut der Stadt Mainz (Inhaber: Familie Fleischer) bezogen. Der Weiße Riesling sowie der Cabernet Sauvignon aus dem Rheingau werden von der Forschungsanstalt Geisenheim zur Verfügung gestellt, während der Blaue Portugieser aus der Pfalz, der Portugieser Weißherbst aus Rheinhessen, der Spätburgunder Weißherbst sowie der Weiße Riesling aus der Pfalz über den Lebensmitteleinzelhandel erworben werden. Der Morio Muskat sowie der Gewürztraminer werden bei einem rheinhessischen Winzer erworben. Eine Übersicht der in den Versuchen eingesetzten Weinsorten findet sich in Tabelle 2.

Die Weintrauben und der Most stammen von der Forschungsanstalt Geisenheim und sind in Tabelle 3 gelistet.

**Tabelle 2: Verwendete Weinsorten**

<b>Rebsorte und Jahrgang</b>	<b>Anbaugebiet (Lage, wenn bekannt)</b>
<b>Weißwein</b>	
Weißer Riesling 2005	Rheingau (Geisenheimer Fuchsberg)
Weißer Riesling 2004	Rheingau (Geisenheimer Fuchsberg)
Weißer Riesling 2006 (Kabinett trocken)	Rheinhessen (Mainz; Hechtsheimer Kirchenstück)
Weißer Riesling 2005 (Kabinett trocken)	Rheinhessen (Mainz; Hechtsheimer Kirchenstück)
Weißer Riesling 2004 (Kabinett trocken)	Rheinhessen (Mainz; Hechtsheimer Kirchenstück)
Weißer Riesling 2003 (Kabinett trocken)	Rheinhessen (Mainz; Hechtsheimer Kirchenstück)
Weißer Riesling 2007	Pfalz
Sauvignon Blanc 2006	Rheinhessen (Mainzer St. Alban)
Morio Muskat 2003 (Spätlese)	Rheinhessen (Harxheimer Lieth)
Gewürztraminer 2006 (Spätlese trocken)	Rheinhessen (Harxheimer Schlossberg)
<b>Weißherbst</b>	
Portugieser Weißherbst 2006 (lieblich)	Rheinhessen
Portugieser Weißherbst 2007	Pfalz
Spätburgunder Weißherbst 2007 (halbtrocken)	Rheingau

<b>Rotwein</b>	
Blauer Portugieser trocken 2005	Pfalz (Freinsheim)
Blauer Portugieser trocken 2004	Pfalz (Freinsheim)
Cabernet Sauvignon 2005	Rheingau (Geisenheimer Fuchsberg)
Dornfelder 2005 trocken	Rheinhessen (Mainzer St. Alban)
Dornfelder 2004 trocken	Rheinhessen (Mainzer St. Alban)
Dornfelder 2003 trocken	Rheinhessen (Mainzer St. Alban)
Dornfelder 2002 trocken	Rheinhessen (Mainzer St. Alban)
Spätburgunder 2005 (12 Monate im Holzfass gereift)	Rheinhessen

**Tabelle 3: Verwendete Weintrauben und Most**

<b>Rebsorte und Jahrgang</b>	<b>Anbaugebiet Lage</b>
<b>Weißer Rebsorte</b>	
Weißer Riesling 2007	Rheingau (Geisenheimer Fuchsberg)
Weißer Riesling 2006	Rheingau (Geisenheimer Fuchsberg)
Weißer Riesling 2005	Rheingau (Geisenheimer Fuchsberg)
Weißer Riesling 2004	Rheingau (Geisenheimer Fuchsberg)
<b>Rote Rebsorte</b>	
Cabernet Sauvignon 2005	Rheingau (Geisenheimer Fuchsberg)
Cabernet Sauvignon 2006	Rheingau (Geisenheimer Fuchsberg)

Im Folgenden werden für die Weinsorten Weißer Riesling und Blauer Portugieser die Synonyme Riesling und Portugieser eingesetzt.

## **2.5 Puffer und Lösungen**

Alle Puffer und Lösungen werden mit destilliertem Wasser angesetzt. Bei der Herstellung der Puffer werden die pH-Werte mit konzentrierter Salzsäure beziehungsweise mit 0,5 M Natronlauge bei Raumtemperatur (20°C) eingestellt. Die Phosphatpuffer werden nach der von HOLTZHAUER beschriebenen Methode angesetzt [HOLTZHAUER 1997].

Die Lösungen, die für die Chromatographie benutzt werden, werden mittels einer Membran-Vakuumpumpe durch einen Membranfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert und anschließend entgast.

**Puffer für die Proteinextraktion**

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Phosphatpuffer 1 pH 7,0	100 mM Natriumphosphat
Traubenextraktionspuffer pH 7,0	100 mM Natriumphosphat 20 mM EDTA 3 mM NaN <sub>3</sub> 0,5 % Tween-20 Protease-Inhibitor-Cocktail (2 mM AEBSF; 1 mM EDTA; 130 µM Bestatin; 14µM E-64; 1 µM Leupeptin; 0,3 µM Aprotinin)

**Puffer und Lösungen für die Gelelektrophorese**

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Trenngelpuffer	1,5 M Tris (pH 8,8)
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris (pH 6,8)
Laufpuffer (SDS-PAGE)	0,2 M Tris 0,15 M Glycin 0,08 % (w/v) SDS
Laufpuffer (native PAGE)	0,1 M Tris 0,75 M Glycin
Denaturierungspuffer (SDS-PAGE)	25 % (v/v) Sammelgelpuffer 20 % (v/v) Glycerin 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol 5 % (v/v) H <sub>2</sub> O 4 % (w/v) SDS + Spatelspitze Bromphenolblau
Probenpuffer (native PAGE)	50 % (v/v) Glycerin + Spatelspitze Bromphenolblau
Rehydratationslösung (2D-Gelelektrophorese)	7 M Harnstoff 2 M Thioharnstoff 4 % CHAPS 0,5 % Triton X-100 0,5 % IPG-Puffer

	auf 30 ml mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> auffüllen direkt vor Gebrauch Zugabe von 1 mg DTT pro 100 µl Lösung
Äquibrierungslösung (2D-Gelelektrophorese)	50 mM Trenngelbuffer (6,7 ml) 6 M Harnstoff 30 % (v/v) Glycerol 2 % (w/v) SDS 1 Spatelspitze Bromphenolblau auf 200 ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> auffüllen direkt vor Gebrauch Zugabe von 50 mg DTT bzw. 125 mg Iodoacetamid pro 5 ml Lösung

### Lösungen für die Coomassie-Färbung

Lösung	Zusammensetzung
Färbelösung 1 [nach SEE UND JACKOWSKI 1989]	50 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure 0,5 % (w/v) Coomassie R 250
Entfärbelösung 1 [nach SEE UND JACKOWSKI 1989]	40 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure
Färbelösung 2 [nach KANG ET AL 2002]	0,02 % Coomassie G 250 5 % Aluminiumsulfat-Hydrat 10 % Ethanol 2 % <i>o</i> -Phosphorsäure
Entfärbelösung 2 [nach KANG ET AL 2002]	10 % Ethanol 2 % <i>o</i> -Phosphorsäure

### Lösungen für die Silber-Färbung

Lösung	Zusammensetzung
50 % Methanol-Lösung	50 % (v/v)Methanol 10 % (v/v)Essigsäure 40 % (v/v)Wasser
5 % Methanol-Lösung	5 % (v/v)Methanol 7 % (v/v)Essigsäure

	88 % (v/v) Wasser
Enhancer-Lösung	0,02 % (w/v) Natriumthiosulfat in Wasser
Färbelösung	0,2 % (w/v) Silbernitrat 0,075 % (v/v) Formaldehyd In Wasser
Entwickler-Lösung	6 % (w/v) Natriumcarbonat 0,004 % (w/v) Natriumthiosulfat 0,05 % (v/v) Formaldehyd In Wasser
Stop-Lösung	2,0 M Zitronensäure in Wasser

### Puffer und Lösungen für den Lektinblot

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Transferpuffer	39 mM Glycin 49 mM Tris 0,037 % (w/v) SDS 20 % (v/v) Methanol
Tris-buffered saline 1 (TBS 1) pH 7,5	50 mM Tris 150 mM NaCl
Tris-buffered saline 2 (TBS 2) pH 7,5	50 mM Tris 150 mM NaCl 1 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM CaCl <sub>2</sub> 1 mM MnSO <sub>4</sub>
Tris-buffered saline 3 (TBS 3) pH 7,5	50 mM Tris 347 mM NaCl
Lektin-Stammlösung	2 mg/ml Concanavalin A in TBS 1 / 50 % Glycerin
Lektin-Lösung	10 µg/ml Concanavalin A in TBS 2
Avidin-Peroxidase-Stammlösung	1 mg/ml Avidin-Peroxidase in TBS 3
Avidin-Peroxidase-Lösung	0,5 µl Avidin-Peroxidase-Stammlösung in 10 ml TBS 3
4-Chloro-1-Naphtol-Stammlösung	3 mg/ml 4-Chloro-1-Naphtol in Methanol
4-Chloro-1-	1 ml 4-Chloro-1-Naphtol-Stammlösung in 5

Naphtol/Wasserstoffperoxislösung	ml TBS 1 mit 0,015 % (v/v) Wasserstoffperoxid
Ponceau S – Lösung	3 % (w/v) Trichloressigsäure 3 % (w/v) Sulfosalicylsäure 0,2 % (w/v) Ponceau S

### Puffer und Lösungen für den Western-Blot

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Transferpuffer	39 mM Glycin 48 mM TRIS 0,037 % (w/v) SDS 20 % Methanol In Wasser
Ponceau S-Lösung	3 % TRIS 3 % Sulfosalicylsäure 0,2 % Ponceau S In Wasser
TBS (TRIS-buffered saline) (10fach) pH 7,4	100 mM TRIS 1,4 M In Wasser
TBST (TBS mit Tween)	100 ml TBS (10fach) 0,3 % (v/v) Tween In Wasser
Blocklösung	5 % (w/v) Magermilchpulver in TBST
Entwicklungspuffer (10fach) pH 9,5	100 mM TRIS 1,0 M NaCl 50 mM MgCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O In Wasser
NBT-Lösung	50 mg/ml p-Nitrobluetetrazolium (NBT) in 70 % DMF
BCIP-Lösung	50 mg/ml 5- Brom-4-chlor-3-Indolyl- phosphat-p-toluidinsalz (BCIP) in DMF
Entwicklungslösung	1 ml Entwicklungspuffer (10fach) 33 µl BCIP-Lösung

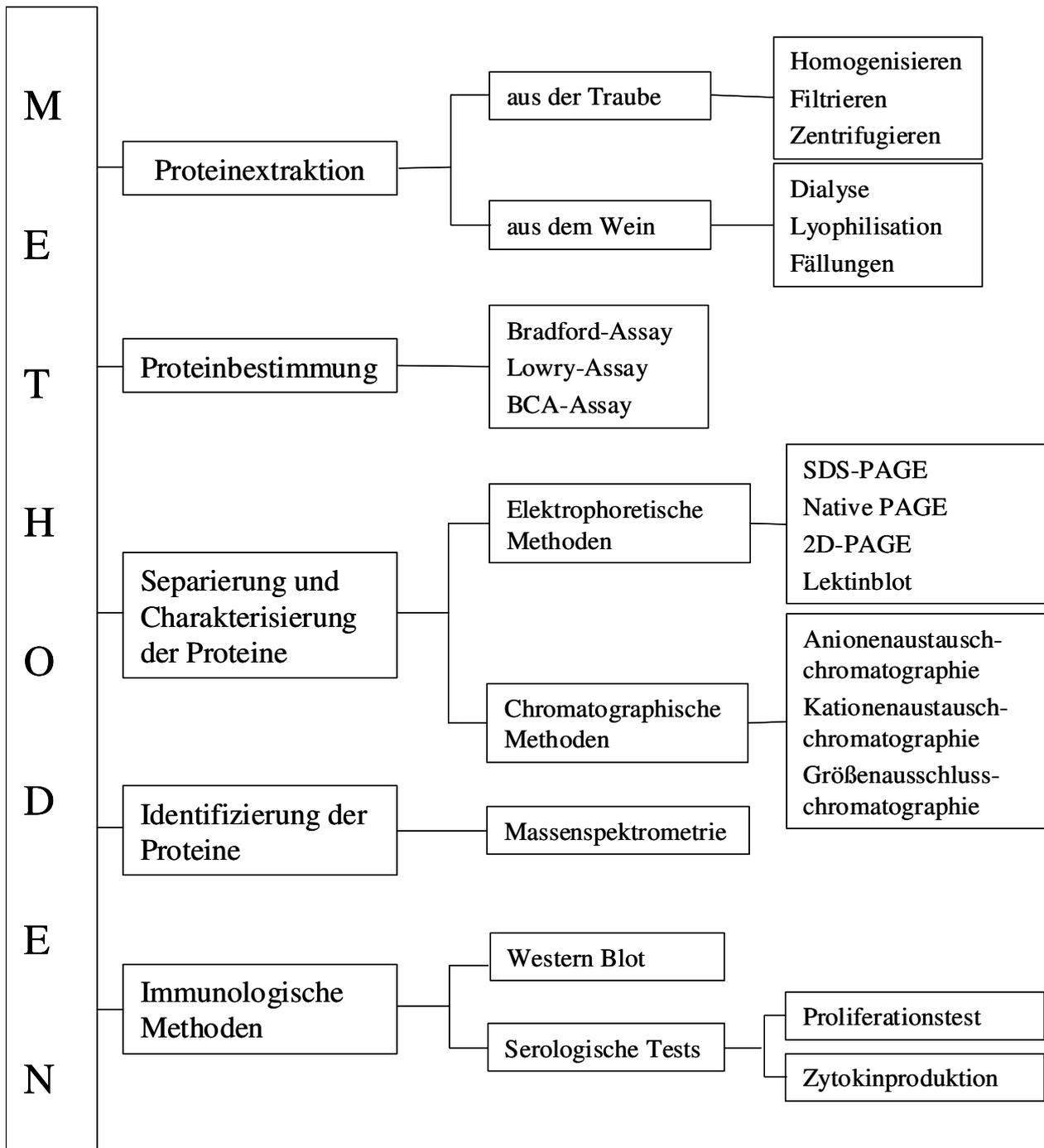
	66 µl NBT-Lösung In 9 ml Wasser
--	------------------------------------

**Puffer für die Chromatographie**

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Phosphatpuffer 2 – Niedrigsalzpuffer pH 7,7	50 mM Natriumphosphat
Phosphatpuffer 3 – Hochsalzpuffer pH 7,7	50 mM Natriumphosphat 1 M NaCl
Phosphatpuffer 4 pH 7,0	50 mM Natriumphosphat
Citratpuffer – Niedrigsalzpuffer pH 3,0	50 mM Natriumcitrat
Citratpuffer – Hochsalzpuffer pH 3,0	50 mM Natriumcitrat 1 M NaCl

## 2.6 Methodenübersicht

In der folgenden Darstellung sind alle Methoden zusammengestellt, die im Rahmen dieser Arbeit Anwendung finden und nachfolgend im Einzelnen erläutert werden.



## **2.7 Aufreinigung der Proteine aus dem Wein**

### **2.7.1 Dialyse**

Die Dialyse wird zur Entfernung niedermolekularer Substanzen wie Salzen, Farbstoffen und Zuckern eingesetzt. Eine Dialyse vor der Durchführung der Gefriertrocknung ist notwendig, da es bei einer zu hohen Osmolarität der Lösung zur Anreicherung von Salzen und Zuckern kommen kann. Dies bewirkt eine Senkung des Schmelzpunktes, was zum Auftauen des Eises und in der Folge zum Kochen der Lösung führen kann.

Für die Dialysen werden Spectra/Por<sup>®</sup> Dialyseschläuche aus regenerierter Cellulose mit einer Ausschlussgrenze von 3,5 kDa verwendet. Die Dialysen erfolgen bei 4 °C unter ständigem Rühren für mindestens 72 Stunden gegen destilliertes Wasser bei mindestens zweifachem Wechsel des Wassers pro Tag.

### **2.7.2 Gefriertrocknung**

Mit Hilfe der Gefriertrocknung (ALPHA 1-4 LSC von CHRIST Gefriertrocknungsanlagen) werden einer gefrorenen Probe durch Sublimation Wasser bzw. leicht flüchtige Substanzen unter Anlegen eines Vakuums bei Raumtemperatur entzogen. Eingesetzt wird ein Zweikammer-System, d.h. das Gefrieren findet separat statt und das Trocknen außerhalb der Eiskondensatorkammer.

#### **2.7.2.1 Einfrieren**

Die Weinproben werden im Rundkolben mittels Spin-Freezing (unter Rotation) in einem Kältebad bei -30°C gefroren, um die Schichtdicke der Probe im Rundkolben möglichst gering zu halten und somit die Zeitdauer der Gefriertrocknung zu minimieren. Bei einem Flüssigkeitsvolumen von 100 bis 200 ml Wein werden 1 l Kolben eingesetzt. Probenmengen kleiner 50 ml werden in Glasröhrchen bzw. Erlenmeyerkolben in der Tiefkühltruhe bei -20°C über einen Zeitraum von mindestens 12 Stunden gefroren.

#### **2.7.2.2 Lyophilisation**

Das Trocknen findet bei einem Druck von 0,940 mbar über einen Zeitraum von 20 bis 28 Stunden statt. Bei der Konzentrierung der dialysierten Wein-, Most- und Traubenproben werden Rundkolben als Trocknungsgefäße verwendet, die an einem der Grundplatte aufgesetzten Trockenrechen befestigt sind. Die Trocknung kleinerer Mengen z. B. zur Konzentrie-

rung der Fraktionen nach einer chromatographischen Auftrennung erfolgt auf Stellflächen in Erlmeyerkolben oder Glasröhrchen.

## 2.7.3 Fällung der Proteine

### 2.7.3.1 Fällung mit Ethanol

Die Ethanolfällung wird zur Extraktion der Proteine aus dem Rotwein eingesetzt, wobei insbesondere eine Abtrennung der Polyphenole erreicht werden soll.

Eingesetzt wird sowohl unbehandelter als auch aufkonzentrierter Dornfelder Rotwein des Jahrgangs 2005, welcher sowohl über den Lebensmitteleinzelhandel als auch über ein Weingut erworben wird. Nach der Dialyse und Gefriertrocknung werden 50 mg des lyophilisierten Weinextraktes in 1 ml Phosphatpuffer 1 gelöst. Die zu fällende Probe wird mit eiskaltem Ethanol entsprechend der Angaben in Tabelle 4 vermischt und mindestens eine Stunde gerührt. Über Nacht wird die Probe bei 4°C inkubiert und am folgenden Tag 30 min bei 5.000 g (nicht behandelter Wein) bzw. bei 10.000 g (lyophilisierter Wein) zentrifugiert (siehe Tabelle 5). Das Pellet wird nach Lösen in Phosphatpuffer 1 zur Analyse mittels SDS-PAGE eingesetzt.

**Tabelle 4: Proben für die Ethanolfällung mit unbehandeltem Wein**

	Wein	Ethanol	Verdünnung
<b>unbehandelter Wein</b>			
Probe A Dornfelder 2005 (Lebensmitteleinzelhandel; Rheinhessen)	20 ml	20 ml	1:2
Probe B Dornfelder 2005 (Lebensmitteleinzelhandel; Rheinhessen)	10 ml	30 ml	1:4
Probe C Dornfelder 2005 (Lebensmitteleinzelhandel; Rheinhessen)	5 ml	45 ml	1:10
Probe D Dornfelder 2005 (Winzer; Rheinhessen)	10 ml	30 ml	1:4
<b>aufkonzentrierter Wein</b>			
Probe E Dornfelder 2005 (Winzer; Rheinhessen)	300 µl	900 µl	1:4
Probe F Dornfelder 2005 (Winzer; Rheinhessen)	400 µl	1600 µl	1:5
Probe G Dornfelder 2005 (Winzer; Rheinhessen)	100 µl	900 µl	1:10

**Tabelle 5: Durchführung der Ethanolfällung**

<b>Arbeitsschritt</b>	<b>Dauer</b>
Zugabe von eiskaltem Ethanol zu den Proben	
Schütteln/Rühren	60 min
Inkubieren bei 4°C	über Nacht
Zentrifugieren bei 4°C bei 10.000 g (lyophilisierte Proben) bei 5.000 g (unbehandelter Wein)	30 min

### 2.7.3.2 Fällung mit TCA/Aceton

Die TCA-Aceton-Fällung dient der Probenvorbereitung für die zweidimensionale Gelelektrophorese. Sie wird mit Trauben der Rebsorte Cabernet Sauvignon des Jahrgangs 2005 aus Rheinhessen durchgeführt. Die verwendete TCA-Acetonlösung setzt sich aus 10 % TCA in Aceton mit 0,07 %  $\beta$ -Mercaptoethanol zusammen. Die Fällung wird entsprechend der in Tabelle 6 aufgeführten Schritte durchgeführt. Zunächst werden die Trauben unter Zugabe von flüssigem Stickstoff zermörsert. Pro 500  $\mu$ l Traube wird 1 ml der TCA-Acetonlösung zugegeben, die Mischung bei -20°C im Gefrierfach über den Zeitraum von 45 min inkubiert und in der Ultrazentrifuge (UZ) bei 18.000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird mit dem gleichen Volumen an TCA-Acetonlösung versetzt, 15 min bei -20°C inkubiert und erneut bei 18.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Für die anschließende zweidimensionale Gelelektrophorese wird das Pellet in Rehydratationslösung aufgenommen, wobei pro Gramm Traube 1 ml der Lösung eingesetzt wird. Diese Mischung wird über einen Zeitraum von einer Stunde sechsmal eine Minute gevortext und bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert.

**Tabelle 6: Durchführung der TCA/Aceton-Fällung**

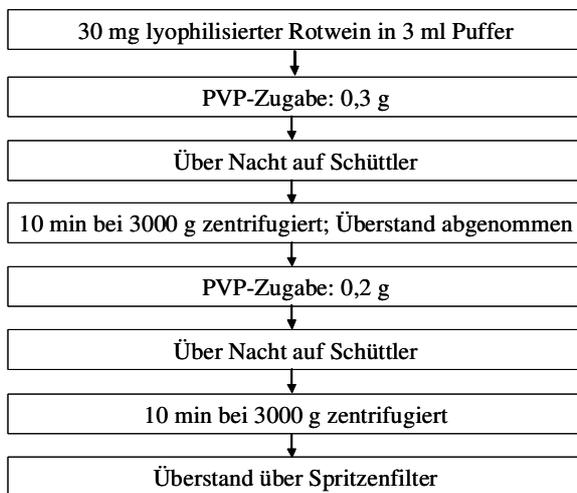
<b>Durchführung</b>	<b>Dauer</b>	<b>Temperatur</b>
Mörsern unter flüssigem Stickstoff		
Zugabe von 1 ml TCA-Aceton-Lösung pro 500 $\mu$ g Traube		
Inkubieren	45 min	-20°C
Zentrifugieren bei 18.000 rpm (UZ); Pellet verwerfen	15 min	4 °C
Gleiches Volumen -20 °C kalte Aceton-Lösung zum Überstand geben und inkubieren	10 min	4 °C
bei 18.000 rpm und 4 °C zentrifugieren; Pellet verwerfen	15 min	-20 °C

Zugabe des gleiches Volumens $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ kalte Aceton-Lösung		
Zentrifugieren bei 18.000 rpm (UZ)	15 min	$4\text{ }^{\circ}\text{C}$
Pellet in 1 ml Rehydratationslösung pro 1 g Ausgangsmaterial aufnehmen		
Vortexen	6 x 1min über 60 min	
Zentrifugieren bei 14.000 rpm (UZ)	10 min	$4\text{ }^{\circ}\text{C}$

### 2.7.3.3 Behandlung mit Polyvinylpyrrolidon (PVP)

Wasserunlösliches Polyvinylpyrrolidon (PVP), hier Polyclar® AT, wird zur Bindung und anschließenden Entfernung von Polyphenolen eingesetzt [LOOMIS/BATAILLE 1966, LABORDE ET AL 2006].

Die Behandlung mit Polyclar® AT erfolgt einerseits als Vorbereitung der SDS-PAGE nach Dialyse und Gefriertrocknung der Weinproben entsprechend des in Abbildung 7 dargestellten Ablaufs.



**Abbildung 7: Versuchsprotokoll zur Extraktion der Proteine aus lyophilisierten Weinproben mittels Polyvinylpyrrolidon (PVP)**

Andererseits erfolgt eine Behandlung mit Polyclar® AT des unbehandelten Weines zur Vorbereitung einer Größenausschlusschromatographie entsprechend des in Abbildung 8 dargestellten Ablaufs.

Eingesetzt werden ein Portugieser des Jahrgangs 2005 aus der Pfalz sowie ein Dornfelder des Jahrgangs 2005 aus Rheinhessen.

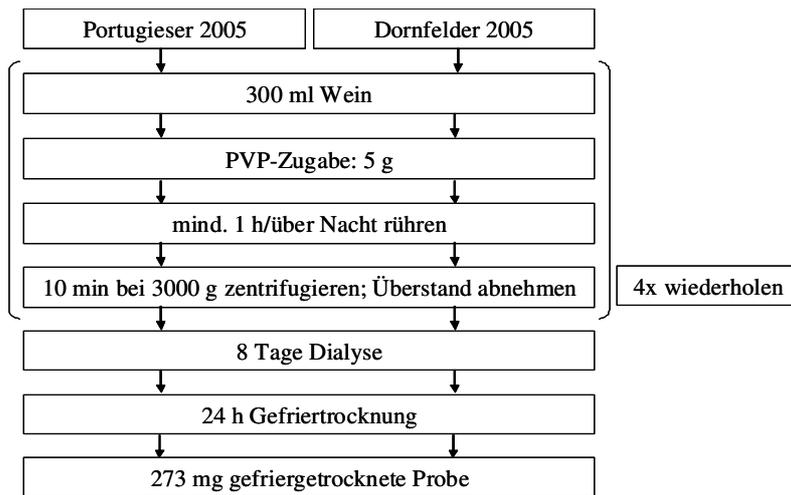


Abbildung 8: Versuchsprotokoll zur Extraktion der Weinproteine mittels Polyvinylpyrrolidon (PVP)

## 2.8 Aufreinigung der Proteine aus der Weinbeere

Die Weinbeeren werden hinsichtlich der Proteinzusammensetzung sowohl in ihrer Gesamtheit als auch in ihren Bestandteilen Schale, Fruchtfleisch und Kerne untersucht. Eingesetzt werden Weinbeeren der Rebsorten Riesling und Cabernet Sauvignon aus dem Rheingau.

Falls notwendig, erfolgt die Lagerung der Weintrauben von der Ernte bis zur Weiterverarbeitung bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Aufgrund der geringen Proteinkonzentration und des vergleichsweise hohen Anteils an Tanninen und Pektinen gestaltet sich die Extraktion bei Weinbeeren schwierig. In der vorliegenden Arbeit wird ein nach VASSILOPOULOU ET AL (2007A) modifiziertes Protokoll verwendet.

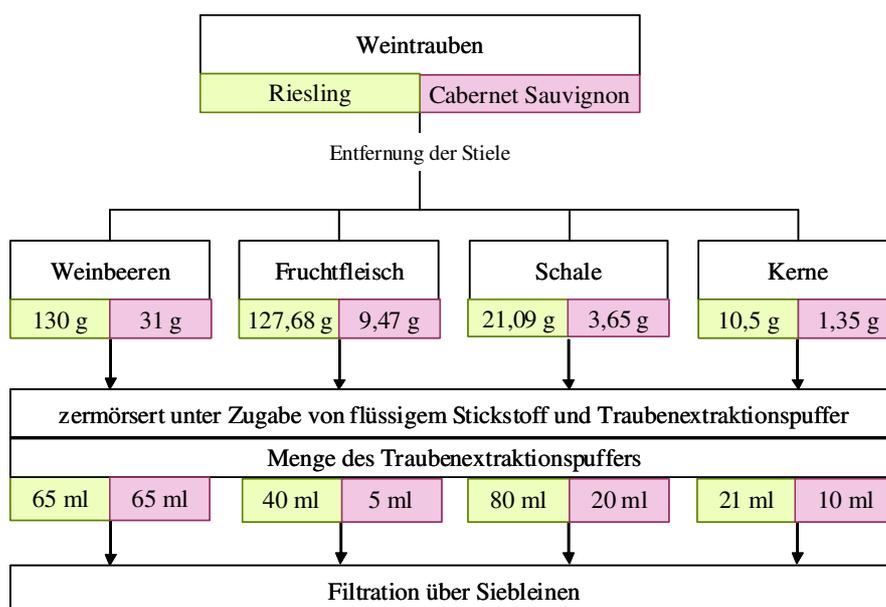


Abbildung 9: Schritte der Traubenaufreinigung der Rebsorten Riesling und Cabernet Sauvignon

Zunächst werden bei den Weintrauben nach der Lese die Stiele und Rappen entfernt. Ein Teil der Weinbeeren wird direkt weiterverarbeitet, während bei einem anderen mit einer Pinzette die Schale der Weinbeere abgezogen wird und die Kerne aus dem Fruchtfleisch entfernt werden, so dass eine Unterteilung in Fruchtfleisch, Schale und Kerne erfolgt. Dies wird direkt auf Eis durchgeführt. Im Folgenden werden die vier Proben (Weinbeeren in ihrer Gesamtheit, Fruchtfleisch, Schale und Kerne) getrennt voneinander, jedoch auf identische Weise weiterverarbeitet. In einem Mörser wird die Probensubstanz unter Zugabe von flüssigem Stickstoff und des Traubenextraktionspuffers inklusive dem Proteaseinhibitor (200 mM Natriumphosphat; 20 mM EDTA; 3 mM NaN<sub>3</sub>; 0,5 % Tween-20; Protease-Inhibitor-Cocktail) zerkleinert. Die Menge des Traubenextraktionspuffers wird je nach Löslichkeit der einzelnen Bestandteile variiert (Abbildung 9). Im Anschluss erfolgt eine Filtration über ein Siebleinentuch.

## **2.9 Absorptionsspektroskopie**

### **2.9.1 Proteinbestimmung**

Nach wie vor ist umstritten, welche Proteinbestimmungsmethode für Weinproteine am besten geeignet ist. Als problematisch erweist sich das Vorhandensein vieler verschiedener Inhaltsstoffe im Wein, die die Messungen beeinflussen können. So führen die Polyphenole zu Abweichungen bei der Messung nach LOWRY ET AL (1951) und nach BRADFORD (1976), bei der auch Peptide mit in die Messung einbezogen werden. Außerdem fehlt ein Standard für Weinproteine. Um einen Vergleich mit bisherigen Veröffentlichungen und von verschiedenen Methoden zu ermöglichen, werden die im Folgenden beschriebenen drei kolorimetrischen Methoden zur Proteinbestimmung eingesetzt.

#### **2.9.1.1 Bradford-Assay**

Die quantitative Bestimmung des Proteingehaltes mit der Methode von BRADFORD (1976) erfolgt im sauren Milieu durch unspezifische Bindung von hydrophoben und kationischen Seitenketten der Aminogruppen an die negativen Gruppen des Farbstoffs Coomassie® Brilliant Blue G 250. Die Bindung der Proteine hat eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm auf 595 nm zur Folge, so dass die Zunahme der Absorption bei 595 nm als Maß für die Proteinkonzentration herangezogen werden kann. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe einer Kalibriergeraden mit BSA als Referenzprotein. Sowohl bei der Eichgeraden als auch bei den Proben werden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

### **2.9.1.2 Lowry-Assay**

Der Lowry-Assay beruht auf der Biuret-Methode, d.h. der Bildung eines Komplexes aus Proteinen und  $\text{Cu}^{2+}$ , das in alkalischer Lösung zu  $\text{Cu}^+$  reduziert wird [LOWRY ET AL 1951]. Mit dem Folin-Ciocalteau-Reagenz bilden die Kupferionen einen blauen Farbkomplex, der bei 750 nm photometrisch bestimmt als Maß für die Proteinreaktion herangezogen wird. Durchgeführt wird der modifizierte Lowry Protein-Assay entsprechend den Angaben des Herstellers [Technical Handbook, Pierce 2005] mit BSA als Referenzprotein und Dreifachbestimmungen.

### **2.9.1.3 Bicinchoninsäure-Assay**

Der Bicinchoninsäure (BCA)-Assay, basierend auf der Methode von SMITH ET AL (1985), macht sich wie der Lowry-Test die Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  im alkalischen Milieu bei Anwesenheit von Proteinen zunutze.  $\text{Cu}^+$  bildet mit der Bicinchoninsäure (BCA) einen blauviolett-farbigem Komplex, der mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm photometrisch detektierbar ist. Der Test wird nach dem Micro BCA™ Protein Assay mit einem BSA-Standard entsprechend dem Standard-Protokoll des Herstellers durchgeführt [Technical Handbook, Pierce 2005].

### **2.9.1.4 Aufnahme von Absorptionsspektren**

Absorptionsspektren werden in Quarzküvetten im Spektralphotometer (Carry 300, Varian) in einem Bereich zwischen 200 – 850 nm gemessen. Nach Aufnahme einer Puffer-Baseline wird dieselbe Küvette (Quarzküvette mit einer optischen Weglänge von 1 cm) für die Messung der Probe verwendet.

## **2.10 Polyacrylamid – Gelelektrophorese (PAGE)**

### **2.10.1 Denaturierende SDS-PAGE**

Bei der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) kommt es durch Bindung der Proteine an das negativ geladene Detergenz SDS zur Ausbildung eines SDS-Protein-Komplexes mit konstantem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis, so dass eine Auftrennung der Proteine ausschließlich anhand deren Molekulargewichts erfolgt [GUTTMAN 1996].

Das eingesetzte Trennmedium besteht aus Polyacrylamid. Die Porengröße, die maßgebend für die Trennleistung ist, wird über die Totalamidkonzentration und den Vernetzungsgrad bestimmt.

Bei der hier eingesetzten diskontinuierlichen PAGE mit einem Tris-HCl/Tris-Glycin-Puffersystem nach LÄMMLI (1970), modifiziert nach SEE UND JACKOWSKI (1989) werden die Proteine in einem Sammelgel (3% Polyacrylamidanteil) fokussiert, bevor sie in das Trenngel (10 bis 20 % Polyacrylamidanteil) einwandern. Die Proteine werden nach ihrem Molekulargewicht getrennt, wobei die kleinen Moleküle in dem Polyacrylamidnetz schneller wandern als die größeren. Die genauen Zusammensetzungen des Trenn- sowie Sammelgels finden sich in Tabelle 7 und 8.

**Tabelle 7: Zusammensetzung des Trenngels für je zwei Minigele einer SDS-PAGE**

	10 %	12,5 %	15 %	17,5 %
Rotiphorese 30 [ml]	4,67	5,83	7,00	8,16
Trenngelpuffer [,ml]	3,50	3,50	3,50	3,50
Aqua dest. [ml]	5,34	4,18	3,01	1,85
SDS-Lösung 10 % [ $\mu$ l]	280	280	280	280
TEMED [ $\mu$ l]	28	28	28	28
APS 4 % [ $\mu$ l]	420	420	420	420

**Tabelle 8: Zusammensetzung des Sammelgels für je zwei Minigele (3%) einer SDS-PAGE**

Rotiphorese 30 [ml]	1,00
Trenngelpuffer [,ml]	2,50
Aqua dest. [ml]	6,15
SDS-Lösung 10 % [ $\mu$ l]	200
TEMED [ $\mu$ l]	40
APS 4 % [ $\mu$ l]	300

Die Proteinproben werden im Verhältnis 1:1 mit Denaturierungspuffer gemischt und nach einer zehnmütigen Denaturierung bei 95°C auf das Gel aufgetragen. Bei Minigelen (10 cm x 7,5 cm mit einer Dicke von 0,4 mm) werden 25  $\mu$ l bzw. 30  $\mu$ l mit einer 10er-Kamm-Tasche, bei großen Gelen (13,5 cm x 16 cm mit einer Dicke von 1 mm) 50  $\mu$ l in einer 12er-Kamm-Tasche aufgetragen. Die Elektrophorese wird in Minigel-Kammern der Firma Keutz bzw. in Kammern für große Gele der Firma Hölzel bei einer Spannung von 100 V bei Minigelen bzw. 140 V bei großen Gelen bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Auswertung erfolgt mit dem Molekulargewichtsmarker „Precision Plus Protein Standard“ und der Software Quantity One v4.5.2 auf einem GS-800 Calibrated Densitometer der Firma BioRad.

### **2.10.2 Gradientengel**

Gradientengele erweitern den Trennbereich durch eine kontinuierliche Änderung der Polyacrylamidkonzentration. Der lineare Gradient entsteht durch ein Zwei-Kammer-Mischsystem mit einer Schlauchpumpe: das Trenngel mit der geringeren Konzentration wird in das vordere, die Mischung mit der höheren Konzentration in das hintere Reservoir des Gradientenmischers gefüllt. Der Inhalt der vorderen Kammer wird mit einem Magnetrührer gemischt und dann über einen Schlauch von unten in die Gelkassette gepumpt. Durch Öffnen des Ventils zwischen den zwei Kammern des Gradientenmischers fließt das Trenngel mit der höheren Prozentigkeit nach, dadurch entsteht ein ansteigender Gradient in der Gelkammer. Die Elektrophorese von Gradientengelen wird bei einer Spannung von 120 V für das Einlaufen ins Sammelgel und mit 140 V bei der Trennung im Trenngel durchgeführt.

Die Gradientengele haben eine Größe von 13,5 cm x 16 cm bei einer Dicke von 1 mm. Es werden die gleichen Puffer und Lösungen wie bei den Minigelen verwendet.

### **2.10.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese**

Die Auftrennung der Proteine mit der zweidimensionalen Gelelektrophorese erfolgt nach dem isoelektrischen Punkt der nativen Proteine in der ersten sowie dem Molekulargewicht der denaturierten Proteine in der zweiten Dimension.

#### Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Zur Isoelektrischen Fokussierung werden IPG-Streifen mit einem pH-Bereich von 3 bis 10 eingesetzt. In einem ersten Schritt erfolgt die Rehydratation der IPG-Streifen. Hierzu wird jeweils ein IPG-Streifen in einen „Strip Holder“ mit der Gelseite nach unten gelegt. 50 µl der Rehydratationslösung werden mit 150 µl der mit der TCA/Aceton-Fällung bearbeiteten Traubenprobe vermischt und in die „Strip Holder“ unter den IPG-Streifen pipettiert. Abschließend wird der IPG-Streifen mit Cover Fluid-Lösung bedeckt, um ein Austrocknen zu verhindern. Die Rehydratation läuft bei 50 V für mindestens 16 Stunden.

Die IEF wird in der IEF-Gelelektrophoreseapparatur IPGphor bei einer Temperatur von 20°C und einer maximalen Stromstärke von 50 µA pro IPG-Streifen durchgeführt. Das Protokoll ist im Folgenden aufgeführt.

100 V	100 Voltstunden	StepNHold
500 V	500 Voltstunden	StepNHold
1000 V	1000 Voltstunden	StepNHold
6000 V	3500 Voltstunden	Gradient
6000 V	75000 Voltstunden	StepNHold
	80100 Voltstunden	

Im direkten Anschluss an die IEF wird überschüssige Cover Fluid-Lösung entfernt. Dann werden die IPG-Streifen in Schraubdeckelröhrchen zunächst 15 min in 5 ml Äquilibrationslösung mit 50 mg DTT und im Anschluss daran 15 min in 125 mg Jodoacetamid-enthaltender Äquilibrationslösung geschwenkt. Nach 10 minütigem Trocknen auf Filterpapier erfolgt die gelelektrophoretische Auftrennung.

### SDS-PAGE

Für die SDS-PAGE werden 12,5%ige Trenngele verwendet, die den Trenngelen der eindimensionalen SDS-PAGE entsprechen (Tabelle 7, Abschnitt 2.10.1). Der äquilibrierte IPG-Streifen wird kurz in SDS-Laufpuffer getaucht, auf das Gel aufgelegt und mit 1 %iger Agaroselösung überschichtet. Die Elektrophorese wird in den Gelelektrophoresekammern „Hoefer electrophoresis unit SE600“ (Amersham Pharmacia, Schweden) nach folgendem Laufprotokoll durchgeführt:

15 min	7,5 $\mu$ A pro Gel
60 min	15 $\mu$ A pro Gel
180 min	30 $\mu$ A pro Gel

### **2.10.4 Coomassie-Färbung**

Bei Proteinmengen größer 1  $\mu$ g/Bande wird die Coomassie-Färbung nach SEE UND JACKOWSKI (1989) mit dem Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brilliant-Blau R250 zur Färbung der Gele eingesetzt. Die Fixierung der Proteine erfolgt beim Einlegen in die Färbelösung gleichzeitig mit der Färbung durch das in der Lösung enthaltene Methanol/Essigsäure-Gemisch. Nach mindestens einer Stunde in der Färbelösung haben die Proteine mit dem Farbstoff einen stabilen Farbkomplex gebildet. Der überschüssige Farbstoff wird durch das Einlegen in die

Entfärbelösung so lange entfernt, bis die blauen Proteinbanden auf dem Gel deutlich zu erkennen sind. Sensitiver ist die Coomassie-Färbung nach KANG ET AL (2002) mit Coomassie-Brilliant-Blau G250 in der aluminiumsulfathydrat-, ethanol- und phosphorsäurehaltigen Färbelösung.

### 2.10.5 Silberfärbung

Bei der Silberfärbung erfolgt zunächst die Fixierung der Proteine in einer Methanollösung. In einem zweiten Schritt folgt die Färbung mit einer Silbernitratlösung. Diese beruht auf der Komplexbildung der Silberionen mit Seitenketten (Glu-, Asp-, Cys-Resten) der Proteine, wobei  $\text{Ag}^+$  durch alkalisches Formaldehyd zu  $\text{Ag}$  reduziert wird.

Die Silberfärbung zeichnet sich durch eine vergleichsweise hohe Empfindlichkeit aus. Die detaillierte Anleitung findet sich in Tabelle 9.

**Tabelle 9: Protokoll der Silberfärbung nach der Methode von BLUM ET AL [BLUM ET AL 1987]**

Lösung	Minigel	Großes Gel
50 % Methanol-Lösung	mindestens 60 min	mindestens 60 min
5 % Methanol-Lösung	20 min	30 min
Aqua dest.	20 min	30 min
Enhancer-Lösung	1 min	5 min
Aqua dest.	3x 20 s	3x 20 s
Färbelösung	20 min	30 min
Aqua dest.	3x 20 s	3x 20 s
Entwickler-Lösung	bis Banden sichtbar sind	bis Banden sichtbar sind
Stop-Lösung	zum Abstoppen	zum Abstoppen

### 2.11 Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung dient der Auftrennung der Proteine entsprechend ihres isoelektrischen Punktes.

Als Gel findet das SERVALYT® PreNets® mit einem pH-Bereich von 3 bis 10 Anwendung. Zunächst wird der pH-Gradient stufenweise eingestellt. Die Anodenlösung (0,17 g L-Asparaginsäure; 0,18 g L-Glutaminsäure; in 50 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ) sowie die Kathodenlösung (0,22 g L-Arginin; 0,18 g L-Lysin; 6 ml Ethylendiamin; auf 50 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ) werden auf die Elektrodenstreifen des entsprechenden Pols aufgetragen. Das Einstellen des Gradienten erfolgt durch eine

Erhöhung der Leistung um 1 Watt in zehnminütigem Abstand, beginnend bei 1 Watt und endend bei 5 Watt.

Als Probe wird Riesling des Jahrgangs 2004 aus dem Rheingau eingesetzt. Von diesem werden ebenso wie von dem Marker (IEF-Marker 3-10, Serva Liquid Mix) 5 µl auf den Applikatorstreifen aufgetragen. Die Fokussierung wird bei einer Leistung von 5 Watt über einen Zeitraum von ca. 3 Stunden durchgeführt, wobei der Applikatorstreifen nach 45 min entfernt wird. Anschließend, bevor die Färbung erfolgt, wird das Gel 1 min mit H<sub>2</sub>O gespült.

### **Färbung mit Serva Violett**

Eingesetzt wird die Färbung mit Serva Violett 17. Dies ist eine kolloidale Färbemethode, die insbesondere aufgrund des vergleichsweise klaren Hintergrundes vom Hersteller für die IEF empfohlen wird. Das Gel wird 10 min in der Färbelösung geschüttelt. Diese setzt sich aus den zwei folgenden Stammlösungen zusammen, die im Verhältnis 1:1 gemischt werden.

Stammlösung 1	500 mg SERVA Violett 17 Pulver in 250 ml H <sub>2</sub> O
Stammlösung 2	20 % (w/v) Phosphorsäure

Das Entfärben erfolgt in 3 % (w/v) Phosphorsäure über einen Zeitraum von ca. 10 min bzw. bis keine Hintergrundfärbung mehr zu erkennen ist.

## **2.12 Glykoproteinbestimmung**

### **2.12.1 Perjodsäure-Färbung**

Bei der Färbung mittels Perjodsäure und Schiff's Reagenz (PAS – Periodic acid Schiff) werden nichtsubstituierte Glykol-Gruppen der Kohlenhydrate in wässriger Perjodsäure zu Aldehyden oxidiert. Diese reagieren mit fuchsinschwefliger Säure (Schiff's Reagenz), was zur Bildung eines magenta-roten Farbstoffs führt. Die PAS-Färbung wird auf einem für Weinproteine modifizierten Protokoll basierend auf GLOSSMANN//NEVILLE (1971) und RIEBE/THORN (1991) auf einem Gel durchgeführt. Zunächst wird eine SDS-PAGE, wie in Abschnitt 2.10.1 beschrieben, durchgeführt. Die einzelnen Schritte des weiteren Ablaufs sind in Tabelle 10 dargestellt und werden nachfolgend beschrieben.

**Tabelle 10: Durchführung der PAS-Färbung**

Arbeitsschritt/Funktion	Dauer (Bedingungen)	Lösung
Fixieren	mind. 1 h	50 % (v/v) Methanol; 40 % (v/v) Essigsäure; 10 % (v/v) H <sub>2</sub> O
Waschen	2 x 1 min	7,5%ige Essigsäure in H <sub>2</sub> O
Oxidieren	20 min	1% Perjodsäure in H <sub>2</sub> O
Waschen	2 x 1 min	7,5%ige Essigsäure in H <sub>2</sub> O
Komplexierung/Färbung	10 min	Schiff's Reagenz (1 % (w/v) basisches Fuchsin, 1,9 % Natriumbisulfit in 0,15 N Salzsäure

Im Anschluss an die Gelelektrophorese werden die Proteine auf dem Gel in einer Methanol-Essigsäurehaltigen Lösung eine Stunde fixiert. Die Oxidation der Kohlenhydrate erfolgt in 1%iger Perjodsäurelösung über die Dauer von 20 min. Die Inkubation in Schiff's Reagenz bewirkt eine Komplexierung und die Färbereaktion. Als Protein Standard wird der Kaleidoskop „Prestained Standard Marker“ von BioRad eingesetzt.

### 2.12.2 Lektinblot

Der Lektinblot wird entsprechend eines Protokolls der Arbeitsgruppe STÖCKER/HOEGER durchgeführt, welches auf der Methodik nach JONES ET AL (1999) basiert. Hierbei werden lektinboundene Kohlenhydrate auf einer Blotmembran angefärbt. Als Lektin wird biotinyliertes Concanavalin A (Con A), ein Metalloprotein aus der Schwertbohne (*Canavalia ensiformis*) eingesetzt. Con A zeigt eine hohe Spezifität für verzweigt-kettige Polysaccharide mit einem terminalen nicht-reduzierenden Glycopyranosyl-/- oder Mannopyranosylrest [GOLDSTEIN ET AL 1965, GOLDSTEIN/SO 1956, GOLDSTEIN/IYER 1966, GRUDEN-MOVSESIJAN ET AL 2002]. Dieses Lektin wird gewählt, da die im Wein aufgeklärten Kohlenhydratstrukturen komplex bzw. vom Oligomannosetyp sind [MARCHAL ET AL 1996]. Hohe Spezifität zeigt sich auch für Mannane (Mannosepolysaccharide) aus der Hefe, die im ebenfalls im Wein nachgewiesen werden konnten [GOLDSTEIN ET AL 1965, CARIDI 2006, WATERS ET AL 1994, WATERS ET AL 1993]. Der Nachweis und die Färbung erfolgen mit einer Avidin-Peroxidase und einer Chloro-1-Naphtol/Wasserstoff-peroxidlösung.

Der Ablauf des Lektinblots ist in Tabelle 11 dargestellt, wobei aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Blots alle Schritte im Dunkeln stattfinden. Zunächst wird eine denaturierende Gelelektrophorese durchgeführt, wie in Abschnitt 2.10.1 beschrieben. Im Anschluss daran

werden das Gel ebenso wie die Nitrocellulosemembran 30 min in Transferpuffer inkubiert. Darauf folgt der Elektrotransfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran mittels eines Semi-Dry-Blot-Verfahrens nach KHYSE-ANDERSEN [KHYSE-ANDERSEN 1984]. Die Membran und das darauf liegende Gel befinden sich hierbei luftblasenfrei eingebettet in je 10 in Transferpuffer getränkte Filterpapiere. Das Blotten erfolgt über einen Zeitraum von zwei Stunden bei einer Stromstärke von 0,8 mA/cm<sup>2</sup> Gelfläche. Zur Überprüfung der Proteinübertragung wird die Membran mit Ponceau S angefärbt und anschließend in TBS 1 gewaschen. Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wird durch Inkubieren der Membran in 5%iger BSA-Lösung erreicht. Das Lektin Concanavalin A wird in biotinylierter Form zugegeben und bindet die Zuckerreste der Glykoproteine. Der Nachweis erfolgt über die Avidin-Peroxidase und das Substrat 4-Chloro-1-Naphtol.

**Tabelle 11: Durchführung des Lektinblots**

Arbeitsschritt	Dauer	Lösungen
SDS-PAGE (12,5 %)	ca. 90 min bei 100 V (RT)	Laufpuffer
Inkubation des Gels und der Nitrocellulosemembran	30 min	Transferpuffer
Blotten	2 h; 0.8 mA*cm-2 (RT)	mit Transferpuffer getränkte Filterpapiere
Anfärben	1 min (RT)	Ponceau S-Lösung
Waschen	1 min (RT)	TBST
Blocken freier Bindungsstellen	über Nacht (4°C)	5 % BSA (Fraktion V) in TBS 1
Waschen	2 x 10 min (RT)	TBS 1
Inkubation in Lektinlösung	1 h (37°C)	10 µg/ml Lektin in TBS 1
Waschen	2 x 10 min (RT)	TBS 2
Inkubation mit Avidin-Peroxidase	1 h (37°C)	0,05 µg/ml in TBS 3
Waschen	2 x 10 min (RT)	TBS 1
Inkubation mit 4-Chloro-1-Naphtol/Wasserstoffperoxidlösung	bis zur Färbung	3 mg/ml 4-Chloro-1-Naphtol in Methanol plus 5fache Menge TBS 1; 0,015 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

Waschen	2 x 10 min (RT)	TBS 1
Trocknen		

## 2.13 Chromatographische Methoden

### 2.13.1 Ionenaustausch-Chromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie basiert auf dem Prinzip der kompetitiven Wechselwirkung geladener Ionen. In einem ersten Schritt binden die Proteine an die fixierte Ladung der stationären Phase (Ionentauscher-Matrix). In einem zweiten Schritt werden die Proteine durch eine steigende Salzkonzentration verdrängt und eluiert, wobei im Anschluss die Salzkonzentration so hoch gewählt wird, dass die Elution aller Proteine erfolgt.

#### 2.13.1.1 Anionenaustausch-Chromatographie

Der Anionenaustausch findet an einer FPLC-Anlage bei Raumtemperatur statt. Eingesetzt werden eine UNO Q-12-Säule, die sich durch quaternäre Trimethylaminoethyl [ $[-N(CH_3)_3]$ -Gegenionen und ein Volumen von 12 ml auszeichnet und eine UNO Q-1-Säule mit einem Volumen von 1,3 ml.

Bevor die Probe auf die Säule gegeben wird, wird sie über einen sterilen Spritzenfilter mit einer Porengröße von 0,22  $\mu\text{m}$  filtriert. Lyophilisierte Proben werden zuvor in 100 mM Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,0 gelöst. Als mobile Phase wird ein 50 mM Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,7 eingesetzt. Eluiert wird mit einem linearen Salzgradienten mit 1M NaCl. Die entsprechenden Protokolle sind in Anhang 8.1 aufgeführt.

#### 2.13.1.2 Kationenaustausch-Chromatographie

Der Kationenaustausch wird mit einer UNO S-6 Säule durchgeführt, die Sulfomethylgruppen enthält. Das Säulenvolumen liegt bei 6 ml. Als Elutionspuffer wird ein 50 mM Citratpuffer mit einem pH-Wert von 3,0 eingesetzt, die Elution erfolgt mit einem linearen Salzgradienten mit 1M NaCl. Vor der Aufgabe auf die Säule wird die Probe über einen sterilen Spritzenfilter mit einer Porengröße von 0,22  $\mu\text{m}$  filtriert. Das Protokoll ist in Anhang 8.1 aufgeführt.

### 2.13.2 Größenausschluss-Chromatographie

Auch die Größenausschluss-Chromatographie (SEC) wird bei Raumtemperatur an einer FPLC-Anlage durchgeführt. Als Säule wird eine Sephacryl S-100-Säule mit einem Volumen

von 120 ml verwendet, die für die Auftrennung von Proteinen im Bereich von 5 bis 100 kDa geeignet ist. Auch hier wird die Probe vor dem Auftragen auf die Säule durch sterile Spritzenfilter mit einer Porengröße von 0,22µm filtriert. Die Elution erfolgt mit einem 0,05 molaren Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,0. Das entsprechende Protokoll ist in Anhang 8.1 aufgeführt.

Eingesetzt wird die SEC als zweiter Schritt der Proteinaufreinigung. Einerseits infolge einer Anionenaustauschchromatographie bei den Weißweinproteinen und andererseits infolge einer Fällung mit Polyvinylpyrrolidon (PVP) bei Rotweinproteinen.

## **2.14 Massenspektrometrie**

Die Identifizierung der Proteinproben mittels Massenspektrometrie erfolgt freundlicherweise durch Dr. Stefan Tenzer in der AG Schild am Institut für Immunologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

In einem ersten Schritt werden die Proteinproben durch eine SDS-PAGE aufgetrennt, mit Coomassie angefärbt und die zu analysierenden Banden ausgeschnitten. Die Fragmentierung der Proteine wird durch einen tryptischen Verdau erreicht. Die weitere Auftrennung und Analyse erfolgt durch eine Kopplung von einer kapillaren HPLC (nanoACQUITY UPLC System™ der Firma Waters GmbH mit einer nanoACQUITY UPLC™ Symmetry C18 Umkehrphasensäule) mit dem Waters Q-TOF Premier System Massenspektrometer (Waters GmbH, Eschborn). Bei diesem werden die Moleküle durch eine Elektrospray-Ionisation (ESI) ionisiert, als Analysator zur Trennung und zum Nachweis der Analyt-Ionen wird eine Kombination aus Quadrupol (Q) und Flugzeitanalysator (TOF) eingesetzt.

Die Auswertung der Daten erfolgt mittels PROTEINLYNX GLOBAL SERVER v2.2 (Waters GmbH, Eschborn). Zur Proteinidentifizierung wird eine Datenbank als Grundlage genutzt, die alle bekannten Sequenzen der Weinrebe *Vitis*, der der Hefe *Saccharomyces* sowie der bereits im Wein identifizierten Proteine enthält.

## **2.15 Proteinsequenzanalyse und Sequenzalignments**

Proteinsequenzen werden mit der NCBI-Sequendatenbank [[HTTP://WWW.NCBI.NLM.NIH.GOV](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)] ermittelt und im FASTA-Format weiterverwendet. Die Ermittlung von Aminosäureanzahl, Aminosäurezusammensetzung, Molekulargewicht und isoelektrischem Punkt erfolgt mit dem ProtParam Tool von Expasy [[HTTP://WWW.EXPAS.Y.CH/TOOLS/PROTPARAM.HTML](http://www.expasy.ch/tools/protparam.html)].

Die Sequenzalignments werden mit „ClustalX 1.83“ mit den Standardeinstellungen align, die Sequenzidentitäten und /-ähnlichkeiten werden mit „GeneDoc“ (Version 2.6.002) ausgewertet [NICHOLAS ET AL 1997, THOMPSON ET AL 1997, [HTTP://WWW.NRBSC.ORG/GFX/GENEDOC/INDEX.HTML](http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/index.html)].

## **2.16 Proteinmodellierung**

Proteinmodelle werden mit Hilfe von Swiss Model über den „SwissModel Automatic Modeling Mode“ erstellt [[HTTP://SWISSMODEL.EXPASY.ORG](http://swissmodel.expasy.org), ARNOLD ET AL 2006, KOPP/SCHWEDE 2004, SCHWEDE ET AL 2003, GUEX ET AL 1997] und mit Chimera 1.2540 bearbeitet [[HTTP://WWW.CGL.UCSF.EDU/CHIMERA](http://www.cgl.ucsf.edu/chimera)].

## **2.17 Immunologische Methoden**

Das allergene Potential der Thaumatin-ähnlichen Proteine im Wein wird durch den Western Blot untersucht. Untersuchungen zur Allergenität der Weinproteine (Proliferationstest und Zytokinproduktion) finden freundlicherweise durch Dr. Iris Bellinghausen und Dr. Bettina König der AG Saloga in der Hautklinik der Johannes Gutenberg-Universität statt.

### **2.17.1 Western Blot**

Der Western Blot wird in der vorliegenden Arbeit zur Identifizierung Thaumatin-ähnlicher Proteine in dem Proteingemisch des Weines eingesetzt.

Die Durchführung des Western Blots ist in Tabelle 12 zusammengefasst. Im ersten Schritt wird das Proteingemisch der Weinextrakte mittels einer diskontinuierlichen SDS-PAGE, wie in Abschnitt 2.10.1 beschrieben, aufgetrennt. Im zweiten Schritt erfolgt der Transfer der Proteine mittels eines Semi-Dry-Blot-Verfahrens, welches in Abschnitt 2.12.2 erläutert wird, von dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran. Die Überprüfung des Proteintransfers erfolgt durch Anfärben der Membran mit Ponceau S-Lösung, die durch TBST ausgewaschen wird. Das anschließende Blocken der unspezifischen Proteinbindungsstellen erfolgt durch eine 5%ige Magermilchpulverlösung über den Zeitraum von zwei Stunden bei 4°C und dient der Reduktion der Hintergrundfärbung. Die Antikörpermarkierung erfolgt in zwei Schritten. Zunächst bindet der antigenspezifische Thaumatin-Antikörper (=Primärantikörper) an die in dem Proteingemisch enthaltenen Thaumatine bzw. Thaumatin-ähnlichen Proteine. Der Primärantikörper wird in Verdünnungen von 1:1000 bis 1:50000 eingesetzt. Der Sekundärantikörper ist artspe-

zifisch (anti-Chicken-IgG) und mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt, über die die Proteinbindung visualisiert wird. Auch der Sekundärantikörper wird in Verdünnungen von 1:1000 bis 1:50000 eingesetzt. Als Substrate der alkalischen Phosphatase dienen Brom-4-chlor-3-indolylphosphat- p-toluidinsalz (BCIP) und p-Nitrobluetetrazolium (NBT) [BLAKE ET AL 1984].

**Tabelle 12: Durchführung des Western Blots**

Arbeitsschritt	Dauer	Lösungen
SDS-PAGE (12,5 %)	ca. 90 min bei 100 V (RT)	Laufpuffer
Inkubation des Gels und der Nitrocellulosemembran	30 min	Transferpuffer
Blotten	2 h; 0.8 mA*cm <sup>2</sup> (RT)	mit Transferpuffer getränkte Filterpapiere
Anfärben	1 min (RT)	Ponceau S-Lösung
Waschen	1 min (RT)	TBST
Blocken freier Bindungsstellen	2 h (4°C)	5 % Magermilchpulver in TBST (Blocklösung)
Inkubation mit Primärantikörper	Über Nacht (4°C)	Primärantikörper in Blocklösung
Waschen	4 x 10 min (4°C)	TBST
Inkubation mit Sekundärantikörper	2 h (4°C)	Sekundärantikörper in Blocklösung
Waschen	4 x 10 min (4°C)	TBST
Entwicklung	bis Banden sichtbar (RT)	Entwicklungslösung
Waschen	2 x 30 s (RT)	Wasser
Trocknen		

### 2.17.2 Proliferationstest

Für die Testung der Proliferationsraten werden CD4<sup>+</sup>-T-Zellen mit allergenbeladenen Dendritischen Zellen (DC) kokultiviert. Die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen hierfür werden aus PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell) entsprechend BELLINGHAUSEN ET AL 2007 gewonnen. Das Beladen der DCs wird ebenfalls nach BELLINGHAUSEN ET AL 2007 durchgeführt, mit dem Unterschied,

dass die kultivierten unreifen DCs nach sechs Tagen mit verschiedenen Mengen an lyophilisierten Wein- bzw. Traubenproben inkubiert werden.

Nach fünf Tagen der Kokultivierung der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen mit den beladenen Dendritischen Zellen (DC) wird <sup>3</sup>[H]-Thymidin zugegeben und nach einer sechsstündigen Inkubation der Einbau gemessen [BELLINGHAUSEN ET AL 2007].

### **2.17.3 Zytokinproduktion**

Die Quantifizierung der humanen Zytokine Interleukin 4 (IL-4) und Interleukin 5 (IL-5) erfolgt mittels eines ELISA (enzyme-linked immunosorbend assay) entsprechend der Herstellerangaben [BD Biosciences, Heidelberg, BELLINGHAUSEN ET AL 2007].

Für die Versuche werden Blutseren von vier Probanden eingesetzt, von welchen zwei Gräserallergiker und zwei ohne bekannte Allergie sind.



### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Konzentrierung der Proteine**

Da Wein einen sehr geringen Proteingehalt aufweist, muss zunächst eine Konzentrierung der Proteine vorgenommen werden. Im Test mit anderen Methoden erweist sich die Gefriertrocknung als geeignet, da ein vergleichsweise hoher Proteinverlust, wie er bei allen membranabhängigen Methoden wie Vivacell oder Zentrifugalkonzentratoren auftritt, verhindert werden kann und eine vollständige Gewinnung aller Proteine ohne Molekulargewichtsausschluss möglich ist. Des Weiteren ist der Konzentrierungseffekt am größten, eine Denaturierung der Proteine kann vermieden werden und eine Lagerung ist gut möglich. Zur Entfernung niedermolekularer Substanzen wie Salze, Farbstoffe und Zucker wird die Probe zuvor mit einem molekularen Ausschluss von 3,5 kDa gegen entionisiertes Reinstwasser dialysiert. Auf diese Weise können auch weitere in der späteren Analyse störende Substanzen wie Phenole und Peptide abgetrennt werden.

Der Einsatz von 200 ml Weißwein und 200 ml Weißherbst resultiert jeweils in 90 bis 120 mg lyophilisiertem Pulver, bei Rotwein werden 190 bis 220 mg Probe nach der Gefriertrocknung gewonnen. Neben den Proteinen sind in diesem Extrakt noch weitere Feststoffe, die im Rahmen der Dialyse mit einem molekularen Ausschluss von 3,5 kDa nicht entfernt werden, wie Saccharide und Polyphenole enthalten. Die größere Menge des Rotweins ist wahrscheinlich auf den höheren Gehalt an polymeren Phenolen, wie den Tanninen, zurückzuführen sowie auf die Verbindung der Proteine mit diesen.

#### **3.2 Proteingehalt von Wein, Most und Weinbeeren**

##### **Vergleich des Proteingehaltes vor und nach Dialyse und Gefriertrocknung**

Eine Ermittlung des Proteingehaltes mit der Methode nach BRADFORD wird einerseits mit dem unbehandelten Wein durchgeführt, andererseits werden die Proben nach der Konzentrierung der Weinproteine durch Dialyse und Gefriertrocknung gemessen. Eingesetzt werden die weißen Rebsorten Riesling und Sauvignon Blanc des Jahrgangs 2006 aus Rheinhessen. Wie Tabelle 13 zeigt, liegt der Proteinverlust durch Dialyse und Gefriertrocknung beim Riesling bei 11,1 % und beim Sauvignon Blanc bei 6 %.

**Tabelle 13: Proteingehalt von Riesling 2006 sowie Sauvignon Blanc 2006 aus Rheinhessen vor und nach Dialyse und Gefriertrocknung, ermittelt mit Hilfe des Bradford-Assays mit BSA als Standard.** Die Daten sind Durchschnittswerte von Dreifachbestimmungen +/- Standardfehler

	<b>Riesling 2006 (Rheinhessen)</b>	<b>Sauvignon Blanc 2006 (Rheinhessen)</b>
vor Dialyse und Gefriertrocknung	15,31 µg/ml +/- 0,67 µg/ml	30,38 µg/ml +/- 0,71 µg/ml
nach Dialyse und Gefriertrocknung	13,60 µg/ml +/- 0,73 µg/ml	28,56 µg/ml +/- 1,14 µg/ml
„Rückgewinnungsrate“	88,9 %	94 %

### Proteingehalt von Weinbeere, Most und Wein

Zur Bestimmung des Proteingehaltes der Weinbeere, dem Most und dem daraus hergestellten Wein wird die Rebsorte Riesling des Jahrgangs 2005 aus dem Rheingau eingesetzt. Die Weinbeeren wurden bei vollständiger Reife im Rheingau gelesen und von der Forschungsanstalt in Geisenheim direkt weiterverarbeitet. Die in Tabelle 14 gezeigten Analysedaten zur Charakterisierung des Weins wurden mir freundlicherweise von der Forschungsanstalt Geisenheim zur Verfügung gestellt.

**Tabelle 14: Analysedaten Weißer Riesling 2005** (Wein Nr. 05-140 der Forschungsanstalt Geisenheim)

Weinhaltstoff	Gehalt
Gesamtalkohol	13,8 % Vol
Gesamtalkohol	109,1 g/l
Gesamtextrakt	22 g/l
Asche	1,6 g/l
Dichte	0,9907 (20/20)
Zucker	2 g/l
Gesamtsäure	5,8 g/l
pH-Wert	3,3
Weinsäure	2,6 g/l
Flüchtige Säure	0,4 g/l
Freie SO <sub>2</sub>	44 mg/l
Gesamte SO <sub>2</sub>	103 mg/l

Der eingesetzte Wein wird vor der Abfüllung mit Bentonit behandelt und geschwefelt. Andere Behandlungsverfahren werden nicht angewendet.

Tabelle 15 beleuchtet die Entwicklung des Proteingehaltes von der Weinbeere über den Most bis zum Wein. Die Proteinbestimmung erfolgt mit Hilfe des Bradford-Assays. Eingesetzt werden hierfür Wein, Most und Weinbeeren der gleichen Lage aus dem Anbaugebiet Rheingau, wobei der Wein geschwefelt und mit Bentonit behandelt ist, eine weitere Behandlung findet nicht statt. Auch der Most wird direkt für die Messung eingesetzt, während die Trauben entsprechend der in Abschnitt 2.8 geschilderten Methode behandelt werden.

**Tabelle 15: Proteingehalt von Weinbeeren, Most und Wein der Rebsorte Riesling des Jahrgangs 2005 aus dem Rheingau, ermittelt mit Hilfe des Bradford-Assays mit BSA als Standard.** Die Daten sind Durchschnittswerte von Dreifachbestimmungen +/- Standardfehler

Produktionsstufe	Proteingehalt [ $\mu\text{g/ml}$ ]
Weinbeere Riesling 2005 (Rheingau)	133,92 +/- 0,83
Most Riesling 2005 (Rheingau)	32,82 +/- 0,32
Wein Riesling 2005 (Rheingau)	10,18 +/- 0,27

Es ist deutlich zu erkennen, dass ein Proteinverlust während der Weinherstellung von der Weinbeere über den Most bis zum Wein einsetzt. Von der Weinbeere zum Most reduziert sich der Proteingehalt auf ca. ein Fünftel und weiterhin auf ca. ein Drittel bis zum Endprodukt Wein. Diese Werte stimmen mit von CANALS ET AL 1998 veröffentlichten Daten überein, die eine ca. dreifache Reduktion vom Most zum Wein nach der Fermentation beobachten. Auch die Größenordnung ist bei Anwendung des gleichen Assays (Bradford mit BSA als Standard) vergleichbar, die Werte sind mit  $32,36 \mu\text{g/ml} \pm 1,57 \mu\text{g/ml}$  und  $9,82 \mu\text{g/ml} \pm 0,39 \mu\text{g/ml}$  denen der eigenen Messungen sehr ähnlich [CANALS ET AL 1998].

### **Vergleich verschiedener Proteinbestimmungsmethoden für die Ermittlung des Proteingehaltes von Riesling und Sauvignon Blanc**

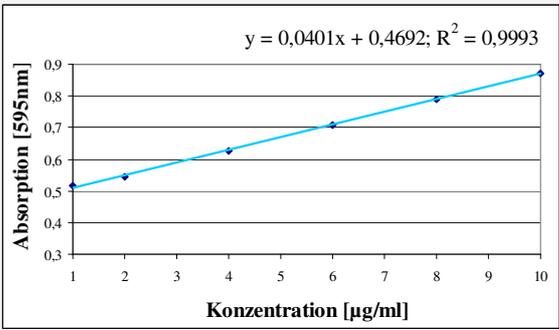
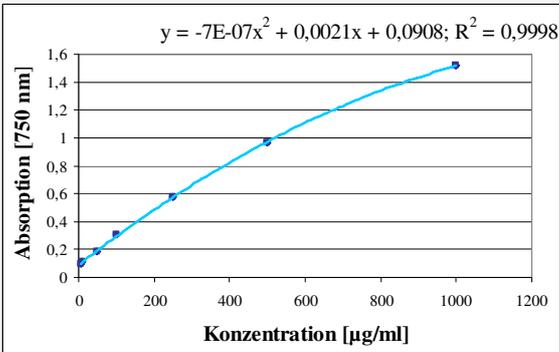
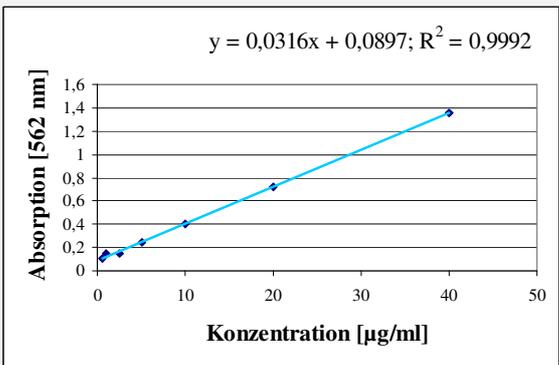
Am Beispiel von Riesling 2006 sowie Sauvignon Blanc 2006 aus Rheinhessen wird die Proteinbestimmung von Weinproteinen mit den drei verschiedenen Bestimmungsmethoden Bradford-Assay, Lowry-Assay sowie BCA-Assay verglichen. Als Standard dient jeweils BSA.

Bei der Weinherstellung des für diese Messungen eingesetzten Weines wird der Most mit Mostgelatine und Kasein als Schönungsmittel behandelt, der Wein wird nach der Gärung mit Bentonit versetzt.

Zunächst ist deutlich zu erkennen, dass der Proteingehalt von Sauvignon Blanc bei allen Bestimmungen im Vergleich zum Riesling ca. zwei- bis dreimal höher liegt (Tabelle 16).

Des Weiteren ist der große Unterschied zwischen den verschiedenen Bestimmungsmethoden auffällig. In der Literatur wird nach wie vor häufig der Bradford-Assay eingesetzt, der den Proteingehalt jedoch deutlich unterschätzt. Dies wird bereits von MARCHAL ET AL sowie VINCENZI ET AL berichtet und durch die vorliegenden Messungen bestätigt. Hingegen findet beim BCA-Assay sowie in etwas geringerem Ausmaß beim Lowry-Assay eine Überschätzung des Proteingehaltes statt [MARCHAL ET AL 1997; VINCENZI ET AL 2005]. Auch dies ist bei den in Tabelle 16 dargestellten Daten deutlich zu erkennen.

**Tabelle 16: Proteingehalt von Riesling und Sauvignon Blanc, ermittelt mittels Bradford-Assay, Lowry-Assay und BCA-Assay mit BSA als Standard.** Die Daten sind Durchschnittswerte von Dreifachbestimmungen +/- Standardfehler

	<b>Riesling 2006 (Rheinhessen)</b>	<b>Sauvignon Blanc 2006 (Rheinhessen)</b>
<b>Bradford-Assay</b> 	<b>13,6 µg/ml +/- 0,27</b>	<b>29,9 µg/ml +/- 0,87</b>
<b>Lowry-Assay</b> 	<b>107,5 µg/ml +/- 3,2</b>	<b>243,7 µg/ml +/- 1,3</b>
<b>BCA-Assay</b> 	<b>270,04 µg/ml +/- 6,23</b>	<b>780,23 µg/ml +/- 1,73</b>

Eine absolute Quantifizierung des Proteingehaltes bei Wein, Most und Weinbeeren ist somit nicht möglich, da Wechselwirkungen mit Phenolen zu einer Verfälschung führen können und ein Standard für Proteine aus Wein, Most oder Weinbeeren fehlt [MARCHAL ET AL 1997, MORENO-ARRIBAS ET AL 2002].

Die in weiten Bereichen schwankenden Angaben zu den Proteingehalten von Wein im Bereich von 0,1 mg/l bis 500 mg/l in der Literatur können teilweise auch durch die Unterschiede

der Bestimmungsmethoden erklärt werden. In der vorliegenden Arbeit wird beobachtet, dass eine Proteinbestimmung mittels der drei eingesetzten Bestimmungsmethoden (Bradford-Assay, Lowry-Assay, Bicinchoninsäure-Assay) nicht mit ausreichender Genauigkeit für dialysierte und lyophilisierte Weinproben ohne weitere Behandlung möglich ist, was auch bei VINCENZI ET AL (2005) beschrieben wurde. Auf Erklärungsansätze hierfür wird im Folgenden eingegangen.

### **Bradford Assay**

Weit verbreitet ist nach wie vor die Proteinbestimmung nach BRADFORD. Dieser Assay wird auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzt, um eine Vergleichbarkeit mit den in der Literatur beschriebenen Daten zu erhalten. Die Reproduzierbarkeit der Proteinbestimmung mit den verschiedenen Assays ist gegeben.

Mit Hilfe des Bradford-Assays werden Werte im Bereich von 2,85 bis 81,4 mg/l für Weißweine der Rebsorten Riesling, Gewürztraminer und Chardonnay ermittelt [DAMBROUCK ET AL 2003, DAMBROUCK ET AL 2005, HSU/HEATHERBELL 1987A, MURPHEY ET AL 1989A, CANALS ET AL 1998, LUGUERA ET AL 1998]. Die eigenen Werte liegen mit 15,3 mg/l für den Riesling und 30,4 mg/l für den Sauvignon Blanc innerhalb dieses Bereiches.

Diese Bestimmungsmethode führt jedoch zu einer Unterschätzung des Proteingehalts um 50 bis 80 %, was zumindest teilweise auf die Wechselwirkungen mit Alkohol und Phenolen zurückzuführen ist [WATERS ET AL 1991, MARCHAL ET AL 1997, VINCENZI ET AL 2005]. Problematisch ist, dass die vollständige Entfernung von interagierenden Komponenten kaum möglich ist. Polyphenole und Tannine beispielsweise können Verbindungen mit Proteinen eingehen oder bei proteinfällenden Methoden unlöslich werden, so dass eine Vorbehandlung der Proteine durch Proteinfällungen nicht zwangsläufig zu dem absoluten Proteingehalt führt [VINCENZI ET AL 2005, LOOMIS/BATAILE 1966].

Beim Bradford-Assay beruht die Reaktion auf einer Bindung der Proteine mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250. Diese Bindung wird maßgeblich durch den Anteil basischer Aminosäuren im Protein bestimmt, so dass vor allem das Vorhandensein der Aminosäuren Lysin, Histidin und Arginin von Bedeutung für die Bindung ist [TAL ET AL 1985]. Bei einem Vergleich des Anteils basischer Aminosäuren von BSA, welches als Standardprotein eingesetzt wird, mit dem der Weinproteine fällt auf, dass der Anteil der basischen Aminosäuren der Weinproteine deutlich niedriger liegt als der von BSA (Tabelle 17). Dies könnte einen Erklärungsansatz für die Unterschätzung des Proteingehaltes von Wein bei Verwendung von BSA als Standard darstellen, da die Bindungsfähigkeit zwischen den Proteinen und Coomassie Brilliant Blue somit auch erniedrigt ist.

**Tabelle 17: Anteil basischer Aminosäuren in BSA und Weinproteinen. Die Werte sind mit dem ExPASy Prot Param Tool ermittelt.**

	BSA	Lipid Transfer Protein Isoform 4	Vitis Vinifera Thaumatin-like Protein 1	Thaumatin-like Protein	Vakuoläre Invertase
Lysin	9,9 %	7,6 %	3,6 %	2,7 %	2,5 %
Histidin	2,8 %	0 %	0,5 %	0,4 %	3,0 %
Arginin	4,3 %	0,8 %	3,6 %	2,2 %	4,0 %
<b>Gesamt</b>	<b>17 %</b>	<b>8,4 %</b>	<b>7,7 %</b>	<b>5,3 %</b>	<b>9,5 %</b>

### Lowry-/ und BCA-Assay

Mit dem modifizierten Lowry-Assay werden Proteinkonzentrationen im Bereich von 31 mg/l bis 504 mg/l gefunden, wobei sich die Werte um 100 mg/l bis 250 mg/l konzentrieren [DORRESTEIN ET AL 1995, MONTEIRO ET AL 2001, MESQUITA ET AL 2001 FERREIRA ET AL 2000]. Hier sind auch die eigenen Analyseergebnisse mit 107,5 mg/l für den Riesling und 243,7 mg/l für den Sauvignon Blanc einzuordnen.

Bei Anwendung des BCA-Assays liegen die Werte der eigenen Untersuchungen mit 270 mg/l bzw. 780 mg/l weit über den bei VINCENZI ET AL (2005) beschriebenen Werten von 12,2 bis 30,4 mg/l. Dies liegt an der Art der Probenvorbereitung, da bei VINCENZI ET AL der Proteinbestimmung eine Kaliumdodecylsulfat (KDS)-Fällung vorangeht und in meinen Versuchen die Dialyse und Gefriertrocknung vor der Konzentrationsbestimmung eingesetzt wird. Nach Dialyse und Gefriertrocknung finden auch VINCENZI ET AL erhöhte Werte, die sie nicht erklären.

Der BCA-/ sowie der Lowry-Assay basieren auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{+}$  durch die Proteine. Während beim Lowry-Assay die einwertigen Kupferionen Folin-Ciocalteu Reagenz zu Molybdänblau reduzieren, schließt sich bei dem BCA-Assay die Komplexbildung von  $\text{Cu}^{+}$  mit Bicinchoninsäure an, was ebenfalls eine Farbänderung herbeiführt.

Da beide Reaktionen im ersten Schritt von der quantitativen Reduktion des Kupfers abhängig sind, gilt es den Einfluss darauf näher zu betrachten.

Die aromatischen Phenole, wie beispielsweise die Anthocyane, die im Wein und in hohen Mengen insbesondere im Rotwein enthalten sind, stellen oxidierbare Substanzen dar. So könnten diese ebenfalls eine Reduktion des Kupfers bewirken und somit die quantitative Proteinmessung beeinträchtigen. Dies erklärt einerseits die Überschätzung des Proteingehaltes durch den Lowry-/ und BCA-Assay sowie andererseits die Unbrauchbarkeit der Messungen für Rotweine und die Korrelation der Messwerte mit dem Phenolgehalt des Weines. Auch

reduzierende Zucker beeinflussen die Messung insbesondere beim BCA-Assay. So wird beschrieben, dass die Werte von Lowry-/ und BCA-Assay in der Regel gut übereinstimmen, die Ausnahme bildet Avidin, ein Glykoprotein aus dem Hühnereiweiß [LOTTSPREICH/ZORBAS 1998]. Ein hoher Anteil der Proteine in glykosylierter Form im Wein könnte die höheren Werte des BCA-/ im Vergleich zum Lowry-Assay erklären.

Auch scheint es aufgrund des möglichen Einflusses von oxidierbaren Phenolen logisch, dass die Werte bei der Proteinbestimmung von dialysiertem und lyophilisiertem Wein über den Werten der mittels Fällungen behandelten Weine liegen, da durch die Fällungen ein größerer Anteil an Phenolen abgetrennt wird.

### **Proteingehalt in Rotwein**

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass im Rotwein keine Proteine enthalten sind, da sie an Tannine, die während der Fermentation durch Haut und Kerne freigesetzt werden, binden. Eine Untersuchung von YOKOTSUKA ET AL konnten dies bereits 1994 widerlegen. Auch die vorliegende Arbeit zeigt, dass Proteine im Rotwein enthalten sind. Diese Aussage kann jedoch nur mit Hilfe der SDS-PAGE getroffen werden. Eine Angabe zum Proteingehalt im Rotwein kann mit dem Bradford-/ , dem Lowry-/ sowie dem BCA-Assay nicht gemacht werden.

Die ermittelten Proteinkonzentrationen der Rotweinsorten Portugieser, Dornfelder und Cabernet Sauvignon mit dem unbehandelten Wein sowie mit dem Wein nach der Konzentrierung durch Dialyse und Gefriertrocknung führt zu unrealistischen Ergebnissen. Die Werte liegen auch nach Abzug der Eigenabsorption der Polyphenole bei der entsprechenden Wellenlänge um das ca. zehnfache bis zwanzigfache höher als beim Weißwein (Tabelle 18). Dies widerspricht einerseits den gelelektrophoretischen Daten, andererseits werden Werte erreicht, die aus rein rechnerischen Gründen nicht möglich sind. Zurückzuführen sind die hohen Werte vermutlich auf den Einfluss der Phenole auf die Reaktion des BCA-Assays.

**Tabelle 18: Proteingehalt von Weinen der weißen Rebsorten Riesling und Sauvignon Blanc, des Portugieser Weißherbstes sowie der roten Rebsorten Portugieser, Dornfelder und Cabernet Sauvignon, ermittelt mit Hilfe des BCA-Assays mit Angabe des Standardfehlers**

Weinsorte	Proteingehalt [ $\mu\text{g/ml}$ ]
Riesling 2006	270,04 +/- 6,23
Sauvignon Blanc 2006	780,23 +/- 1,73
Portugieser Weißherbst 2007	1317,40 +/- 56,58
Portugieser 2005	1527,40 +/- 86,51
Cabernet Sauvignon 2006	2714,87 +/- 110,22
Dornfelder 2005	4506,00 +/- 86,41

### 3.3 Absorptionsspektrometrie von Weißwein, Roséwein und Rotwein

Absorptionsspektren werden von den dialysierten und lyophilisierten Weinproben über einen Wellenlängenbereich von 250 bis 800 nm aufgenommen. Hierzu werden je 10 mg der lyophilisierten Weinprobe in 10 ml Phosphatpuffer 1 gelöst und je nach Weinsorte entsprechend verdünnt.

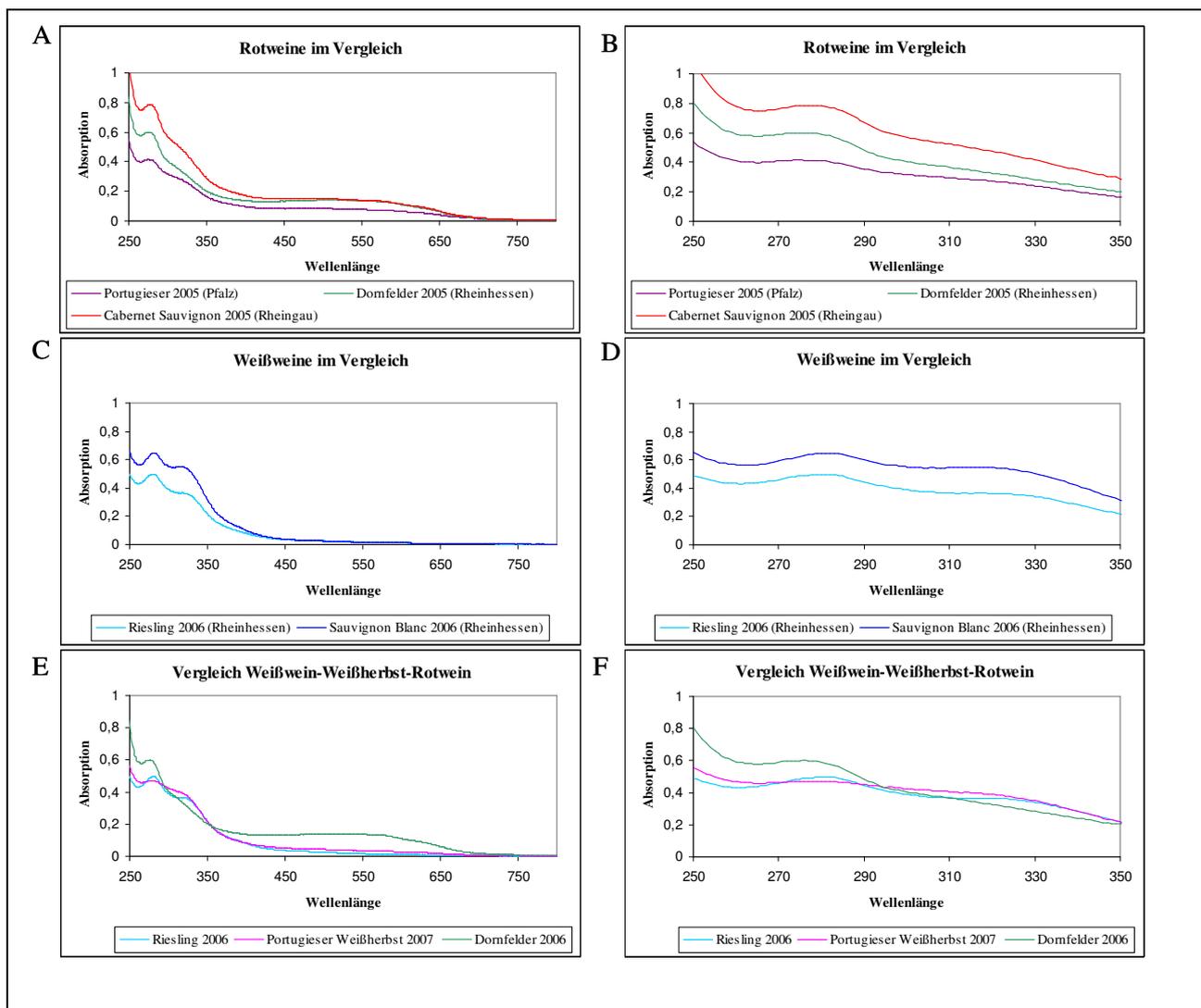
Neben dem Proteinpeak der aromatischen Aminosäuren bei 280 nm ist die Absorption der im Wein enthaltenen Polyphenole zu beachten.

Der Vergleich zwischen den verschiedenen Rotweinsorten Portugieser, Dornfelder und Cabernet Sauvignon zeigt ein weitgehend identisches Absorptionsmuster, das sich lediglich in der Intensität unterscheidet, wobei Dornfelder die höchste Absorption zeigt, gefolgt von Cabernet Sauvignon und Portugieser (Abbildung 10 A und B). Während der Portugieser und der Cabernet Sauvignon in den in Abbildung 10 dargestellten Spektren in zehnfacher Verdünnung der Ausgangsprobe eingesetzt werden, wird der Dornfelder zwanzigfach verdünnt, um in den Messbereich zu gelangen. Eine Erklärung könnte sein, dass die Höhe der Absorption mit den Angaben zu dem Polyphenolgehalt dieser Weine korreliert [RIBEREAU-GAYON ET AL 2006]. Es ist bekannt, dass die im Rotwein enthaltenen farbgebenden Anthocyane ein Absorptionsmaximum im visuellen Bereich bei einer Wellenlänge von 465 bis 560 nm haben. Die Absorption sowie die Farbe der Anthocyane sind pH-Wert-abhängig. Während sie im stark sauren Bereich (pH-Wert 1 bis 3) rot gefärbt sind, liegen sie im schwach sauren Bereich (pH-Wert 4 bis 6) in farbloser Form vor. Bei pH-Werten > 6 herrscht eine violett-blaue Färbung vor [WATZL ET AL 2002]. Dies erklärt die Blauverschiebung der gezeigten Absorptionsspekt-

ren in den Wellenlängenbereich um 600 nm, da die lyophilisierten Proben in einem Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,0 aufgenommen werden.

Auch die Spektren der zwei Weißweinsorten Riesling und Sauvignon Blanc sind sich sehr ähnlich (Abbildung 10 C und D). Neben einem Absorptionsmaximum bei 280 nm zeigen sie ein weiteres Maximum bei 320 nm. Das vor allem in Weißweinen enthaltene Quercetin hat Absorptionsmaxima bei 267 nm sowie bei 375 nm (eigene Messungen).

Ein Vergleich der Absorptionsspektren zwischen Rotwein, Weißherbst und Weißwein zeigt deutliche Unterschiede (Abbildung 10 E und F). Nur im Rotwein ist im Wellenlängenbereich ab 400 nm eine erhöhte Absorption zu beobachten. Die Absorption des Weißherbstes in diesem Bereich liegt nur unwesentlich höher als die des Weißweines. Im Wellenlängenbereich von 250 bis 350 nm ist das Absorptionsspektrum des Rotweines durch ein Maximum bei 280 nm gekennzeichnet, während der Weißwein zwei Absorptionsmaxima zeigt und beim Weißherbst zwar eine erhöhte Absorption, jedoch keine voneinander trennbaren Peaks zu erkennen sind.



**Abbildung 10: Absorptionsspektren verschiedener Weinsorten im Vergleich. Die Absorptionsspektren werden mit Weinproben nach Dialyse und Gefriertrocknung aufgenommen.**

Während in den Abbildungen A, C und E der Wellenlängenbereich von 250 bis 800 nm aufgetragen ist, stellen die Abbildungen B, D und F den Ausschnitt von 250 bis 350 nm dar.

(A, B) Vergleich der Rotweinsorten Portugieser (2005, Pfalz), Dornfelder (2005, Rheinhessen) und Cabernet Sauvignon (2005, Rheingau). Für die Absorptionsspektren von Portugieser und Cabernet Sauvignon werden 0,1 mg, für Dornfelder 0,05 mg lyophilisierter Weinextrakt eingesetzt.

(C, D) Vergleich der Weißweinsorten Riesling und Sauvignon Blanc: Für das Absorptionsspektrum von Riesling wird 1 mg und für das von Sauvignon Blanc 0,1 mg lyophilisierter Weinextrakt eingesetzt.

(E, F) Vergleich der Absorptionsspektren eines Rotweins (Dornfelder 2005, Rheinhessen) mit einem Weißherbst (Portugieser 2007, Rheinhessen) und einem Weißwein (Riesling 2006, Rheinhessen). Für das Absorptionsspektrum von Riesling wird 1 mg, für das von Portugieser Weißherbst 0,1 mg und für das von Dornfelder 0,05 mg lyophilisierter Weinextrakt eingesetzt.

### 3.4 Proteinzusammensetzung von Weißwein, Roséwein und Rotwein

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in der Untersuchung der Proteinzusammensetzung verschiedener deutscher Weinsorten. Da die Literatur, wie in der Einleitung beschrieben, kein eindeutiges und vollständiges Bild über die Proteinzusammensetzung von Wein zeichnet und es bislang nur wenige Veröffentlichung zur umfassenden Identifizierung von Proteinen im Wein und hierbei ausschließlich Weißwein gibt, besteht hier noch großer Forschungsbedarf. Deutsche Weine werden bisher nicht beschrieben, was in dieser Arbeit die Zielsetzung darstellt. So werden in den folgenden Unterkapiteln die Proteinzusammensetzungen von Weißwein, Rotwein sowie Weißherbst analysiert und abschließend miteinander verglichen.

Eine Identifizierung der Proteine ist von Bedeutung, da Proteine einerseits zur Trübungsbildung im Wein beitragen können und andererseits allergene Reaktion auf Wein beschrieben sind, hinsichtlich der auslösenden Allergene jedoch noch Unklarheit besteht.

#### 3.4.1 Weißwein

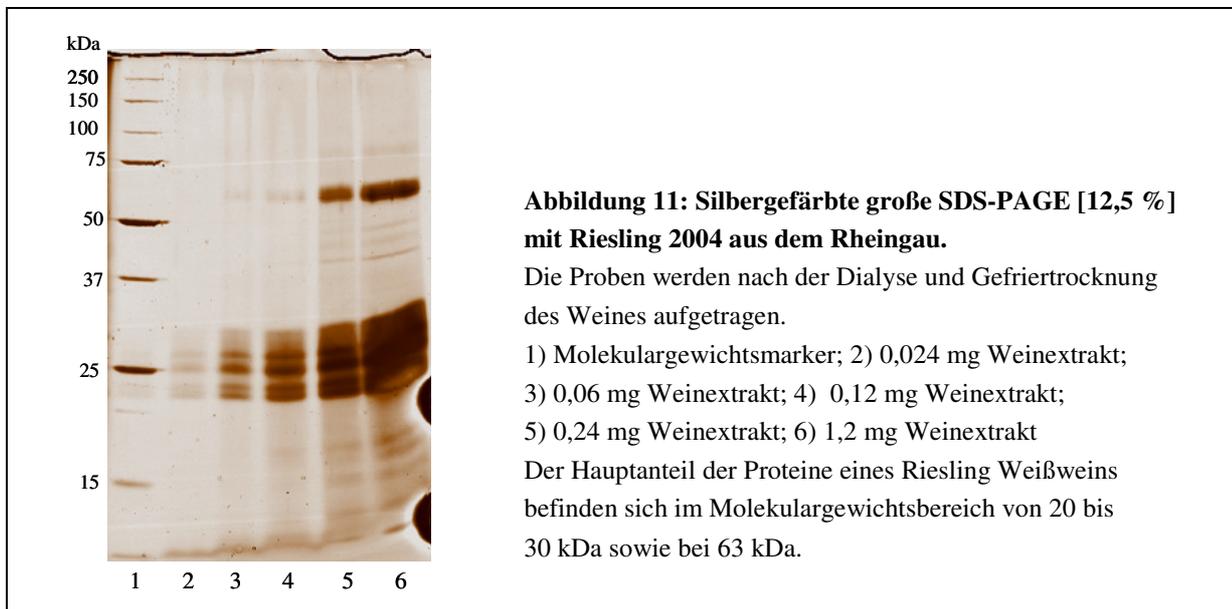
Die in diesem Abschnitt beschriebenen Versuche zielen darauf ab, die Proteinzusammensetzung verschiedener Weißweine zu beleuchten. Hierzu erfolgt zunächst eine Molekulargewichtsbestimmung mittels SDS-PAGE und darauf aufbauend eine massenspektrometrische Identifizierung. Die isoelektrische Fokussierung sowie die Glykoproteinbestimmung vervollständigen die Charakterisierung der Proteine in Weißwein.

Für die Identifizierung wird als Rebsorte ein Riesling gewählt, da dieser den weitaus größten Anteil der Rebfläche in Deutschland ausmacht. Es wird geprüft ob dieser regional angebaute

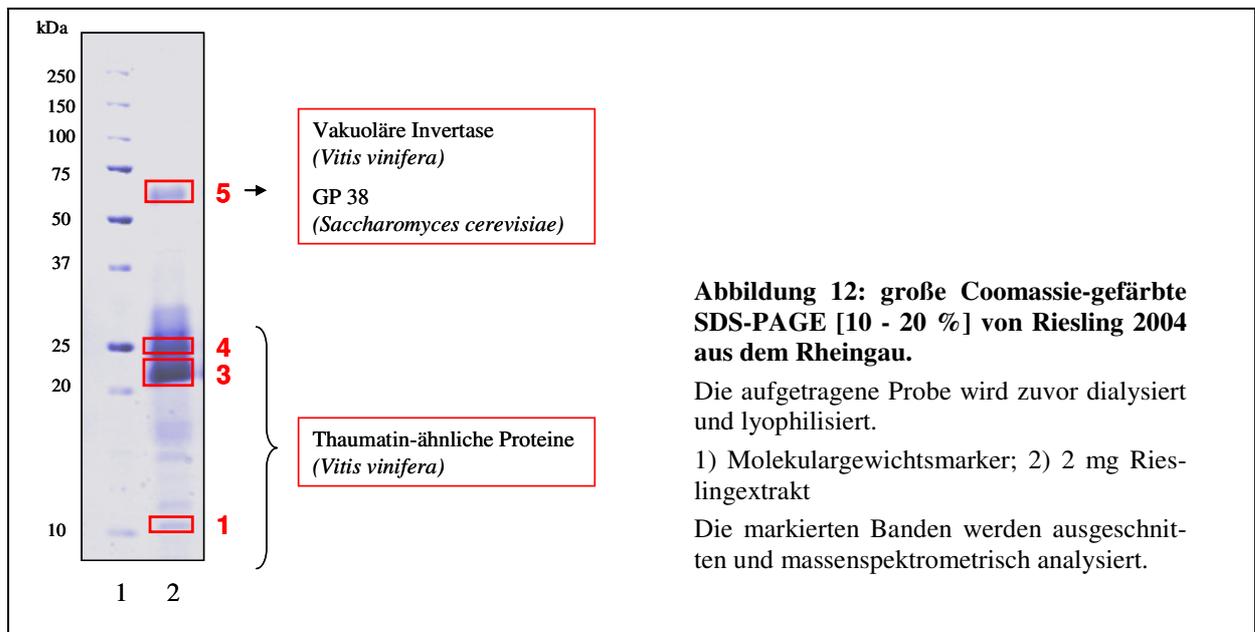
Weißwein Proteine enthält, die zur Trübungsbildung beitragen können oder allergenes Potential besitzen.

### 3.4.1.1 Gelelektrophoretisches Verhalten und massenspektrometrische Analyse

Weißwein, hier dargestellt am Beispiel eines Rieslings des Jahrgangs 2004 aus dem Rheingau, zeigt bei einer SDS-PAGE das in Abbildung 11 dargestellte typische Bandenmuster. Dieses ist durch vier dicke Proteinbanden bei 21, 22, 24 und 26 kDa gekennzeichnet. Eine weitere stark ausgeprägte Proteinbande liegt bei 63 kDa, weitere schwächere Banden finden sich bei 12, 14, 16, 17, 40, 44, 48 und 84 kDa.



Um die Proteine, die sich mittels der SDS-PAGE auftrennen lassen, identifizieren zu können, werden die mit Coomassie angefärbten Banden aus dem Gel ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und massenspektrometrisch mit einem ESI-Q-TOF-Massenspektrometer analysiert. Die Massenspektrometrie wird freundlicherweise von Dr. Stefan Tenzer im Institut für Immunologie der Universität Mainz durchgeführt. Das hierfür eingesetzte Gel ist in Abbildung 12 dargestellt, die Ergebnisse der Massenspektrometrie sind in Tabelle 19 zusammengefasst.



**Tabelle 19: Identifizierte Proteine in Riesling des Jahrgangs 2004 aus dem Rheingau**

Identifiziertes Protein	MW [kDa]	Herkunft	Abdeckung [%]	Peptide	Accession/ gi Nummer
VVTL1	23,953	<i>V. vinifera</i>	58,86	22	AAB61590/ 2213852
Putatives Thaumatin-ähnliches Protein	24,035	<i>V. vinifera</i>	56,3	24	CAB85637/ 7406716
GP38 Protein (Protein YGP1 [Vorläuferprotein])	37,22	<i>S. cerevisiae</i>	9,04	3	P38616/ 1723930
Vacuoläre Invertase 1 (GIN 1)	71,501	<i>V. vinifera</i>	8,72	8	AAB47171/ 1839578

## Traubenproteine

Die Identifizierung der Proteine ergibt, dass der Hauptanteil der Proteine im Wein Thaumatin-ähnliche Proteine sind, die sich im Molekulargewichtsbereich von 20 bis 30 kDa befinden.

Das VVTL (*Vitis vinifera* thaumatin-like protein 1) ist ein in der Traube bereits identifiziertes und deklariertes Thaumatin-ähnliches Protein. Daneben gibt es weitere Formen Thaumatin-ähnlicher Proteine in der Traube, von denen auch ein weiteres mit einem Molekulargewicht von 24,035 kDa in dem untersuchten Weißwein identifiziert werden kann.

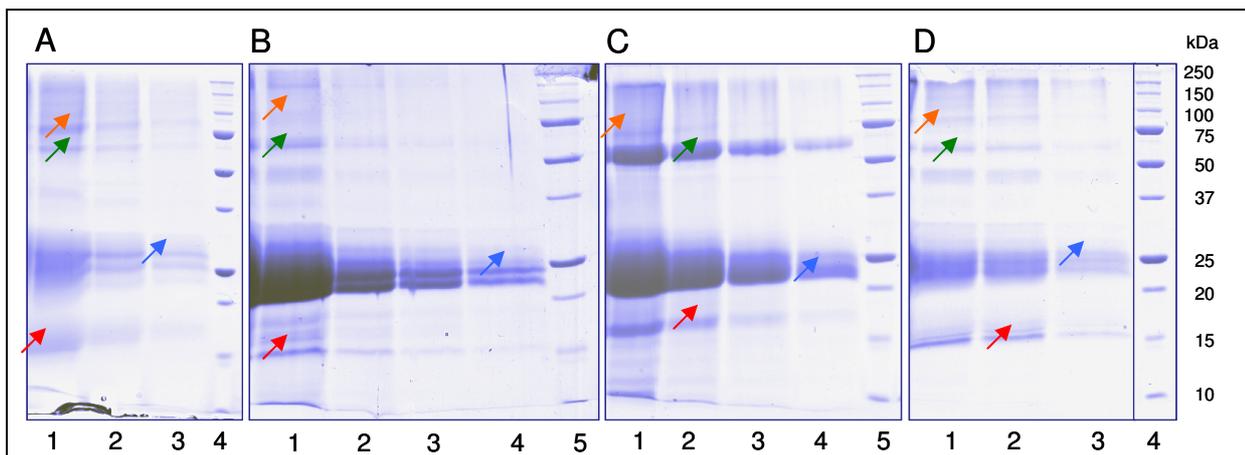
Die Proteinbande bei ca. 70 kDa enthält die vakuoläre Invertase 1 (GIN 1) aus der Weinbeere.

## Hefeproteine

Neben den Traubenproteinen wird im Riesling das Vorläuferprotein YGP1 (GP38) identifiziert. Die Funktion dieses 37,33 kDa – Glykoproteins, das durch die Hefe in den Wein gelangt, ist nicht vollständig geklärt. Eine Beteiligung der Anpassungsvorgänge auf zellulärer Ebene im Rahmen des Reifeprozesses wird diskutiert.

## Einfluss der Rebsorte auf die Proteinzusammensetzung in Weißweinen

Der Einfluss der Rebsorte auf die Proteinzusammensetzung im Wein wird mittels einer denaturierenden Gelelektrophorese untersucht. Die Proben werden zuvor dialysiert und lyophilisiert. Eingesetzt werden Riesling, Sauvignon Blanc und Gewürztraminer des Jahrgangs 2006 sowie Morio Muskat des Jahrgangs 2003 aus Rheinhessen.



**Abbildung 13: Coomassie-gefärbte SDS-PAGE [12,5%] zum Vergleich der Proteinzusammensetzung verschiedener Weinsorten.**

Die Proben werden nach Dialyse und Gefriertrocknung aufgetragen.

(A) Riesling 2006 (Rheinhessen): 1) 4,17 mg Weinextrakt; 2) 1,67 mg Weinextrakt; 3) 0,83 mg Weinextrakt; 4) Molekulargewichtsmarker

(B) Sauvignon Blanc 2006 (Rheinhessen): 1) 0,83 mg Weinextrakt; 2) 0,417 mg Weinextrakt; 3) 0,208 mg Weinextrakt; 4) 0,104 mg Weinextrakt; 5) Molekulargewichtsmarker

(C) Morio Muskat 2003 (Rheinhessen): 1) 1,56 mg Weinextrakt; 2) 0,625 mg Weinextrakt; 3) 0,3125 mg Weinextrakt; 4) 0,156 mg Weinextrakt; 5) Molekulargewichtsmarker

(D) Gewürztraminer 2006 (Rheinhessen): 1) 1,25 mg Weinextrakt; 2) 0,625 mg Weinextrakt; 3) 0,3125 mg Weinextrakt; 4) Molekulargewichtsmarker

Die in allen vier untersuchten Weinsorten enthaltenen Proteine sind mit Pfeilen markiert, eine genaue Erläuterung findet sich im Text.

Zwischen den Weinen der Rebsorten Riesling, Sauvignon Blanc, Gewürztraminer und Morio Muskat sind, wie Abbildung 13 verdeutlicht, Gemeinsamkeiten wie auch geringfügige Unterschiede zu erkennen. Der Hauptanteil der Proteine ist den Thaumatin-ähnlichen Proteinen im

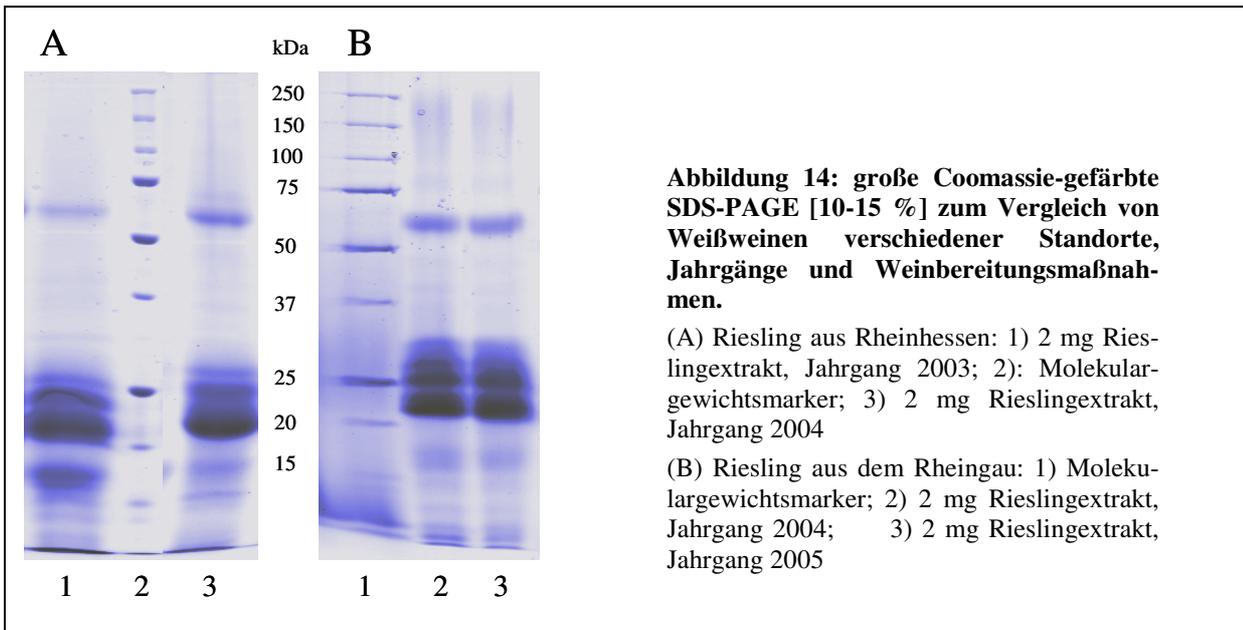
Molekulargewichtsbereich zwischen 20 und 30 kDa zuzuordnen (mit dem blauen Pfeil gekennzeichnet). Eine Proteinbande bei ca. 60 kDa ist in allen Weinsorten zu identifizieren (grüner Pfeil), wobei es sich hierbei aller Wahrscheinlichkeit nach um eine vakuoläre Invertase handelt, die in der Rebsorte Morio Muskat besonders ausgeprägt ist. Zwei weitere Proteinbanden bei ca. 80 kDa sind für alle gezeigten Weinsorten charakteristisch (oranger Pfeil), während die 48 kDa-Bande insbesondere bei Sauvignon Blanc und Gewürztraminer in Erscheinung tritt. Im Bereich von 15 kDa findet sich eine Proteinbande (roter Pfeil) und bei höheren Konzentrationen der Weinextrakte ist ebenfalls eine Bande bei ca. 10 kDa sichtbar. Zusätzliche Banden sind bei Sauvignon Blanc bei 16 kDa, 17 kDa und 18 kDa und bei Gewürztraminer bei 11 kDa, 12,5 kDa und 14 kDa zu erkennen.

### **Einfluss von Jahrgang, Standort und Prozess der Weinherstellung auf die Proteinzusammensetzung**

In Abbildung 14 ist Riesling aus Rheinhessen (A) der Jahrgänge 2003 und 2004 sowie Riesling aus dem Rheingau (B) der Jahrgänge 2004 und 2005 dargestellt. Bei den verwendeten Weißweinen wurden die folgenden Schönungsmaßnahmen angewendet:

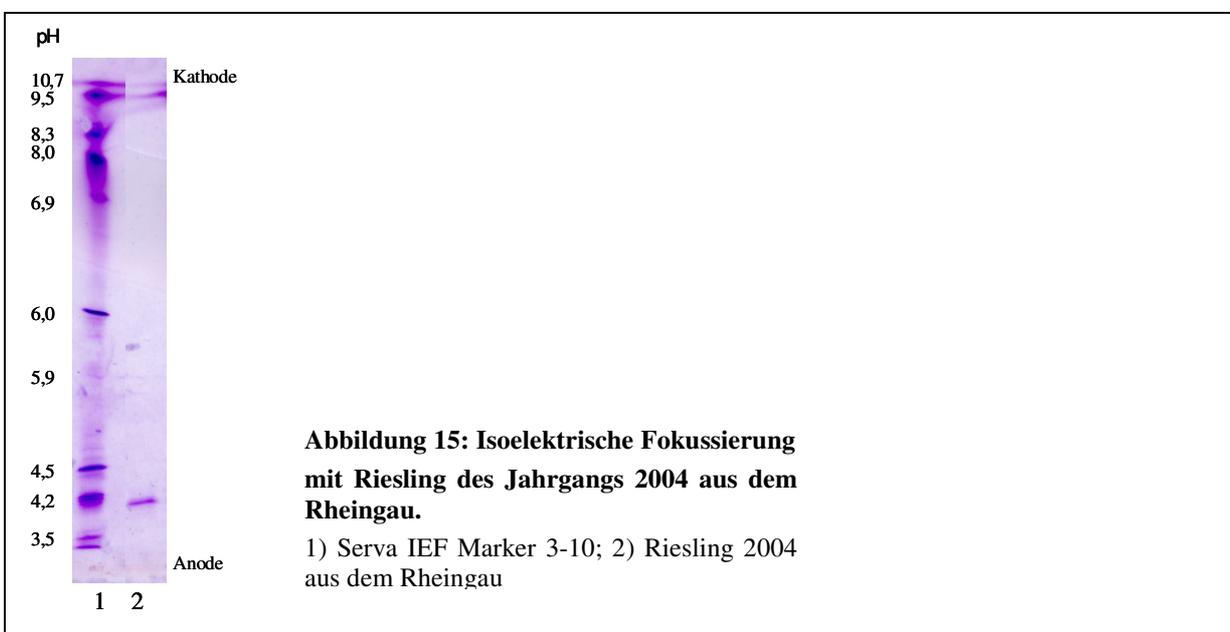
Riesling 2003 und 2004 (Rheinhessen)	Mostgelantine und Kasein im Most; Bentonit im Jungwein (nach der Gärung)
Riesling 2004 (Rheingau)	Bentonit im Most
Riesling 2005 (Rheingau)	Bentonit im Wein (vor der Abfüllung)

Es ist zu erkennen, dass sowohl zwischen verschiedenen Jahrgängen als auch zwischen den verschiedenen Standorten Rheinhessen (Mainz) und Rheingau (Geisenheim) bei der denaturierenden Elektrophorese keine grundlegenden Unterschiede vorhanden sind. Während die Jahrgänge 2004 und 2005 des Rieslingweines aus Rheinhessen auf der SDS-PAGE identisch sind, sind beim Riesling aus dem Rheingau Unterschiede in der Intensität vorhanden. So ist die Proteinbande bei ca. 17 kDa beim Riesling des Jahrgang 2003 intensiver, während die 60 kDa Bande, bei der es sich wahrscheinlich um die vakuoläre Invertase handelt, beim Riesling des Jahrgangs 2004 stärker ausgeprägt ist.



### 3.4.1.2 Isoelektrischer Punkt der Proteine

Eine isoelektrische Fokussierung, durchgeführt mit einem Riesling des Jahrgangs 2004 aus dem Rheingau, ergibt eine deutliche Bande, die einen isoelektrischen Punkt für die Gesamtheit der Weinproteine bei ca. 4,1 definiert (Abbildung 15).



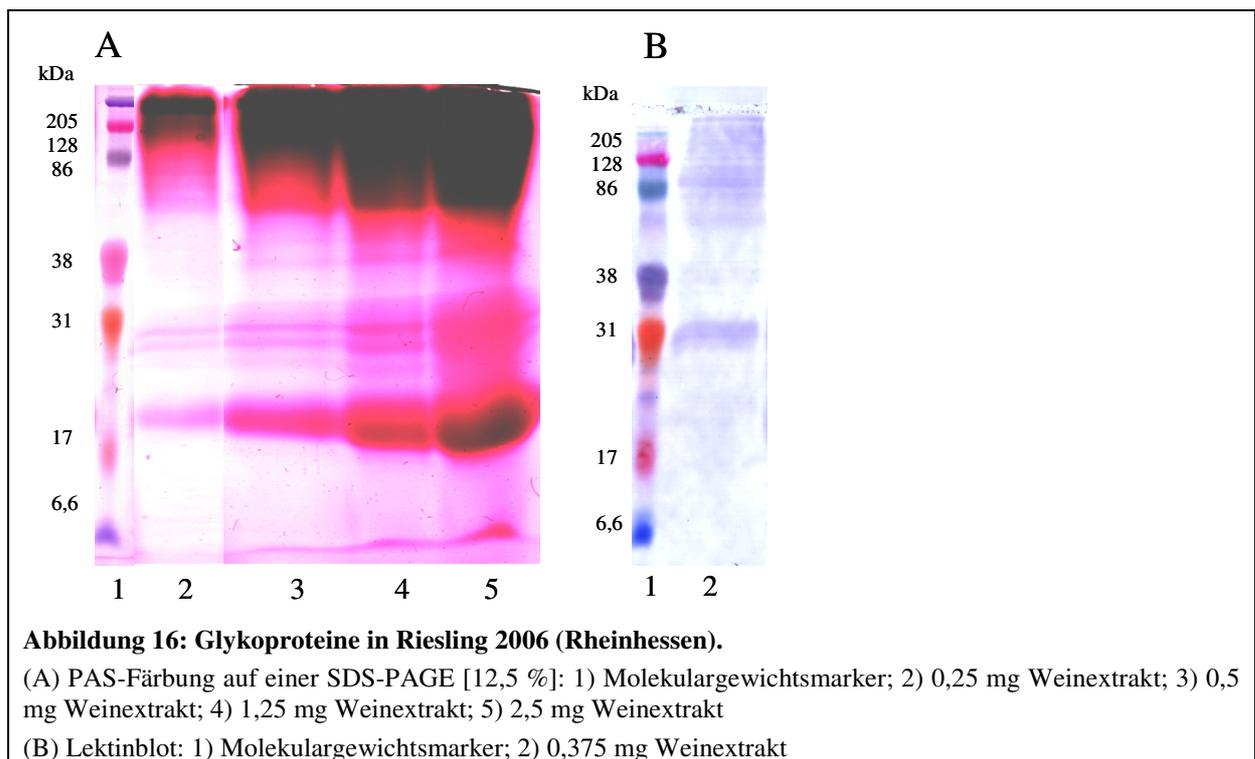
Der theoretisch berechnete isoelektrische Punkt der Thaumatin-ähnlichen Proteine, die den Hauptanteil der Proteine in Weißwein ausmachen, liegt bei ca. 4,9. Der theoretische isoelektrische Punkt der vakuolären Invertase, die ebenfalls in Weißwein identifiziert werden

kann, liegt bei 4,6 [ProtPram Tool von Expasy; [HTTP://WWW.EXPASY.CH/TOOLS/ PROTPARAM.HTML](http://www.expasy.ch/tools/protparam.html)]. Eine Auftrennung der Weinproteine kann mittels der isoelektrischen Fokussierung nicht erreicht werden, da sich nur eine Bande zeigt und keine weitere Auftrennung hinsichtlich der isoelektrischen Punkte der Weinproteine erzielt werden kann.

### 3.4.1.3 Glykoproteine in Weißwein

Glykoproteine spielen einerseits bei der Vermittlung von Allergien eine Rolle, andererseits werden sie im Zusammenhang mit der Proteinstabilität in Wein diskutiert, so dass das Vorhandensein von Glykoproteinen einen wichtigen, jedoch zugleich noch wenig erforschten, Untersuchungsgegenstand darstellt.

Das Vorhandensein von Glykoproteinen wird mit der Perjodsäure (PAS)-Färbung auf einer SDS-PAGE sowie mit einem Lektinbindungs-Assay untersucht. Als Probe wird Riesling des Jahrgangs 2006 aus Rheinhessen eingesetzt.



Die PAS-Färbung verdeutlicht, dass sich ein großer Anteil an Glykoproteinen im höhermolekularen Bereich (>80 kDa) findet. Diese Proteine werden bei einer Coomassie-/ oder Silberfärbung nicht angefärbt (vgl. Abbildungen 11 und 13), so dass es sich vermutlich um Glykoproteine mit einem geringen Anteil an Proteinen und einem großen Anteil von Kohlenhyd-

raten handelt, wie beispielsweise Mannoproteine. Auch im niedermolekularen Bereich finden sich glykosylierte Proteine. So färben sich eine vergleichsweise dicke Bande bei 20 kDa und drei weitere diskrete Banden im Bereich von 20 bis 30 kDa sowie zwei weitere bei ca. 38 kDa und 40 kDa an. Beim Lektinbindungs-Assay hingegen finden sich die ausgeprägte Bande sowie die zwei schwächeren Banden in den etwas höhermolekularen Bereich verschoben, bei ca. 30 sowie 37 und 38 kDa. Der Großteil der Glykoproteine wird jedoch auch bei dieser Nachweismethode ebenso wie bei der PAS-Färbung im Bereich größer 80 kDa detektiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Thaumantin-ähnliche Proteine im Molekulargewichtsbereich von 20 bis 30 kDa den größten Anteil der Proteine im Weißwein stellen. Ein großer Teil der Proteine liegt in glykosylierter Form vor.

### **3.4.2 Rotwein**

Die im Folgenden beschriebenen Versuche zielen darauf ab, die in Rotwein enthaltenen Proteine zu identifizieren. Hierzu sind mir bisher keine Veröffentlichungen bekannt. Ein Augenmerk liegt hierbei auf dem Vorhandensein von Proteinen, die einen Einfluss auf die Stabilität von Wein ausüben sowie auf potentiell allergen wirkenden Proteinen.

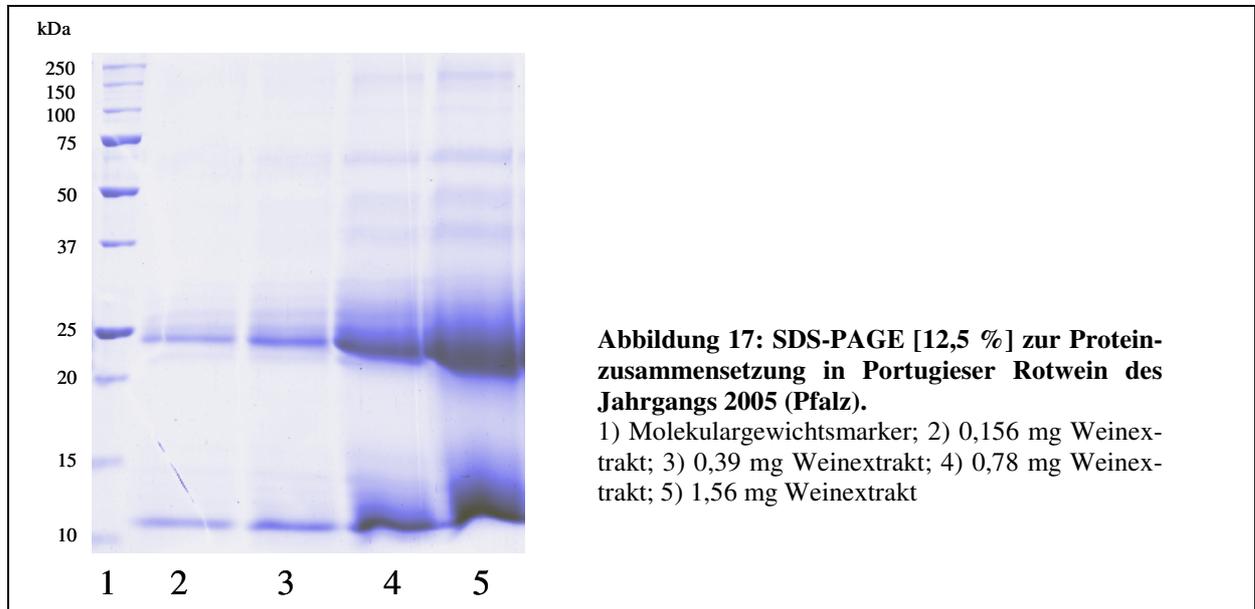
Zunächst wird das gelelektrophoretische Verhalten analysiert und eine massenspektrometrische Analyse vorgenommen, um eine eindeutige Zuordnung der Proteine zu erreichen.

Die Sorte des eingesetzten Rotweins hat einen entscheidenden Einfluss auf die Darstellung mittels SDS-PAGE. Während ein Portugieser Rotwein direkt nach der Dialyse und Gefrier-trocknung zur gelelektrophoretischen Trennung eingesetzt werden kann, ist dies bei Weinen der roten Rebsorten Dornfelder und Spätburgunder nicht möglich. Es sind keine Banden zu erkennen und ein großer Schmier zieht sich über die Spur, wofür die Polyphenole und deren kovalente Bindung mit Proteinen verantwortlich gemacht werden. Deren Entfernung soll mit den unter 3.4.2.2 beschriebenen Methoden erreicht werden.

Vervollständigt werden die Daten zur Identifizierung und Charakterisierung der Proteine im Rotwein durch die in Absatz 3.4.2.3 beschriebene Glykoproteinbestimmung. Glykoproteine spielen sowohl bei der Vermittlung der Allergenität als auch bei der Weinstabilität eine wichtige Rolle, so dass das Vorhandensein dieser im Wein dahingehend von Bedeutung ist.

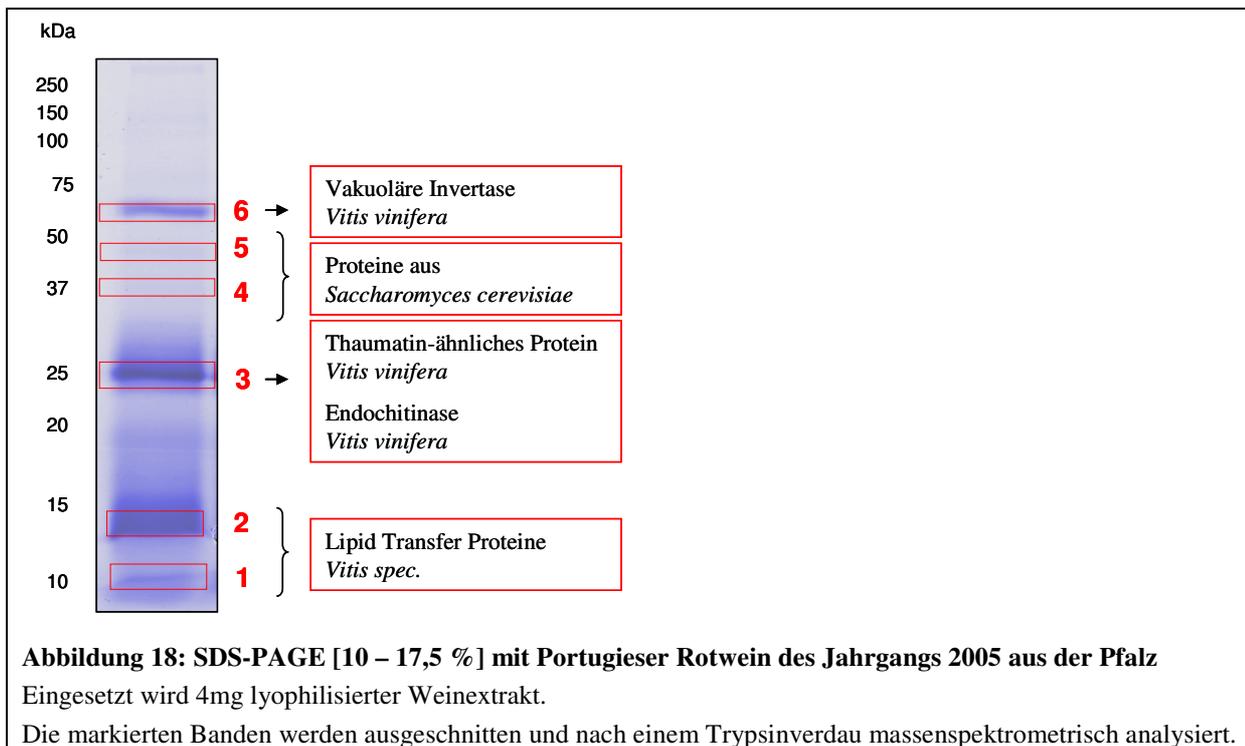
### 3.4.2.1 SDS-PAGE und massenspektrometrische Analyse

Der Portugieser Rotwein des Jahrgangs 2005 aus der Pfalz zeigt das in Abbildung 17 dargestellte Bandenmuster.



Der Portugieser Rotwein zeichnet sich durch Proteine im Molekulargewichtsbereich von 12 bis 210 kDa aus. Eine intensive Proteinbande findet sich bei 12 kDa, eine weitere Bande vergleichbarer Intensität bei 24 kDa. Im Molekulargewichtsbereich von 25 bis 30 kDa finden sich ebenso wie bei 38 kDa, 47 kDa, 67 kDa und 210 kDa weitere definierte Banden.

Für die massenspektrometrische Analyse werden die in Abbildung 18 markierten Banden aus dem mit Coomassie gefärbten Gel ausgeschnitten und einem Trypsinverdau unterzogen.



Die Massenspektrometrie wird durch Dr. Stefan Tenzer mit einem ESI-Q-TOF-Massenspektrometer am Institut für Immunologie der Universität Mainz durchgeführt. In dem Portugieser Rotwein können die in Tabelle 20 aufgeführten Proteine identifiziert werden.

**Tabelle 20: Identifizierte Proteine eines Portugieser Rotweins 2005 aus der Pfalz**

Identifiziertes Protein	MW [kDa]	Herkunft	Abdeckung [%]	Peptide	Accession/ gi Nummer
Protein mit unbekannter Funktion	11,656	<i>V. vinifera</i>	20	6	CAN70512 147802122
Nicht spezifisches Lipid Transfer Protein	11,663	<i>V. berlandieri x</i> <i>V. vinifera</i>	14,29	3	AAO33357 281939961
Lipid Transfer Protein Isoform 4	11,677	<i>V. vinifera</i>	52,78	27	AAO33394 28194086
Lipid Transfer Protein	11,756	<i>V. aestivalis</i>	14,29	15	AAQ96338 37625029
Putatives Thaumatococcus-ähnliches Protein	20,108	<i>V. vinifera</i>	26,84	15	CAB85636/ 7406714
Protein mit unbekannter Funktion	21,143	<i>V. vinifera</i>	14,43	4	CAN67019/ 147773144
Kovalent gebundenes Zellwandprotein 11 [Vorläuferprotein]	23,227	<i>S. cerevisiae</i>	11,45	7	P47001/ 1353025
Thaumatococcus-ähnliches Protein	23,847	<i>V. vinifera</i>	30,67	16	ABD64681/ 89242712

Protein mit unbekannter Funktion	23,929	<i>V. vinifera</i>	19,56	7	CAN65933/ 147784586
VVTL1	23,953	<i>V. vinifera</i>	36,94	12	AAB61590/ 2213852
Putatives Thaumatin-ähnliches Protein	24,035	<i>V. vinifera</i>	36,94	13	CAB85637/ 7406716
Zellwandprotein CWP1 [Vorläuferprotein]	24,253	<i>S. cerevisiae</i>	37,66	11	P28319/ 465661
Klasse IV Endochitinase	27,224	<i>V. vinifera</i>	16,48	26	AAB65776/ 2306811
Protein TOS1 Precursor	47,964	<i>S. cerevisiae</i>	8,13	6	P38288/ 586301
Extrazelluläres Matrix Protein 33 [Vorläuferprotein]	48,278	<i>S. cerevisiae</i>	6,82	5	P38248/ 1351738
Glycosidase CRH1 [Vorläuferprotein]	52,725	<i>S. cerevisiae</i>	19,53	21	P53301/ 1723734
Endochitinase [Vorläuferprotein]	58,978	<i>S. cerevisiae</i>	3,2	2	P29029/ 1705815
Vacuoläre Invertase 1 (GIN1)	71,501	<i>V. vinifera</i>	15,26	19	AAB47171/ 1839578

In dem Portugieser Rotwein des Jahrgangs 2005 aus der Pfalz können somit fünfzehn Proteine aus der Weintraube *Vitis spec.* sowie sechs Proteine aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert werden, die im Folgenden beschrieben werden.

### **Traubenproteine in Portugieser Rotwein**

Der Großteil der in Portugieser Rotwein enthaltenen Proteine stammen aus der Weinbeere, welche im Folgenden aufgeführt sind.

#### ***Lipid Transfer Proteine***

Neben dem Lipid Transfer Protein Isoform 4 mit 11,7 kDa aus *Vitis vinifera* kann ein Lipid Transfer Protein mit 11,8 kDa aus *Vitis aestivalis* sowie eines mit 11,6 kDa aus einer Kreuzung von *Vitis berlandieri x Vitis vinifera* gefunden werden.

#### ***Thaumatin-ähnliche Proteine***

In dem untersuchten Rotwein werden vier Thaumatin-ähnliche Proteine mit Molekulargewichten im Bereich von 20,1 bis 24 kDa identifiziert. Eines von diesen ist das VVTL1 (*Vitis*

vinifera thaumatin like protein) mit einem Molekulargewicht von 23,953 kDa. Die weiteren Thaumatin-ähnlichen Proteine sind bei Molekulargewichten von 20,108 kDa sowie 23,847 kDa und 24,253 kDa.

### ***Endochitinase***

In dem untersuchten Portugieser Rotwein ist die Klasse IV Endochitinase mit einem Molekulargewicht von 27,2 kDa vorhanden.

### ***Vakuoläre Invertase***

Von den zwei bisher beschriebenen Formen der vakuolären Invertase ist in dem analysierten Wein die vakuoläre Invertase 1 (GIN 1) mit einem Molekulargewicht von 71,5 kDa zu finden.

Drei weitere Proteine (in Tabelle 20 als Proteine mit unbekannter Funktion bezeichnet) werden in dem Portugieser Rotwein gefunden, können jedoch keinem der in der Datenbank gelisteten Proteine eindeutig zugeordnet werden. Hier wird durch eine BLAST-Recherche sowie ein Alignment mit ClustalX 1.83 und GeneDoc v2.6.002 eine Analyse vorgenommen, um Rückschlüsse auf die Proteinfamilie zu ziehen (Abbildung 19).

Das Protein mit einem Molekulargewicht von 11,656 kDa ist wahrscheinlich der Familie der LTP zuzuordnen: zu dem LTP P5 aus *Vitis spec.* weist die Sequenz des unbekanntes Proteins eine Sequenzidentität sowie /-ähnlichkeit von 73 % und zu dem LTP P3 aus *Vitis spec.* besteht eine Sequenzidentität von 66 % sowie eine Sequenzähnlichkeit von 70 % (Abbildung 19A).

Das Protein unbekannter Funktion mit einem Molekulargewicht von 21,143 kDa kann keiner Proteinfamilie eindeutig zugeordnet werden. Es zeigt eine Sequenzidentität von 39 % sowie eine Ähnlichkeit von 55 % mit einem LTP aus der Kichererbse ebenso wie eine 37%ige Identität und 56 % Homologität zu einem LTP aus *Arabidopsis thaliana*, so dass es sich hierbei möglicherweise auch um ein Lipid Transfer Protein handeln könnte (Abbildung 19B).

Das Protein mit einem Molekulargewicht bei 23,929 kDa ist mit hoher Wahrscheinlichkeit der Familie der Thaumatin-ähnlichen Proteine zuzuordnen. Es ist zu 91 % identisch mit einem TLP und einem Osmotin-ähnlichen Protein, welches zur Gruppe der TLP gezählt wird, aus *Vitis vinifera*. Die Ähnlichkeit liegt bei 95 bzw. 94 % (Abbildung 19C).

A

```

      *           20           *           40           *           60
11, 656kDa : MAGSVAVKVSCLVLMCLVASPMAVEGLSCGDVATQLAIPCINYLRSAGPLEPACCCNGVKNLKNsAAT : 67
LTPP5 : -----LSCGDVATQLAIPCINYLRSAGPLEPACCCNGVKNLKNsAAT : 40
LTPP3 : -----LSCGDVATQMAISCINYLRSAGPLEPACCCNGVKNLKNsAAT : 40
              LSCGDVATQ6ApCINYLRSAGPLP ACCNGVKNLKNsAaT

      *           80           *           100           *
11, 656kDa : TQDRRTACKCLINASKSISGVNFGLAAGLPKCGVNI PYKIS PSTNCD--- : 115
LTPP5 : TQDRRTACKCLINASKSISGVNFGLAAGLPKCGVNI PYKIS PSTNCDQVN : 91
LTPP3 : TQDRRTACKCLINASKSISGVNFGLAAGLPKCGVNI PYKIS PSTNCDQVN : 91
              TQDRRTACKCLINASK3ISGVNFGLAAGLPKCGVNI PYKIS PSTNCDqvn

```

B

```

      *           20           *           40           *           60
21, 143kDa : MEAMKkKMLNLPERWFLVEMISSEALISGSAGAASLADOCANEEKRVSEBCLSPFATGKAATPTKDC : 65
LTPchickpe : -----MMLT----FVQVGLGLIMITGGSEGAEDLAQKCGVVKVI ECLDFATGKALT PKKRECC : 54
LTPParabido : ----MKGLHLHLVLTMTIVASLAAAAPAPGGALADECNQDEQKVTLCCLDFATGKATTPSKKCC : 61
              k 6 L      6 66 lia i gsaga LAd C q fqKV CLdFATGKA TP K CC

      *           80           *           100           *           120           *
21, 143kDa : SAMSEIROSKPVCCLCYEIIQOETHNGSEOVKSLGIQEA KLLQLPSPDCKLANASLSDCPKLLNISASS : 130
LTPchickpe : DAANSIKETDDEECLCYEIIQOETHKGSPEKSLGIQEDKLLQLPTVCKVRNANLTDCKP LGLSESS : 119
LTPParabido : DAMEDIKERDPEKCLCFVIOQAKTGGALKDLGVOEDKLIQLPTSCQLHNASITNCPKLLGISSESS : 126
              dAv I42 dP CLC5 IQQth Gs KsLG6QEdKL6QLP3 Ck6 NAs631CPKLLG6SpSS

      140           *           160           *           180           *
21, 143kDa : PDYSIFTS-----NSTST--APASTSTGTS SSGAKDESNADMYAPSLAGTMAIAYAVFFSMLSQQ : 188
LTPchickpe : PDAAIFK-----NASKL--SEESTPSASADQSTPPTPSDSY---MVRPLMTEVIVMLLALLA : 173
LTPParabido : PDAAVFN-----NATFTPVAPAGKSPATPATSTDKGGSASAKDGHAVVALAVALMAVSVFVTLTP : 186
              PDaaGft Na3 t aPasts a3 d ad y v 6a6a iv 61 l

21, 143kDa : GLPFOAGEGFPPG---- : 201
LTPchickpe : VAVETCFISIYT----- : 185
LTPParabido : RHYTLGM----- : 193
              vp q

```

C

```

      *           20           *           40           *           60
23, 929kDa : MGLCKILSISFFLLTFLFETS SYAATFNIQNRCSYTVWAAV PGGGMRLGSGQSWSLDVKAGTTG : 66
OLP : MGLCKILSISFFLLTFLFETS SYAATFNIQNRCSYTVWAAV PGGGMQLGSGQSWSLVNVAGTGA : 66
TLP : MGLCKILSISFFLLTFLFETS SYAATFNIQNRCSYTVWAAV PGGGMQLGSGQSWSLVNVAGTGA : 66
              MGLCKILSISFFLLTFLFETS SYAATFNIQNhCSYTVWAAa6PGGGMqLGSGQSWSLVnAGTTGg

      *           80           *           100           *           120           *
23, 929kDa : RVWARTNCNFDASNGKCE TGDCCGGLQCKAFPT PNTLAEFALNQF SNLDFFDI SLVDGFNVEMA : 132
OLP : RVWARTNCNFDASNGKCE TGDCCGGLQCTAYGT PNTLAEFALNQF SNLDFFDI SLVDGFNVEMA : 132
TLP : RVWARTNCNFDASNGKCE TGDCCGGLQCTAYGT PNTLAEFALNQF SNLDFFDI SLVDGFNVEMA : 132
              RVWArTnCnFDASNGKCE TGDCCGGLQctA5GT PNTLAEFALNQF SNLDFFDI SLVDGFNVEMA

      140           *           160           *           180           *           2
23, 929kDa : FNPTSnGCTRGISCTANIVGQCPAALKTAGGCNNPCTVFKTDEYCCNSGSCNATDYSRPFKTRCPD : 198
OLP : FNPTSnGCTRGISCTADIVGECPAALKTAGGCNNPCTVFKTDEYCCNSGSCNATDYSRPFKTRCPD : 198
TLP : FNPTSnGCTRGISCTADIVGECPAALKTAGGCNNPCTVFKTDEYCCNSGSCNATDYSRPFKTRCPD : 198
              FNPTsnGCTRGISCTA1IVG2CPAALKTtagGCNNPCTVFKTDEYCCNSGSCnATdYSrPFKTRCPD

      00           *           220
23, 929kDa : AYSYPKDDQTSFTFCPAGTNYEVVIFCF : 225
OLP : AYSYPKDDQTSFTFCPAGTNYEVVIFCF : 225
TLP : AYSYPKDDQTSFTFCPAGTNYEVVIFCF : 225
              AYSYPKDDQTSFTFCPAGTNYEV6FCF

```

### Abbildung 19: Sequenzalignement der identifizierten Proteine unbekannter Funktion

(A) Protein unbekannter Funktion mit 11,656 kDa. In Folge einer BLAST-Suche Alignment mit dem Lipid Transfer Protein P5 sowie dem Lipid Transfer Protein P3 aus *Vitis vinifera*.

(B) Protein unbekannter Funktion mit 21,143 kDa. In Folge einer BLAST-Suche Alignment mit dem Lipid Transfer Protein aus der Kichererbse (*Cicer arietinum*) sowie einem Lipid Transfer Protein aus der Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana*).

(C) Protein unbekannter Funktion mit 23,929 kDa. In Folge einer BLAST-Suche Alignment mit dem Osmotin-ähnlichen Protein sowie einem Thaumatin-ähnlichen Protein aus *Vitis vinifera*.

### **Hefeproteine in Portugieser Rotwein**

Proteine, die von der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* in den Wein freigesetzt werden und in dem Portugieser Rotwein gefunden werden, sind das kovalent gebundene Zellwandprotein [Precursor] mit 23,3 kDa, das Zellwandprotein CWP1 [Precursor] mit 24,3 kDa, das Protein TOS1 [Precursor] mit 48 kDa, das extrazelluläre Matrixprotein 33 [Precursor] mit 48,3 kDa, die Glykosidase CRH1 [Precursor] sowie die Endochitinase [Precursor] mit 59 kDa. Diesen Proteinen gemein ist ihre Lokalisation in der Hefezellwand.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass im Rahmen dieser Arbeit erstmalig eine Identifizierung von Proteinen eines Rotweins durchgeführt wird. Der Portugieser Rotwein wird gewählt, da dieser ohne weitere Fällungsschritte unmittelbar nach Dialyse und Gefriertrocknung eingesetzt werden kann. Fünfzehn Proteine aus der Traube sind im Verlauf der Weinherstellung nicht entfernt worden und in dem fertig ausgebauten Wein mittels massenspektrometrischer Analyse nachweisbar. Weitere sechs Proteine werden bei der Weinherstellung aus der Hefe in den Wein freigesetzt.

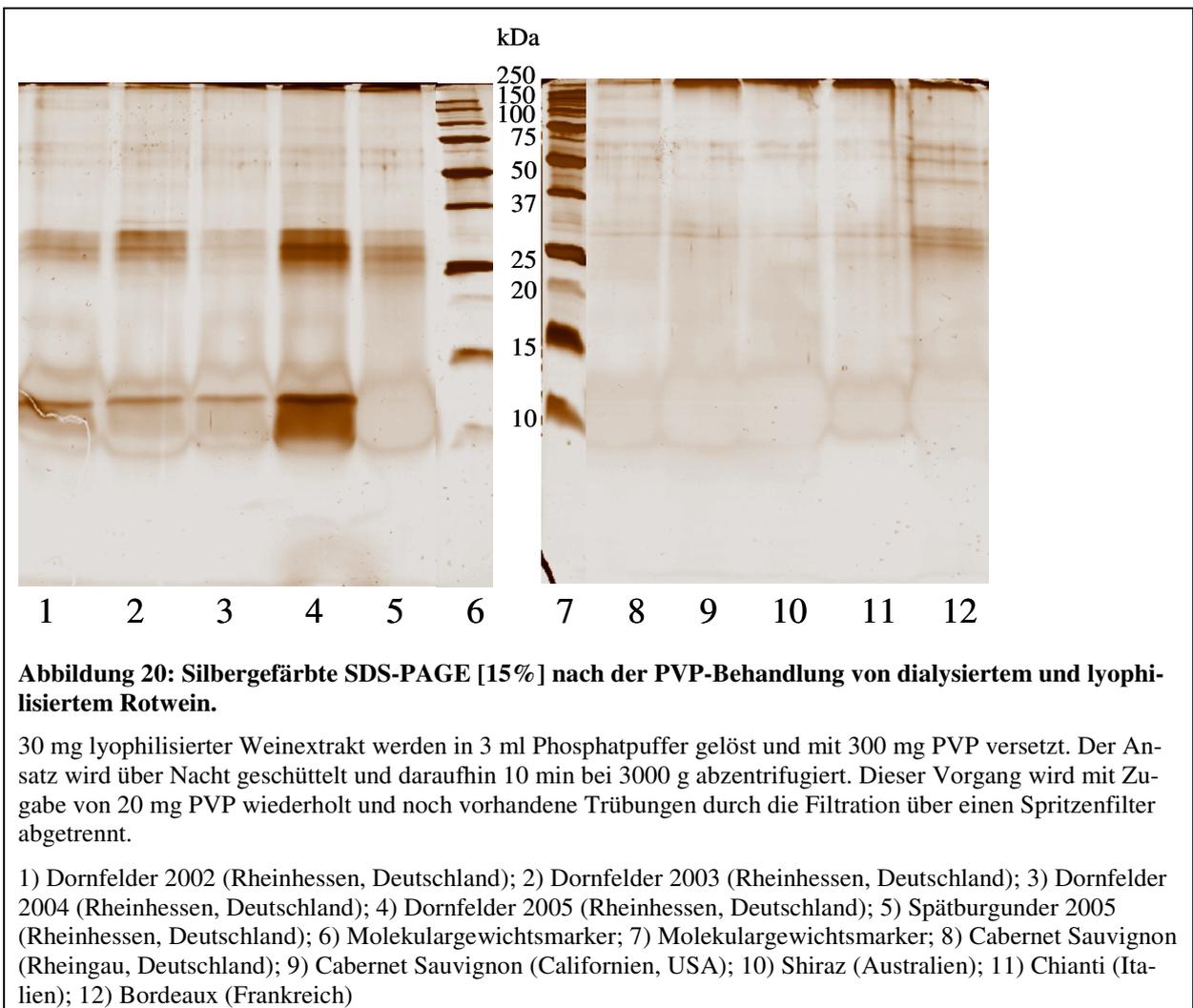
#### **3.4.2.2 Extraktion der Proteine aus dem Rotwein**

Vor allem bei den Rotweinsorten Dornfelder und Spätburgunder erweist sich der hohe Tanningehalt und die Komplexierung von Proteinen mit (Poly)Phenolen und Tanninen als problematisch. Auf einer SDS-PAGE sind keine klaren Banden zu erkennen und voneinander abzugrenzen. Im Folgenden werden Methoden zur Entfernung bzw. zur Reduktion der störenden Inhaltsstoffe wie der Polyphenole beschrieben.

#### **Behandlung mit Polyvinylpyrrolidon**

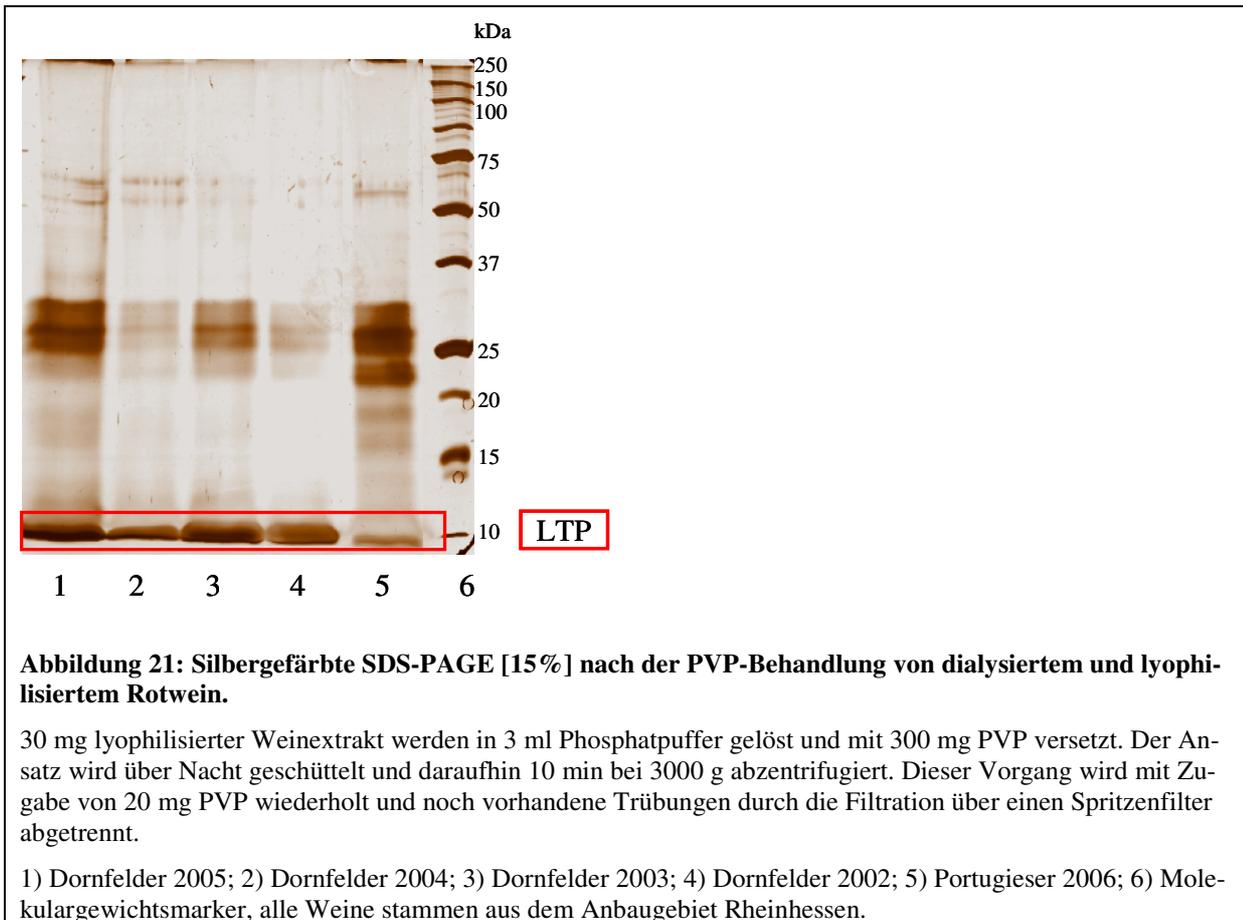
Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) sowie Polyvinylpyrrolidon (PVP) werden schon seit den 60er Jahren zur Entfernung der Polyphenole in Pflanzen eingesetzt, da sie als Stabilisierungsmittel unerwünschte Gerbstoffe und Polyphenole binden können [LOOMIS/BATAILLE 1966].

In der vorliegenden Arbeit wird eine Behandlung mit Polyclar® AT einerseits bei unbehandeltem Wein und andererseits bei Wein nach der Dialyse und Gefriertrocknung eingesetzt.



Eine Behandlung von dialysiertem und lyophilisiertem Wein mit Polyclar® AT zeigt, dass die Abtrennung störender Substanzen mittels PVP möglich ist und auf einer SDS-PAGE diskrete Banden zu erkennen sind. Dies wird für die deutschen Rotweinsorten Dornfelder, Spätburgunder und Portugieser aus Rheinhessen sowie Cabernet Sauvignon aus dem Rheingau gezeigt (Abbildungen 20 und 21). Um einen Einfluss des Jahrgangs zu betrachten, werden vom Dornfelder Rotwein die Jahrgänge 2002, 2003, 2004 sowie 2005 eingesetzt, die aus dem gleichen Anbaugebiet stammen und auf identische Weise hergestellt werden. Während Dornfelder sowie Spätburgunder von dem Mainzer Weingut Fleischer bezogen werden, wird der Cabernet Sauvignon von der Forschungsanstalt Geisenheim bereit gestellt. Der Spätburgunder zeichnet sich durch eine zwölfmonatige Lagerung im Holzfass aus. Um einen Vergleich der Proteinzusammensetzung zwischen deutschen und ausländischen Weinen zu erzielen, wird das Rotweinspektrum um Bordeaux aus Frankreich, Chianti aus Italien, Shiraz aus Australien sowie Cabernet Sauvignon aus den USA erweitert.

Bei Dornfelder Rotweinen der Jahrgänge 2002 bis 2005 ist die Proteinbande bei ca. 11 kDa stark ausgeprägt. Diese Bande ist in allen weiteren Weinen nicht vorhanden.



**Abbildung 21: Silbergefärbte SDS-PAGE [15%] nach der PVP-Behandlung von dialysiertem und lyophilisiertem Rotwein.**

30 mg lyophilisierter Weinextrakt werden in 3 ml Phosphatpuffer gelöst und mit 300 mg PVP versetzt. Der Ansatz wird über Nacht geschüttelt und daraufhin 10 min bei 3000 g abzentrifugiert. Dieser Vorgang wird mit Zugabe von 20 mg PVP wiederholt und noch vorhandene Trübungen durch die Filtration über einen Spritzenfilter abgetrennt.

1) Dornfelder 2005; 2) Dornfelder 2004; 3) Dornfelder 2003; 4) Dornfelder 2002; 5) Portugieser 2006; 6) Molekulargewichtsmarker, alle Weine stammen aus dem Anbaugebiet Rheinhessen.

Für den Portugieser des Jahrgangs 2005 sowie den Dornfelder der Jahrgänge 2002 bis 2005 kann das Vorhandensein des Lipid Transfer Proteins Isoform 4 mittels massenspektrometrischer Analyse nachgewiesen werden. Hierfür werden die Banden einer Coomassie-gefärbten SDS-PAGE wie bereits zuvor beschrieben ausgeschnitten, tryptisch verdaut und über LC/MS analysiert. Die entsprechende silbergefärbte SDS-PAGE ist in Abbildung 21 dargestellt, da die Banden mit der Coomassie-Färbung nur sehr schwach zu erkennen sind. In den Dornfelder Rotweinen der Jahrgänge 2002, 2003 und 2005 wird neben dem LTP das PR 4Typ Protein (AAC33732.1) mit einem Molekulargewicht von 15 kDa aus *Vitis vinifera* detektiert.

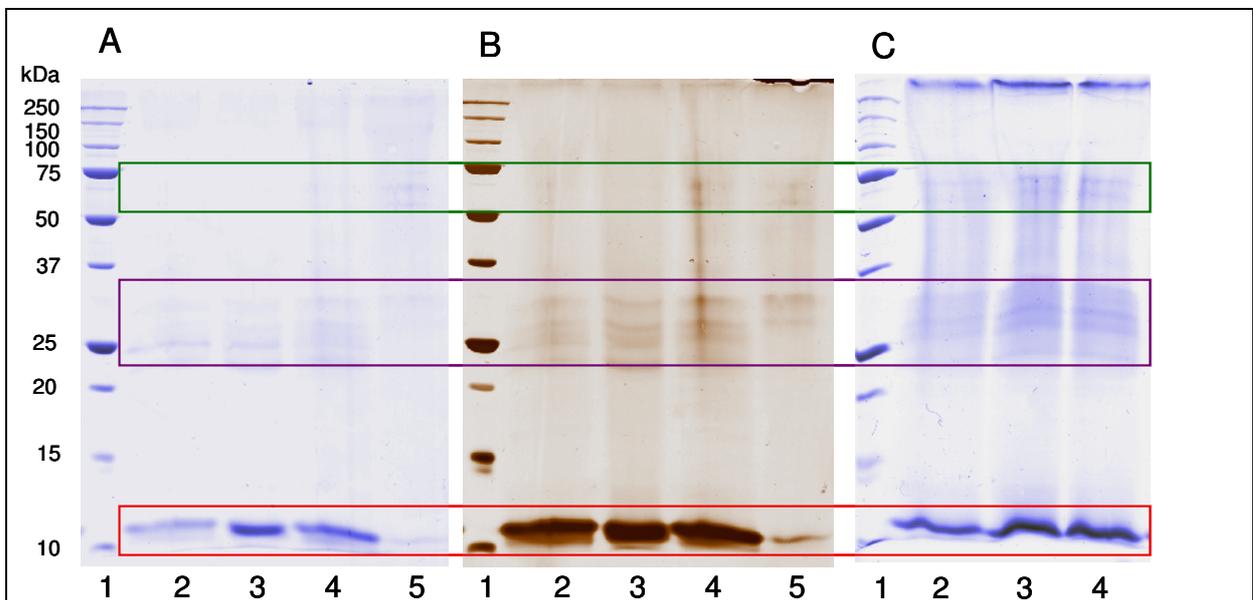
Nach der Überprüfung verschiedener Ansätze, d.h. unterschiedlicher Konzentrationen des lyophilisierten Weines und des PVPs, zeigen die in Abbildung 21 dargestellten Ansätze die besten Ergebnisse. Hier werden jeweils 30 mg lyophilisierter Wein in 3 ml Phosphatpuffer gelöst und mit 300 mg PVP versetzt. Nachdem dieser Ansatz über Nacht unter Schütteln inkubiert wird, erfolgt im Anschluss an eine zehnminütige Zentrifugation eine erneute Zugabe von 200 g PVP mit erneuter Inkubation und Zentrifugation. Durch die Behandlung mit PVP

können störende Substanzen im Wein abgetrennt und eine elektrophoretische Auftrennung erzielt werden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass einige der im Wein enthaltenen Proteine gleichzeitig mit entfernt werden, wobei das mittels SDS-PAGE ermittelte Proteinmuster von Portugieser Rotwein vor und nach der Behandlung mit PVP nicht darauf schließen lässt. Mit der beschriebenen Methode können nur geringe Mengen an Protein gewonnen werden, so dass eine Färbung der SDS-PAGE mit Coomassie nur zu schwach bzw. keinen angefärbten Banden führt.

### Ethanol-fällung der Weinproteine

Aufgrund der guten Löslichkeit der Polyphenole in Ethanol wird neben der Behandlung mit PVP eine Ethanol-fällung zur Entfernung der Polyphenole eingesetzt.

In Abbildung 22 A und B ist die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine im Anschluss an eine Ethanol-fällung des unbehandelten Dornfelder Rotweins 2005 aus Rheinhessen dargestellt. Als Proben werden einerseits ein Dornfelder eines Weingutes und andererseits ein im Einzelhandel erworbener Dornfelder eingesetzt. Da die Konzentration der Proteine nach der Ethanol-fällung in der Endprobe sehr gering ist, wird neben der Coomassie-Färbung (Abbildung 22 A) auch die Silberfärbung (Abbildung 22 B) eingesetzt.



**Abbildung 22: SDS-PAGE [12,5%] mit ethanolgefälltem Dornfelder des Jahrgangs 2005 aus Rheinhessen.**

(A) Dornfelder nach der Dialyse und Gefriertrocknung, 1) Molekulargewichtsmarker; 2) 1:2 Verdünnung, EZ; 3) 1:10 Verdünnung, EZ; 4) 1:4 Verdünnung, EZ; 5) 1:4 Verdünnung, WG; mit Coomassie angefärbt

(B) Identische Proben und Auftragung wie (A), mit Silber angefärbt

(C) Lyophilisierter Dornfelder 2005 (WG), 1) Molekulargewichtsmarker; 2) 1:10 Verdünnung; 3) 1:5 Verdünnung; 4) 1:4 Verdünnung

EZ = Einzelhandel; WG = Weingut

Es zeigt sich, dass sich das Lipid Transfer Protein bei ca. 11 kDa stark anreichert und die einzige deutlich gefärbte Bande darstellt (rote Umrandung). Im Bereich von 22 bis 30 kDa (22,8 kDa, 25,8 kDa, 27,7 kDa, 30,3 kDa) sind bis zu vier weitere schwache Banden, insbesondere bei der Silberfärbung, zu erkennen (violette Umrandung). Hierbei handelt es sich vermutlich um Thaumatin-ähnliche Proteine, sie wurden bisher jedoch keiner massenspektrometrischen Analyse unterzogen. Zwischen den einzelnen Verdünnungen des Weins mit Ethanol von 1:2 über 1:4 bis 1:10 gibt es kaum Unterschiede. Ein deutlicher Unterschied ist jedoch zwischen den zwei Dornfeldersorten (Abbildung 22 A und B, Spur 4 und 5) zu erkennen, wobei die Proteine des Dornfelder Rotweins aus dem Weingut in geringerer Konzentration in der ethanolgefällten Probe enthalten sind. Da der Probenansatz identisch ist, ist davon auszugehen, dass der Dornfelder Rotwein, der über das Weingut bezogen wurde, einen geringeren Proteingehalt aufweist als der im Einzelhandel erworbene Wein. Das Lipid Transfer Protein ist nach der Ethanol-fällung in wesentlich geringeren Mengen enthalten und die Banden bei 20 bis 30 kDa sind nur sehr schwach ausgeprägt. Zusätzlich sind hingegen zwei weitere schwache Banden bei 60 bis 70 kDa zu finden (Abbildung 22 A, Spur 5, grüne Umrandung).

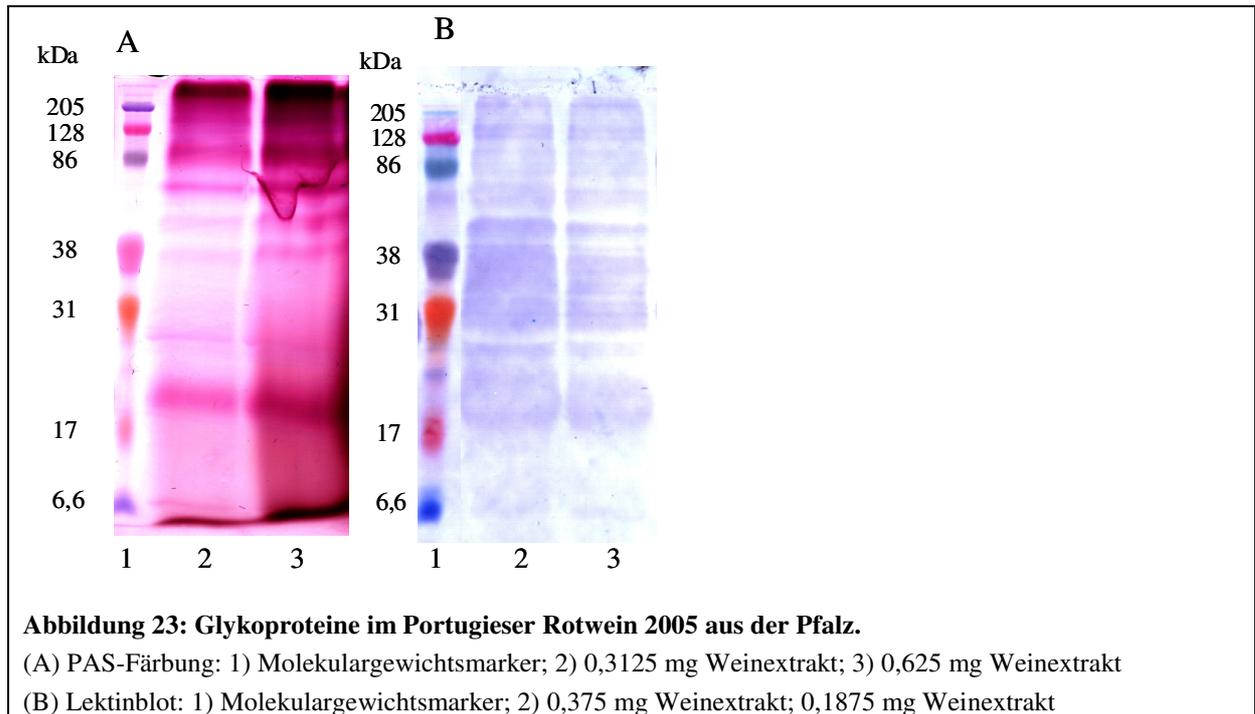
Bei Verwendung von aufkonzentrierten (d.h. dialysierten und lyophilisierten) Proben führt eine Ethanol-fällung zu deutlich erkennbaren Banden bei 11 kDa, 22 kDa, 25 kDa, 27 kDa sowie 30 kDa, wobei im Bereich von 30 bis 60 kDa ein Schmier vorhanden ist (Abbildung 22 C). Bei 60 kDa und 70 kDa treten zwei weitere schwach ausgeprägte Banden auf. Die Proteinbanden in der SDS-PAGE sind bei Verwendung des aufkonzentrierten Dornfelder Rotweins alle intensiver ausgeprägt als bei der Durchführung mit dem unbehandelten Wein.

Vermutlich werden neben den störenden Substanzen auch Proteine durch die Ethanol-fällung extrahiert. Da eine Proteinbestimmung jedoch nicht möglich ist (siehe Abschnitt 3.2), kann dies nicht mit abschließender Sicherheit beurteilt werden.

### 3.4.2.3 Glykoproteine in Rotwein

Da Aussagen zum Vorkommen von Glykoproteinen in Wein und insbesondere in Rotwein zum heutigen Zeitpunkt in der Literatur sehr uneinheitlich, jedoch von großer Bedeutung hinsichtlich Weinstabilität und Allergenität sind, wird das Vorhandensein von Glykoproteinen im Rotwein durch zwei Untersuchungsansätze überprüft. Einerseits findet die Perjodsäure-Färbung nach vorangegangener SDS-PAGE Anwendung, andererseits ein Lektinbindungs-Assay, der auf dem Anfärben von Kohlenhydraten auf einer Nitrocellulosemembran basiert. Wie in Abbildung 23 dargestellt, ist deutlich zu erkennen, dass sich sowohl mit der PAS-

Färbung als auch mit dem Lektinblot eine Vielzahl an Proteinen des Portugieser Rotweins anfärbt und somit den Glykoproteinen zugeordnet werden kann.



Von diesen befindet sich ein großer Anteil im höhermolekularen Bereich. Eine breite, nicht weiter aufgetrennte Bande befindet sich im Bereich größer 130 kDa. Diskrete Banden sind bei 20 kDa, 30 kDa, 38 kDa, 40 kDa, 70 kDa und 87 kDa zu erkennen. Die Darstellung durch den Lektinblot zeigt ein etwas anderes Bild. Im Vergleich zur PAS-Färbung finden sich ebenfalls Banden bei 20 kDa, 30 kDa, 38 kDa, 40 kDa, 70 kDa sowie 87 kDa. Zwei weitere Banden sind bei 130 kDa und 132 kDa zu erkennen sowie im Bereich größer 205 kDa. Es sind zusätzlich zur PAS-Färbung viele weitere Banden im Bereich zwischen 30 und 40 kDa zu finden. Der Anteil der Glykoproteine im hochmolekularen Bereich scheint im Vergleich zur PAS-Färbung nicht so stark ausgeprägt zu sein, was jedoch daran liegen kann, dass der Transfer der Proteine von dem Gel auf die Nitrozellulosemembran über einen Zeitraum von zwei Stunden durchgeführt wird und hierdurch nicht der gesamte Anteil an hochmolekularen Proteinen geblottet wird. Bei einer längeren Dauer des elektrophoretischen Transfers würden die kleinen Proteine durchgeblottet, so dass zwei Stunden als beste Zeitdauer angesehen wird.

Von den identifizierten Hefeproteinen des Portugieser Rotweins sind das kovalent gebundene Zellwandprotein [Vorläuferprotein] mit 23,3 kDa, das Zellwandprotein CWP1 [Vorläuferprotein] mit 24,3 kDa sowie die Endochitinase [Vorläuferprotein] mit 59 kDa stark *O*-glykosyliert. Das Protein TOS1 [Vorläuferprotein] mit 48 kDa sowie die Glykosidase CRH1 [Vorläuferprotein] besitzen potentielle Glykosylierungs-Bindungsstellen.

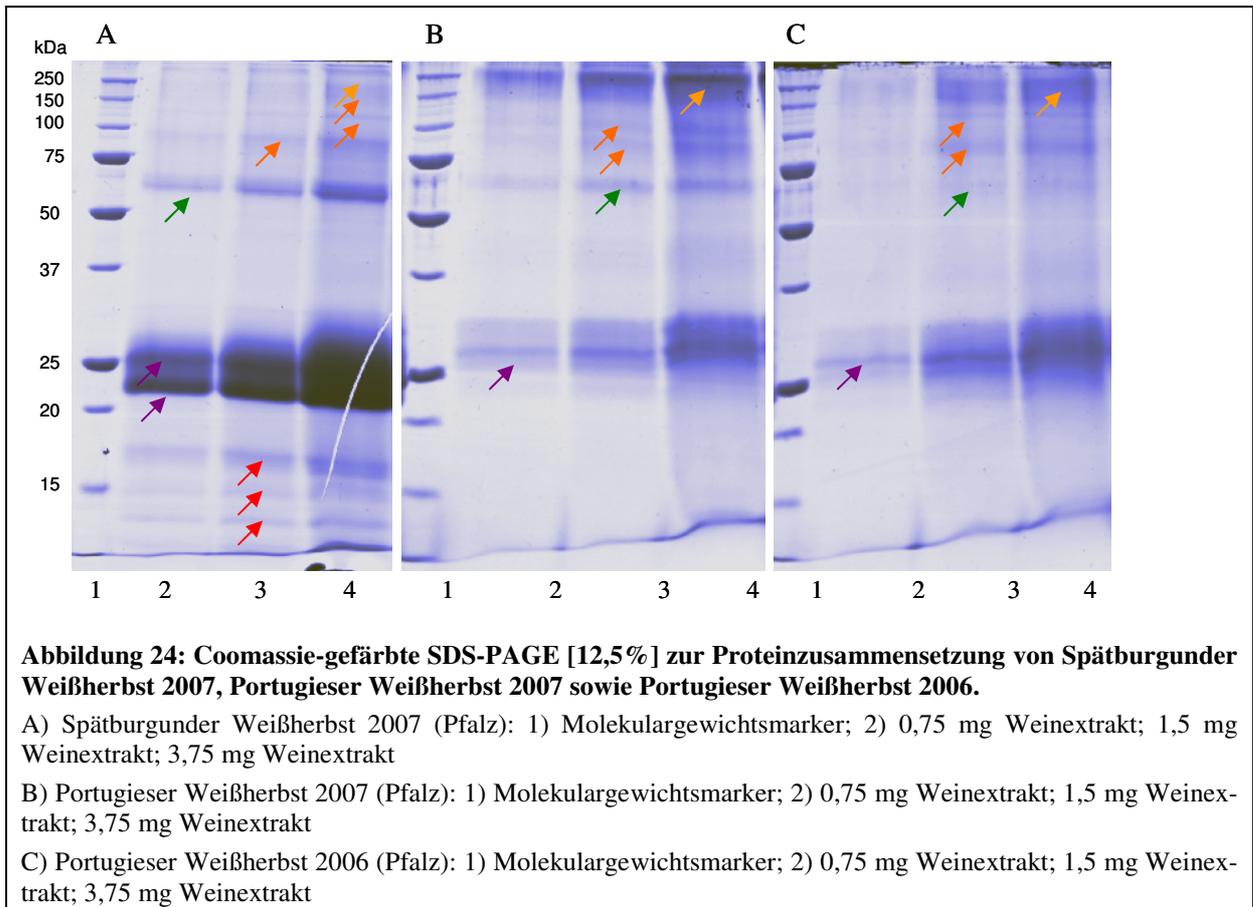
### 3.4.3 Weißherbst

Zur Proteinzusammensetzung von Weißherbst gibt es nach meinem Kenntnisstand bisher keine Veröffentlichungen. Weißherbst ist geeignet, sowohl den Einfluss der Rebsorte als auch den der Weinbereitungsmaßnahmen zu verdeutlichen, da er aus roten Trauben gewonnen und wie Weißwein durch eine Mostgärung hergestellt wird.

Als Weinsorten werden ein Portugieser Weißherbst des Jahrgangs 2006, ein Portugieser Weißherbst des Jahrgangs 2007 und ein Spätburgunder Weißherbst des Jahrgangs 2007, alle aus dem Weinanbaugebiet Pfalz, eingesetzt.

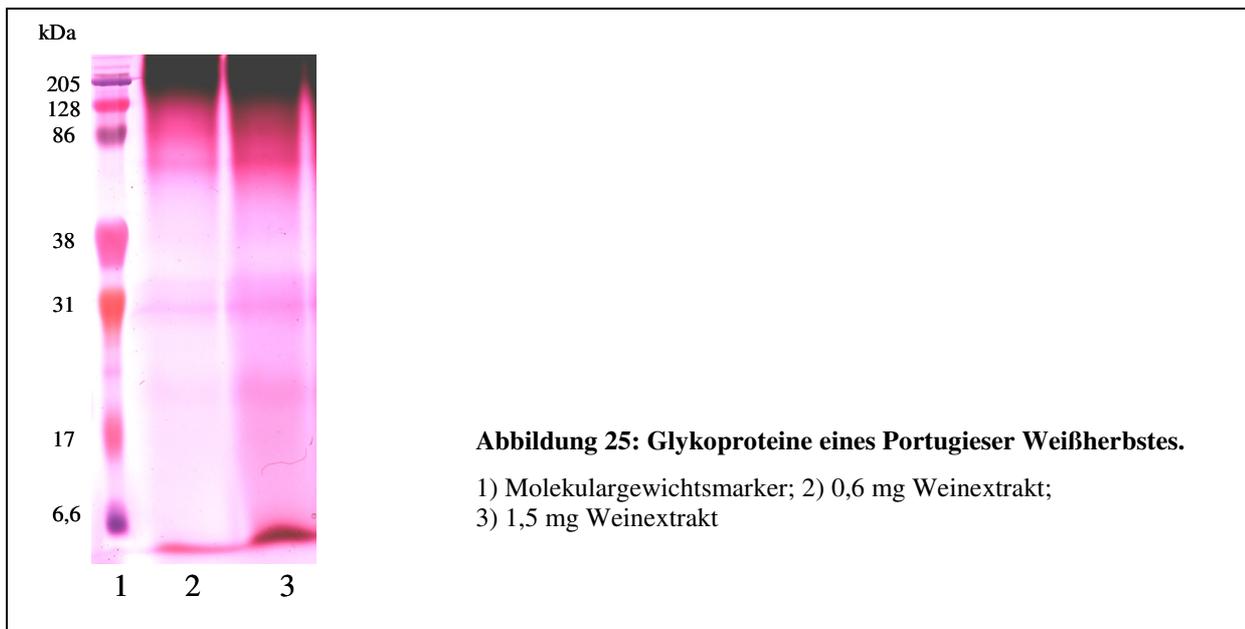
Ein Vergleich der Proteinzusammensetzung zwischen einem Spätburgunder Weißherbst des Jahrgangs 2007, einem Portugieser Weißherbst des Jahrgangs 2007 sowie einem Portugieser Weißherbst des Jahrgangs 2006 ist in Abbildung 24 dargestellt. Auch bei Weißherbst befindet sich der Hauptanteil der Proteine im Bereich von 20 bis 30 kDa. Während dieser Bereich beim Spätburgunder Weißherbst durch zwei Hauptbanden gekennzeichnet ist, ist beim Portugieser Weißherbst nur eine Proteinbande klar sichtbar (violette Pfeile). Im Molekulargewichtsbereich von 12 bis 17 kDa sind beim Spätburgunder Weißherbst drei weitere Banden zu erkennen, diese sind beim Portugieser Weißherbst nicht deutlich vorhanden (rote Pfeile). Die Proteinbande bei 70 kDa ist in beiden Weinsorten vorhanden (grüner Pfeil), ebenso wie weitere Banden im Bereich  $> 80$  kDa (orange Pfeile), wobei die mit der 12,5% igen SDS-PAGE nicht weiter aufgetrennte Bande bei 250 kDa beim Portugieser Weißherbst intensiver ausgeprägt ist (gelber Pfeil).

Der Vergleich zweier Jahrgänge des Portugieser Weißherbstes zeigt eine weitgehend identische Proteinzusammensetzung, lediglich die Intensität der Proteinbanden im Bereich  $>70$  kDa unterscheidet sich geringfügig.



### 3.4.3.1 Glykoproteine im Weißherbst

Der Großteil der Proteine des untersuchten Portugieser Weißherbstes des Jahrganges 2006 aus der Pfalz ist den Glykoproteinen zuzuordnen. Abbildung 25 veranschaulicht, dass die Hauptbanden der mit Coomassie angefärbten SDS-PAGE (Abbildung 25) auch durch die Perjodsäurefärbung detektierbar sind. Im Bereich bei 30 kDa ist eine Bande zu erkennen, wobei sich der Großteil der Glykoproteine im Bereich  $> 70$  kDa befindet.



### 3.4.4 Vergleich der Proteinzusammensetzung zwischen Weißwein, Weißherbst und Rotwein

Abschließend zur gelelektrophoretischen Betrachtung der Weinproteine wird ein Vergleich zwischen einem Weißwein (Riesling 2006, Rheinhessen), einem Weißherbst (Portugieser 2006, Rheinhessen) und einem Rotwein (Portugieser 2005, Pfalz) unternommen.

Hinsichtlich der Zusammensetzung und Konzentration der Proteine bei diesen Weinen lassen sich sowohl Gemeinsamkeiten als auch deutliche Unterschiede in der Konzentration und Zusammensetzung der Proteine erkennen (Abbildung 26).

Bei allen Rebsorten bilden die PR-Proteine die Hauptproteine im Wein. Die Zusammensetzung und Konzentration dieser Proteine variiert jedoch. So zeigt sich, dass das Lipid Transfer Protein bei ca. 11 kDa im Rotwein in wesentlich höherer Konzentration enthalten ist als im Weißherbst und im Weißwein (rote Umrandung in Abbildung 26). Dies lässt sich durch die Unterschiede der Weinherstellung von Rot- und Weißwein erklären: das LTP ist in den Schalen der Weinbeeren zu finden und kann somit bei der Herstellung von roten Weinen in das fertige Produkt übergehen (Maischegärung und Maischeerhitzung), während bei der Weißwein- und Roséherstellung die Schale schon vor der Gärung abgetrennt und der Most vergoren wird. Somit gelangen die Proteine aus der Schale der Weinbeere nur bei Rotweinen in nennenswerten Mengen in den Wein.

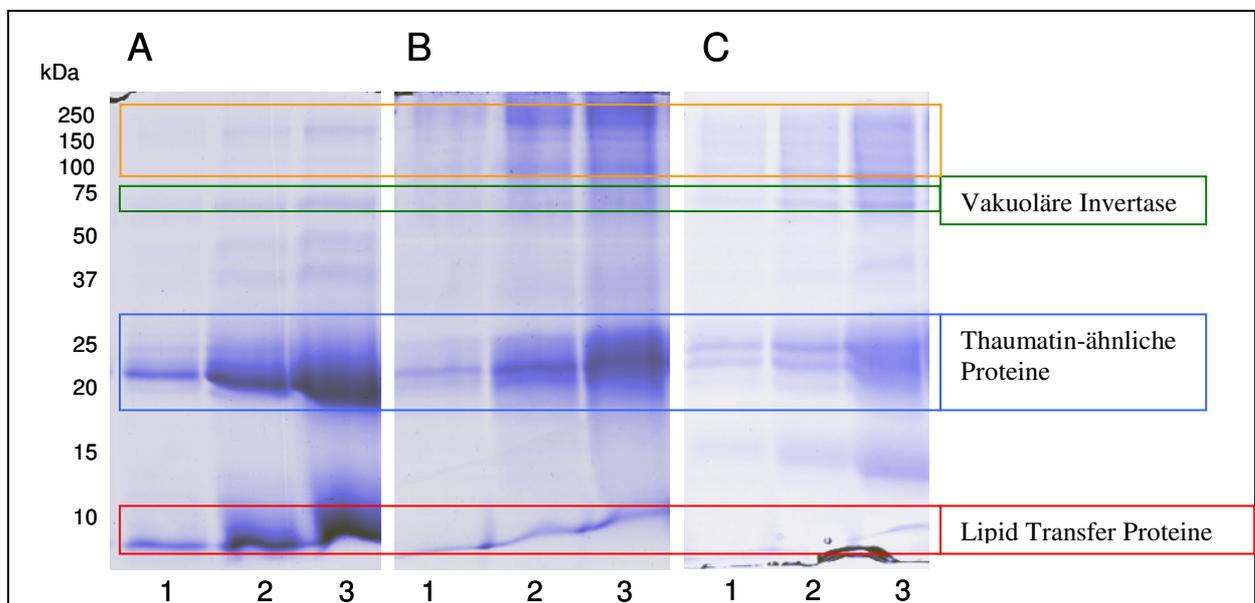
Die Gruppe der Thaumatin-ähnlichen Proteine im Molekulargewichtsbereich von 20 bis 25 kDa ist bei dem Portugieser Rotwein durch eine intensive Bande sowie weitere schwach ausgeprägte Banden gekennzeichnet, während im Portugieser Weißherbst eine stärkere und eine

schwächere Bande und im Riesling zwei klare Banden gleicher Intensität sowie eine schwache Bande zu erkennen sind (blaue Umrandung in Abbildung 26). Identifiziert werden können sowohl im Rot-/ als auch im Weißwein das VVTL1 mit 23,953 und ein putatives Thaumtin-ähnliches Protein mit 24,035 kDa.

Eine Endochitinase mit einem Molekulargewicht von 27,224 kDa kann bei den Untersuchungen dieser Arbeit bislang nur im Rotwein identifiziert werden.

Den untersuchten Weinsorten gemein ist eine Bande bei ca. 70 kDa, die im Rot- sowie Weißwein als vakuoläre Invertase 1 (GIN1) identifiziert werden kann (grüne Umrandung in Abbildung 26).

Proteine im Molekulargewichtsbereich größer 100 kDa sind vor allem im Weißherbst, in geringerer Menge im Weißwein und in noch geringerer Menge im Rotwein enthalten (gelbe Umrandung in Abbildung 26).



**Abbildung 26: Vergleich der Proteinzusammensetzung zwischen einem Portugieser Rotwein, einem Portugieser Weißherbst und einem Riesling Weißwein.**

(A) Portugieser Rotwein 2005 (Pfalz): 1) 0,39 mg Weinextrakt; 2) 0,78 mg Weinextrakt; 3) 1,56 mg Weinextrakt

(B) Portugieser Weißherbst 2006 (Pfalz): 0,75 mg Weinextrakt; 1,5 mg Weinextrakt; 3,75 mg Weinextrakt

(C) Riesling 2006 (Rhein Hessen): 1) 0,83 mg Weinextrakt; 2) 1,67 mg Weinextrakt; 3) 4,17 mg Weinextrakt

Den Hauptanteil der Proteine stellen die PR-Proteine dar. Von diesen sind die Thaumatin-ähnlichen Proteine mit der blauen und die Lipid Transfer Proteine mit der roten Umrandung gekennzeichnet. Die Vakuoläre Invertase, die ebenfalls in allen Weinsorten gefunden wird, ist grün umrandet. Der Anteil der höhermolekularen Proteine unterscheidet sich zwischen den Weinsorten, dies ist mit der gelben Umrandung gekennzeichnet.

Wie in den vorhergehenden Kapiteln gezeigt werden kann, stellen bei allen untersuchten Weinsorten glykosylierte Proteine einen großen Anteil des Proteinspektrums dar.

### **3.5 Herkunft der Proteine im Wein**

Bei den folgenden Versuchen wird ein Vergleich der Proteinzusammensetzung zwischen der Weinbeere und des daraus gewonnenen Mostes sowie Weines angestrebt, um die Entwicklung der Proteinzusammensetzung im Laufe der Verarbeitungsschritte zu veranschaulichen. Eingesetzt werden hierfür die weiße Rebsorte Riesling und die rote Rebsorte Cabernet Sauvignon aus dem Rheingau. Von der Forschungsanstalt Geisenheim werden freundlicherweise die Trauben, der Most und der Wein der gleichen Anbaufläche zur Verfügung gestellt.

Bei der Bestimmung des Proteingehalts wird bei einem Riesling 2005 aus dem Rheingau eine Reduktion des Proteingehalts von der Weinbeere zum Most auf ca. ein Fünftel beobachtet. Bei den Verarbeitungsschritten vom Most zum Wein zeigt sich weiterhin eine dreifache Reduktion (siehe Abschnitt 3.2). Mit Hilfe der SDS-PAGE wird im Folgenden gezeigt, Proteine welchen Molekulargewichts im Laufe der Weinbereitung abgetrennt oder in ihrem Gehalt reduziert werden.

Um einen Vergleich der Proteinzusammensetzung von Weinbeeren, Most und Wein zu erhalten, wird in den folgenden Abschnitten zunächst auf die der Weinbeeren (Abschnitt 3.5.2) und des Mostes (Abschnitt 3.5.3) eingegangen.

Vor der Durchführung der elektrophoretischen Versuche werden die Proteine aus der Weinbeere – wie in Abschnitt 2.8 beschrieben – extrahiert. Die Ergebnisse der Traubenextraktion werden im folgenden Kapitel dargelegt, bevor darauffolgend die Ergebnisse der elektrophoretischen Auftrennung beschrieben werden.

#### **3.5.1 Traubenextraktion**

Bei der Auftrennung der Weinbeeren der Rebsorten Riesling und Cabernet Sauvignon des Jahrgangs 2006 aus dem Rheingau (Forschungsanstalt Geisenheim) in die einzelnen Beerbestandteile Fruchtfleisch, Schale und Kerne ergibt sich die in Tabelle 21 gelistete Verteilung.

**Tabelle 21: Prozentuale Aufteilung der Beerenbestandteile**

Beerenbestandteil	Anteil [w/w%]		
	Eigene Untersuchungen		Referenzwerte Weinbeere [JAKOB 1997]
	Riesling	Cabernet Sauvignon	
Fruchtfleisch	80,2	65,4	70 – 80
Schale/Beerenhaut	13,2	25,2	15 – 25
Kerne	6,6	9,3	2 - 6

Die Weinbeeren des Rieslings, von welchen 130 g eingesetzt werden, setzen sich aus 80,2 % Fruchtfleisch, 13,2 % Schale sowie 6,6 % Kernen zusammen, während bei den Weinbeeren des Cabernet Sauvignons, von welchen 31 g eingesetzt werden, ein Anteil von 65,4 % auf das Fruchtfleisch entfällt, die Schale zu 25,2 % und die Kerne zu 9,3 % zum Gesamtgewicht der Weinbeere beitragen.

Die ermittelten Werte stimmen ungefähr mit den in der Literatur aufgeführten Werten überein. Die Referenzwerte stellen Durchschnittswerte dar und beziehen sich nicht auf eine Rebsorte. Es lässt sich beobachten, dass bei den Weinbeeren der Rebsorte Riesling der Anteil der Schale vergleichsweise gering und der des Fruchtfleisches sowie der Kerne vergleichsweise hoch liegt. Die Weinbeeren der Rebsorte Cabernet Sauvignon hingegen zeichnen sich durch einen vergleichsweise hohen Anteil an Schale und Kernen und einen geringen Anteil Fruchtfleisch aus.

### 3.5.2 Proteinzusammensetzung der Weinbeere

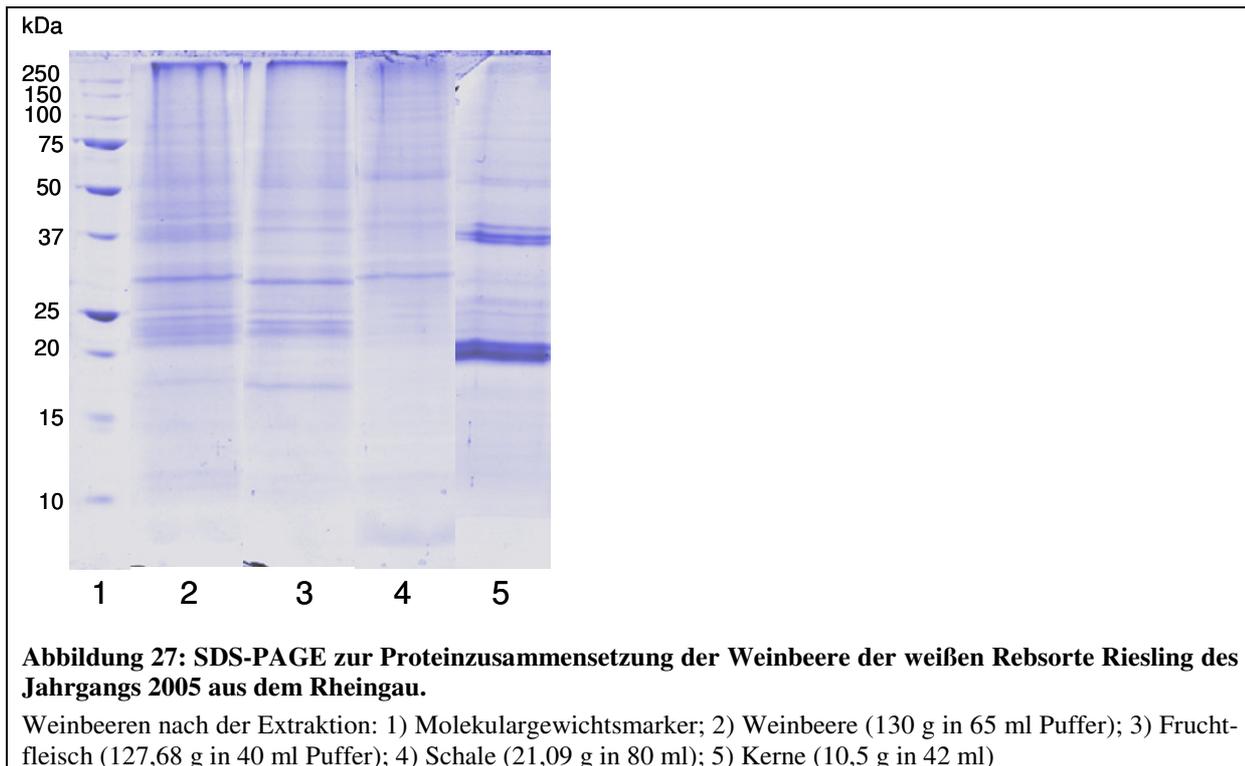
Bei der Betrachtung der Proteinzusammensetzung der Weinbeeren wird besonderes Augenmerk auf die Proteinzusammensetzung der einzelnen Beerenbestandteile Fruchtfleisch, Schale und Kerne gelegt, die wie in Abschnitt 2.8 beschrieben, gewonnen werden.

#### **Weinbeeren der Rebsorte Riesling (Rheingau)**

Die Weinbeere enthält ein breites Spektrum an Proteinen. Der Molekulargewichtsbereich erstreckt sich von ca. 12 kDa bis über 100 kDa.

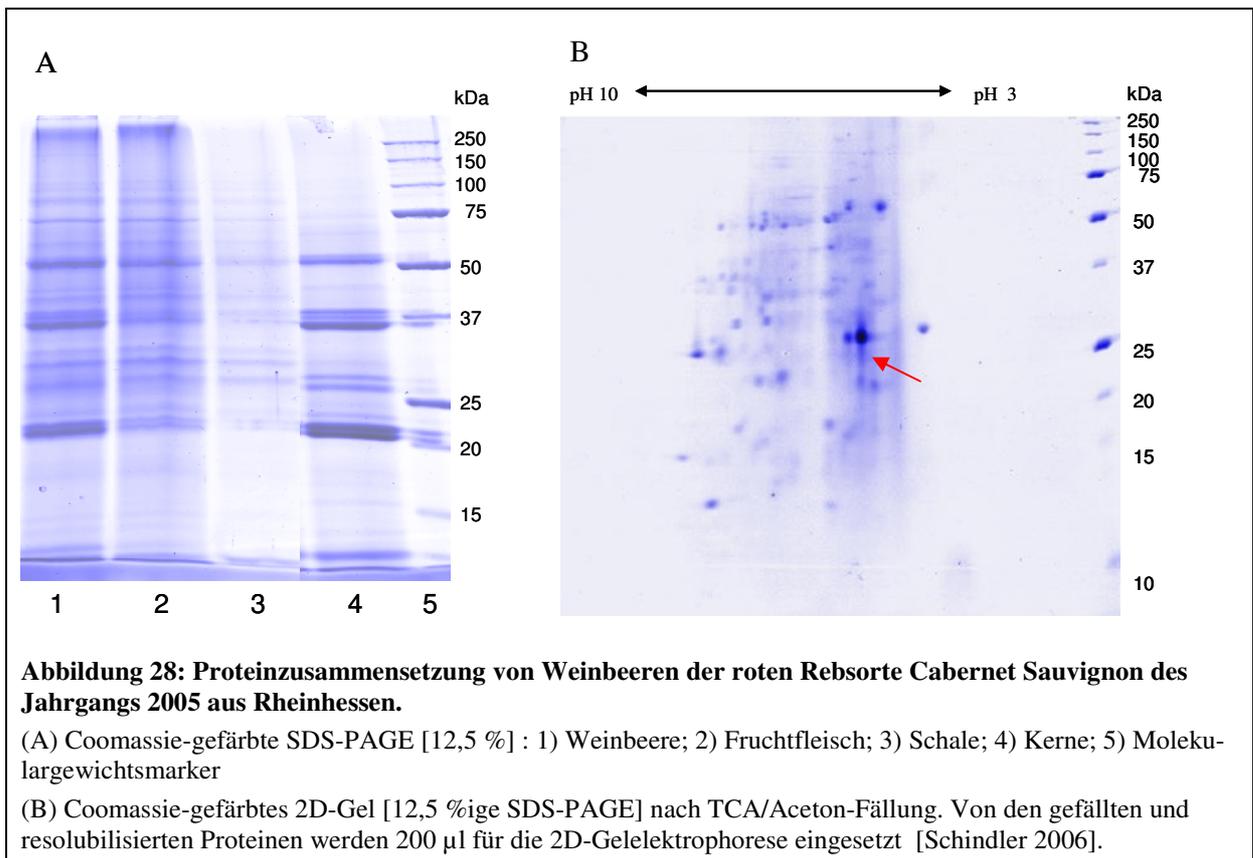
Anhand der elektrophoretischen Auftrennung sind Gemeinsamkeiten wie Unterschiede in der Proteinzusammensetzung zwischen den einzelnen Beerenbestandteilen zu beobachten. Bei ca. 12 kDa ist ausschließlich in der Schale eine ausgeprägte Bande zu erkennen, während diese im Fruchtfleisch wesentlich geringer konzentriert und in den Kernen kaum sichtbar ist. Hier-

bei handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um ein LTP, von dem bekannt ist, dass es in der Schale in wesentlich höheren Konzentrationen enthalten ist als in den Frucht-/ und Beerenbestandteilen [FERNÁNDEZ-RIVAS/CUEVAS 1999, BALLMER-WEBER 2002, PASTORELLO/ROBINO 2004]. Der Hauptanteil der Proteine liegt im Molekulargewichtsbereich von 20 bis 60 kDa (Abbildung 27). Bei den Proteinen im Molekulargewichtsbereich von 20 bis 30 kDa handelt es sich vermutlich um Thaumatin-ähnliche Proteine und Chitinasen, da diese Proteine bekanntermaßen den Hauptanteil der Proteine in der Weinbeere ausmachen [WATERS ET AL 1996, TATTERSALL ET AL 1997, FERREIRA ET AL 2002].



### Weinbeeren der Sorte Cabernet Sauvignon (Rheingau)

Ebenso wie beim Riesling zeichnet sich die Weinbeere der roten Rebsorte Cabernet Sauvignon durch ein breites Spektrum an Proteinen aus, das sich über den gesamten Molekulargewichtsbereich, der mit der 12,5%igen SDS-PAGE detektierbar ist, von 10 bis 250 kDa erstreckt (Abbildung 28A). Die Mehrzahl der Proteine hat ein Molekulargewicht im Bereich von 20 bis 60 kDa, wie dies auch bei den Weinbeeren der weißen Rebsorte Riesling beobachtet wird. Die Konzentration einzelner Proteine unterscheidet sich in den einzelnen Beerenbestandteilen, wobei insbesondere die Kerne eine abweichende Verteilung zeigen.



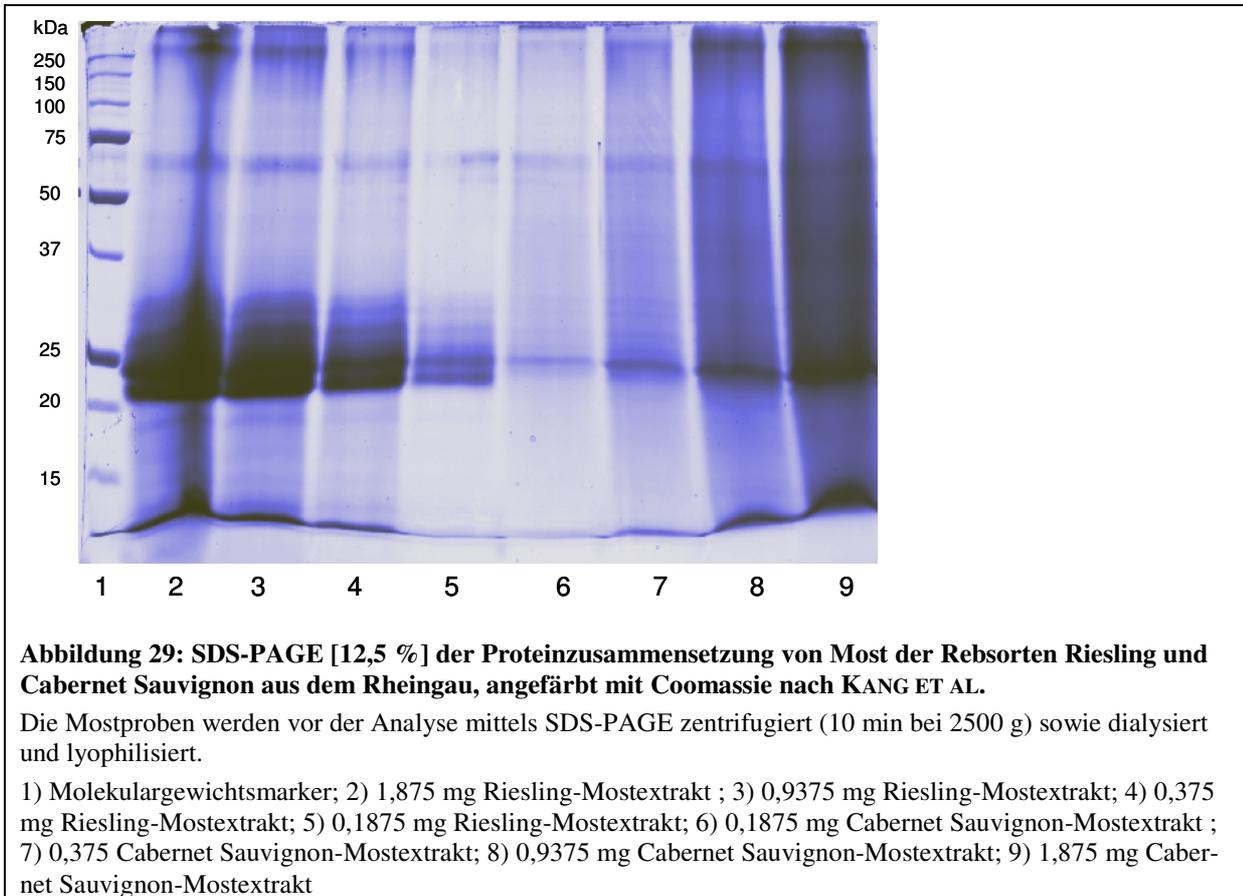
Die Auftrennung der Traubenproteine mittels einer zweidimensionalen Gelelektrophorese bestätigt die Beobachtungen der eindimensionalen Gelelektrophorese, dass sich die Proteine in einem breiten Molekulargewichtsbereich bewegen, wobei sich der Hauptanteil auf 20 bis 60 kDa konzentriert (Abbildung 28B). Des Weiteren wird gezeigt, dass sich der Bereich der isoelektrischen Punkte der Traubenproteine von 3,5 bis 8 erstreckt. Durchgeführt werden die Versuche der zweidimensionalen Gelelektrophorese von MAGNUS SCHINDLER (2006).

Bei dem am intensivsten ausgeprägten Spot, der in Abbildung 28 mit dem roten Pfeil gekennzeichnet ist, handelt es sich vermutlich um das Thaumatin-ähnliche Protein VVTL1. Mit der zweidimensionalen Gelelektrophorese wird ein Molekulargewicht von 25 kDa und ein isoelektrischer Punkt von 4,9 ermittelt, was mit den tatsächlichen Werten dieses Proteins von 24 kDa und 4,9 sehr gut übereinstimmt.

### 3.5.3 Proteinzusammensetzung von Most

Die Proteinzusammensetzungen des Mostes der Rebsorten Riesling sowie Cabernet Sauvignon aus dem Rheingau werden mittels SDS-PAGE analysiert und sind in Abbildung 29 dargestellt. Es zeigt sich, dass Proteinbanden bei ca. 10 kDa, im Bereich von 20 bis 30 kDa, bei 70 kDa sowie bei 250 kDa zu erkennen sind. Bei Rieslingsmost ist, im Vergleich zu dem

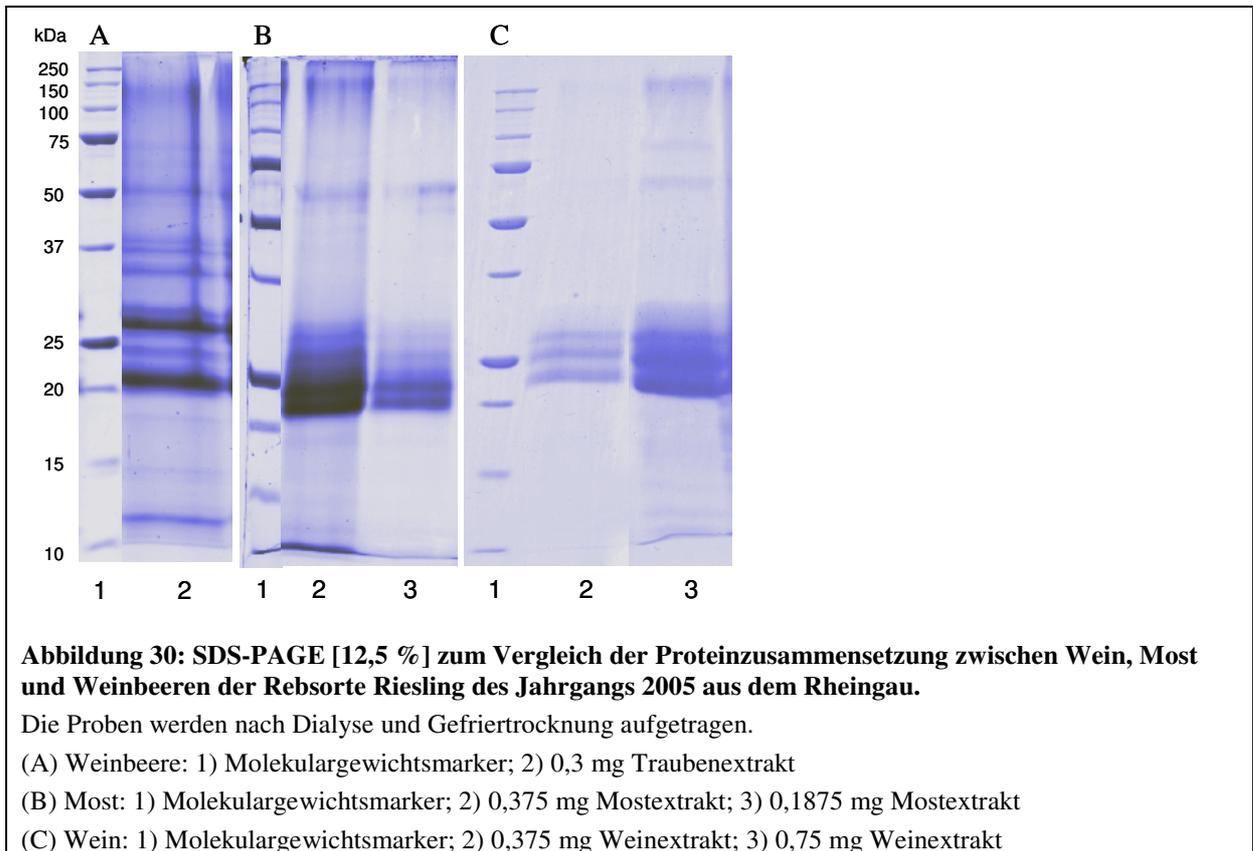
Most von Cabernet Sauvignon, die Intensität der Proteine im Bereich von 20 – 30 kDa sehr hoch.



### 3.5.4 Vergleich der Proteinzusammensetzung Wein, Most und Weinbeere

Die Analyse mittels SDS-PAGE bestätigt die Ergebnisse der Proteinkonzentrationsbestimmung. Während die Weinbeeren Proteine über das gesamte Molekulargewichtsspektrum der SDS-PAGE verteilt enthalten, nimmt die Proteinvielfalt bereits bei der Herstellung bis zur Stufe des Mostes deutlich ab. Die Proteinzusammensetzung des Mostes, wie sie mit der SDS-PAGE sichtbar ist, unterscheidet sich nur noch geringfügig von der des Weines (Abbildung 30), wobei der Proteingehalt weiter abnimmt.

Die Abnahme des Proteingehaltes ist durch die Schönungsmaßnahmen während der Weinbereitung zu erklären. Bei der Herstellung des untersuchten Weines wird ausschließlich Bentonit zur Schönung eingesetzt.



### 3.6 Aufreinigung und Isolierung der Weinproteine

Mit Hilfe chromatographischer Trennmethode wird eine Aufreinigung einzelner Proteine angestrebt, welche für anschließende Versuche, sowohl zur weiteren Charakterisierung der Proteine als auch für die Überprüfung des allergenen Potentials dieser Proteine, von Bedeutung sind.

Die Aufreinigung erfolgt in einem zweistufigen Verfahren. Die Proteine des Weißweins werden im ersten Aufreinigungsschritt über einen Anionenaustausch separiert, gefolgt von einer Größenausschlusschromatographie (SEC) im zweiten Schritt.

Beim Rotwein wird durch eine Behandlung mit PVP eine Entfernung von störenden Substanzen erreicht, bevor die Probe über eine Größenausschlusschromatographie aufgereinigt wird.

#### 3.6.1 Aufreinigung der Proteine aus Weißwein

Die Anionenaustauschchromatographie wird mit einem Riesling 2007 aus der Pfalz, welcher im Einzelhandel erworben wird, durchgeführt. Für einen Lauf werden 50 mg lyophilisierter Weinextrakt eingesetzt. Das Elutionsprofil ist in Abbildung 31A dargestellt und wird im Folgenden beschrieben. Die Elution erfolgt mittels eines linearen Gradienten von 0 bis 60 % mit

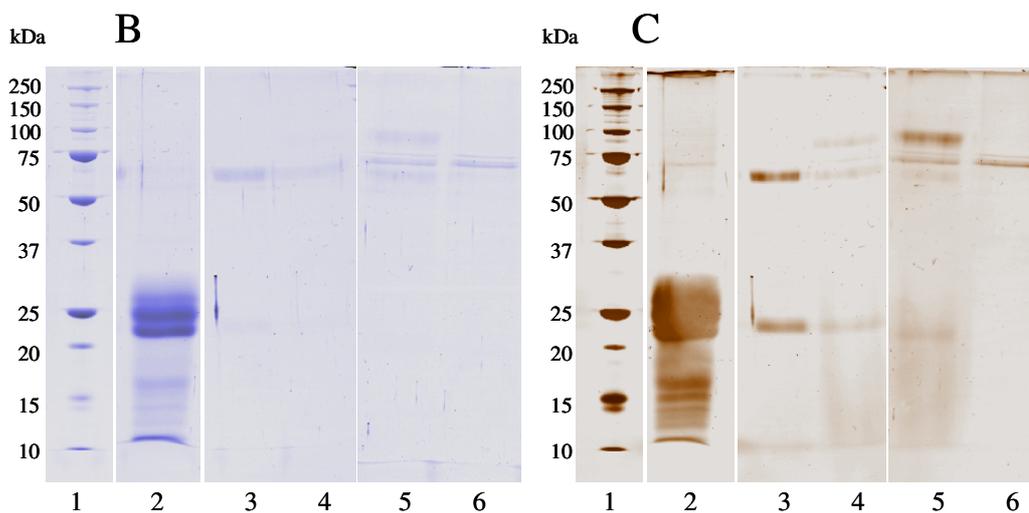
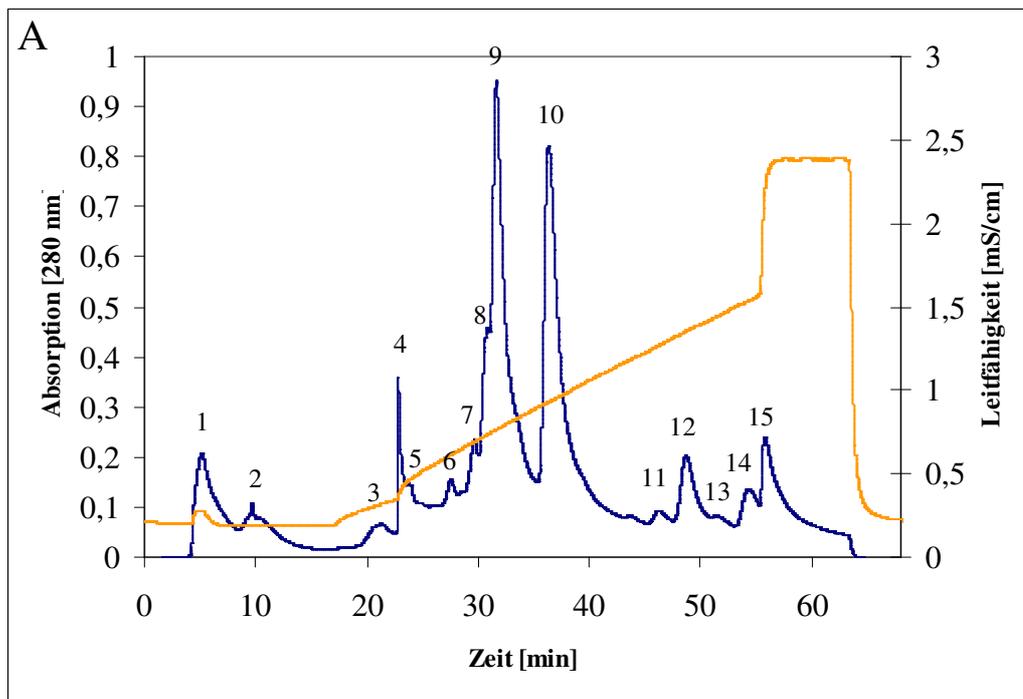
Hochsalzpuffer bei einem pH-Wert von 7,7 (Abbildung 31A). Bei einer Flussrate von 3 ml/min sind bei einer Retentionszeit von 4 min bis 63 min Peaks zu erkennen. Da einige der im Wein enthaltenen Polyphenole, auch die in Weißwein in hohen Mengen enthaltenen Catechine wie Quercetin, ebenso wie Proteine im Bereich von 280 nm absorbieren, kann bei den Peaks nicht automatisch von Proteinpeaks ausgegangen werden. Zur Überprüfung des Vorhandenseins von Proteinen wird die SDS-PAGE eingesetzt.

Da die Proteinmenge im Anschluss an die Anionenaustauschchromatographie sehr gering ist und Proteine mittels SDS-PAGE kaum detektierbar sind, werden die einzelnen Peaks von sechs identischen Läufen vereinigt und jeweils in Zentrifugalkonzentratoren mit einem MWCO von 5 kDa konzentriert. Die entsprechenden Peaks sind in Abbildung 31A von 1 bis 15 durchnummeriert. Die im Anschluss daran durchgeführte SDS-PAGE ist in Abbildung 31B und C dargestellt. Da die Proteinbanden bei der Färbung mit Coomassie nur schwach zu erkennen sind (Abbildung 31B), wird das Gel noch mit einer Silberfärbung behandelt (Abbildung 31C).

Die SDS-PAGE zeigt, dass in Peak 1 zahlreiche Proteine mit einem Molekulargewicht von 20 kDa bis 30 kDa sowie in geringeren Mengen Proteine von 10 bis 20 kDa enthalten sind, die nicht an die Matrix des Anionenaustauschers binden (Abbildung 31B und C, Spur 2). Verglichen mit dem Proteinmuster eines Weißweins stellt dies den Hauptanteil der Proteine dar.

Ein weiterer proteinhaltiger Peak eluiert nach ca. 28 min (Peak 7 in Abbildung 31A). Dieser Peak enthält, wie auf der SDS-PAGE in Abbildung 31C (Spur 3) zu erkennen ist, sowohl ein Protein mit einem Molekulargewicht von 63 kDa als auch eines mit einem Molekulargewicht von 23 kDa. Hierbei handelt es sich vermutlich um die vakuoläre Invertase und ein Thaumatin-ähnliches Protein, eine abschließende Identifizierung steht jedoch noch aus. Auch in Peak 6 ist eine schwache Bande bei 23 kDa zu erkennen.

In Peak 8 sind in geringen Mengen ebenfalls die in Peak 7 gefundenen Proteine in geringerer Menge sowie zwei weitere schwache Proteinbanden bei 75 und 100 kDa enthalten (Abbildung 31C, Spur 4). Die Proteine mit 75 und 100 kDa sind charakteristisch für Peak 9 (Abbildung 31C, Spur 5), so dass Peak 8 vermutlich nur die Proteine von Peak 7 sowie 9 enthält, da keine Auftrennung der Peaks bis auf die Nulllinie erfolgt und somit eine eindeutige Trennung nicht möglich ist. Peak 10 enthält ein Protein mit einem Molekulargewicht von 75 kDa (Abbildung 31C, Spur 5). In allen weiteren Peaks können mittels SDS-PAGE keine Proteine detektiert werden.



**Abbildung 31: Anionenaustauschchromatographie (UNO-Q12 – Säule) mit Riesling 2007 aus der Pfalz.** Vor der Auftragung auf die Säule wird der Wein dialysiert, lyophilisiert und über einen Spritzenfilter filtriert.

A) Elutionsprofil des Anionenaustauschs mit 50 mg Weinextrakt, gelöst in 2ml Phosphatpuffer.

Der Anionenaustausch wird mit einer Flußrate von 3 ml/min bei einem pH-Wert von 7,7 durchgeführt.

(B) Coomassie-gefärbte SDS-PAGE [12,5 %] mit Proben der Anionenaustauschchromatographie: 1) Molekulargewichtsmarker; 2) Peak 1; 3) Peak 7; 4) Peak 8; 5) Peak 9; 6) Peak 10

(C) Silbergefärbte SDS-PAGE [12,5 %] mit Proben der Anionenaustauschchromatographie: 1) Molekulargewichtsmarker; 2) Peak 1; 3) Peak 7; 4) Peak 8; 5) Peak 9; 6) Peak 10

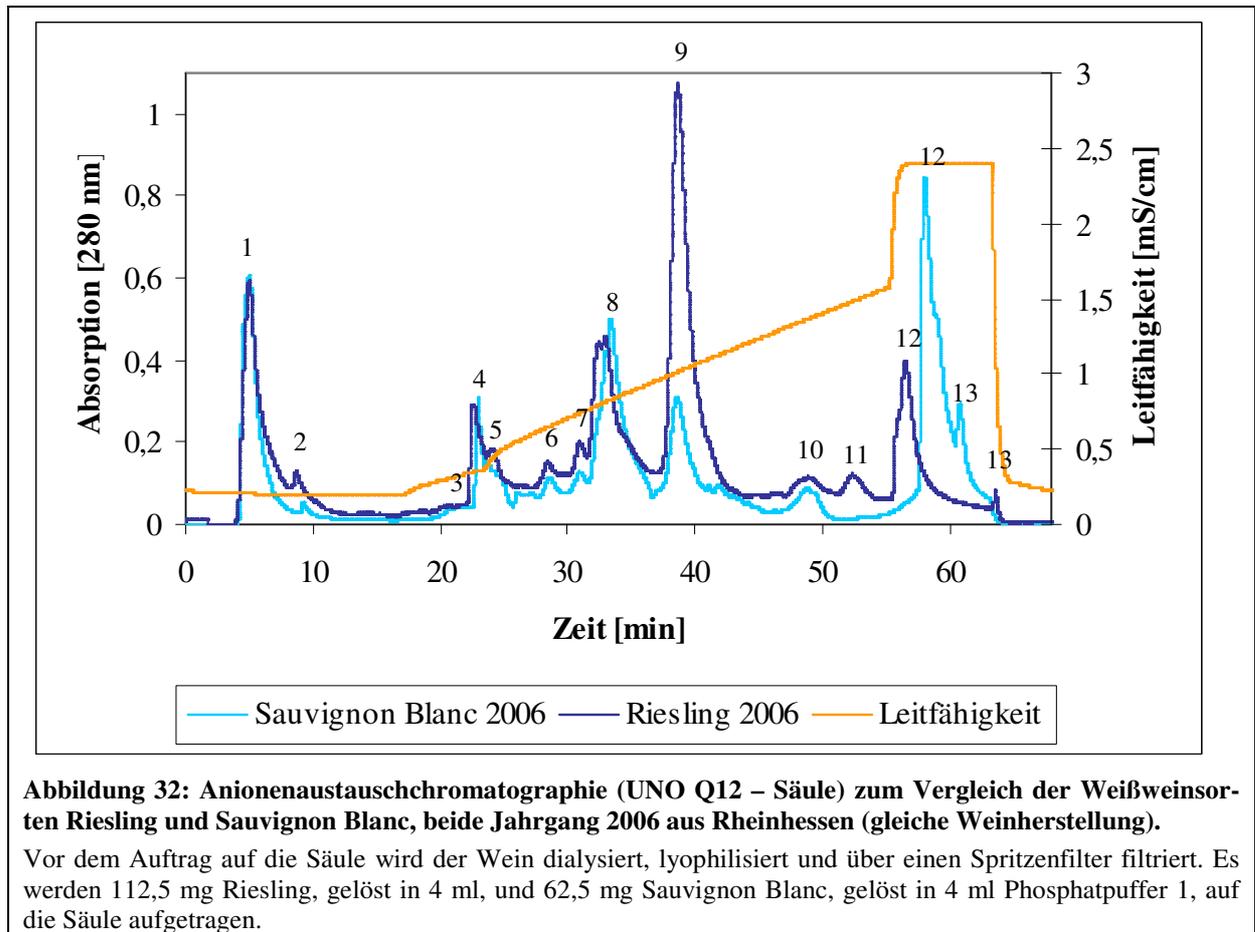
Um die Proteine von Peak 7 mit den Molekulargewichten von einerseits 23 kDa und andererseits 63 kDa voneinander zu separieren, wird eine Größenausschlusschromatographie mit einer S-100-Säule, die sich durch einen optimalen Trennbereich von 5 bis 100 kDa auszeichnet, durchgeführt. Hierfür wird die aufkonzentrierte Probe von Peak 7 aus den sechs Anionenaustauschläufen eingesetzt, wofür insgesamt 300 mg Weinextrakt aus ca. 750 ml Wein eingesetzt

werden. Die maximale Absorption der Größenausschlusschromatographie liegt mit 0,01 in einem sehr geringen Bereich, so dass keine weiteren Aussagen zu der Auftrennung getroffen werden können. Ein Proteinverlust ist wahrscheinlich sowohl auf die Konzentrierung mittels Zentrifugalkonzentratoren als auch auf die Größenausschlusschromatographie zurückzuführen.

### **Vergleich der Anionenaustauschchromatographie zwischen Sauvignon Blanc und Riesling**

Für einen Vergleich der Anionenaustauschchromatographie zweier Weißweine werden ein Riesling sowie ein Sauvignon Blanc des Jahrgangs 2006 aus Rheinhessen (Weingut Fleischer, Mainz) eingesetzt. Die Herstellung der Weine verläuft identisch.

Für den Anionenaustausch werden die Weine zuvor mittels Dialyse und Gefriertrocknung konzentriert und über einen Spritzenfilter filtriert. Für einen Lauf werden 112,5 mg des lyophilisierten Riesling-Extraktes sowie 62,5 mg des Sauvignon Blanc-Extraktes, gelöst in 4 ml Posphatpuffer 1, eingesetzt. Die geringere Menge Sauvignon Blanc wird gewählt, da sich sowohl bei der Proteinkonzentrationsbestimmung als auch bei der SDS-PAGE gezeigt hat, dass der Proteingehalt dieser Weinsorte höher als der des Rieslings liegt. Die Elution erfolgt mittels eines linearen Gradienten bis 60 % mit Hochsalzpuffer. Der Vergleich der Elutionsprofile zeigt weitgehende Übereinstimmung in den zwei Elutionsprofilen (Abbildung 32), so dass im Folgenden nur auf die Unterschiede sowie die proteinhaltigen Peaks eingegangen wird. Peak 1, der die Proteine, die nicht an die Matrix des Anionenaustauschers binden, enthält, eluiert nach ca. 4 min. Hierbei handelt es sich vorwiegend um Proteine im Molekulargewichtsbereich von 20 bis 30 kDa und in geringeren Mengen auch um Proteine zwischen ca. 10 und 20 kDa. Peak 4 enthält eine bei der SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung sichtbare, schwach ausgeprägte Bande bei 25 kDa. Die Peaks 5 und 6 enthalten drei Proteinbanden im Molekulargewichtsbereich von 75 bis 100 kDa. In den weiteren Peaks sind keine Proteine mittels SDS-PAGE detektierbar. Auffällig ist, dass Peak 7 beim Riesling deutlich höher ausgeprägt ist. Dies ist jedoch auch nur für den im Rahmen dieser Aufreinigung eingesetzten Riesling der Fall, da z.B. bei dem in Abbildung 31A dargestellten Riesling 2007 aus der Pfalz die Relation der Peaks 6 und 7 denen des Sauvignon Blancs ähnlicher ist als denen des Rieslings in Abbildung 32. Peak 9 ist nur im Riesling vorhanden und Peak 10 ist beim Sauvignon Blanc zeitlich gegenüber dem des Rieslings nach hinten verschoben sowie höher ausgeprägt.

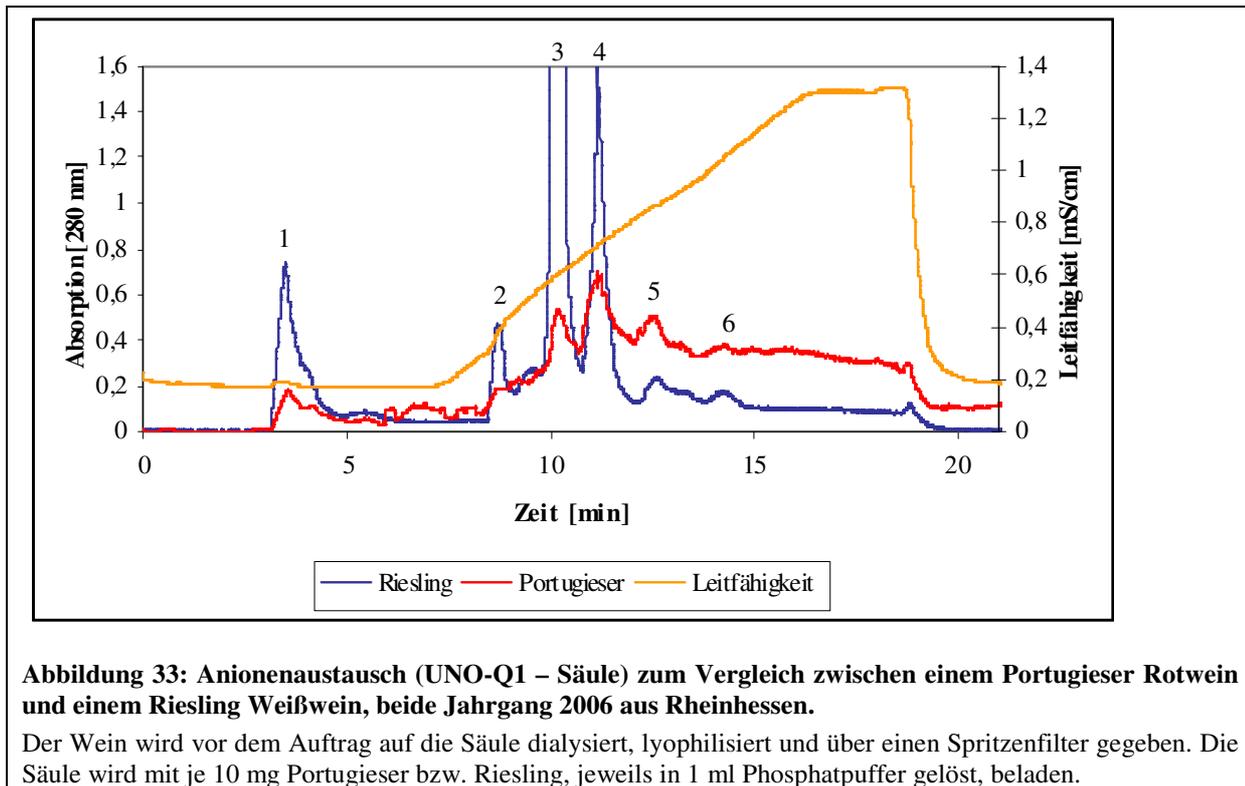


### Vergleich der Anionenaustauschchromatographie zwischen Portugieser und Riesling

Um einen Vergleich zwischen dem Laufverhalten eines Rieslings als Beispiel für einen Weißwein und dem eines Portugiesers als Beispiel für einen Rotwein zu erreichen, wird eine UNO Q1-Säule eingesetzt. Diese hat ein geringeres Volumen als die zuvor eingesetzte UNO Q12-Säule, wird jedoch in diesem Fall aus Kostengründen eingesetzt, da die Säule nach der einmaligen Verwendung mit dem Rotwein keine optimale Auftrennung mehr zeigt. Dies liegt vermutlich an der Bindung verschiedener Pigmente/Polyphenole, die selbst mit einer Hochsalzlösung und intensivem Waschen nicht zu entfernen sind. Die eingesetzte Probenmenge liegt bei je 10 mg lyophilisiertem Weinextrakt, der jeweils in 1 ml Phosphatpuffer gelöst wird. Die ersten Proteine, die nicht an die Matrix der Säule binden, eluieren nach 3 min (Peak 1 in Abbildung 33). Diese sind sowohl bei dem Riesling Weißwein als auch bei dem Portugieser Rotwein auf einer silbergefärbten SDS-PAGE schwach zu erkennen, wobei sich die Proteine, die nicht an die Matrix des Anionenaustauschers binden und mittels SDS-PAGE sichtbar gemacht werden können, beim Riesling im Molekulargewichtsbereich von 20 bis 30 kDa befinden, während beim Portugieser Rotwein neben drei schwach ausgeprägten Banden bei 20 bis 25 kDa noch eine Proteinbande bei ca. 10 kDa zu erkennen ist. In allen weiteren Peaks kön-

nen bei den eingesetzten Mengen mit der silbergefärbten SDS-PAGE keine Proteine detektiert werden. Dies liegt einerseits daran, dass viele der Peaks vermutlich durch Polyphenole bedingt sind, andererseits ist die eingesetzte Proteinmenge zu gering.

Die Peaks 3 und 4, die nach 10 min und 11 min eluieren, sind in beiden Weinsorten vorhanden. Das Elutionsprofil unterscheidet sich im weiteren Verlauf dahingehend, dass die Grundabsorption beim Rotwein deutlich höher als beim Weißwein verläuft.



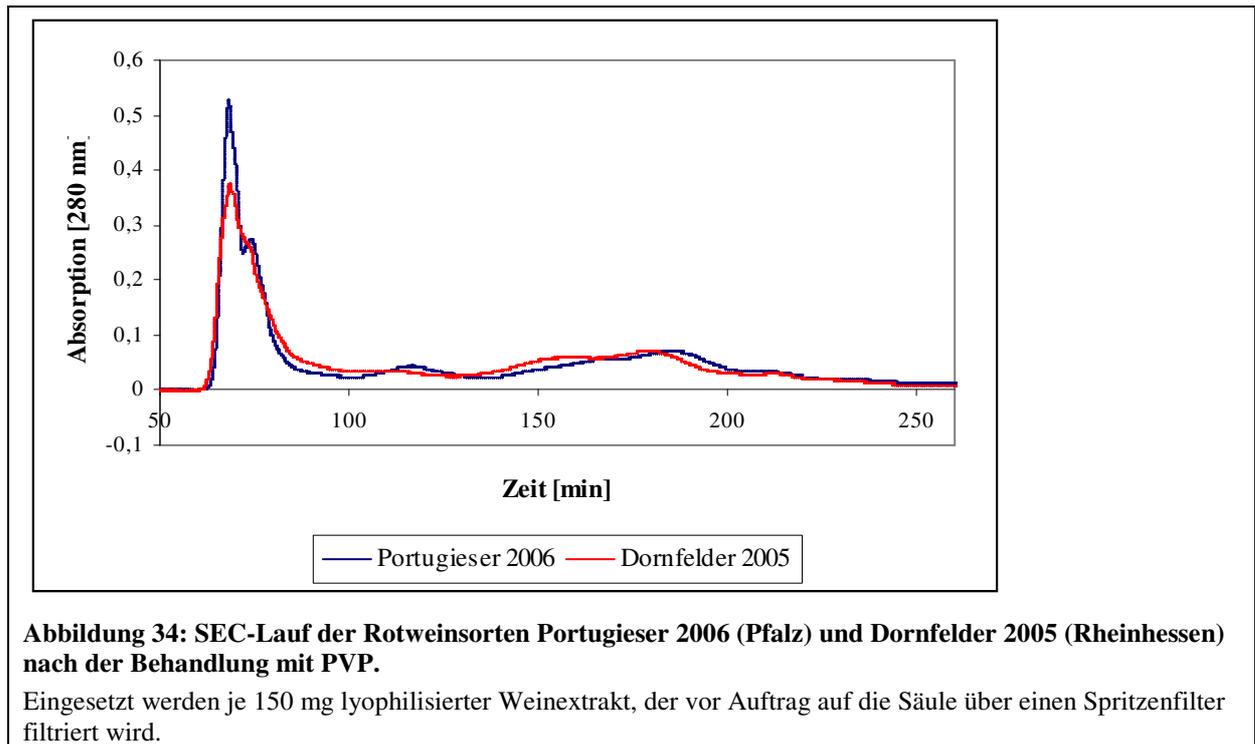
### 3.6.2 Aufreinigung der Proteine aus Rotwein

Beim Rotwein ist eine chromatographische Aufreinigung im ersten Schritt nicht möglich, da die Polyphenole an die Matrix der Säule binden und nicht mehr ausreichend zu entfernen sind. Somit steht zunächst die Entfernung der Polyphenole im Vordergrund. Diese wird entsprechend der Beschreibung unter Abschnitt 2.7.3.3 mit Polyclar® AT durchgeführt.

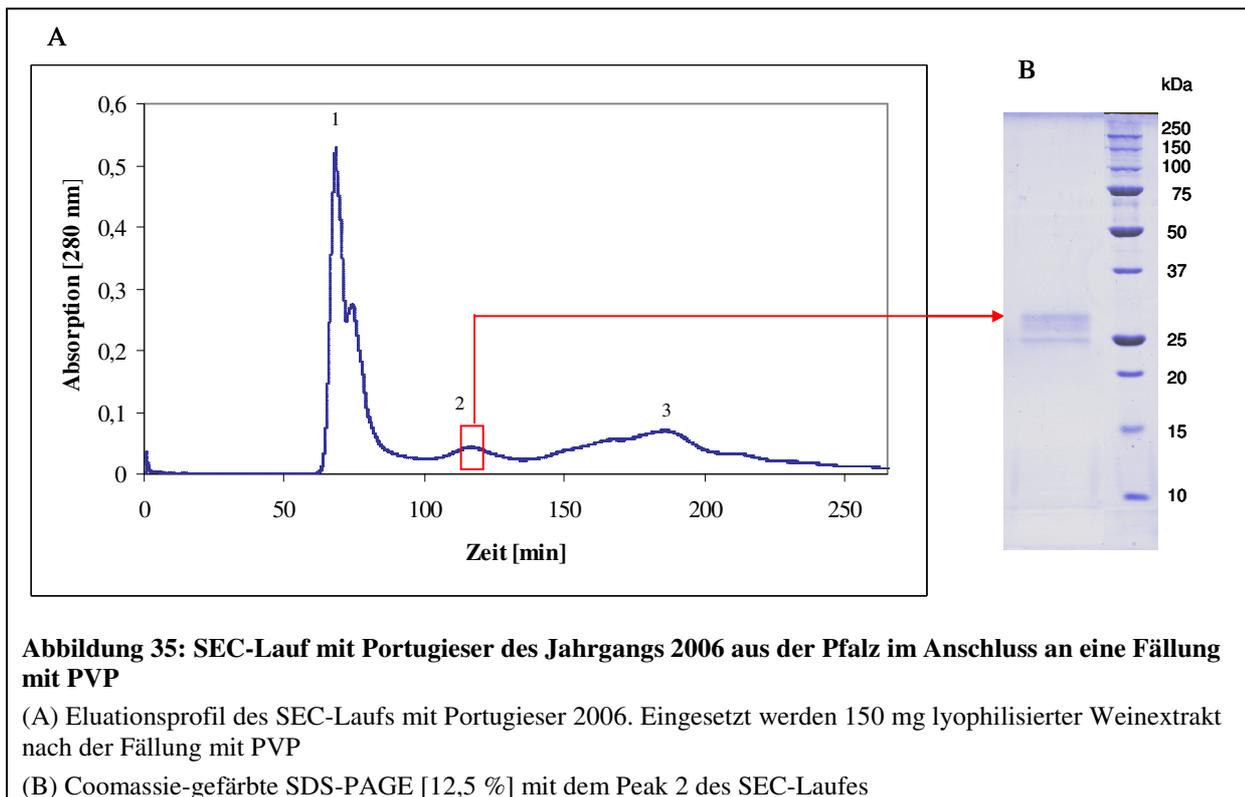
### Größenausschlusschromatographie

Für die daran anschließende Aufreinigung der Proteine mittels Größenausschlusschromatographie werden jeweils 300 ml der Weinsorten Portugieser des Jahrgangs 2005 aus der Pfalz (im Einzelhandel erworben, Birkweiler) sowie Dornfelder des Jahrgangs 2005 aus Rheinhes-

sen (Weingut Fleischer, Mainz) eingesetzt. Nach der Fällung werden die verbleibenden 120 ml Rotwein dialysiert und lyophilisiert. Die daraus gewonnene Menge Weinextrakt liegt bei 250 mg. Für einen Lauf der Größenausschlusschromatographie im zweiten Schritt werden 150 mg des Lyophilisats des PVP-gefällten Weines in 4 ml Phosphatpuffer (pH 7,0) gelöst eingesetzt. Die entsprechenden Elutionsprofile von Portugieser sowie Dornfelder sind in Abbildung 34 und 35 mit der entsprechenden SDS-PAGE dargestellt.



Das Elutionsprofil ist durch drei klar voneinander getrennte Peaks gekennzeichnet, wobei Peak 1 noch einen kleinen Zusatzpeak enthält und Peak 3 aus zwei nicht klar voneinander getrennten Peaks besteht (Abbildung 35A). Nur Peak 2, der über den Zeitraum von 110 bis 130 min eluiert, enthält mittels SDS-PAGE detektierbare Proteine. Diese besitzen, wie Abbildung 35B am Beispiel des Portugieser Rotweins zeigt, Molekulargewichte von 25,3 kDa, 26,9 kDa und 28,5 kDa. In Peak 1 und 3 sind keine Proteinbanden detektierbar. Bei Peak 1 könnte es sich um höhermolekulare Verbindungen wie komplexe Polyphenole oder Polysaccharide handeln, während Peak 3 niedermolekulare Komponenten enthält. Hier müssten noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

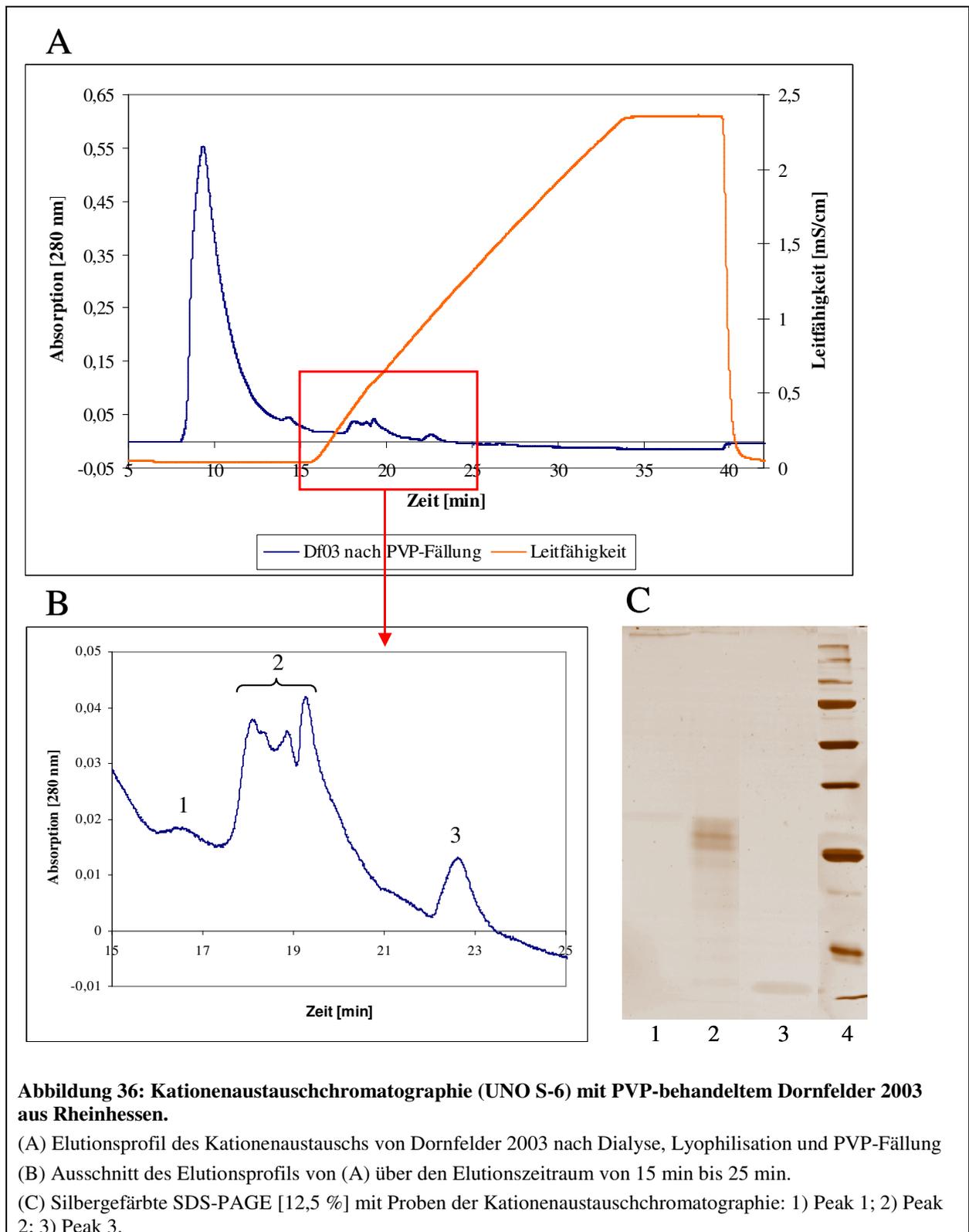


Die Fraktionen beider Läufe werden nach Durchführung einer SDS-PAGE vereinigt und erneut gefriergetrocknet oder mittels Zentrifugalkonzentratoren mit einem molekularen Ausschluss von 5 kDa konzentriert. Doch auch nach der Konzentrierung sind keine weiteren Proteine mittels SDS-PAGE zu erkennen.

### Kationenaustausch-Chromatographie

Ziel der Kationenaustausch-Chromatographie ist die Isolierung des Lipid Transfer Proteins, welches sich als basisches Protein mit einem Isoelektrischen Punkt bei ca. 9 stark von den weiteren im Wein enthaltenen Proteinen unterscheidet.

Für die Aufreinigung von Dornfelder Rotwein des Jahrgangs 2003 aus Rheinhessen mittels Kationenaustausch-Chromatographie wird zur Probenvorbereitung die PVP-Fällung entsprechend der Ausführungen unter 2.7.3.3 durchgeführt, wobei 200 mg lyophilisierter Weinextrakt gelöst in 20 ml Citratpuffer mit einem pH-Wert von 3,0 eingesetzt werden. Nach der Fällung wird der Ansatz über einen Spritzenfilter filtriert, bevor 4 ml von diesem auf die Säule gegeben werden. Eluiert wird mit einem linearen Salzgradienten. Das Elutionsprofil mit der entsprechenden SDS-PAGE ist in Abbildung 36 dargestellt.



Wie Abbildung 36A verdeutlicht bindet ein großer Anteil der Proteine nicht an die Matrix des Kationentauschers. Des Weiteren eluieren Proteine nach einer Wechselwirkung mit der Säulenmatrix im Bereich von 15 bis 25 Minuten, was in Abbildung 36B dargestellt ist. Während Peak 1 ein Protein mit einem Molekulargewicht von 31 kDa enthält, sind in den unter 2 zu-

sammengefassten Peaks Proteine im Molekulargewichtsbereich von 20 bis 30 kDa enthalten. Peak 3 enthält ausschließlich ein Protein mit einem Molekulargewicht von 11 kDa, wobei es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um ein Lipid Transfer Protein handelt, eine massenspektrometrische Identifizierung steht jedoch noch aus. Hierfür müssen größere Mengen an Protein eingesetzt bzw. mehrere Kationenaustauschläufe vereinigt und aufkonzentriert werden, um das Protein mittels einer elektrophoretischen Auftrennung mit Coomassie sichtbar zu machen, so dass eine Identifizierung mittels Massenspektrometrie möglich ist.

### **3.7 Untersuchungen zum allergenen Potential von Weinproteinen**

Untersuchungen zum allergenen Potential der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Proteine sind Inhalt dieses Kapitels. Von den identifizierten Proteinen ist das Lipid Transfer Protein bereits als Allergen der Traube beschrieben. Es stellt das einzige in der internationalen Allergendatenbank geführte Allergen aus *Vitis vinifera* dar, wobei Lipid Transfer Proteine als Allergene weiterer Nahrungsmittel bereits beschrieben sind [WWW.ALLERGEN.ORG]. Aus den Gruppen der Thaumatin-ähnlichen Proteine sowie der Chitinasen ist eine Reihe von Proteinen verschiedener Früchte als Nahrungsmittelallergene identifiziert. So wird im Folgenden ein Sequenzvergleich jeweils zwischen der Sequenz der identifizierten Traubenproteine und bekannten Allergenen aus der gleichen Proteingruppe vorgenommen. Da bisher keine Strukturen der im Wein enthaltenen Proteine beschrieben sind, habe ich Proteinmodelle auf Grundlage bekannter Kristallstrukturen erstellt, um einen Einblick in die Struktur der entsprechenden Weinproteine zu erlangen und mögliche Bindungsepitope zu identifizieren. Durch einen Western Blot mit einem Thaumatin-Antikörper sollen spezifisch Thaumatin-ähnliche Proteine im Wein detektiert werden. Abschließend werden erste Untersuchungen zur Proliferation und Zytokinausschüttung vorgestellt, die in Zusammenarbeit mit der AG Saloga der Hautklinik der Universität Mainz durchgeführt werden. Ziel ist somit neben der Detektion potentieller Allergene auch die Überprüfung der klinischen Relevanz.

#### **3.7.1 Sequenzvergleich der Weinproteine mit bekannten Allergenen**

Um eine erste Einschätzung über eine mögliche Allergenität der Weinproteine zu erlangen, werden die Sequenzen der identifizierten Proteine aus *Vitis vinifera* mit bekannten Allergenen anderer Spezies verglichen. Je größer die sequenzielle Ähnlichkeit der Proteine ist, desto höher ist auch die Wahrscheinlichkeit, dass Kreuzreaktionen auftreten. Bei Peptiden aus mindestens 80 Aminosäuren ist diese als hoch einzustufen, wenn eine Sequenzidentität von mindestens 35 % besteht [AALBERSE 2007]. Da die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur für die

Vorhersage der Allergenität wichtig ist, werden Modelle der potentiell allergenen Proteine im Wein erstellt.

Die im Folgenden beschriebenen Sequenzalignments werden mit ClustalX 1.83 sowie GeneDoc (Version 2.6.002) durchgeführt. Die Proteinstrukturen werden mit Swiss Modell erstellt und mit Chimera bearbeitet.

### Lipid Transfer Proteine

Das nichtspezifische Lipid Transfer Protein P4 ist das einzige Allergen aus *Vitis vinifera*, welches bei der International Union of Immunological Societies gelistet ist. Es wird als Vit v 1 deklariert. Neben dieser bereits als Allergen beschriebenen Isoform P4 aus *Vitis vinifera* habe ich in dem untersuchten Portugieser Rotwein ein weiteres LTP aus *Vitis aestivalis* sowie das LTP P1 aus einer Kreuzung von *Vitis berlandieri* und *Vitis vinifera* identifiziert. Ein weiteres Protein mit einem Molekulargewicht von 11,656 kDa ist den Ergebnissen der BLAST-Suche zur Folge aller Wahrscheinlichkeit nach auch der Familie der LTP zuzuordnen (Kapitel 3.4.2.1). Tabelle 22 vergleicht die Sequenzen der Lipid Transfer Proteine, die in dem in dieser Arbeit untersuchten Portugieser Rotwein enthalten sind, mit den Sequenzen von als Allergenen beschriebenen Lipid Transfer Proteinen aus anderen Organismen. Als Vergleich werden hierbei die Lipid Transfer Protein Mal d 3 aus Apfel, Pru p 3 aus Pfirsich, Pru av 3 aus Süßkirsche, Pru d 3 aus Pflaume, Pru ar 3 aus Aprikose, Zea m 14 aus Mais sowie Amb a 6 aus Ambrosia, Art v 3 aus Beifuß und Par j 1 aus Parietaria herangezogen. In Anhang 8.2.1 ist das entsprechende Sequenzalignment aufgeführt.

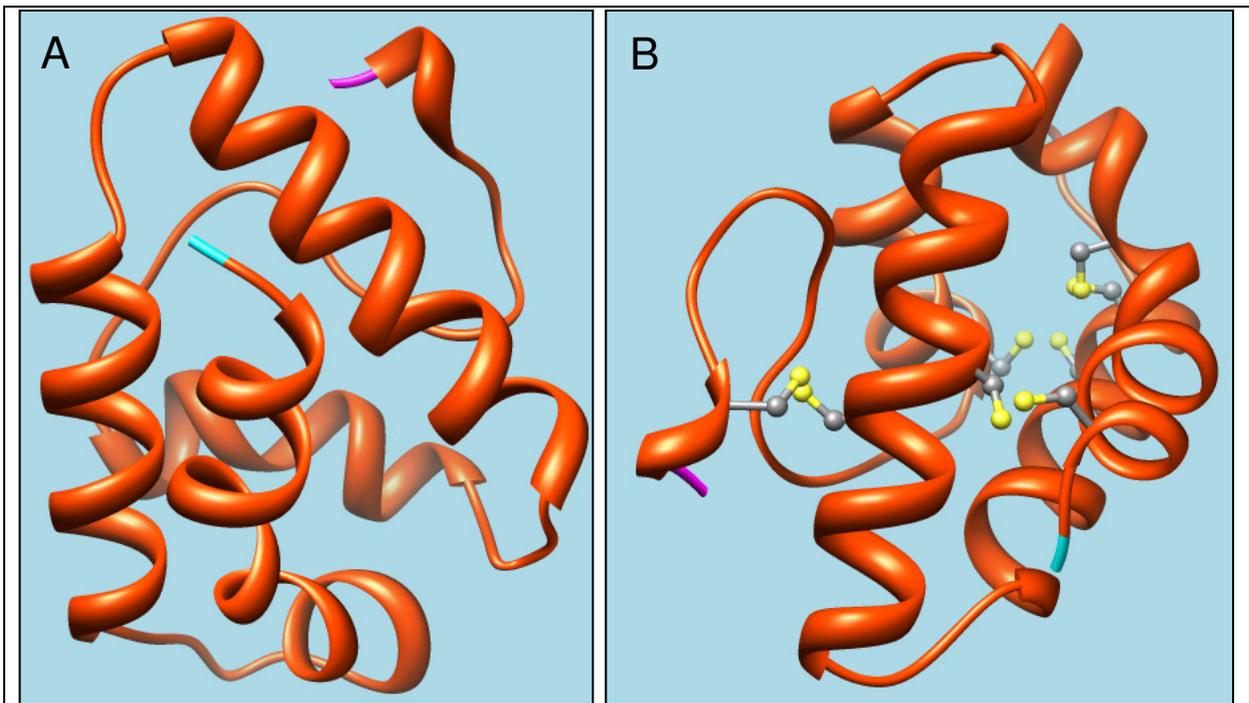
**Tabelle 22: Sequenzidentitäten und Ähnlichkeiten zwischen Lipid Transfer Proteinen aus der Weinbeere und als Allergen beschriebenen LTP aus Nahrungsmitteln (Apfel, Pfirsich, Süßkirsche, Pflaume, Aprikose, Mais) sowie Pollen (Ambrosie, Beifuß, Parietaria).** Die Werte werden durch ein Sequenzalignment mit ClustalX und GeneDoc ermittelt. Aufgeführt sind die Sequenzidentitäten sowie die Sequenzähnlichkeiten (Sequenzidentität / Sequenzähnlichkeit)

	Weinbeere			
	LTP P 4 <i>Vitis vinifera</i> gi 28194086	LTP <i>Vitis aestivalis</i> gi 37625029	LTP <i>Vitis berlandieri</i> x <i>Vitis vinifera</i> gi 28193997	hypothetisches LTP <i>Vitis vinifera</i> gi 147802122
	<b>Nahrungsmittel</b>			
<b>Apfel (Mal d 3)</b> gi8980444	40 % / 54 %	42 % / 57 %	41 % / 55 %	40 % / 50 %
<b>Pfirsich (Pru p 3)</b> gi3287877	46 % / 61 %	47 % / 63 %	47 % / 61 %	45 % / 55 %
<b>Süßkirsche (Pru av 3)</b> gi14423815	57 % / 74 %	58 % / 78 %	58 % / 75 %	55 % / 71 %

<b>Pflaume (Pru d 3)</b> gi9297015	45 % / 62 %	47 % / 64 %	50 % / 63 %	46 % / 55 %
<b>Aprikose (Pru ar 3)</b> gi7404406	44 % / 62 %	46 % / 63 %	47 % / 62 %	49 % / 56 %
<b>Mais (Zea m 14)</b> gi128388	51 % / 72 %	53 % / 74 %	48 % / 70 %	45 % / 64 %
<b>Pollen</b>				
<b>Ambrosia (Amb a 6)</b> gi1485595	28 % / 50 %	28 % / 48 %	30 % / 48 %	27 % / 40 %
<b>Beifuß (Art v 3)</b> gi73621307	16 % / 24 %	16 % / 24 %	17 % / 21 %	13 % / 22 %
<b>Parietaria (Par j 1)</b> gi741844	17 % / 25 %	17 % / 23 %	15 % / 23 %	13 % / 22 %

Wie Tabelle 22 zeigt, liegen die Sequenzidentitäten zwischen den Lipid Transfer Proteinen aus der Weinbeere und den Lipid Transfer Proteinen anderer Früchte (Apfel, Pfirsich, Aprikose, Pflaume, Süßkirsche) sowie Mais im Bereich von 40 bis 57 %, so dass von einer strukturellen Ähnlichkeit ausgegangen werden kann. Bei einem Vergleich der LTP aus der Weinbeere mit denen des Pollens von Ambrosia, Beifuß und Parietaria hingegen liegen die Sequenzidentitäten nur bei 16 bis 28 %. Dementsprechend sind Kreuzreaktionen zwischen den Aeroallergenen und den LTP der Weinbeere als unwahrscheinlich einzustufen.

Die Kristallstruktur des als Allergen beschriebenen LTP pru p 3 aus dem Pfirsich (*Prunus persica*) ist bereits aufgeklärt [PASQUATO ET AL 2006]. Basierend auf dieser bekannten Struktur wird die in Abbildung 37 dargestellte hypothetische Struktur des Lipid Transfer Proteins Isoform 4 aus der Weinbeere mit Hilfe von Swiss Model erstellt, da eine Struktur des LTPs aus der Weinbeere bisher nicht beschrieben ist [HTTP://SWISSMODEL.EXPASYS.ORG, ARNOLD ET AL 2006, KOPP/SCHWEDE 2004, SCHWEDE ET AL 2003, GUEx/ ET AL 1997, PEITSCH 1997; ET AL 1995]. Bearbeitet wird das Proteinmodell mit Chimera [HTTP://WWW.CGL.UCSF.EDU/CHIMERA]. Für die Erstellung des Proteinmodells werden nur die Aminosäuren 29 bis 118 des LTP Isoform 4 aus der Weinbeere berücksichtigt. Die Sequenzidentität für diesen Bereich liegt bei 60 %, die Sequenzähnlichkeit bei 81 %.



**Abbildung 37: Proteinmodell des Lipid Transfer Proteins P4 aus *Vitis vinifera*.**

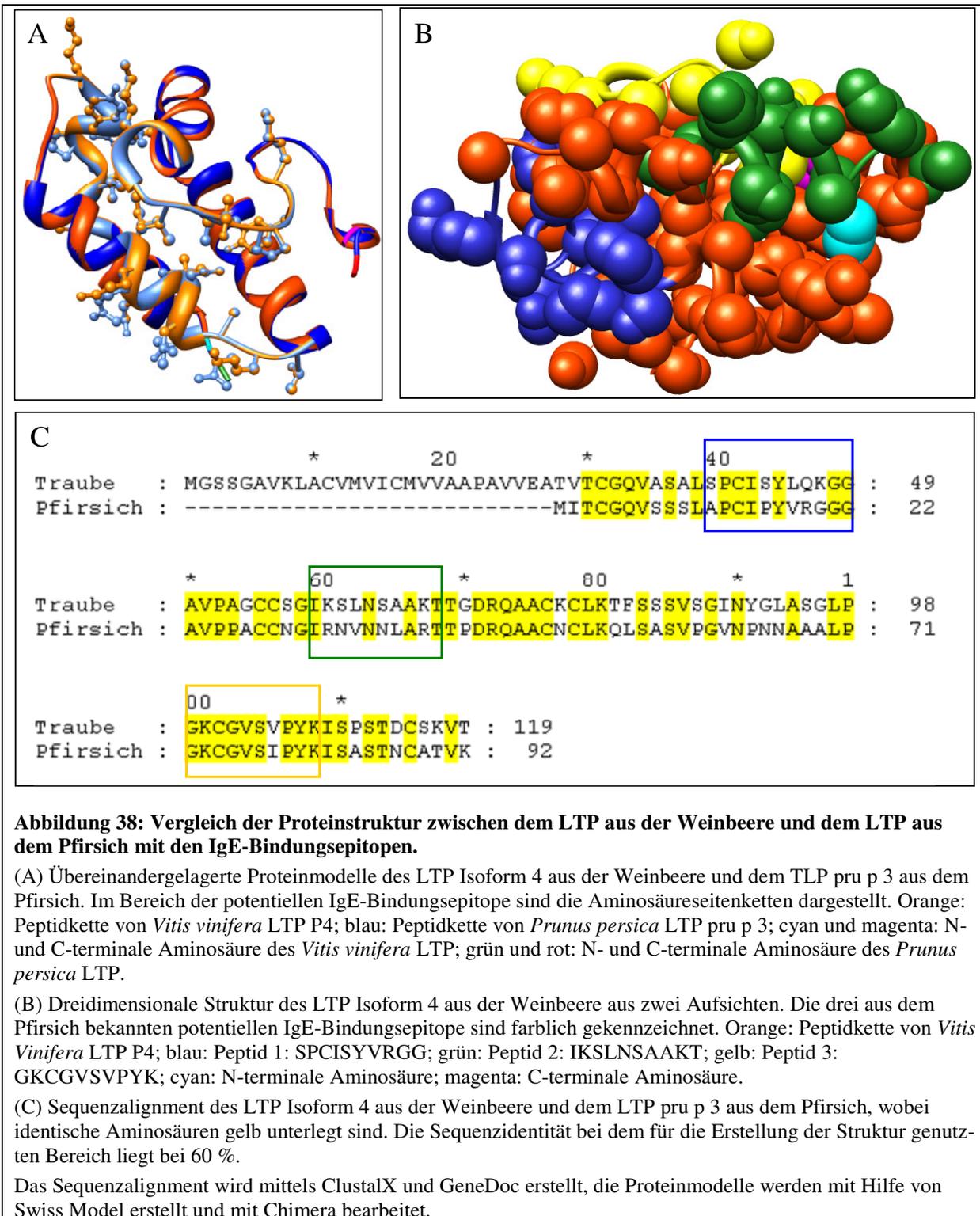
(A) Proteinmodell des Lipid Transfer Proteins P4 aus *Vitis vinifera* erstellt mit Swiss Modell und bearbeitet mit Chimera. Für das Modelling wird die Aminosäurekette ab der 29. Aminosäure des Weinbeeren-LTP Isoform 4 herangezogen und basierend auf der Struktur des LTP pru p 3 des Pfirsichs erstellt. Cyan: N-terminale Aminosäure; magenta: C-terminale Aminosäure

(B) wie (A) mit der Darstellung der Cysteinreste und deren Schwefelatomen (gelb), die insgesamt vier Disulfidbrücken ausbilden.

Die hypothetische Struktur zeichnet vier  $\alpha$ -Helices, die durch kurze Loops miteinander verbunden sind. Eine Stabilisierung erfolgt bei dem LTP der Weinbeere aller Wahrscheinlichkeit nach, wie bereits bei anderen Lipid Transfer Proteinen beschrieben, durch vier Disulfidbrücken, da die Sequenz acht konservierte Cysteine enthält.

Bereits 2003 werden potentielle IgE-Bindungs epitope für das LTP pru p 3 aus dem Pfirsich beschrieben [GARCIA-CASADO ET AL 2003]. Die IgE-Bindung wird für drei Peptide postuliert: Peptid 1 mit der Aminosäuresequenz APCIPYVRGG, Peptid 2 mit der Aminosäuresequenz IRNVNLLART und Peptid 3 mit der Aminosäuresequenz GKCGVSIPYK. Abbildung 38A zeigt einen Vergleich des LTP pru p 3 aus dem Pfirsich mit dem LTP Isoform 4 aus der Weinbeere, wobei die Peptidkette des LTP aus dem Pfirsich in blau und die der Weinbeere in orange dargestellt ist. Die Aminosäureseitenketten sind nur in den Bereichen der IgE-Bindungs epitope dargestellt. Abbildung 38B bildet die sphärische Darstellung des LTP Isoform 4 aus der Weinbeere ab, bei der die IgE-Bindungs epitope, die aus dem Pfirsich bekannt sind, farblich gekennzeichnet sind. Das entsprechende Sequenzalignment zwischen dem LTP aus der Weinbeere und dem LTP aus dem Pfirsich ist in Abbildung 38C aufgeführt. Auch in

diesem sind die IgE-Bindungssepitope durch die farbliche Umrandung hervorgehoben und identische Aminosäuren gelb hinterlegt.



Die potentiellen IgE-Bindungssepitope befinden sich an der Oberfläche des Proteins. Bei einem Vergleich der IgE-Bindungssepitope beim Pfirsich und der entsprechenden Sequenz der Weinbeere zeigt sich, dass das Peptid 3, welches zehn Aminosäuren umfasst, nahezu identisch ist und nur ein Valin durch ein Isoleucin in der Sequenz der Weinbeere ausgetauscht ist. Beim

Peptid 1, welches elf Aminosäuren umfasst, sind Serin durch Alanin, Serin durch Prolin, Leucin durch Valin, Glutamin durch Arginin und Lysin durch Glycin ausgetauscht, d.h. ein Aminosäuretausch tritt in fünf von elf Aminosäuren auf. Bei Peptid 2 sind nur vier der zehn Aminosäuren identisch. Die Unterschiede liegen bei Lysin anstelle von Arginin (zweimal), Serin anstelle von Asparagin, Leucin anstelle von Valin, Serin anstelle von Asparagin sowie Alanin anstelle von Leucin.

### Thaumatin-ähnliche Proteine

Als Minorallergen der Weinbeere wird ein Thaumatin-ähnliches Protein bei PASTORELLO ET AL 2003 diskutiert. Als Majorallergene sind die Thaumatin-ähnlichen Proteine Mal d 2 aus dem Apfel, Pru av 2 aus der Süßkirsche sowie Act d 2 aus der Kiwi beschrieben [HSIEH ET AL 1995, KREBITZ ET AL 2003, INSCHLAG ET AL 1998, GAVROVIC-JANKULOVIC ET AL 2002]. Auch in der Banane, der Paprika und der Tomate sind die Thaumatin-ähnlichen Proteine als Allergene identifiziert worden [LEONE ET AL 2006, FUCHS ET AL 2002, JENSEN-JAROLIN ET AL 1998, GHOSH/CHAKRABARTI 2008]. Im Folgenden (Tabelle 23) ist ein Sequenzvergleich der bekannten Nahrungsmittelallergene mit den im Rahmen dieser Arbeit identifizierten TLP aus dem Wein dargestellt. Ergänzt wird die Zusammenstellung durch zwei Pollenallergene Jun a 3, ein TLP aus der Bergzeder (*Juniperus ashei*), sowie Cup a 3, ein TLP aus der Arizona-Zypresse (*Cupressus arizonica*) [MIDORO-HORIUTI ET AL 2000, CORTEGANO ET AL 2004, SOMAN ET AL 2000]. Das entsprechende Sequenzalignment ist in Anhang 8.2.2 aufgeführt.

**Tabelle 23: Sequenzidentitäten und Ähnlichkeiten zwischen Thaumatin-ähnlichen Proteinen aus der Weinbeere und den als Nahrungsmittelallergenen bekannten Thaumatin-ähnlichen Proteinen aus Apfel, Süßkirsche, Kiwi, Banane und Paprika sowie mit den Pollenallergenen aus der Bergzeder und der Arizona-Zypresse.** Die Werte werden durch ein Sequenzalignment mit ClustalX und GeneDoc ermittelt. Aufgeführt sind die Sequenzidentitäten sowie die Sequenzähnlichkeiten (Sequenzidentität / Sequenzähnlichkeit)

	Weinbeere				
	VVTL 1 gi 2213852	TLP gi 89242712	putatives TLP gi 7406716	putatives TLP gi 7406714	hypothetisches TLP gi 147784586
<b>Nahrungsmittel</b>					
<b>Apfel (Mal d 2) gi30316292</b>	35 % / 47 %	35 % / 47 %	35 % / 47 %	31 % / 42 %	38 % / 51 %
<b>Süßkirsche (Pru av 2) gi118137277</b>	36 % / 44 %	36 % / 46 %	36 % / 44 %	36 % / 47 %	37 % / 46 %
<b>Kiwi (Act d 2) P81370</b>	66 % / 79 %	66 % / 79 %	65 % / 78 %	62 % / 70 %	70 % / 82 %

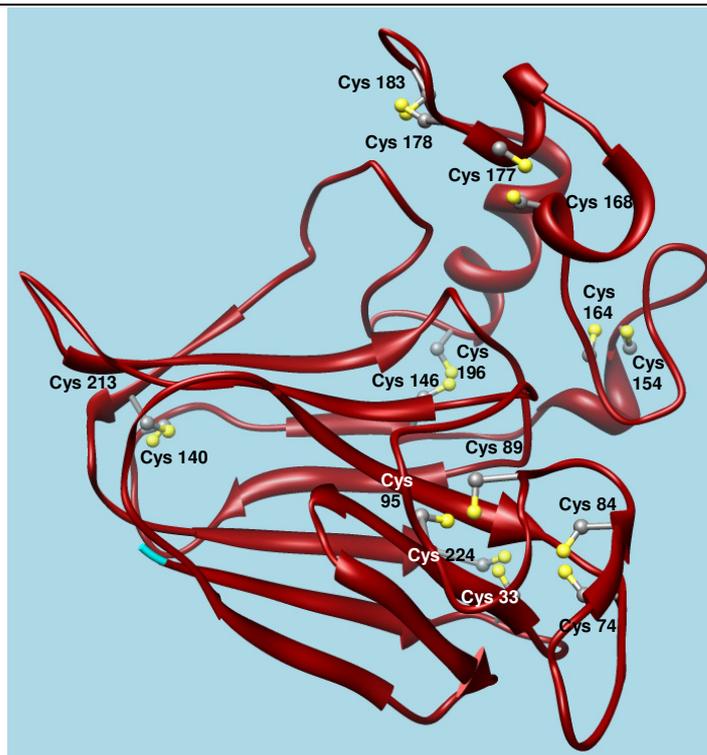
<b>Banane</b> gi88191901	64 % / 75 %	70 % / 76 %	64 % / 74 %	73 % / 81 %	69 % / 76 %
<b>Paprika</b> (Cap a 1) gi15419836	57 % / 66 %	57 % / 66 %	56 % / 66 %	50 % / 59 %	54 % / 65 %
<b>Tomate</b> (NP24) gi6093527	55 % / 65 %	56 % / 65 %	54 % / 64 %	49 % / 58 %	55 % / 65 %
<b>Pollen</b>					
<b>Bergzeder</b> (Jun a 3) gi6940772	50 % / 63 %	50 % / 65 %	50 % / 63 %	45 % / 57 %	49 % / 66 %
<b>Zypresse</b> (Cup a 3) gi9929163	46 % / 59 %	46 % / 59 %	46 % / 59 %	49 % / 64 %	45 % / 61 %

Die Sequenzidentitäten der Thaumatin-ähnlichen Proteine aus der Weinbeere mit den Allergenen aus dem Apfel und der Süßkirsche liegen im Bereich von 31 bis 38 %, bei der Paprika bei 50 bis 57 % und bei der Kiwi sowie bei der Banane im Bereich von 62 bis 73 %.

Auch bei einem Vergleich der Thaumatin-ähnlichen Proteine aus der Weinbeere mit zwei bekannten Pollenallergenen zeigen sich Sequenzidentitäten im Bereich von 45 bis 50 %. Dem zur Folge sind Kreuzreaktionen mit den aufgeführten Früchten wie auch mit den Pollen als wahrscheinlich einzustufen.

Eine Allergie gegen die Arizona-Zypresse ist in Spanien verbreitet, während allergische Reaktionen gegenüber der Bergzeder vor allem im Süden und in der Mitte der USA sowie in Nordmexiko auftreten [Breiteneder 2004]. Da weder die Arizona-Zypresse noch die Bergzeder in Deutschland heimisch sind, ist diese Pollenallergie hier weniger von Bedeutung.

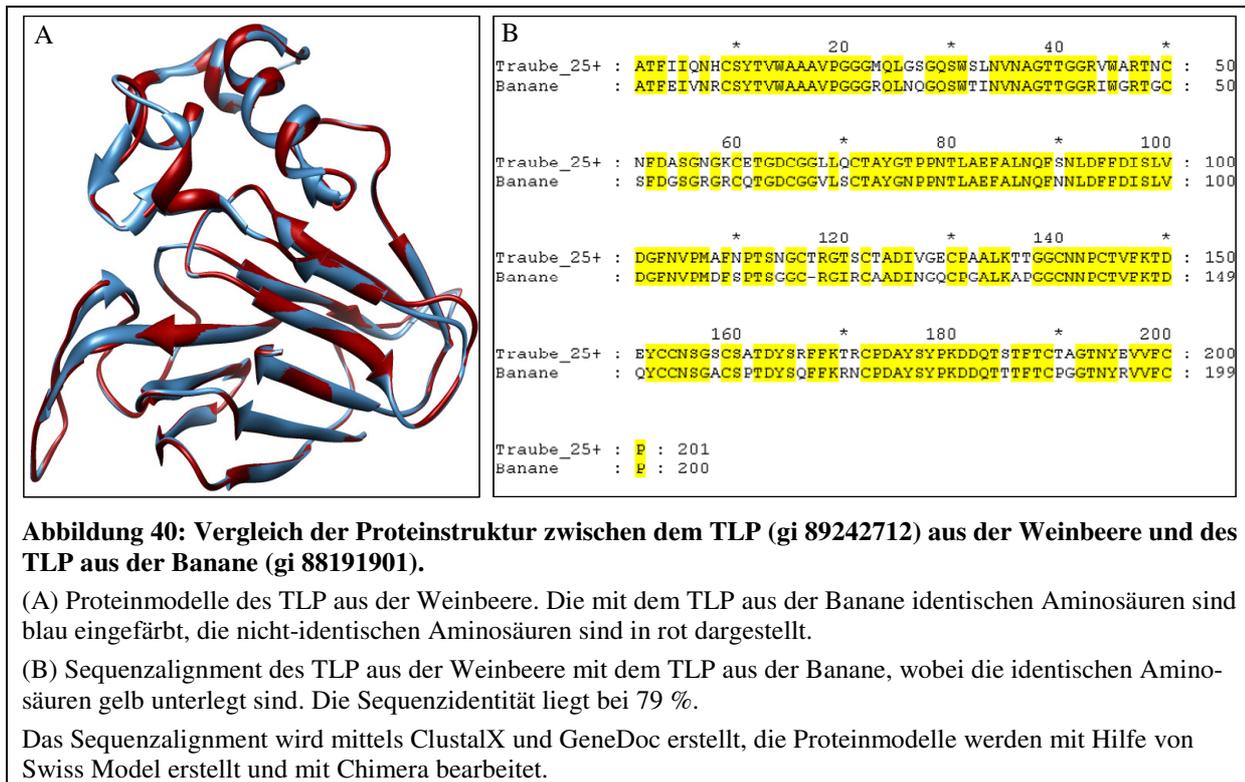
Da auch von den Thaumatin-ähnlichen Proteinen der Weinbeere bisher keine Struktur bekannt ist, wird basierend auf der bekannten Kristallstruktur der Banane ein hypothetisches Proteinmodell mit Hilfe von Swiss Model erstellt [HTTP://SWISSMODEL.EXPASYS.ORG, ARNOLD ET AL 2006, KOPP/SCHWEDE 2004, SCHWEDE ET AL 2003, GUEXPEITSCH]. Die Banane wird gewählt, da zwischen dem TLP aus *Vitis vinifera* und dem TLP der Banane (*Musa acuminata*) mit 79 % die höchste Sequenzidentität besteht. In Abbildung 39 ist die hypothetische Proteinstruktur, die mit Swiss Model erstellt und mit Chimera bearbeitet wird, dargestellt.



**Abbildung 39: Proteinmodell des Thaumatin-ähnlichen Proteins ( gi 89242712) aus *Vitis vinifera*, erstellt mit Swiss Modell und bearbeitet mit Chimera. Als strukturelle Grundlage wird das TLP aus der Banane (gi 88191901) verwendet. Die Cysteine, die insgesamt acht Disulfidbrücken ausbilden, sind in grau und gelb (Schwefelatom) eingezeichnet.**

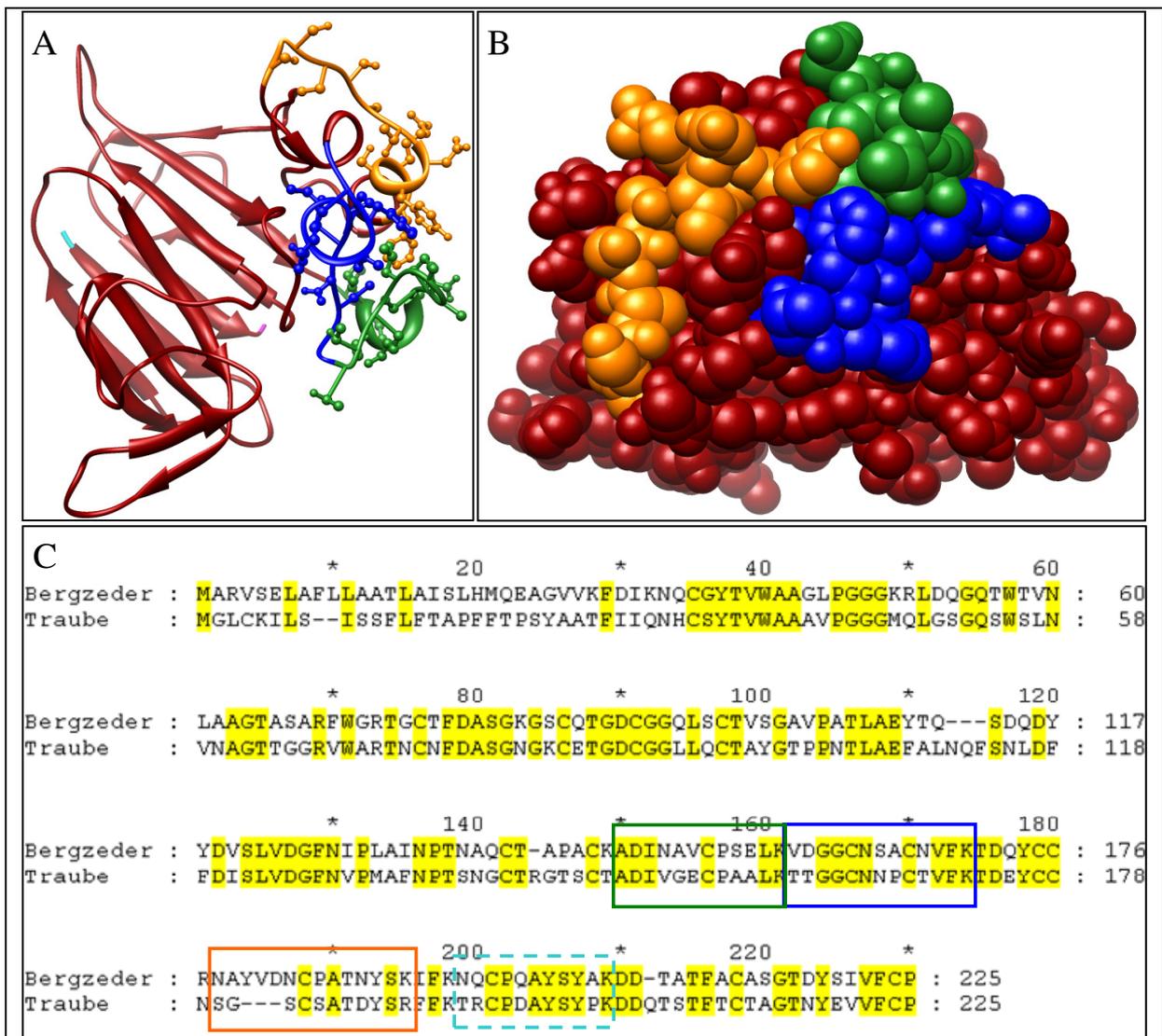
Die Struktur der Thaumatin-ähnlichen Proteine ist durch drei strukturelle Domänen gekennzeichnet. Domäne I bildet das zentrale  $\beta$ -Faltblattmotiv. Dieses ist einerseits mit Domäne II, einem Helix-Motiv, und andererseits mit Domäne III, einem kurzen  $\beta$ -Faltblattmotiv mit einem Loop verbunden. Stabilisiert wird diese Struktur über acht Disulfidbrücken, die durch sechzehn konservierte Cysteine gebildet werden [LEONE ET AL 2007]. Die korrekte Ausbildung der Disulfidbrücken scheint für die Bindungsfähigkeit des IgE von großer Bedeutung zu sein [BREITENEDER 2004].

Abbildung 40 stellt die strukturelle Übereinanderlagerung der Thaumatin-ähnlichen Proteine aus der Weinbeere und der Banane sowie das zugehörige Sequenzalignment dar.



Für das Allergen Jun a 3 aus der Bergzeder konnten bereits von SOMAN ET AL (2000) IgE-Bindungsepitope bestimmt werden. Während die drei Peptide ADINAVCPSELK, VDGGCNSACNVFK und NAYVDNCPATNYSK eindeutig als IgE-Bindungsepitope bestimmt werden konnten, dient ein viertes Peptid NQCPQAYSYAK wahrscheinlich ebenfalls als IgE-Bindungsepitop, eine eindeutige Zuordnung konnte jedoch nicht erreicht werden [SOMAN ET AL 2000]. In Abbildung 41 ist das Proteinmodell des TLP der Weinbeere (gi 89242712), basierend auf dem TLP der Banane (gi 88191901) dargestellt, wobei die entsprechend aus der Bergzeder bekannten Bindungsepitope farblich markiert sind.

Die IgE-Bindungsepitope von Jun a 3 liegen auf der Oberfläche des Proteins, alle auf einer Seite in der Helix-Loop-Region [SOMAN ET AL 2000]. Dies wird auch in der Abbildung 39 deutlich. Die Aminosäurezusammensetzung zwischen der Weinbeere und der Bergzeder unterscheidet sich im Bereich der Epitope jedoch teilweise deutlich (Abbildung 41C).



**Abbildung 41: IgE-Bindungsepitope des TLP (gi 6940772) aus der Bergzeder [nach SOMAN ET AL 2000], übertragen auf ein Proteinmodell des TLP (gi 89242712) aus der Weinbeere.**

(A) Proteinmodell des TLP aus der Weinbeere mit den aus der Bergzeder bekannten IgE-Bindungsepitopen, die farblich hervorgehoben sind. Im Bereich der potentiellen IgE-Bindungsepitope sind die Aminosäureseitenketten dargestellt. Grün: Peptid ADINAVCPSELK; Blau: Peptid VDGGCNSACNVFK; Orange: Peptid NAYVDNCPATNYSK; cyan: N-terminale AS; magenta: C-terminale AS

(B) Sphärische Ansicht des Proteinmodells mit den farblich gekennzeichneten IgE-Bindungsepitopen entsprechend (A)

(C) Sequenzalignment des TLP aus der Weinbeere mit dem TLP aus der Bergzeder, wobei identische Aminosäuren gelb unterlegt sind. Die Sequenzidentität liegt bei 50 %. Die aus der Bergzeder bekannten IgE-Bindungsepitope sind farblich umrandet, wobei die drei eindeutig zugeordneten IgE-Bindungsepitope in grün, blau und orange umrandet sind; das vierte potentielle, jedoch nicht eindeutig nachgewiesene IgE-Bindungsepitop ist hellblau gestrichelt umrandet.

Das Sequenzalignment wird mittels ClustalX und GeneDoc erstellt, die Proteinmodelle werden mit Hilfe von Swiss Model erstellt und mit Chimera bearbeitet.

## Endochitinase

Die Klasse IV Endochitinase, die PASTORELLO ET AL 2003 als potentielles Allergen in jungem italienischem Rotwein diskutieren, wird im Rahmen dieser Arbeit auch in dem untersuchten Portugieser Rotwein aus der Pfalz identifiziert. Da auch Chitinasen verbreitete Allergene sind, wird ein Sequenzvergleich der Klasse IV Endochitinase aus *Vitis vinifera*, die in dem untersuchten Rotwein enthalten ist, mit bekannten Allergenen aus der Gruppe der Chitinasen vorgenommen (Tabelle 24). Als Nahrungsmittelallergene werden Pers a 1 aus der Avocado, Cas s 5 aus der Kastanie, mus xp aus der Banane sowie Zis m 1 aus der Jujube (Chinesische Dattel) für den Vergleich eingesetzt, welche um Hev b 11 aus dem Kautschukbaum und Der f 15 aus der Milbe ergänzt werden.

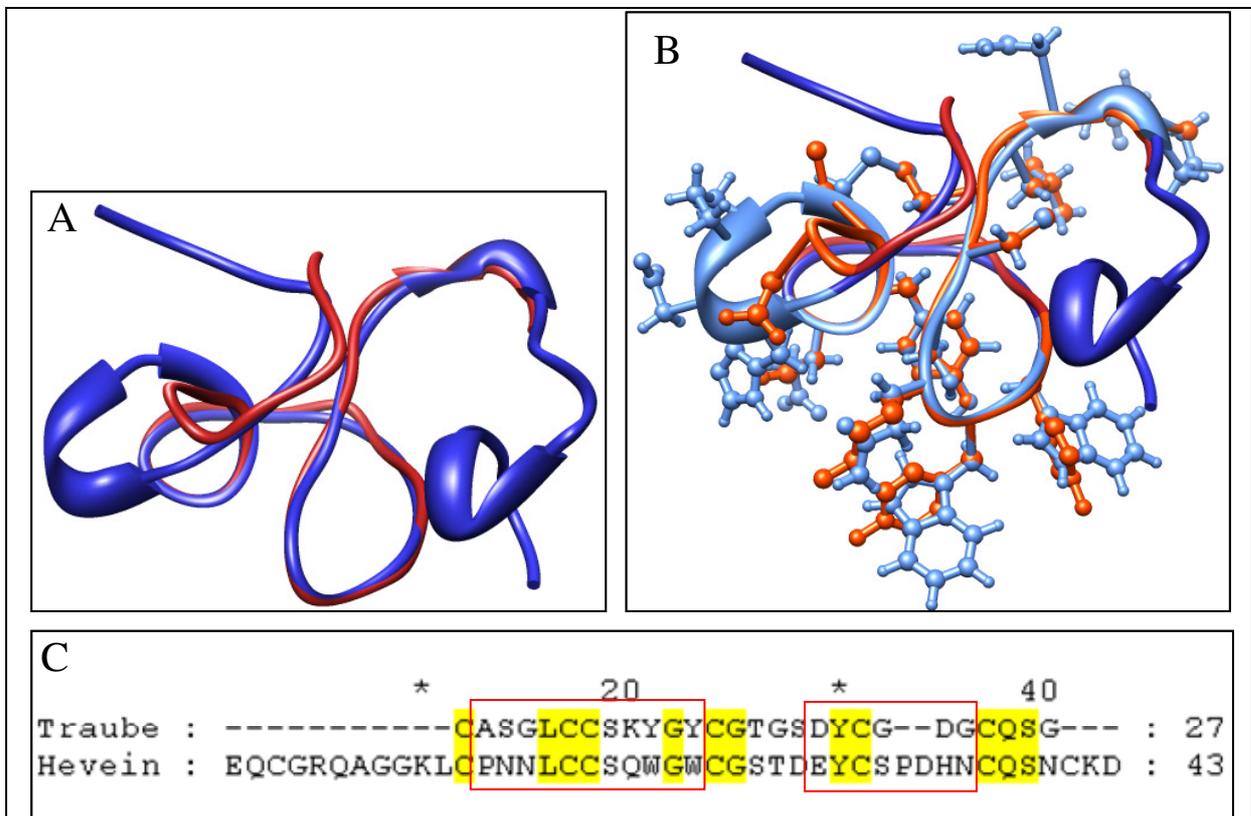
**Tabelle 24: Sequenzidentitäten und Ähnlichkeiten zwischen der Klasse IV Endochitinase aus der Weinbeere und den als Nahrungsmittelallergenen bekannten Chitinasen aus Avocado, Banane und Jujube (Chinesische Dattel) sowie aus Latex und Milbe.** Die Werte werden durch ein Sequenzalignment mit ClustalX und GeneDoc ermittelt. Aufgeführt sind die Sequenzidentitäten sowie die Sequenzähnlichkeiten (Sequenzidentität / Sequenzähnlichkeit)

	<b>Weinbeere</b> <b>Klasse IV Endochitinase <i>Vitis vinifera</i></b> gi 2306811
<b>Nahrungsmittel</b>	
<b>Avocado (Pers a 1)</b> gi 3201547	36 % / 51 %
<b>Kastanie (Cas s 5)</b> gi 1354129	1 % / 4 %
<b>Banane (Mus xp)</b> gi 40806506	23 % / 32 %
<b>Jujube (Ziz m 1)</b> gi 61225281	5 % / 14 %
<b>Latex/Milbe</b>	
<b>Latex (Hev b 11)</b> gi 27526732	35 % / 47 %
<b>Milbe (Der f 15)</b> gi 156938895	5 % / 10 %

Für die allergene Wirksamkeit der Chitinasen ist die N-terminale Hevein-Domäne von Bedeutung [DIAZ-PERALES ET AL 1998]. In Abbildung 42 ist ein Strukturvergleich der N-terminalen Hevein-Domäne mit dem entsprechenden Sequenzausschnitt der Klasse IV Endochitinase (Aminosäure 25 bis 51) aus der Weinbeere dargestellt. Die Struktur des Ausschnittes der Endochitinase wird mit Hilfe von Swiss Model auf Grundlage der Struktur von Hevein erstellt [ANDERSEN ET AL 1993]. Hevein, ein Chitin-bindendes Protein, ist das N-terminale Fragment von Prohevein, einem Protein des Kautschukbaumes (*Hevea brasiliensis*). Es wird als 20 kDa

Vorläuferprotein synthetisiert und posttranslational in ein 5 kDa reifes Hevein und eine 14 kDa-C-Domäne gespalten. Hevein und hierbei insbesondere die 5 kDa Domäne wird für einen Großteil der allergischen Reaktionen gegenüber Latex verantwortlich gemacht. In diesem Bereich sind bislang zwei potentielle IgE-Bindungsstellen identifiziert worden [BEEZHOLD ET AL 1997, ALENIUS ET AL 1996].

Die Sequenzidentität zwischen dem Sequenzbereich der Aminosäuren 25 bis 51 der Klasse IV Endochitinase aus der Weinbeere und dem Hevein liegt bei 30 %, die Sequenzähnlichkeit bei 44 %. Im Bereich der IgE-Bindungsstellen variiert die Aminosäurezusammensetzung jedoch stark, so dass eine Kreuzallergenität, wie sie zwischen Latex und Früchten beschrieben ist, nicht zu erwarten ist.



**Abbildung 42: Vergleich der Proteinstruktur zwischen einem Sequenzabschnitt der Endochitinase aus der Weinbeere und dem Hevein.**

(A) Überinandergelagerte Proteinmodelle eines Sequenzausschnittes der Endochitinase (Aminosäuren 25 bis 51) aus der Weinbeere und des Heveins; rot: Peptidkette der Endochitinase (Aminosäuren 25 bis 51) aus *Vitis vinifera*; blau: Peptidkette des Heveins aus *Hevea brasiliensis*

(B) Überinandergelagerte Proteinmodelle eines Sequenzausschnittes der Endochitinase (Aminosäuren 25 bis 51) aus der Weinbeere und des Heveins. Im Bereich der zwei aus dem Hevein bekannten potentiellen IgE-Bindungssepitope sind die Aminosäureketten dargestellt. Rot: Peptidkette der Endochitinase (Aminosäuren 25 bis 51) Weinbeere; blau: Peptidkette des Heveins

(C) Sequenzalignment der Klasse IV Endochitinase aus der Weinbeere und dem Hevein aus dem Kautschukbaum. Die Sequenzidentität in dem für die Erstellung der Struktur genutzten Bereich liegt bei 30 %.

Das Sequenzalignment wird mittels ClustalX und GeneDoc erstellt, die Proteinmodelle werden mit Hilfe von Swiss Model erstellt und mit Chimera bearbeitet.

### 3.7.2 Western Blots

Der Western Blot wird mit einem Thaumatin-Antikörper durchgeführt und dient der spezifischen Erkennung Thaumatin-ähnlicher Proteine im Wein. Wie durch die massenspektrometrische Analyse gezeigt werden kann, sind eine Reihe Thaumatin-ähnlicher Proteine im Wein enthalten, deren Reaktion mit einem Thaumatin-Antikörper, der gegen das Thaumatin aus *Thaumatococcus daniellii* generiert wird, getestet werden soll. Tabelle 25 stellt den Vergleich der Sequenzen zwischen dem Thaumatin aus *Thaumatococcus daniellii* und den Thaumatin-ähnlichen Proteinen, die im Wein gefunden werden, dar. Die Kristallstruktur des Thaumatins wurde bereits 1992 aufgeklärt [OGATA ET AL 1992]. Es zeigt sich, dass eine Sequenzidentität von 54 bzw. 55 % sowie eine Sequenzähnlichkeit von 63 bis 67 % besteht. Das entsprechende Sequenzalignment ist in Abbildung 43 aufgeführt, welches mit ClustalX und Gene Doc erstellt wird.

Dem zur Folge sollten die Thaumatin-ähnlichen Proteine mit dem Thaumatin-Antikörper spezifisch reagieren. Ziel des Western Blots ist es, diese Reaktion zu veranschaulichen, so dass darauf aufbauend beispielsweise eine Affinitätssäule entwickelt werden kann, um Thaumatin-ähnliche Proteine aus dem Wein aufzureinigen.

**Tabelle 25: Sequenzidentitäten und Ähnlichkeiten zwischen Thaumatin-ähnlichen Proteinen aus der Traube und dem Thaumatin aus der südafrikanischen Staude (*Thaumatococcus daniellii*).** Die Werte werden durch ein Sequenzalignment mit ClustalX und GeneDoc ermittelt. Aufgeführt sind die Sequenzidentitäten sowie die Sequenzähnlichkeiten (Sequenzidentität / Sequenzähnlichkeit)

	Weinbeere ( <i>Vitis vinifera</i> )				
	VVTL 1	TLP	TLP	TLP	hypothetisches TLP
	gi 2213852	gi 89242712	gi 7406716	gi 7406714	gi 147784586
<b>Thaumatin</b> ( <i>Thaumatococcus daniellii</i> ) gi 490038	55 % / 67 %	54 % / 63 %	55 % / 66 %	55 % / 66 %	54 % / 64 %

```

                *           20           *           40           *           60
Thaumat in : -----ATFEIVNRCSYTVWAAAASKGDAALDAGGRQLNSGES : 36
Traube1 : MRFTTTLPIILIPLLLSLFTSTHAATFDILNKCTYTVWAAAASPG-----GRRRLDSGQS : 54
Traube2 : MGLCKILSISSFLFTAPFFTPSYAATFIIQNHCSYTVWAAAAPG-----GGMQLGSGQS : 54
Traube3 : MRFTTTLPIILIPLLLSLFTSTHEATFDILNKCTYTVWAAAASPG-----GRRRLDSGQS : 54
Traube4 : -----LIQ-----VAAVPG-----GGMQLGSGQS : 19
Traube5 : MGLCKILSISSFLLTTLFFTSYAATFNIQNRCSTYTVWAVAIIPG-----GGMRLGSGQS : 54

                *           80           *           100          *           120
Thaumat in : WTINVEPGTKGGKIWARTDCYFDDSGRIGICRTGDCGGLLQCKRFRPPTTLAEFSLNQYG : 96
Traube1 : WTITVNPGETTNARIWGRTSCTFDANGRGKCECTGDCNGLLECQGYGSPNTLAEFALNQPN : 114
Traube2 : WSLNVNAGTTGGRVWARTNCFDASNGKCECTGDCGGLLQCTAYGTPNTLAEFALNQFS : 114
Traube3 : WTITVNPGETTNARIWGRTSCTFDANGRGKCECTGDCNGLLECQGYGSPNTLAEFALNQPN : 114
Traube4 : WSLNVNAGTTGGRVWARTNCFDASNGKCECTRDGCGLLQCTAYGTPNTLAEFALNQFS : 79
Traube5 : WSLDVKAGTTGGRVWARTGCSFDASNGKCECTGDCGGRLLQCKAFGTPNTLAEFALNQFS : 114

                *           140          *           160          *           180
Thaumat in : -KDYIDISNIKGFNVPMDFSPTTRGC-RGVRC AADIVGQCPAKLKAPGGCNDACTVFQT : 154
Traube1 : NLDYIDISLVDGFNIPMDFS----GC-RGIQCSVDINGQCPSELKAPGG-CNNPCTVFKT : 168
Traube2 : NLDFFDISLVDGFNVPMAFNPTSNGCTRGTSCTADIVGECPAALKTTGG-CNNPCTVFKT : 173
Traube3 : NLDYIDISLFDGFNIPMDFS----GC-RGIQCSADINGQCPSELKAPGG-CNNPCTVFKT : 168
Traube4 : NLDFFDISLVDGFNVPMAFNPTSNGCTRGISCTADIVGECPAALKTTGG-CNNPCTVFKT : 138
Traube5 : NLDFFDISLVDGFNVPMAFNPTSKGCTRGISCTANIVGQCPAALKTAGG-CNNPCTVFKT : 173

                *           200          *           220          *
Thaumat in : SEYCCTTG--KCGPTEYSRFFKRLCPDAYSIVLD-KPTTVT---CPGSSNYRVTFCTPA : 207
Traube1 : NEYCCTDGPSCGPTTYSKFFKDRCPDAYSYPQDDKTSLEFT---CPSGTNYKVTFCP-- : 222
Traube2 : DEYCCNSG--SCSATDYSRFFKTRCPDAYSYPKDDQTSFT---CTAGTNYEVVFCP-- : 225
Traube3 : NEYCCTDGPSCGPTTYSKFFKDRCPDAYSYPQDDKTSLEFT---CTSGTNYKVTFCP-- : 222
Traube4 : DEYCCNSG--SCNATDYSRFFKTRCPDAYSYPKDDQTSFT---CPTGTNYEVVFCP-- : 190
Traube5 : DEYCCNSG--SCSATDYSRFFKTRCPDAYSYPKDDQTSFT---CPAGTNYEVIFCP-- : 225

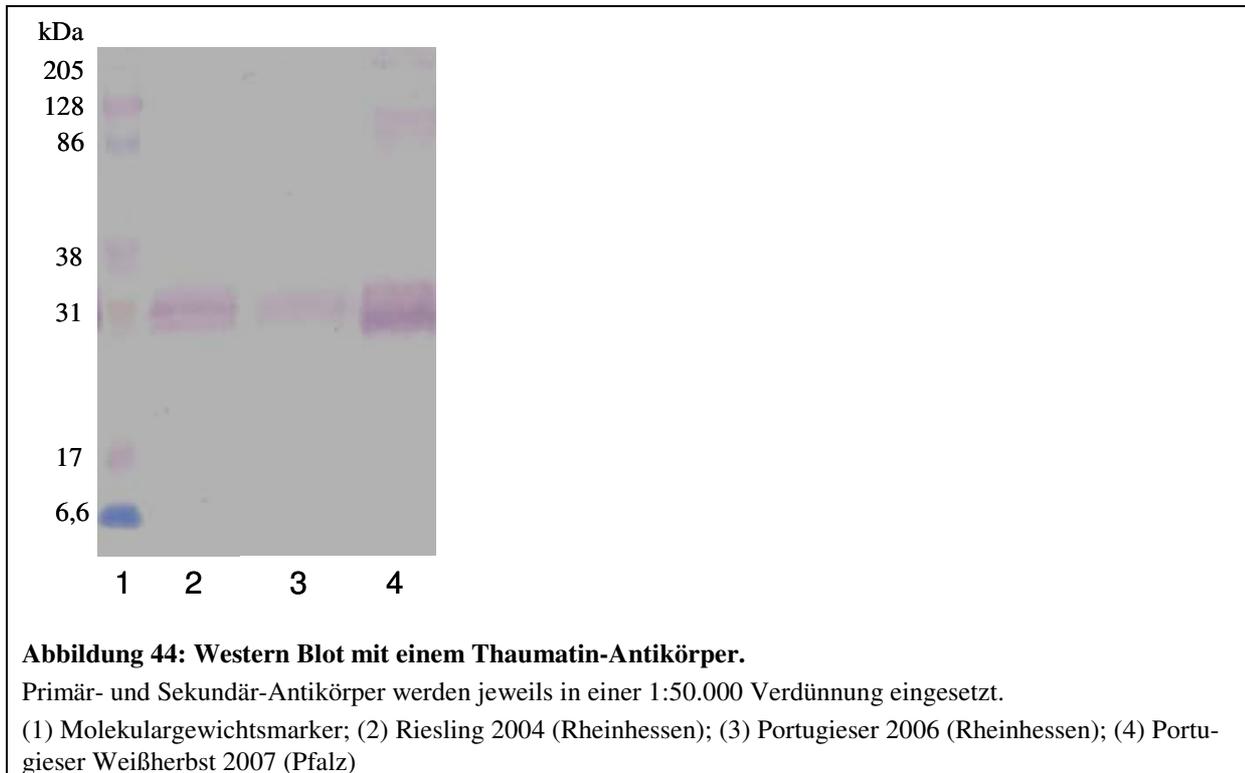
```

**Abbildung 43: Sequenzalignent zwischen Thaumatococcus daniellii und den im Wein enthaltenen TLP aus Vitis vinifera.**

Traube1 = VVTL1 (gi 2213852); Traube2 = TLP gi 89242712; Traube3 = gi 7406716; Traube4 = TLP gi 7406714; Traube5 = hypothetisches TLP gi 147784586. Die Sequenzidentität liegt bei 54 bzw. 55 %.

Die Ergebnisse des Western Blots sind in Abbildung 44 dargestellt. Als Primärantikörper wird ein kommerziell erworbener, polyklonaler Thaumatococcus daniellii-Antikörper aus dem Huhn eingesetzt. Als Sekundärantikörper findet ein anti-Chicken-IgG-AK mit gekoppelter alkalischer Phosphatase Anwendung. Als Weinsorten werden jeweils ein Weißwein (Riesling 2004 aus Rheinhessen), ein Weißherbst (Portugieser 2007 aus Rheinhessen) sowie ein Rotwein (Portugieser 2006 aus Rheinhessen) gewählt. Es ist deutlich zu erkennen, dass bei allen eingesetzten Weinsorten eine Reaktion mit dem Thaumatococcus daniellii-Antikörper bei ca. 30 kDa auftritt. Hierbei handelt es sich um die Thaumatococcus daniellii-ähnlichen Proteine im Wein. Die Verschiebung des Molekulargewichtes der TLP, die im Molekulargewichtsbereich von 20 kDa bis 25 kDa zu erwarten sind, ist vermutlich auf das Laufverhalten im Gel zurückzuführen. Beim Riesling sind zwei Banden bei ca. 30 kDa zu erkennen, während beim Portugieser Rotwein keine Banden unterschieden werden können. Beim Portugieser Weißwein zeigt sich eine vergleichsweise intensive Bande, die auch nicht weiter unterteilt werden kann. Im Gegensatz zu den anderen

Weinsorten zeigen sich beim Portugieser Weißherbst weitere schwache Banden bei 100 kDa und 110 kDa sowie bei 205 kDa.

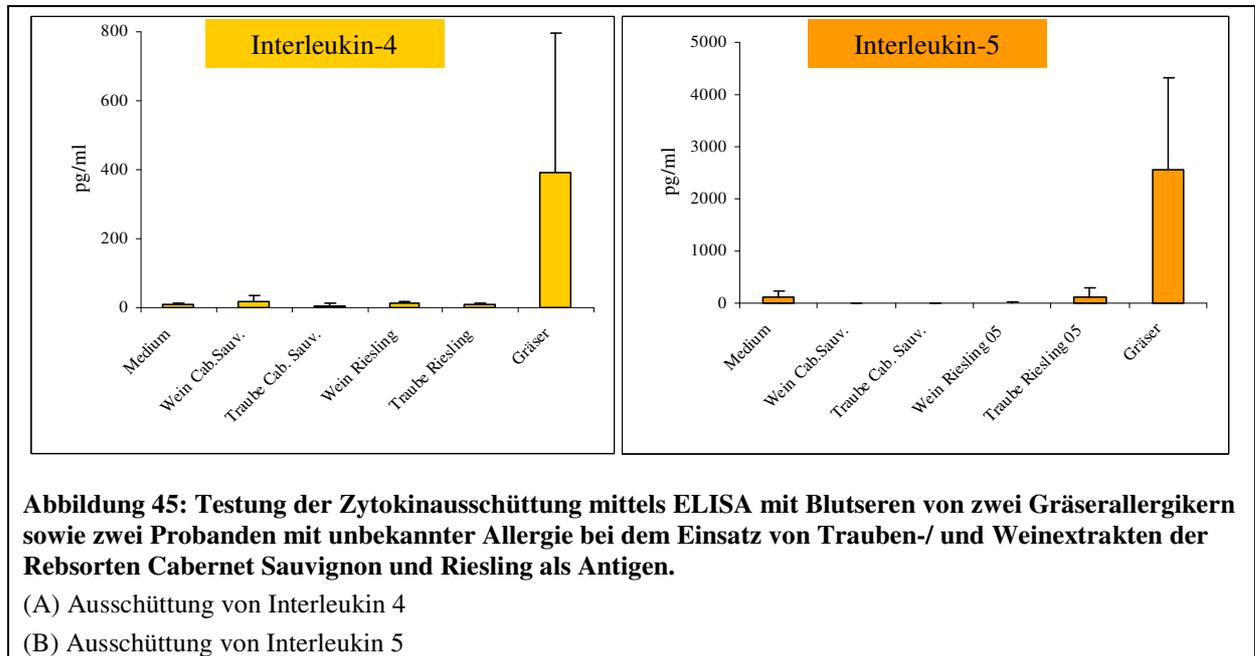


### 3.7.3 Klinische Tests

Erste Untersuchungen zur Allergenität von Weinproteinen werden in der Hautklinik der Universität Mainz in der AG Saloga durchgeführt. Hierzu werden Blutseren von zwei Gräserallergikern und zwei Probanden mit nicht bekannter Allergie eingesetzt, deren Reaktion auf Wein- und Traubenextrakte getestet wird.

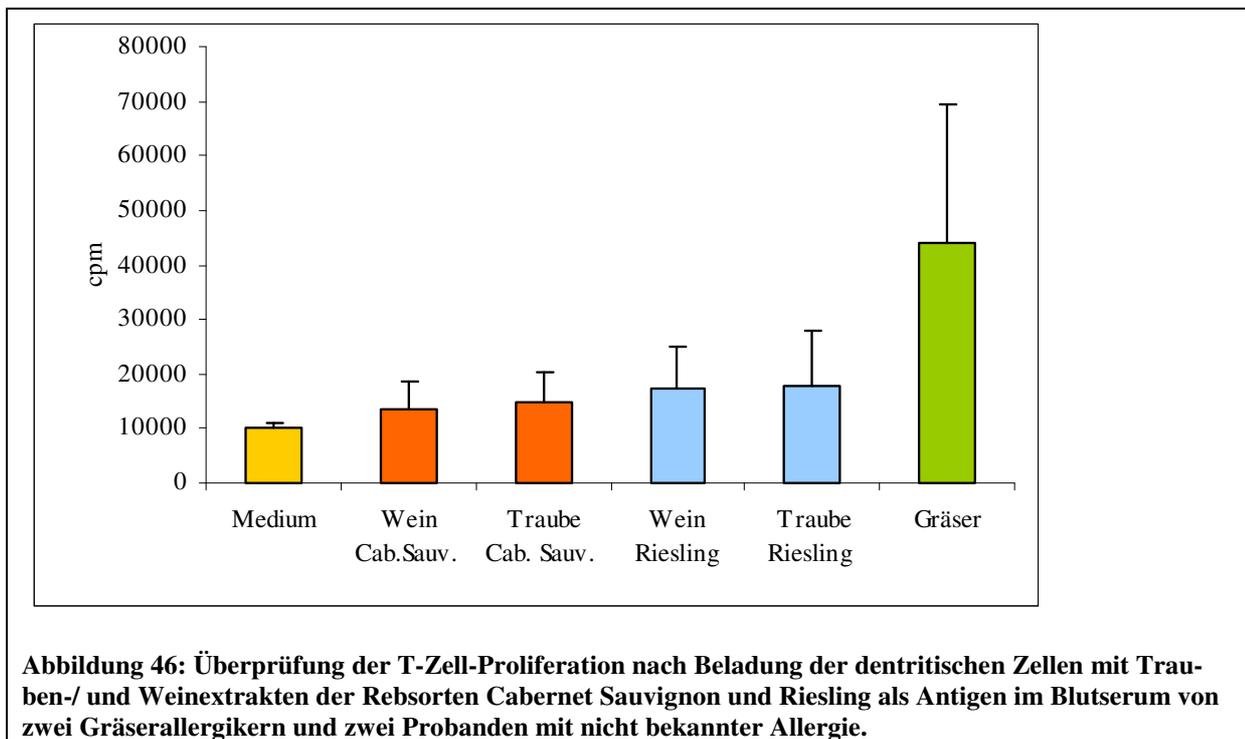
Eine Immunglobulin E (IgE) vermittelte Reaktion vom Soforttyp auf die Trauben-/ und Weinextrakte wird anhand der Ausschüttung der von den T<sub>H</sub>2-Zellen sezernierten Zytokine Interleukin-4 (IL-4) und Interleukin-5 (IL-5) überprüft (Abbildung 45). IL-5 und insbesondere IL-4 bewirken die Aktivierung und das Wachstum von B-Zellen und begünstigen die Entwicklung von T<sub>H</sub>2-Zellen gegenüber T<sub>H</sub>1-Zellen, was eine Voraussetzung der IgE-vermittelten Reaktion darstellt. Außerdem fördern IL-4 sowie IL-5 eine allergische Reaktion indem sie einerseits das Wachstum von Mastzellen und andererseits das Wachstum und die Differenzierung der Eosinophilen fördern, da beide Zelltypen eine Verstärkung der IgE-Produktion bewirken. Eine Erhöhung dieser Interleukine würde somit auf eine IgE vermittelte Reaktion des Körpers hindeuten.

Als Trauben-/ und Weinextrakte werden die rote Rebsorte Cabernet Sauvignon sowie die weiße Rebsorte Riesling aus dem Rheingau eingesetzt. Die Proben werden mittels Dialyse und Gefriertrocknung aufkonzentriert.



In Abbildung 45 ist eindeutig zu erkennen, dass im Blut der untersuchten Probanden durch die Trauben- und Weinextrakte keine Ausschüttung von IL-4 oder IL-5 und somit keine allergische Reaktion induziert wird.

Des Weiteren wird die Proliferation von T-Zellen nach Beladung von dendritischen Zellen mit Trauben- und Weinextrakten als Antigenen getestet. Wie Abbildung 46 zeigt, setzt keine signifikante Proliferation der T-Zellen nach Kontakt mit dem von den dendritischen Zellen präsentierten Antigen (Wein, Traube) ein, so dass im Folgenden auch keine immunologisch vermittelte Reaktion stattfinden kann.



Eine signifikante allergische Reaktion auf Wein bzw. Weinbeeren kann anhand dieser Versuche somit nicht gezeigt werden.

## 4. Diskussion

### 4.1 Weinanbaugebiete und Weinsorten

In der vorliegenden Arbeit werden vor allem Weinsorten aus den Weinanbaugebieten Rheinhessen, Rheingau und der Pfalz eingesetzt. Aufgrund der Verfügbarkeit und des direkten Kontaktes mit den Erzeugern werden die naheliegenden Weinanbaugebiete gewählt. So konnte ich von den Winzern Informationen zu den Methoden der Weinherstellung erhalten.

Auch zeichnen sich Mainz und das Weinanbaugebiet Rheinhessen durch die Aufnahme in den Kreis der Great Wine Capitals seit 2008 aus. Rheinhessen und die Pfalz stellen zudem mit einer Anbaufläche von 26.334 ha bzw. 23.389 ha (Statistisches Bundesamt Wiesbaden 2007) die größten Weinanbaugebiete Deutschlands dar.

Aus dem Rheingau (mit einer Rebfläche von 3.097 ha) wird Wein bezogen, da es durch die Forschungsanstalt Geisenheim möglich ist, Analysedaten zu erhalten und von den zwei eingesetzten Rebsorten Riesling und Cabernet Sauvignon sowohl Trauben als auch den daraus hergestellten Most und Wein zu beziehen.

Die Weißweinrebsorte Riesling wird in den Versuchen eingesetzt, da diese mit 33,7 % die häufigste Weißweinrebsorte in Deutschland darstellt (Statistisches Bundesamt Wiesbaden 2007). Der Sauvignon Blanc als weitere weiße Rebsorte wird gewählt, da die umfassende Identifizierung der Weinproteine von KWON (2004) bei einem Sauvignon Blanc vorgenommen wurde und somit eine Vergleichsmöglichkeit zwischen den in der Literatur analysierten Daten aus französischem Wein mit dem in Deutschland angebauten Sauvignon Blanc gegeben ist. Als weitere Weißweinsorten werden die in Rheinhessen angebauten Rebsorten Morio Muskat und Gewürztraminer eingesetzt.

Als Rotweinrebsorten wird auf die in Deutschland am häufigsten angebauten Sorten Dornfelder, Spätburgunder und Portugieser zurückgegriffen. Der Cabernet Sauvignon wird aufgrund der Verfügbarkeit von Trauben, Most und Wein der gleichen Anbaufläche ausgewählt. Auch als Rotweine ausländischer Anbaugebiete werden regionaltypische Rebsorten der entsprechenden Länder gewählt.

Auch aus Sicht des Verbrauchers scheint es interessant, die auf dem Weinmarkt am weitesten verbreiteten Sorten zu untersuchen.

## 4.2 Proteine im Wein

Bis zum heutigen Zeitpunkt gibt es nur wenige umfassende Analysen über Proteine im Wein. Obwohl bereits 1959 die erste Veröffentlichung über Traubenproteine erschien und bereits in den 70er Jahren von Proteinen im Wein berichtet wird, dauert es bis 2004 bis erstmalig eine Identifizierung der Weinproteine erfolgte. Seit Beginn dieses Jahrhunderts häufen sich die Veröffentlichungen zur Proteinzusammensetzung verschiedener Weinsorten, wobei es ausschließlich ausländische Arbeitsgruppen sind, die dies untersuchen, so dass es aktuell keine umfassenden Identifizierungen deutscher Weine gibt. Dies wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmalig erreicht, wobei die Identifizierung von Proteinen eines Rotweins nach meinem Wissensstand bislang noch überhaupt nicht publiziert wurde.

Auch im Hinblick auf die EU-Richtlinie 2007/68/EG der Kommission vom 27. November 2007 zur Änderung von Anhang IIIa der Richtlinie 2000/13/EG des Europäischen Rates hinsichtlich bestimmter Lebensmittelzutaten sind Proteinuntersuchungen im Wein von Bedeutung. Diese Richtlinie „enthält eine Liste von Lebensmittelzutaten, die bei der Etikettierung von Lebensmitteln angegeben werden müssen, da sie bei empfindlichen Personen wahrscheinlich unerwünschte Reaktionen hervorrufen“ [EU-Richtlinie 2007/68/EG]. Diese beinhaltet auch in der Weinbereitung eingesetzte Schönungsmittel, die möglicherweise in den Wein eingebracht werden könnten.

Schönungsmittel wie die proteinhaltigen Schönungsmittel Gelatine und Kasein oder auch die häufig eingesetzten Bentonite verfolgen das Ziel, Proteine zu entfernen und werden in der Regel selbst wieder eliminiert. Das in ausgebauten Weinen trotz des Einsatzes von Schönungsmitteln Proteine zu finden sind, ist einerseits darauf zurückzuführen, dass nicht alle Proteine mit den Schönungsmitteln in den entsprechend eingesetzten Mengen interagieren. Aufgrund einer Beeinflussung von organoleptischen Eigenschaften ist der Schönungsmiteleinsatz auf bestimmte Mengen restringiert. Hinzu kommt, dass einige Proteine eine starke Resistenz gegenüber sauren und proteolytischen Bedingungen zeigen. Während das Vorhandensein von Schönungsmitteln aufgrund der aufgeführten EU-Richtlinie in den vergangenen Jahren verstärkt untersucht wurde, auch von einer deutschen Arbeitsgruppe, liegt der Fokus der vorliegenden Arbeit auf dem Vorhandensein von Proteinen, die natürlicherweise in der Weinbeere vorhanden sind und in den Wein übergehen. Welche Faktoren einen Einfluss auf den Proteingehalt der Weinbeere und des Weins ausüben, wird im Folgenden erläutert.

## **Einflussfaktoren auf den Proteingehalt der Weinbeere und im Wein**

Der Proteingehalt der Weinbeere ist von deren Reifegrad abhängig. Je reifer das Erntegut ist, desto höher liegt der Proteingehalt. Für ein Thaumatin-ähnliches Protein, ein Lipid Transfer Protein sowie für Chitinasen konnte gezeigt werden, dass diese Proteine gleichzeitig mit dem Zucker während der Reifung der Trauben akkumulieren, was für die Resistenz gegenüber Pathogenen von großer Bedeutung ist [MURPHEY ET AL 1989, FERREIRA ET AL 2002, SALZMANN ET AL 1998, TATTERSALL ET AL 1997, RUIZ-LARREA ET AL 1998]. Der Einfluss des Reifegrades auf die Proteinkonzentration wird im Rahmen dieser Arbeit nicht betrachtet.

Welche Proteine der Weinbeere in den Wein übergehen, wird durch die Art der Weinbehandlung und hierbei insbesondere die Schönungsmaßnahmen maßgeblich beeinflusst. Weit verbreitet ist der Einsatz von Bentonit als Klär- und Fällmittel insbesondere zur Reduktion von Eiweißtrübungen. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung des Weines mit Bentonit zu einer signifikanten, wenn auch unspezifischen, Reduktion der Proteinkonzentration führt [FUKUI/YOKOTSUKA 2003, VINCENZI ET AL 2005, FERREIRA ET AL 2002].

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wird der Riesling aus dem Rheingau (Forschungsanstalt Geisenheim) ausschließlich mit Bentonit geschönt. Hierbei wird der Most vor der Gärung mit 200 g/hl Bentonit versetzt. Der Riesling sowie der Sauvignon Blanc aus Rheinhessen (Weingut Fleischer, Mainz) werden mit „Mostgelatine mit Kasein“ zur Gerbstoffreduzierung behandelt. Bei Bedarf wird nach der Gärung 100 g/hl Bentonit zugegeben.

### **4.3 Herkunft der Proteine im Wein**

Weinbeeren enthalten ein breites Spektrum an Proteinen. Einige dieser Proteine überstehen den Prozess der Weinbereitung und sind im ausgebauten Wein zu finden. Neben den Traubenproteinen wird das Vorhandensein von Proteinen, die durch Mikroorganismen in den Wein freigesetzt werden, diskutiert. Der Transfer von Proteinen aus der Hefe in den Wein erfolgt durch die Autolyse. Auch können proteolytische Enzyme aus der Hefe zu einer Hydrolyse von Mostproteinen führen [FERREIRA ET AL 2002].

FERREIRA ET AL (2000) postulieren auf Grundlage immunologischer Untersuchungen, dass die Weinproteine nahezu vollständig aus der Weinbeere und hierbei insbesondere aus dem Fruchtfleisch stammen, wobei andererseits nicht alle Proteine aus dem Fruchtfleisch in den Wein gelangen. Als Wein findet hierbei Assario, ein portugiesischer Weißwein, Anwendung. Die Arbeitsgruppe um DAMBROUCK (2003), die Chardonnay Wein untersucht, findet neben den Traubenproteinen Proteine aus der Hefe im Wein. Dies sind vor allem Glykoproteine, die während der alkoholischen Gärung freigesetzt werden. FUKUI und YOKOTSUKA (2003) ordnen

in Chardonnay und in Cabernet Sauvignon ca. 90 % der Proteine dem Traubensaft zu. Der restliche Anteil setzt sich aus Hefeproteinen sowie Proteinen der Traubenschalen und der Traubenkerne zusammen, die während der Weinbereitung in den Wein übergehen. Bestätigt werden diese Ergebnisse von OKUDA ET AL (2006), die die Hauptproteine in Chardonnay mittels N-terminaler Sequenzierung als Traubenproteine identifizieren. Auch CILINDRE ET AL (2008) ordnen den Hauptteil der identifizierten Proteine eines Chardonnay Weines mittels 2D-Gelelektrophorese und LC-MS/MS den Traubenproteinen zu.

KWON (2004) identifiziert mittels massenspektrometrischer Analyse fünf Proteine aus der Traube, zwölf Proteine aus der Hefe, zwei Proteine aus Bakterien und ein Protein aus einem Pilz bei einem Sauvignon Blanc. Die geringe Anzahl der Traubenproteine erklärt der Autor durch unvollständige Datenbanken in diesem Bereich. Nach Veröffentlichung des Genoms von *Vitis vinifera* im vergangenen Jahr ist das Problem der unvollständigen Datenbanken behoben. In der vorliegenden Arbeit werden durch eine massenspektrometrische Analyse in einem Portugieser Rotwein fünfzehn Proteine aus der Weinbeere der Gattung *Vitis* sowie sechs Proteine aus der Hefe *Saccharomyces cerevisia* identifiziert.

Die unterschiedlichen Aussagen zur Herkunft der Proteine im Wein sind auch auf verschiedene Bestimmungs- und Analysemethoden zurückzuführen. Durch die massenspektrometrische Analyse ist eine eindeutige Zuordnung möglich, so dass diese im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzt wird. Der Schwachpunkt der Massenspektrometrie liegt in der Nachweisgrenze der coomassiegefärbten SDS-PAGE, da nur die mit Coomassie angefärbten Banden für die massenspektrometrische Analyse eingesetzt werden können.

#### **4.3.1 Einfluss der Rebsorte und der Weinherstellung auf die Proteinzusammensetzung im Wein**

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden kann, wird in allen untersuchten Weinsorten ein gemeinsames Spektrum an Proteinen gefunden. Pathogenese bezogene (PR) Proteine stellen hierbei den größten Anteil dar. Dies trifft auf verschiedene Rebsorten, unterschiedliche Anbauggebiete innerhalb Deutschlands, verschiedene Jahrgänge sowie verschiedene Weinbereitungsmaßnahmen zu. Es sind jedoch auch grundlegende Unterschiede insbesondere zwischen roten und weißen Rebsorten zu beobachten (Kapitel 3.4.4, Abbildung 26), so dass die Rebsorte die Proteinzusammensetzung mitbedingt. Auch die Analyse verschiedener Weißweinsorten aus dem gleichen Anbaugbiet bestätigt diese Aussage (Kapitel 3.4.1.1 Abbildung 13).

Der Reifegrad der Weinbeeren hat ebenso einen Einfluss auf das Proteinspektrum im Wein, wobei die Gesamtkonzentration an PR-Proteinen zunimmt, die Diversität jedoch abnimmt [MONTEIRO ET AL 2006]. Einige PR-Proteine, vor allem Thaumatin-ähnliche Proteine und Chitinasen, werden auch in gesunden Trauben reifeabhängig exprimiert [TATTERSALL ET AL 1997, MONTEIRO ET AL 2006, FERREIRA ET AL 2002, ROBINSON/DAVIES 2000, WATERS ET AL 1998]. Außerdem wird die Produktion von PR-Proteinen durch Umweltfaktoren wie Verwundung, Pathogene und abiotischen Stress induziert [MONTEIRO ET AL 2006, ROBINSON/DAVIES 2000, JACOBS 1999, MONTEIRO ET AL 2003, DERCKEL 1998, CASTRO ET AL 2008].

Während die Weinbeeren ein sehr breites Spektrum an Proteinen beinhalten, nimmt die Proteinvierfalt neben dem bereits aufgeführten Proteingehalt im Laufe der Weinherstellung sehr stark ab. Dies ist vereinzelt bereits in der Literatur beschrieben und kann im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden (Kapitel 3.5.4) [MONTEIRO ET AL 2007, CANALS ET AL 1998]. Proteine aus der Gruppe der PR-Proteine sind die einzigen Proteine aus der Weinbeere, die den Prozess der Weinherstellung überstehen, da sie sich durch eine hohe Stabilität gegenüber den sauren Bedingungen, die im Wein herrschen, auszeichnen und auch resistent gegenüber dem proteolytischen Verdau sind. Eine teilweise Degradation der Proteine wird in aktuellen Publikationen jedoch beschrieben [OKUDA ET AL 2006, CILINDRE ET AL 2008]. Auch ein Pilz- und Bakterienbefall der Weinbeere kann einen entscheidenden Einfluss auf das Proteinspektrum des Weines haben [CILINDRE ET AL 2008].

Durch den Einsatz des weit verbreiteten Schönungsmittels Bentonit werden bevorzugt positiv geladene Proteine mit einem isoelektrischen Punkt größer 5,8 absorbiert. Der Großteil der im Wein verbleibenden Proteine, die in dieser Arbeit identifiziert werden können, besitzt einen theoretischen isoelektrischen Punkt im Bereich von 4 bis 5,4. Die isoelektrische Fokussierung eines Rieslings des Jahrgangs 2004 aus dem Rheingau ergibt nur einen isoelektrischen Punkt für die Gesamtheit der Weinproteine bei ca. 4,1. Auch bisherige Veröffentlichungen ordnen dem Großteil der Weinproteine einen isoelektrischen Punkt von 3,6 bis 5,8 zu, wobei vereinzelt auch Proteine mit einem isoelektrischen Punkt im Bereich von 3 bis 9 gefunden werden [FERREIRA ET AL 2002, FERREIRA ET AL 2000, MONTEIRO ET AL 1999, SANTORO 1995, YOKOTSUKA ET AL 1994]. Lipid Transfer Proteine, die in der vorliegenden Arbeit in Portugieser und Dornfelder Rotwein identifiziert werden können, besitzen einen theoretischen isoelektrischen Punkt bei 9. Der theoretische isoelektrische Punkt eines Proteins wird durch die Summe der pIs der einzelnen Aminosäuren berechnet, so dass der tatsächliche pI abhängig von der Faltung eines Proteins von dem theoretischen abweichen kann.

#### 4.4 Identifizierung und Charakterisierung der Proteine im Wein

Die vorliegende Arbeit stellt die erste Untersuchung zur Identifizierung der Proteine eines Rotweins dar. Auch ein Vergleich von Weißwein mit Rotwein und Roséwein ist bisher nicht beschrieben. Im folgenden Kapitel werden die erzielten Ergebnisse zur Identifizierung und Charakterisierung der Proteine im Wein mit den in der Literatur bislang erzielten Ergebnissen verglichen und im Zusammenhang mit diesen diskutiert.

Die schon seit längerer Zeit angewendete Methode zur Charakterisierung von Weinproteinen ist die Elektrophorese. Durch die auch in dieser Arbeit angewendete SDS-PAGE ist es möglich das Molekulargewicht der Weinproteine zu bestimmen. Anhand der Gelelektrophorese können Unterschiede zwischen verschiedenen Weinsorten aufgezeigt werden. Eine Kombination der IEF im ersten Schritt mit der SDS-PAGE im zweiten Schritt wird durch die zweidimensionale Gelelektrophorese erzielt. Diese ermöglicht im Vergleich zur eindimensionalen SDS-PAGE eine verbesserte Auftrennung der Proteine und stellt eine sehr gute Grundlage zur nachfolgenden Identifizierung der Proteine mittels massenspektrometrischer Analyse dar. Für die 2D-Gelelektrophorese bedarf es einer entsprechenden Vorbehandlung der Proben, ohne dass ein Proteinverlust eintritt. Die 2D-Gelelektrophorese ist eine vergleichsweise langwierige Methode. In dieser Arbeit wird die Auftrennung mittels 2D-Gelelektrophorese der Proteine von Weinbeeren der roten Rebsorte Cabernet Sauvignon nach einer TCA/Aceton-Fällung beschrieben.

Zur Identifizierung der Weinproteine wird aktuell vor allem die Massenspektrometrie eingesetzt. Der Vorteil der Massenspektrometrie gegenüber einer N-terminalen Sequenzierung liegt darin, dass auch N-terminal blockierte Proteine detektiert werden können, was bei den Weinproteinen z.B. bei der Chitinase von Bedeutung ist.

Im Rahmen der massenspektrometrischen Analyse kommen insbesondere die Elektronenspray-Ionisation (ESI) sowie die Matrixunterstützte Laserdesorption/Ionisation (MALDI) als Ionisierungsprinzipien zur Anwendung, wobei ESI die schonendere Ionisierungsmethode darstellt [LOTTSPREICH /ZORBAS 1998, PITT 1998]. Die Auftrennung der Ionen hinsichtlich ihres Masse/Ladungs-Quotienten erfolgt vor allem durch ein Quadrupol-System und/oder durch einen Flugzeitanalysator (TOF). Im Rahmen dieser Arbeit wird die Elektronenspray-Ionisation in Verbindung mit einem Quadrupol-TOF-System angewendet, welches seit den 90er Jahren zur Analyse von Proteinen bis 150 kDa etabliert ist [PITT 1998]. Die Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) wird zur Erhöhung der Sensitivität eingesetzt.

In dieser Arbeit wird die ESI-Q-TOF-Massenspektrometrie gekoppelt mit einer kapillaren Flüssigkeitschromatographie (mit einer Umkehrphasensäule) eingesetzt.

Die Auswertung der durch die Massenspektrometrie erhaltenen Daten hat seit der Veröffentlichung des Genoms von *Vitis vinifera* des FRENCH-ITALIEN PUBLIC CONSORTIUM FOR GRAPEVINE GENOME CHARACTERIZATION (2007) einen großen Fortschritt erfahren. So sind in der NCBI-Datenbank aktuell 77920 Proteine der Gattung *Vitis* gelistet [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; Stand: 21.10.2008].

### **Molekulargewicht der Weinproteine**

Die im Wein enthaltenen Proteine erstrecken sich über einen Molekulargewichtsbereich von ca. 11 kDa bis über 100 kDa [YOKOTSUKA ET AL 1977, MURPHEY ET AL 1989, HSU/HEATHERBELL 1987, WEISS ET AL 1998, DORRESTEIN ET AL 1995, SANTORO 1995, RUIZ-LARREA ET AL 1998, DAMBROUCK ET AL 2003], wobei sich der Großteil der Proteine im Molekulargewichtsbereich von 20 bis 30 kDa befindet. Untersucht wurden bislang die weißen Weinsorten Koshu, Riesling (Japan), Muscat of Alexandria, Muscat Gordo Blanco (Australien), Riesling, Gewürztraminer (USA), Verdeca, Chardonnay (Frankreich, Italien), Assario, Arinto, Bical, Fernao Pires und Vital (Portugal) sowie die roten Rebsorten Muscat Bailey A, Cabernet Sauvignon und Black Pinot (Japan) [FERREIRA ET AL 2002, POCOCK ET AL 2000, KWON 2004, DAMBROUCK ET AL 2003, FERREIRA ET AL 2000, MONTEIRO ET AL 2001, HAYASAKA ET AL 2001, YOKOTSUKA ET AL 1977, WATERS ET AL 1995, WATERS ET AL 1996, YOKOTSUKA ET AL 1977, MURPHEY ET AL 1989, HSU/HEATHERBELL 1987]. Auch der Hauptanteil der Weinproteine der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Rebsorten befindet sich im Molekulargewichtsbereich zwischen 20 und 30 kDa. Bei den untersuchten Weißweinsorten Riesling, Sauvignon Blanc, Gewürztraminer und Morio Muskat sowie den Weißherbstsorten Portugieser und Spätburgunder liegt der Anteil der Proteine in diesem Bereich bei 55 bis 80 %, wie mittels Densitometrie ermittelt wird. Im Rotwein liegt der Anteil mit ca. 40 % etwas niedriger, da Proteine im niedermolekularen Bereich noch einen vergleichsweise großen Anteil stellen. Für die in dieser Arbeit untersuchten deutschen Weinsorten kann das Vorhandensein von Proteinen über einen breiten Molekulargewichtsbereich bestätigt werden. Ein genauer Vergleich mit publizierten Daten erweist sich als schwierig, da sich die Laborbedingungen in der Regel unterscheiden, beispielsweise durch verschiedene Elektrophoresesysteme. Auch unterscheidet sich die Art der Aufkonzentrierung der Proteine, die meist durch Fällungen, Ultrazentrifugation oder Lyophilisation in Kombination mit einer Dialyse erfolgt.

Im Rahmen dieser Arbeit kann eine Vielzahl von Weinsorten miteinander verglichen werden, die durch Dialyse und Gefriertrocknung aufkonzentriert werden, wobei ein Proteinverlust weitestgehend verhindert werden kann (siehe 3.2). Erstmals wird in der vorliegenden Arbeit eine direkte Gegenüberstellung der Proteinbanden auf einer SDS-PAGE zwischen Weißwei-

nen (Riesling, Sauvignon Blanc, Gewürztraminer, Morio Muskat), Roséweinen (Portugieser Weißherbst, Spätburgunder Weißherbst) sowie Rotweinen (Portugieser, Dornfelder, Spätburgunder) beschrieben.

#### 4.4.1 Entfernung von Proteinen im Laufe der Weinbereitung

Ein Großteil der Proteine geht im Laufe der Weinbereitung verloren [FERREIRA ET AL 2002, FERREIRA ET AL 2000, MURPHY ET AL 1989A, FUKUI/YOKOTSUKA 2003]. Dies kann im Rahmen dieser Arbeit für die Rebsorten Riesling und Cabernet Sauvignon bestätigt werden, deren Proteinzusammensetzung von der Traube über den Most zum Wein beobachtet wird. Die Untersuchungen der Proteinkonzentrationsbestimmung und die SDS-PAGE zeigen deutlich eine Abnahme der Proteinkonzentration sowie der Proteinvielfalt [siehe Abschnitt 3.2 und 3.5.4].

Pathogenese bezogene Proteine können aufgrund ihrer Resistenz gegenüber Proteolyse und ihrer Stabilität, auch im sauren Milieu des Weines, die Weinherstellung überstehen und stellen damit den größten Anteil der Weinproteine dar [FERREIRA ET AL 2002, WATERS ET AL 1996, PENG ET AL 1997, OKUDA ET AL 2006, CILINDRE ET AL 2008]. Auf die Identifizierung der Weinproteine wird im Folgenden eingegangen.

#### 4.4.2 Proteinzusammensetzung im Wein

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgt die Identifizierung eines deutschen Weißweins (Riesling) sowie eines deutschen Rotweins (Portugieser). Diese wird durch eine Kombination der SDS-PAGE mit der Massenspektrometrie erzielt. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Arbeit in den Kontext bislang veröffentlichter Analysen zur Bestimmung der Proteinzusammensetzung in Wein gestellt.

Die Massenspektrometrie (MS) zur Identifizierung von Weinproteinen wurde erstmals durch SZILÁGYI ET AL 1996 eingesetzt. Anhand der mittels MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization)-MS ermittelten Spektren können zwischen den Weißweinsorten Chardonnay und Sauvignon Blanc signifikante Unterschiede aufgezeigt werden. Auch Unterschiede je nach Erntezeitpunkt werden beobachtet und eine Glykosylierung der Weinproteine nachgewiesen. TATTERSALL ET AL (1997) setzen die ESI (Elektronenspray-Ionisation)-MS zur Bestimmung des aufgereinigten *Vitis vinifera* Thaumatin-ähnlichen Proteins 1 (VVTL 1) aus Trauben der Rebsorte Muscat of Alexandria ein. Auch WATERS ET AL (1998) nutzen ESI-MS zur Identifizierung der aufgereinigten Chitinasen aus Muscat of Alexandria Trauben. WEISS ET AL (1998) setzen sowohl MALDI-MS als auch SELDI-TOF-MS zur Analyse der Weiß-

weinsorten Chardonnay, Sauvignon Blanc und Muscat of Alexandria ein. Sie zeigen mit dieser Methode, dass der Großteil der Proteine in allen analysierten Weinen identisch ist und sich der Proteinhauptanteil der mindestens 15 Proteinpeaks zwischen 7 und 86 kDa bei 21,3 kDa befindet. Unterschiede zwischen den Weinsorten und zwischen verschiedenen Jahrgängen werden im Molekulargewichtsbereich von 16,6 kDa bis 16,8 kDa sowie im Peptidbereich beobachtet. DE PERSON ET AL (2004) setzen die LC-ESI-MS/MS als Nachweis für Di- und Tripeptide in Champagner aus Chardonnaytrauben ein. SARRY ET AL (2004) sowie VINCENT ET AL (2007) finden mit der Methode der MALDI-MS infolge einer Auftrennung mittels 2D-Gelelektrophorese weitgehende Übereinstimmung der Proteinzusammensetzung von Weinbeeren verschiedenster Rebsorten. Eine Übersicht über den Stand der massenspektrometrischen Analyse bis 2006 geben FLAMINI und DE ROSSO (2006). Die erste umfassende Identifizierung von Weinproteinen wird von KWON (2004) durchgeführt, dem es mit der Methode der Massenspektrometrie (LC-MS/MS) erstmalig gelingt, ein breites Spektrum an Proteinen im Wein zu identifizieren. Fünf der identifizierten Proteine aus einem Sauvignon Blanc stammen aus der Traube, zwölf aus der Hefe, zwei Proteine werden aus Bakterien und ein Protein aus einem Pilz im Wein detektiert. OKUDA ET AL (2006) identifizieren mittels N-terminaler Sequenzierung nach einer Auftrennung mittels Sephadex-Säule und 2D-Gelelektrophorese eine Reihe von Traubenproteinen und erstmalig deren Hydrolyseprodukte in einem Chardonnay Wein. Anfang diesen Jahres setzen CILINDRE ET AL (2008) erstmalig eine Auftrennung mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese mit daran anschließender Massenspektrometrie (LC-MS/MS) und Western Blot zur Identifizierung von Weinproteinen ein.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird zur Identifizierung der Weinproteine die Methode der ESI-Massenspektrometrie eingesetzt, da hiermit eine eindeutige Zuordnung der Proteine erfolgen kann. Zunächst werden die Weinproteine mittels Dialyse und Gefriertrocknung konzentriert. Zur Auftrennung der Proteine wird im Anschluss eine SDS-PAGE durchgeführt. Daraufhin werden die mit Coomassie angefärbten Proteinbanden ausgeschnitten und nach einem Trypsin-Verdau mit einem ESI-Q-TOF-Massenspektrometer analysiert. Mit dieser Methode können in Portugieser Rotwein fünfzehn Proteine aus der Traube sowie sechs Proteine aus der Hefe identifiziert werden. Nicht auszuschließen ist jedoch, dass die Identifizierung der Proteine des Portugieser Rotweins dahingehend unvollständig ist, dass Proteine, die unter der Nachweisgrenze für Coomassie liegen, nicht angefärbt, somit nicht ausgeschnitten und nicht analysiert werden können. Die Empfindlichkeit der Coomassie-Färbung liegt bei einem Grenzwert von 200 bis 400 ng Protein pro 0,5 cm Bande [REHM 2002].

Durch meine Untersuchungen wird erstmalig eine Identifizierung der Proteine eines Rotweins (Blauer Portugieser) erzielt. Es wird gezeigt, dass ein Großteil der Proteine, die im Rotwein

enthalten sind, den PR-Proteinen zugeordnet werden kann. Die im Wein identifizierten Proteine werden im Folgenden diskutiert.

### **Traubenproteine**

PR-Proteine und hierbei insbesondere Chitinasen und Thaumatin-ähnliche Proteine (TLP) sind bereits als Hauptproteine in Traubensaft und in Weißwein beschrieben [WATERS ET AL 1996, TATTERSALL ET AL 1997, FERREIRA ET AL 2002, WATERS ET AL 1998]. Dies wird durch meine Arbeiten auch für deutsche Weine der Anbaugebiete Rheinhessen, Rheingau und Pfalz bestätigt.

TLP und Chitinasen sind als Proteine bekannt, die zu Trübungen in Weißweinen, insbesondere bei der Lagerung, führen können. Dieser Zusammenhang wird unter 4.6 diskutiert.

Auch sind Proteine aus diesen Familien als Allergene bekannt. Dieser Aspekt wird unter 4.7 näher beleuchtet.

### ***Lipid Transfer Proteine***

Das Proteinmodell des im Rotwein identifizierten LTP Isoform 4, welches auf der Grundlage des LTP Pru p 3 aus dem Pfirsich, dessen Kristallstruktur bekannt ist, erstellt wird, zeigt, dass die acht Cysteine konserviert sind und vier Disulfidbrücken ausbilden können (Abbildung 37). Diese stabilisieren das Motiv der vier  $\alpha$ -Helices, was auch für andere Lipid Transfer Proteine aus Nahrungsmitteln beschrieben ist [KADER ET AL 1996, PASQUATO ET AL 2006].

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die hohe Stabilität der Lipid Transfer Proteine, die es ermöglicht, den Prozess der Weinherstellung zu überstehen. Diese Arbeit stellt nach OKUDA ET AL (2006) die zweite Untersuchung dar, die das LTP nicht nur in der Weinbeere, sondern auch im Wein und die erste Untersuchung, die es auch in Rotwein nachweist.

In dem untersuchten Portugieser Rotwein aus der Pfalz werden neben dem Lipid Transfer Protein (Isoform 4) aus *Vitis vinifera* mit einem Molekulargewicht von 11,677 kDa ein LTP mit einem Molekulargewicht von 11,756 kDa aus *Vitis aestivalis* sowie ein LTP mit einem Molekulargewicht von 11,663 kDa aus einer Kreuzung von *Vitis berlandieri* und *Vitis vinifera* gefunden. Ein weiteres Protein, welches nicht eindeutig zugeordnet werden kann, ist der BLAST-Recherche aller Wahrscheinlichkeit nach auch ein Lipid Transfer Protein, da es hohe Ähnlichkeit zu bekannten LTP aus der Weinbeere zeigt. Bei *Vitis aestivalis* und *Vitis berlandieri* handelt es sich um Wildreben aus Amerika, die häufig als Unterlage für europäische Züchtungen der Spezies *Vitis vinifera* Verwendung finden, da sie sich durch eine hohe Resistenz gegenüber dem Mehltau und der Reblaus auszeichnen.

Lokalisiert sind LTP vor allem in der Schale der Früchte. Beim Pfirsich beispielsweise liegt der Gehalt der Schale um das siebenfache höher als der des Fruchtfleischs [FERNÁNDEZ-RIVAS/CUEVAS 1999, BALLMER-WEBER 2002, PASTORELLO/ROBINO 2004]. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden kann, sind Lipid Transfer Proteine im Rotwein in wesentlich höheren Mengen enthalten als im Weißwein (Abbildung 26, S. 89). Durch das Dichtescannen einer Coomassie-gefärbten SDS-PAGE wird ein Anteil von ca. 30 % der Rotweinproteine den Lipid Transfer Proteinen zugeordnet, während diese im Weißwein mit einer Coomassie-Färbung kaum sichtbar gemacht werden können. Wie bereits in Abschnitt 3.4.4 ausgeführt, ist dies auf die Unterschiede in der Weinherstellung zurückzuführen: bei der Weißweinherstellung erfolgt die Gärung auf dem Most, während der Rotwein auf der Maische vergoren wird und so die in der Schale in vergleichsweise hoher Menge enthaltenen Inhaltsstoffe in den Wein übergehen können. Von Relevanz könnte dies für das allergene Potential verschiedener Weinsorten sein, worauf in Kapitel 4.7 eingegangen wird.

#### *Thaumatococcus-ähnliche Proteine*

In dem untersuchten Riesling Weißwein des Jahrgangs 2004 aus dem Rheingau werden zwei Thaumatococcus-ähnliche Proteine (TLP) identifiziert. Neben dem *Vitis Vinifera* Thaumatococcus-like Protein (VVTL1) (23,953 kDa) ist ein nicht weiter spezifiziertes TLP mit einem Molekulargewicht von 24,035 kDa enthalten. Diese zwei Thaumatococcus-ähnlichen Proteine sind auch in einem Portugieser Rotwein des Jahrgangs 2005 aus der Pfalz zu finden. Zusätzlich können in diesem Wein noch zwei weitere Thaumatococcus-ähnliche Proteine mit Molekulargewichten von 20,108 kDa und 23,847 kDa identifiziert werden. Der BLAST-Recherche nach ist auch ein weiteres Weinprotein mit einem Molekulargewicht von 23,929 kDa der Familie der TLP zuzuordnen, d.h. es können fünf TLP nachgewiesen werden. Eine Übersicht über die Sequenzähnlichkeiten der im Wein enthaltenen Thaumatococcus-ähnlichen Proteine ist in Tabelle 26 dargestellt.

**Tabelle 26: Sequenzidentitäten und Ähnlichkeiten zwischen den Thaumatin-ähnlichen Proteinen aus der Weinbeere, die in dem untersuchten Portugieser Rotwein 2005 aus der Pfalz enthalten sind.**

Die Werte werden durch ein Sequenzalignment mit ClustalX und GeneDoc ermittelt, aufgeführt sind die Sequenzidentitäten sowie die Sequenzähnlichkeiten (Sequenzidentität / Sequenzähnlichkeit)

	VVTL 1 gi 2213852	TLP gi 89242712	putatives TLP gi 7406716	putatives TLP gi 7406714	hypothetisches TLP gi 147784586
VVTL 1 gi 2213852		64 % / 76 %	98 % / 98 %	57 % / 66 %	65 % / 78 %
TLP gi 89242712			64 % / 76 %	81 % / 82 %	64 % / 77 %
putatives TLP gi 7406716				56 % / 66 %	64 % / 77 %
putatives TLP gi 7406714					75 % / 79 %

Der SDS-PAGE nach zu urteilen stellen Thaumatin-ähnliche Proteine im Molekulargewichtsbereich von 20 bis 30 kDa den größten Anteil der Proteine in den untersuchten Weinen dar (Abbildung 26, S. 89). Je nach Rebsorte befinden sich 55 % bis 80 % der Proteine des Weißweins im Molekulargewichtsbereich von 20 bis 30 kDa, wobei es sich hauptsächlich um Thaumatin-ähnliche Proteine handelt. Beim Rotwein liegt der Anteil bei ca. 40 %.

Meine Untersuchungen bestätigen somit bislang in der Literatur beschriebene Daten auch für deutsche Weine. Anteilsmäßig stellen die TLP laut PENG ET AL (1997) mit 70 % der löslichen Proteine die größte Proteinfraction im Wein dar. Diese Arbeitsgruppe findet in einem Sauvignon Blanc Weißwein, ebenso wie WATERS ET AL (1998) in Trauben der Rebsorte Muscat of Alexandria, drei Thaumatin-ähnliche Proteine. Eines hiervon ist das bereits beschriebene VVTL1 (*Vitis vinifera* Thaumatin like protein 1), die zwei weiteren werden von den Autoren als VVTL2 und VVTL3 benannt [PENG ET AL 1997, WATERS ET AL 1998]. KWON (2004) findet neben dem VVTL1 noch ein TLP mit einem Molekulargewicht von 20,108 kDa in dem untersuchten Sauvignon Blanc Weißwein. Auch nach den Untersuchungen von OKUDA ET AL (2006) stellen Thaumatin-ähnliche Proteine einen großen Anteil der Proteine im Wein dar. Neben dem VVTL1 werden erstmalig auch Hydrolyseprodukte von diesem in einem Chardonnay gefunden. Auch CILINDRE ET AL (2008) finden in Chardonnay das VVTL1, proteolytische Fragmente von diesem sowie zwei weitere putative TLP mit Molekulargewichten von 24,035 kDa und 20,108 kDa, wobei letzteres auch bei KWON identifiziert wurde. In der vorliegenden Arbeit kann ein Vorkommen dieser Proteine erstmalig auch für Rotwein bestätigt werden.

Aufgrund der in der Literatur beschriebenen Ergebnisse und den eigenen Untersuchungen lässt sich schließen, dass TLP als Hauptproteine in allen Weinsorten enthalten sind.

Die Stabilität der TLP ist zu einem Großteil auf das Vorhandensein von acht Disulfidbrücken zurückzuführen [BREITENEDER 2004]. Ein Sequenzvergleich sowie die Erstellung eines Prote-

inmodells eines im Wein enthaltenen Thaumatin-ähnlichen Proteins (gi 89242712) auf der strukturellen Basis eines TLP aus der Banane, welches in Abbildung 40 dargestellt ist, zeigt, dass die sechzehn Cysteine konserviert sind und die Ausbildung von acht Disulfidbrücken ermöglichen.

Osmotin-ähnliche Proteine, deren Bildung durch osmotischen Stress induziert wird, werden aufgrund hoher Sequenzähnlichkeiten zur Gruppe der Thaumatin-ähnlichen Proteine gezählt. Osmotin-ähnliche Proteine sowie deren Hydrolyseprodukte konnten bereits im Wein identifiziert werden [OKUDA ET AL 2006, CILINDRE ET AL 2008], werden jedoch in den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Weinen nicht identifiziert.

### *Chitinasen*

Eine Unterteilung der Chitinasen, die aufgrund ihrer Funktion im Abwehrsystem der Pflanzen zur Familie der PR-Proteine gezählt werden, erfolgt entsprechend ihrer Sequenzähnlichkeiten und physikalischen Eigenschaften in fünf Klassen [BEINTEMA 1994, WATERS ET AL 1998]. In der Weinbeere werden basische Chitinasen der Klasse I und der Klasse III sowie eine saure Chitinase der Klasse IV gefunden, wobei die Chitinase-Aktivität fast ausschließlich auf die Klasse IV Chitinase zurückzuführen ist. Ein Anstieg der Chitinaseaktivität ist während der Reifung zu beobachten, wobei dieser in der Phase der Zuckerakkumulation am höchsten ist [ROBINSON ET AL 1997, DERCKEL ET AL 1996]. Die Chitinasen werden reifeabhängig in scheinbar gesunden Pflanzen exprimiert. Eine Steigerung erfolgt bei Verwundung und Pathogenangriffen, insbesondere bei Pilzen, worauf die Chitinasen ihre antimykotische Wirkung entfalten. Der Angriff von Pathogenen kann somit einen Einfluss auf den Chitinasegehalt der Weinbeere ausüben [DERCKEL ET AL 1996, FERREIRA ET AL 2002, JACOBS ET AL 1999, BUSAM ET AL 1997]. Mit 50 % der löslichen Proteine stellen Chitinasen die Hauptproteinkomponenten von reifen Weinbeeren (*Vitis vinifera* cv. Muscat of Alexandria) dar [WATERS ET AL 1998].

Fast alle aus Pflanzen isolierten Chitinasen sind Endochitinasen, die hydrolytisch Chitin abbauen. Sie liegen in der Regel als Monomere mit einem Molekulargewicht von 25 bis 35 kDa vor [BREITENEDER/EBNER 2000]. In diesen Bereich ist auch die Klasse 4 Endochitinase mit einem Molekulargewicht von 27 kDa einzuordnen, die in dem Portugieser Rotwein gefunden wird (Tabelle 24, S. 114).

Da Fragmente der Chitinase in Traubensaft und Wein gefunden werden, wird auf eine limitierte Proteolyse während der Fermentation oder der Reifung geschlossen, was im Widerspruch zu der proteolytischen Resistenz und der Stabilität der Chitinasen im sauren Milieu steht, der Anteil der Fragmentierung ist jedoch sehr gering [WATERS ET AL 1998].

In dem von mir untersuchten Portugieser Rotwein wird ausschließlich eine Klasse IV Endochitinase identifiziert. Diese ist durch ein Molekulargewicht von 27,242 kDa und einen theoretischen isoelektrischen Punkt von 5,38 charakterisiert. Weitere Chitinasen werden in dem untersuchten Wein nicht gefunden. Dies stimmt mit den Daten des Sauvignon Blanc Weißweins von KWON (2004) überein, so dass es wahrscheinlich ist, dass nur die Klasse IV Endochitinase in den Wein übergeht, nicht jedoch Klasse I-/ sowie Klasse III-Chitinasen. Beim Einsatz von Bentonit als Schönungsmittel im Rahmen der Weinherstellung könnte dies dadurch erklärt werden, dass basische Proteine, wie die Klasse I-/ und Klasse III-Chitinasen durch die Adsorption an Bentonit abgetrennt werden, während saure Proteine, wie die Klasse IV-Chitinase im Wein verbleiben. Da der Portugieser Rotwein kommerziell erworben wurde, stehen mir keine Informationen über den Einsatz der Schönungsmittel zur Verfügung. In dem von mir untersuchten Riesling wird keine Chitinase gefunden, was einerseits darauf zurückgeführt werden könnte, dass die Proteinbande auf der SDS-PAGE aufgrund einer zu geringen Konzentration nicht ausgeschnitten und somit nicht massenspektrometrisch analysiert wurde. Andererseits könnte eine Abtrennung der Chitinase im Laufe der Weinbereitung erfolgen. Bei der Herstellung des Rieslings werden 100 g/hl Bentonit eingesetzt, so dass möglicherweise bei dieser Menge schon eine Abtrennung der Endochitinase erfolgt.

### *Vakuoläre Invertase*

Die Invertase katalysiert die irreversible Hydrolyse der Saccharose in Glukose und Fruktose und spielt in der Weinbeere bei der Regulation des Hexoselevels ebenso eine Rolle wie bei der Freisetzung der in der Vakuole gespeicherten Saccharose. Die vakuoläre Invertase ist, im Gegensatz zur Zellwand-Invertase, löslich und durch ein Aktivitätsoptimum im sauren Bereich gekennzeichnet [DAVIES/ROBINSON 1996]. Für eine aus der Weinbeere isolierte vakuoläre Invertase konnte gezeigt werden, dass sie einen isoelektrischen Punkt im sauren Bereich besitzt und in glykosylierter Form vorliegt. Sie zeigt Stabilität bei einem niedrigen pH-Wert, bei hohen Temperaturen ebenso wie bei hohen Konzentrationen an Alkohol und SO<sub>2</sub> [NAKANISHI ET AL 1991, ISHIKAWA ET AL 1989]. Diese Eigenschaften ermöglichen das Verbleiben der Invertase bis zum fertigen Wein.

In den von mir untersuchten Weinsorten (Riesling, Portugieser) ist die vakuoläre Invertase 1 (GIN1) enthalten, sie konnte auch schon in Weinen der Rebsorten Semillon, Sauvignon Blanc und Chardonnay nachgewiesen werden [FUKUI ET AL 2004, KWON 2004, OKUDA ET AL 2006, CILINDRE ET AL 2008]. OKUDA ET AL finden Hydrolyseprodukte der Invertase im Chardonnay Wein, was von CILINDRE ET AL bestätigt wird. Das Vorhandensein verschiedener Spots der

Invertase auf einer 2D-PAGE wird neben der Degradation auf verschiedene Glykosylierungszustände der Invertase zurückgeführt [CILINDRE ET AL 2008].

### ***Weitere Proteine aus der Weinbeere***

Ein Protein aus der Weinbeere, welches bereits identifiziert wurde und nicht in dem von mir untersuchten Wein vorhanden ist, ist die basische extrazelluläre  $\beta$ -1,3-Glukanase [Vorläuferprotein] [KWON ET AL 2004, CILINDRE ET AL 2008]. Die  $\beta$ -1,3-Glukanase spielt eine Rolle im Abwehrsystem der Pflanzen und zählt somit zu der Gruppe der PR-Proteine. Ihre Funktion beruht auf der Hydrolyse von  $\beta$ -1,3-Glukanen, strukturellen Komponenten der Pilzzellwand. Die Bildung wird durch den Befall von Pathogenen (Pilzinfektionen) z.B. mit *Uncinula necator* induziert [FERREIRA ET AL 2002, JACOBS ET AL 1999], so dass das Vorkommen in der Weintraube und somit auch im Wein möglicherweise von einem entsprechenden Pilzbefall abhängig ist.

### **Hefeproteine**

In dem untersuchten Portugieser Rotwein werden sechs Proteine identifiziert, die durch *Saccharomyces cerevisiae* während der Weinherstellung in den Wein freigesetzt werden, während im Riesling nur ein Protein aus der Hefe identifiziert wird. Hierbei handelt es sich um das Protein GP38, das auch KWON (2004) in dem Sauvignon Blanc Weißwein findet und dessen molekulare Funktion unbekannt ist.

Im Rotwein werden folgende Proteine gefunden, die aus der Hefe stammen: das Protein CIS3, ein kovalent an die Zellwand gebundenes glykosyliertes Protein; das CWP1 Vorläuferprotein (Zellwandprotein1), eine strukturelle Komponente der Zellwand; das Vorläuferprotein TOS 1, ein Glykoprotein mit nicht bekannter molekularer Funktion, welches in der Zellwand vorkommt sowie das ECM33 Protein, ein Zellwandprotein, das für die korrekte Anlagerung der Mannoproteine an die äußere Zellwand von Bedeutung ist.

Proteine, die aus der Hefe in den Wein freigesetzt werden und von KWON (2004), nicht aber im Rahmen dieser Arbeit in den von mir untersuchten Weinen identifiziert werden, sind Proteine mit 1,3- $\beta$ -Glukosidase-Aktivität sowie weitere Zellwandproteine mit unbekannter molekularer Funktion, wovon das YJU1 auch bei CILINDRE ET AL (2008) im Chardonnay Wein gefunden wird.

### ***Pilzproteine***

KWON (2004) findet ein Protein, welches aus einem Pilz in den untersuchten Sauvignon Blanc Weißwein freigesetzt wird. Die Laccase, die zu der Gruppe der Phenoloxidasen zählt und phenolische Substrate oxidiert, wird in dem von KWON untersuchten Wein identifiziert, während sie in dem von mir untersuchten Portugieser 2006 aus der Pfalz sowie dem Riesling 2004 aus dem Rheingau mittels Massenspektrometrie nicht nachgewiesen werden kann.

Da Laccasen aus dem Schimmelpilz *Botrytis* in den Wein freigesetzt werden können, ist deren Vorkommen vom Befall des Lesegutes mit *Botrytis* abhängig. Eine Inaktivierung der Laccase wird durch hohe Mengen an Schwefeldioxid inaktiviert. In einem Riesling des Jahrgangs 2004 aus dem Rheingau kann eine Laccaseaktivität mit dem spezifischen Substrat ABTS (2,2-Azino-bis-(3-Ethylbenzothiazolin-6-Sulfon-Säure)) nachgewiesen werden [JOHANNES /MAJCHERCZYK 2000]. Von diesen Weintrauben ist bekannt, dass 6 % mit *Botrytis* befallen waren. Die Untersuchungen zur Laccaseaktivität wurden freundlicher Weise von Dr. Harald Claus im Institut für Mikrobiologie und Weinforschung der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt. Vermutlich ist die Laccase in so geringen Mengen im Wein enthalten, dass sie mit Coomassie nicht angefärbt wird und in der Folge auch die massenspektrometrische Untersuchung nicht möglich ist.

Dass der Befall des Lesegutes mit *Botrytis cinera* die Proteinzusammensetzung des Weins maßgeblich beeinflusst, zeigen CILINDRE ET AL (2008) im Wein der Rebsorte Chardonnay. 75 % der Proteinspots eines gesunden Weins auf einer 2D-PAGE sind in dem mit *Botrytis* befallenen Wein nicht enthalten, was vermutlich auf die Degradation der Proteine zurückzuführen ist.

### ***Bakterienproteine***

In dem von mir untersuchten Wein werden keine Bakterienproteine nachgewiesen, während KWON (2004) zwei Bakterienproteine findet.

#### **4.4.3 Aufreinigung der Weinproteine**

Nachdem eine Vielzahl von Proteinen sowohl in Rot- als auch in Weißwein identifiziert werden konnte, ist es nun Ziel, diese Proteine im einzelnen aufzureinigen, so dass sie im Anschluss an die Isolierung sowohl biochemisch und biophysikalisch als auch immunologisch charakterisiert werden können.

Die Aufreinigung der Weinproteine gestaltet sich aufgrund des geringen Proteingehaltes sowie der Bindung zwischen Polyphenolen und Proteinen schwierig [SANTORO 1995]. Das Problem der Isolierung von Proteinen aus Pflanzengewebe aufgrund von phenolischen Komponenten ist schon in den 60er Jahren beschrieben worden. Phenole binden einerseits reversibel über Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen an Proteine. Andererseits bestehen irreversible Bindungen durch Oxidation, gefolgt von kovalenter Kondensation. Chinone beispielsweise, die in der Weinbeere durch die Oxidation der Phenole durch Phenoloxidasen entstehen, sind sehr reaktiv und können Proteine oxidieren. Außerdem polymerisieren sie und bilden in Anwesenheit von Proteinen mit diesen kovalente Bindungen aus [LOOMIS/BATTAILE 1966, RICHARD ET AL 2006].

### **Proteine aus Rotwein**

Bei der Auftrennung der Proteine verschiedener Rotweine mittels SDS-PAGE wird in dieser Arbeit die Beobachtung gemacht, dass Portugieser Rotwein ohne weitere Behandlung auf einer SDS-PAGE aufgetrennt werden kann, während Dornfelder, Spätburgunder und Cabernet Sauvignon nur einen Schmier auf dem Gel ergeben. Erklärt werden kann dies durch den hohen Gehalt an monomeren Anthocyanen und Flavonoiden sowie einen sehr hohen Phenol-Polymerisierungsgrad, den der Dornfelder, der Spätburgunder sowie der Cabernet Sauvignon aufweisen. Dies zeigt sich auch an der hohen Farbintensität dieser Weine. Sowohl der Anthocyanengehalt als auch der Polymerisierungsgrad liegen bei Portugieser Rotwein in einem niedrigeren Bereich [SCHNEIDER 1999].

Bei der Aufreinigung der Proteine aus Rotwein steht somit in einem ersten Schritt die Entfernung der farbgebenden Polyphenole im Vordergrund. Diese stören nicht nur bei der gelektrophoretischen Auftrennung, sondern auch bei der Aufreinigung mittels chromatographischer Methoden, da sie beispielsweise mit den Säulenmaterialien interagieren und die Aufreinigung nicht reproduzierbar möglich ist. Ein für Rotweine geeignetes Protokoll mit dem Einsatz von PVP zur Entfernung der Polyphenole wird in dieser Arbeit entwickelt. Weitere Methoden der Proteinfällung werden getestet, wobei nach der Ethanol-fällung eine Auftrennung der Proteine nach Entfernung der Phenole erreicht werden kann. Dies ermöglicht einen Vergleich verschiedener Rotweinsorten, der ohne eine vorhergehende Fällung nicht möglich ist. Mit der KDS-Fällung, die modifiziert nach VINCENZI ET AL (2005) sowohl mit Cabernet Sauvignon 2005 (Rheingau) und Dornfelder 2005 (Rheinhessen) nach Dialyse und Gefriertrocknung als auch mit den entsprechenden Rotweinsorten vor deren Konzentrierung durchgeführt wird, kann eine Auftrennung der Proteine nicht erreicht werden. Ein Großteil der Proteine geht verloren, lediglich im Molekulargewichtsbereich bei 10 kDa ist je nach Ansatz eine Ban-

de sichtbar. Über den restlichen Molekulargewichtsbereich zieht sich ein Schmier, auch bei Variation der eingesetzten SDS-Konzentrationen im Bereich von 0,1 % bis 0,4 % und der KCl-Konzentrationen zwischen 200 mM und 400 mM.

Da sich die PVP-Fällung als geeignete Methode erweist, wird mit den PVP-gefällten Weinproben weiter gearbeitet.

Zur Auftrennung der Proteine im Anschluss an die PVP-Fällung wird einerseits eine Größenausschlusschromatographie an einer FPLC-Anlage mit einer S-100-Säule durchgeführt. Sowohl bei Portugieser als auch bei Dornfelder Rotwein zeigt sich ein Elutionsprofil mit drei Hauptpeaks (Abbildung 34, S. 101 und Abbildung 35, S. 102), wobei nur in einem Peak Proteine nachgewiesen werden können.

Andererseits wird im Anschluss an die PVP-Fällung eines Dornfelder Rotweins des Jahrgangs 2003 aus Rheinhessen eine Kationenaustausch-Chromatographie mit einer UNO S-6-Säule durchgeführt (Abbildung 36, S. 103). Mit dieser Methode ist es möglich, im Rotwein enthaltenes Lipid Transfer Protein zu isolieren, da sich dieses basische Protein ausreichend stark von den anderen im Wein enthaltenen Proteinen unterscheidet. Die massenspektrometrische Identifizierung im Anschluss an den Kationenaustausch steht noch aus, doch aufgrund der Identifizierung des LTP Isoform 4 in dem eingesetzten Dornfelder Rotwein nach einer PVP-Fällung handelt es sich mit größter Wahrscheinlichkeit um dieses Protein. Die PVP-Fällung des dialysierten und lyophilisierten Weins mit dem daran anschließenden Kationenaustausch müsste im Folgenden in einem größeren Ansatz durchgeführt werden, so dass weitergehende Untersuchungen zu den biophysikalischen sowie immunologischen Eigenschaften des Proteins durchgeführt werden können.

Zur Isolierung der Lipid Transfer Proteine bietet sich auch die Auftrennung mit der präparativen Gelelektrophorese an, da sich diese im Molekulargewicht von den anderen Proteinen ausreichend stark unterscheiden. Diese Methode wird in der vorliegenden Arbeit mit der Prepcell von BioRad an einer FPLC-Anlage entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt, wobei aus mir unerklärlichen Gründen zwar das Bromphenolblau aus dem Gel eluiert und in den entsprechenden Fraktionen gesammelt werden kann, eine Elution der Weinproteine jedoch nicht erfolgt.

### **Proteine aus Weißwein**

Bei der Aufreinigung der Proteine aus dem Weißwein wird im ersten Schritt die Anionenaustauschchromatographie durchgeführt. So soll zunächst eine Auftrennung der Proteine ent-

sprechend der Ladung erreicht werden. Diese Methode wird gewählt, da die meisten Proteine sauer sind und die Unterschiede im pI etwas höher liegen als beim Molekulargewicht.

Das Elutionsprofil der Anionenaustauschchromatographie eines Rieslings ergibt 15 Peaks, wobei nicht in allen Peaks Proteine mittels SDS-PAGE nachgewiesen werden können (Abbildung 31, S.97).

Die Anionenaustauschchromatographie zur Proteinisolierung bzw. -charakterisierung ist bereits in der Literatur beschrieben. Ein Vergleich gestaltet sich schwierig, da es Unterschiede hinsichtlich der Rebsorte der untersuchten Weine, der Art der Probenvorbereitung, dem pH-Wert, dem eingesetzten Puffer, dem Salzgradienten sowie der Flussrate gibt.

LUGUERA ET AL (1998) nutzen die Anionenaustauschchromatographie zum Vergleich der Proteine aus Chardonnay während verschiedener Stadien der Herstellung zum Schaumwein. Die Konzentrierung erfolgt wie in der vorliegenden Arbeit durch Dialyse und Gefriertrocknung, die Chromatographie wird mit Tris-Puffer bei einem pH-Wert von 8,0 durchgeführt. Das Elutionsprofil zeigt, dass der Hauptanteil in der Anfangsphase eluiert. Eine Zuordnung von Proteinen zu den entsprechenden Peaks erfolgt hier ebenso wenig wie bei DORRESTEIN ET AL (1995), die die Anionenaustauschchromatographie bei vier Portugiesischen Weißweinen (Arinto, Bical, Fernao Pires, Vital) zum Vergleich der Proteinzusammensetzung, nicht zur Aufreinigung der Proteine einsetzen. Bei dieser Untersuchung wird beobachtet, dass der erste Peak mit den nicht an die Säule bindenden Proteinen sowohl bei einem pH-Wert von 7,5 als auch bei einem pH-Wert von 9,5 am stärksten ausgeprägt ist. Die Ergebnisse widersprechen den eigenen Untersuchungen grundlegend, da bei einem pH-Wert von 7,7 die Peaks bei der Auftrennung von Riesling und Sauvignon Blanc über ein breites Spektrum eluieren (Abbildung 32, S. 99). Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die Aussage von DORRESTEIN ET AL, dass jeder einzelne Wein ein charakteristisches Elutionsprofil aufweist, dies ist sowohl zwischen verschiedenen Weinsorten als auch innerhalb einer Weinsorte bei verschiedenen Jahrgängen zu beobachten (vgl. Abbildungen 32 und 33). YOKOTSUKA/SINGLETON (1997) setzen die Anionenaustauschchromatographie an einer HPLC-Apparatur im Anschluss an eine Ammoniumsulfatfällung und eine Größenausschlusschromatographie ein, wobei eine Separierung einzelner Proteine erzielt werden kann. WATERS ET AL (1995) führen die Anionenaustauschchromatographie zur Proteinaufreinigung bei einem pH-Wert von 8 durch, wobei der eingesetzte Weißwein (Muscat of Alexandria) zuvor durch Ammoniumsulfatfällung behandelt wird. In der Ausgangsprobe finden WATERS ET AL nur drei Proteinbanden im Molekulargewichtsbereich von 24 bis 34 kDa, wobei nach der Aufreinigung eine weitere bei 13 kDa hinzukommt. Die Anionenaustauschchromatographie resultiert in 13 Peaks, eine Isolierung einzelner Proteine wird teilweise erreicht. In der ersten Fraktion nach Abtrennung ungebun-

dener Proteine eluiert ein 24 kDa Protein, die weiteren Peaks enthalten Proteingemische, wobei Proteine mit einem Molekulargewicht von 24, 28 und 32 kDa dominieren. Diese werden von WATERS ET AL (1996) mittels N-terminaler Sequenzierung den Thaumatin-ähnlichen Proteinen und Chitinasen zugeordnet. Im Gegensatz zu dieser Untersuchung werden im Rahmen der vorliegenden Arbeit bei den untersuchten Weißweinsorten Riesling und Sauvignon Blanc zusätzlich Proteine im höheren Molekulargewichtsbereich beobachtet. Die Aufreinigung mittels Anionenaustauschchromatographie zeigt, dass ein Teil der Proteine nicht an den Anionenaustauscher bindet, wobei sich diese Proteine über einen Molekulargewichtsbereich von 12 bis 30 kDa erstrecken. Nach einer Elutionszeit von 28 min bei einer Flussrate von 3 ml/min eluiert ein Peak, der sowohl ein Protein bei 24 kDa als auch bei 63 kDa enthält. In den zwei Hauptpeaks, die nach 30 min bis 40 min eluieren, sind zwei Proteine mit Molekulargewichten von 75 kDa und 100 kDa enthalten, wie mittels SDS-PAGE gezeigt wird. Die Konzentration der Proteine, die über den Anionenaustausch erhalten werden, ist vergleichsweise gering und nur mittels Silberfärbung auf einer SDS-PAGE detektierbar. In allen weiteren Peaks können keine weiteren Proteine gefunden werden, was einerseits an der geringen Konzentration liegen könnte und andererseits daran, dass die weiteren Peaks Phenole enthalten, die auch in diesem Bereich absorbieren.

Im Anschluss an die Anionenaustauschchromatographie wird in der vorliegenden Arbeit die Größenausschlusschromatographie zur Trennung des 23 kDa und des 63 kDa-Proteins eingesetzt. Hierfür werden die zwei entsprechenden Fraktionen von sechs Anionenaustauschläufen vereinigt, mittels Zentrifugalkonzentratoren konzentriert und auf eine S-100-Säule gegeben. Die Absorption bei 280 nm liegt bei maximal 0,01, eine Detektion mittels SDS-PAGE ist nicht möglich. Die Proteinverluste sind wahrscheinlich sowohl auf Verluste während der FPLC als auch während der Konzentrierung mittels Zentrifugalkonzentratoren zurückzuführen. Folglich müssten bei erneuten Versuchen einerseits noch mehr Anionenaustauschläufe vereinigt werden, d.h. insgesamt muss die eingesetzte Menge an Wein erhöht werden, andererseits könnte die zeitintensivere Konzentrierung mittels Dialyse und Gefriertrocknung im Anschluss an die Anionenaustauschchromatographie Verluste mindern.

Die Proteine, die nicht an die Säulenmatrix des Anionenaustauschers binden, sollten über einen Kationenaustauscher weiter aufgetrennt werden. Die Kationenaustauschchromatographie zur Aufreinigung von Proteinen aus Asario-Weißwein wird von MONTEIRO ET AL (1999) eingesetzt. Als Proteine in diesem Wein werden insgesamt nur drei Proteinbanden im Bereich von 20 bis 25 kDa detektiert. Diese können teilweise durch einen kontinuierlichen Gradienten voneinander getrennt werden, eine Identifizierung der Proteine wird nicht durchgeführt.

DORRESTEIN ET AL (1995) führen eine Kationenaustauschchromatographie zum Vergleich von vier Portugiesischen Weinsorten durch, wobei sie Unterschiede im Elutionsprofil beobachten, eine weitere Analyse jedoch nicht durchführen. CANALS ET AL (1998) setzen die Kationenaustauschchromatographie im Anschluss an eine Gelfiltration ein und erreichen eine Auftrennung der Proteine im Molekulargewichtsbereich von 20 bis 25 kDa anhand der Ladung, eine Identifizierung/Zuordnung der erhaltenen Proteine wird auch in dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Immunologische Methoden, d.h. die Herstellung polyklonaler Antikörper in Verbindung mit der Durchführung eines Western Blots, setzen MONTEIRO ET AL (1999), FERREIRA ET AL (2000) ebenso wie DAMBROUCK ET AL (2003) zur Untersuchung der Herkunft von Weinproteinen und zur Überprüfung der strukturellen Verwandtschaft in Weinen verschiedener Rebsorten ein.

Im Rahmen meiner Arbeit wird der Western Blot zur Detektion Thaumatin-ähnlicher Proteine im Wein eingesetzt. Verwendung findet ein kommerziell erworbener polyklonaler Thaumatin-Antikörper. Die Ergebnisse des Western Blots zeigen, dass eine Reaktion Thaumatin-ähnlicher Protein aus dem Wein mit dem Thaumatin-Antikörper aus *Thaumatococcus daniellii* stattfindet. Während bei gleicher eingesetzter Menge beim Weißwein und Rotwein nur Proteine im Bereich von 20 bis 25 kDa angefärbt werden, d.h. dem Molekulargewichtsbereich, in dem sich die TLP befinden, ist beim Portugieser Weißherbst eine zusätzliche Färbung bei 100 kDa zu beobachten. Dies könnte einerseits auf die Unspezifität des Antikörpers hindeuten, andererseits auf das Vorhandensein von strukturell ähnlichen Proteinen wie den TLP in diesem Bereich.

Auch stellen immunologische Methoden eine Grundlage zur Entwicklung neuer Verfahren zur spezifischen Entfernung der Proteine im Wein dar. So könnte durch den Aufbau einer Affinitätssäule mit Thaumatin-Antikörpern eine spezifische Entfernung Thaumatin-ähnlicher Proteine erreicht werden. Die Notwendigkeit zur Entfernung der TLP ergibt sich aus ihrem Einfluss auf die Instabilität von Weinen. Auch stellen TLP potentielle Allergene dar. Sollte die allergene Wirksamkeit auch für TLP aus dem Wein nachgewiesen werden, ist eine Entfernung dieser von großer Bedeutung.

## 4.5 Glykosylierung der Weinproteine

Die vergleichsweise wenigen publizierten Untersuchungen zur Glykosylierung von Weinproteinen sind widersprüchlich. Während in einigen Veröffentlichungen von einer Glykosylierung aller bzw. eines Großteils der Weinproteine ausgegangen wird [YOKOTSUKA ET AL 1994, YOKOTSUKA ET AL 1991, YOKOTSUKA ET AL 1997 DAMBROUCK ET AL 2003, MARCHAL ET AL 1997] beschreiben andere nur einen geringen Teil der Weinproteine als glykosyliert [HSU/HEATHERBELL 1987, WATERS ET AL 1995, RUIZ-LARREA ET AL 1998].

In der vorliegenden Arbeit wird die Glykosylierung der Weinproteine einerseits mit der PAS-Färbung einer SDS-PAGE und andererseits mit einem Lektinbindungs-Assay mit Concanavalin A (Con A) durchgeführt. Diese Untersuchungen zeigen Glykoproteine in einem breiten Molekulargewichtsbereich. Sowohl beim Weißwein (Riesling) als auch beim Rotwein (Portugieser) findet sich ein hoher Anteil an Glykoproteinen im hochmolekularen Bereich, wie die PAS-Färbung einer SDS-PAGE zeigt. Diese Beobachtung ist bereits in der Literatur beschrieben [MARCHAL ET AL 1997, RUIZ-LARREA ET AL 1998, DAMBROUCK ET AL 2003]. Da die mit der PAS-Färbung sichtbar gemachten Banden durch eine Coomassie-Färbung jedoch nicht sichtbar sind, ist davon auszugehen, dass diese Glykoproteine mit einem hohen Anteil an Kohlenhydraten darstellen. Hierbei könnte es sich folglich um Mannoproteine aus der Hefe handeln. DAMBROUCK ET AL (2003) haben in ihrer Arbeit mittels Anti-Hefe-Antikörpern die Herkunft der höhermolekularen Glykoproteine aus der Hefe bestätigt. Auch das Vorkommen von Arabinogalaktan-Proteinen (AGPs) in Carignan Noir Trauben und Wein mit Molekulargewichten von 110 kDa, 176 kDa sowie 224 kDa, deren Proteingehalt geringer als 10 % liegt, wurde bereits beschrieben. Die Arabinogalaktan-Proteine werden wahrscheinlich durch pektolytische Enzyme aus Traubenpektin freigesetzt [PELLERIN ET AL 1993, SAULNIER ET AL 1992]. Aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* freigesetzte Mannoproteine konnten ebenfalls aus Wein isoliert werden. Diese mannosereichen Glykoproteine finden sich vorwiegend im höhermolekularen Bereich bei 252 kDa, 420 kDa und 560 kDa, wobei auch Mannoproteine bei 110 kDa sowie bei 53,4 kDa gefunden werden. Der Proteingehalt dieser Mannoproteine liegt in der Regel bei 2,5 bis 15 % [GONCALVES ET AL 2002, WATERS ET AL 1994, WATERS ET AL 1993]. Mannoproteine werden ebenso wie die Arabinogalactan-Proteine im Zusammenhang mit einer Reduktion von Weintrübungen diskutiert [CARIDI 2006, WATERS ET AL 1994, WATERS ET AL 1993].

Die Glykoproteinbestimmungen mit der Perjodsäurefärbung und dem Lektin-Bindungsassay zeigen, dass auch im Bereich von 20 bis 30 kDa Glykoproteine vorhanden sind. Bei einem Riesling Weißwein werden mit der PAS-Färbung Proteinbanden bei 20 kDa, 25 kDa, 28 kDa

und 30 kDa sichtbar gemacht. Auch HSU/HEATHERBELL (1987) finden in einem Riesling bei einem Molekulargewicht von 25 kDa sowie bei 28 kDa glykosylierte Proteine mittels eines Lektin-Bindungsassays, wobei keine weiteren glykosylierten Proteine detektiert werden.

Auch bei dem in dieser Arbeit untersuchten Portugieser Rotwein, ebenso wie bei einem Portugieser Weißherbst ist die Proteinbande bei 20 kDa intensiv ausgeprägt und eine weitere Proteinbande ist bei 28 kDa zu erkennen. Das Vorkommen von Glykoproteinen im Molekulargewichtsbereich zwischen 20 und 30 kDa ist für die Weinsorten Riesling, Gewürztraminer, Chardonnay, Koschu sowie Muscat Baily A bereits in der Literatur beschrieben [HSU/HEATHERBELL 1987, YOKOTSUKA ET AL 1991, YOKOTSUKA ET AL 1994, YOKOTSUKA ET AL 1997, MARCHAL ET AL 1996, DAMBROUCK ET AL 2003]. Eine eindeutige Zuordnung der Proteine konnte meines Wissens bislang nicht erzielt werden. MARCHAL ET AL (1996) ordnen die Proteinbande mit 24/25 kDa einem N-glykosylierten Protein aus der Traube zu. Da in den untersuchten Weinen die Thaumatin-ähnlichen Proteine den Hauptanteil der Proteine bei 20 bis 25 kDa stellen, könnte es sich bei der 20 kDa-Proteinbande möglicherweise um TLP handeln. In anderen Früchten werden glykosylierte Thaumatin-ähnliche Proteine bzw. Thaumatin-ähnliche Proteine mit potentiellen Glykosylierungsstellen beschrieben. Ein Beispiel ist das TLP Mal d 2 aus dem Apfel, welches als Allergen bekannt ist [KREBITZ ET AL 2003].

Während bei den in der Weintraube vorkommenden Thaumatin-ähnlichen Proteinen das VVTL1 und ein putatives TLP (gi 7406716) keine potentiellen Glykosylierungsstellen besitzen, sind bei anderen Thaumatin-ähnlichen Proteinen (gi 7406714, gi 33329390) zwei potentielle Glykosylierungsstellen vorhanden [CILINDRE ET AL 2008].

Auch bei 38 und 40 kDa werden im Portugieser Rotwein glykosylierte Proteine gefunden. Diese können keinen Proteingruppen zugeordnet werden. Möglicherweise könnte es sich hierbei auch um Hefeproteine handeln. Von den identifizierten Hefeproteinen in dem Portugieser Rotwein sind das kovalent gebundene Zellwandprotein 11 [Vorläuferprotein] mit 23,2 kDa, das Zellwandprotein CWP 1 [Vorläuferprotein] mit 24,3 kDa, die Endochitinase [Vorläuferprotein] mit 59 kDa als stark O-glykosylierte Proteine bekannt. Das Protein TOS 1 [Vorläuferprotein] mit 48 kDa, die Glykosidase CRH1 [Vorläuferprotein] mit 52,7 kDa und das Protein ECM 33 [Vorläuferprotein] mit 48,3 kDa haben potentielle Glykosylierungsstellen. Über Western Blots beispielsweise könnte die Herkunft dieser Proteine geklärt werden.

Ein weiteres glykosyliertes Protein findet sich bei den in dieser Arbeit untersuchten Weinsorten (Riesling, Portugieser und Portugieser Weißherbst) bei 60 bis 70 kDa. Diese Beobachtung wird auch von DAMBROUCK ET AL (2003) sowie von MARCHAL ET AL (1997) gemacht, wobei es sich nach Autorenaussage wahrscheinlich um ein N-glykosyliertes Protein aus der Traube

handelt. Dies könnte folglich die Invertase der Weinbeere sein, die mittels massenspektrometrischer Analyse in diesem Bereich gefunden wird. Die Invertase besitzt zwölf potentielle Glykosylierungsstellen und liegt im Wein vermutlich in verschiedenen Glykosylierungsformen vor [DAMBROUCK ET AL 2005, CILINDRE ET AL 2008].

#### 4.6 Stabilisierung der Proteine im Wein

Trübungen durch Aggregieren und Ausfällen von Proteinen reduzieren die Weinqualität sowie die Verbraucherakzeptanz und stellen somit ein erhebliches Problem für Winzer dar.

Da Proteine zu Trübungen, insbesondere während der Lagerung, führen können, ist eine Beseitigung dieser eines der Ziele weintechnologischer Maßnahmen und erfolgt vor allem im Rahmen der Schönung. Seit Jahrzehnten wird bevorzugt Bentonit als Schönungsmittel eingesetzt, trotz der unspezifischen Proteinentfernung und der Qualitätsbeeinträchtigung. Die zum Wein bzw. Most gegebene Bentonitmenge erhöht sich durch die moderne Art der Weinbereitung zunehmend [WATERS ET AL 1995, RIBÉREAU-GAYON ET AL 2006, FERREIRA ET AL 2002].

Da viele Proteine trotz der Schönung im Wein verbleiben und Bentonit auch die organoleptischen Eigenschaften des Weins beeinträchtigt, ist es Ziel, neue Methoden zu entwickeln, die zur Beseitigung aller Proteine führen. Als Voraussetzung für die Entwicklung neuer Methoden muss die nach wie vor nicht vollständig geklärte Frage beantwortet werden, welche Proteine und welche weiteren Weinhaltstoffe für die Trübungen verantwortlich sind. Es konnte gezeigt werden, dass der Gesamtproteingehalt keine gute Aussage für die Tendenz Trübungen zu entwickeln liefert [BAYLY/BERG 1967, WATERS ET AL 1992, FERREIRA ET AL 2002, PASHOVA ET AL 2004, MESQUITA ET AL 2001, FUKUI/YOKOTSUKA 2003, SIEBERT ET AL 1996]. Proteine mit einem Molekulargewicht von 20 bis 30 kDa mit einem pI, der höher als der pH-Wert des Weines liegt, scheinen die am stärksten zur Instabilität beizutragenden Proteine zu sein [MORENO-ARRIBAS ET AL 2002, WATERS ET AL 1992, RUIZ-LARREA ET AL 1998]. WATERS ET AL (1996) identifizierten die Endochitinase und die Thaumatin-ähnlichen Proteine als trübungsverursachende Proteine im Chardonnay Weißwein.

In dem in dieser Arbeit untersuchten Portugieser Rotwein sowie dem Riesling sind Thaumatin-ähnliche Proteine enthalten, wobei im Rotwein zusätzlich eine Endochitinase vorkommt. Tests zur Überprüfung der Weinstabilität werden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt, befinden sich jedoch in Vorbereitung.

Neben den Proteinen werden zunehmend eine Reihe weiterer Faktoren für die Bedeutung der Weinstabilität diskutiert, wie beispielsweise der Gehalt an Polyphenolen, der pH-Wert und das Vorhandensein von Polysacchariden. Wahrscheinlich ist das Vorhandensein der Proteine

in Verbindung mit nicht-Protein-Komponenten für das Verursachen der Trübungen verantwortlich. Trübungen stellen ein zunehmendes Problem dar, da genetisch modifizierte Weine mit einer Überexpression von PR-Proteinen (u.a. TLP, Chitinasen) gezüchtet werden, um eine Pilzresistenz zu erzielen [FERREIRA ET AL 2002, MESQUITA ET AL 2001, PASHOVA ET AL 2004, SANTORO 1995, WATERS ET AL 1995, DAWES ET AL 1994].

Verschiedene Methoden zur Beseitigung bzw. Verhinderung des Auftretens von Trübungen wie der Einsatz von proteolytischen Enzymen, Ultrafiltration oder Chitin sind bislang nicht erfolgreich und gehen meist mit dem Verlust von wichtigen organoleptischen Komponenten einher [FERREIRA ET AL 2002, WATERS ET AL 1992, WATERS ET AL 1995, VINCENZI ET AL 2005]. Aktuell werden verschiedene Glykoproteine wie Mannoproteine, Arabinogalaktan-Proteine sowie Rhamnogalakturonan zur Verbesserung der Weinstabilität diskutiert. Eine Reduktion der sichtbaren Trübungen kann aller Wahrscheinlichkeit nach durch eine Reduktion der Partikelgröße der Trubstoffe oder durch eine Vermeidung der Proteinaggregation erreicht werden, so dass sich nicht der Gehalt der Proteine ändert, sondern diese auf einer Größe gehalten werden, die nicht zu sichtbaren Trübungen führt [WATERS ET AL 1994, DUPIN ET AL 2000B, GONCALVES ET AL 2002, GONZALES-RAMOS/GONZALEZ 2006, CARIDI 2006, DUFOUR/BAYONOVE 1999].

## 4.7 Allergenes Potential der Weinproteine

In der Literatur wird in einigen Fallstudien von Personen berichtet, die an einer Allergie gegenüber Weinbeeren und den daraus hergestellten Produkten wie Wein leiden. Eine Übersicht hierzu ist in Tabelle 27 dargestellt.

**Tabelle 27: Studien zum Auftreten von Trauben- und Weinallergien**

Land	Anzahl Allergiker	Wein-/Traubensorte	Referenz
Deutschland	1 Erwachsener	Blaue Trauben, weiße Trauben, Weißwein, Rotwein	SCHÄD ET AL 2005
	1 Erwachsener	Rotwein, Weißwein, Trauben	SBORNIK ET AL 2007
Schweiz	1 Erwachsener	Rote <i>Americana</i> -Trauben	BIRCHER ET AL 1999
Italien	1 Erwachsener	Weißwein, Rotwein, Trauben	GIANNOCCARO ET AL 1998
	1 Erwachsener	Weißwein, Rotwein, weiße Trauben	SENNA ET AL 2001
	14 Erwachsene	Vino novello, Fragolino, Trauben	PASTORELLO ET AL 2003
	1 Erwachsener	Rote Traube, weiße Traube, Rotwein, Weißwein, Prosecco	BORGHESAN ET AL 2004
Spanien	1 Kind	Blaue Trauben, Weiße Trauben	RODRIGUEZ ET AL 2001
	14 Kinder	Trauben, Traubensaft	RODRIGUEZ ET AL 2004
Griechenland	13 Erwachsene	Trauben	KALOGEROMITROS ET AL 2004
	11 Erwachsene	Rotwein, Weißwein, Schaumwein, rote Trauben	KALOGEROMITROS ET AL 2005
	61 Kinder und Erwachsene	Rote Trauben, weiße Trauben, Rotwein, Weißwein, Traubensaft	KALOGEROMITROS ET AL 2006
Türkei	1 Erwachsener	Weiße Trauben	KARAKAYA/KALYONCU 2000

Das Alter der betroffenen Personen erstreckt sich vom Kindesalter bis ins hohe Erwachsenenalter. Eine Vielzahl der Trauben/- bzw. Weinallergiker zeigt allergische Reaktionen gegen-

über weiteren Lebensmitteln, insbesondere gegenüber Früchten der *Rosaceae*-Familie sowie vereinzelt gegenüber Pollen und Latex. Die Berichte zu Trauben-/ bzw. Weinallergikern häufen sich in der Mittelmeerregion (Griechenland, Italien, Spanien), einzelne Fälle sind jedoch auch in Deutschland, der Schweiz und den Vereinigten Staaten von Amerika beschrieben [CLAYTON/BUSSE 1980, GIANNOCCARO ET AL 1998, VASWANI ET AL 1999, BIRCHER ET AL 1999, KARAKAYA/KALYONCU 2000, SENNA ET AL 2001, RODRÍGUEZ ET AL 2001, PASTORELLO ET AL 2003, KALOGEROMITROS ET AL 2004, RODRÍGUEZ ET AL 2004, BORGHESAN ET AL 2004, KALOGEROMITROS ET AL 2005, SCHÄD ET AL 2005, KALOGEROMITROS ET AL 2006, VASSILOPOULOU ET AL 2007, SBORNIK ET AL 2007]. Die klinische Reaktion setzt in einem Zeitraum von einer Minute bis zwei Stunden nach dem Konsum ein [KALOGEROMITROS ET AL 2005, CLAYTON/BUSSE 1980, KALOGEROMITROS ET AL 2006, SCHÄD ET AL 2005]. Symptome betreffen die Haut, das Atmungssystem, das Herz-Kreislaufsystem sowie den Gastrointestinaltrakt [KALOGEROMITROS ET AL 2006, PASTORELLO ET AL 2003, SCHÄD ET AL 2005, VASSILOPOULOU ET AL 2007].

Bei den Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit in der Hautklinik durchgeführt werden, zeigt sich keine signifikante allergische Reaktion gegenüber Trauben-/ und Weinextrakten der Rebsorten Riesling und Cabernet Sauvignon aus dem Rheingau bei Patienten, die entweder eine Gräserallergie oder eine nicht bekannte Allergie haben. Getestet wird dies anhand der Zytokinausschüttung von IL-4 und IL-5 sowie der T-Zell-Proliferation. Anzumerken ist, dass diese Untersuchungen lediglich einen ersten Vorversuch darstellen, da die Probandenzahl zu gering ist, um eine statistische Aussage treffen zu können. Auch wurden in den vorliegenden Untersuchungen Probanden mit einer Gräserallergie bzw. einer nicht bekannten Allergie eingesetzt. Im Folgenden wäre es von Bedeutung, dass Blutseren von Personen in repräsentativer Anzahl verwendet werden, von welchen bekannt ist, dass sie auf Lipid Transfer Proteine, Thaumatin-ähnliche Proteine oder Chitinasen bzw. auf die Obstsorten, die diese Proteine als Hauptallergene enthalten, allergisch reagieren, da Proteine dieser Familien als potentielle Allergene im Wein diskutiert werden. Wie in Kapitel 3.7 ausgeführt, besitzen Lipid Transfer Proteine, Thaumatin-ähnlichen Proteine sowie bedingt die Endochitinase strukturelle Ähnlichkeit mit bekannten und weit verbreiteten Allergenen. Von Interesse erscheint es nun, ob beispielsweise Äpfelallergiker, die auf das Thaumatin-ähnliche Protein des Apfels (Mal d 2) eine allergische Reaktion zeigen, auch auf ein Thaumatin-ähnliches Protein aus dem Wein reagieren.

Die Diagnostik von Weinallergikern gestaltet sich schwierig, da es keine standardisierten Tests speziell für Weinproteine gibt, eine allergische Reaktion häufig nur schwer einem bestimmten Lebensmittel zugeordnet werden kann und einige Personen den potentiellen Aller-

gieauslöser meiden anstatt den Arzt zu konsultieren. Da eine Weinallergie jedoch zu schweren anaphylaktischen Reaktionen führen kann, ist eine Untersuchung der potentiell allergenen Proteine notwendig. Auf die potentiellen Allergene im Wein wird im Folgenden eingegangen.

### **Pathogenese bezogene Proteine und Allergenität**

25 % aller Pflanzenallergien, die in der offiziellen Allergen-Datenbank der International Union of Immunological Societies gelistet sind, werden der Gruppe der Pathogenese bezogenen Proteine (PR-Proteine) zugeordnet [HOFFMANN-SOMMERGRUBER 2002]. PR-Proteine zeichnen sich durch Eigenschaften aus, die charakteristisch für Allergene sind. Es sind in der Regel kleine Proteine (5 bis 70 kDa), die bei niedrigen pH-Werten stabil und resistent gegenüber Proteolyse sind [HOFFMANN-SOMMERGRUBER 2002]. Die Liste der PR-Proteine umfasst derzeit siebzehn Proteinfamilien, wobei nach aktuellem Wissensstand in den sieben im Folgenden aufgeführten Familien der PR-Proteine Allergene zu finden sind [BREITENEDER/EBNER 2000, VAN LOOM/VAN STRIEN 1999, HOFFMANN-SOMMERGRUBER 2000, EBNER ET AL 2001, VAN LOON ET AL 2006].

PR-2	β-1,3-Glukanasen
PR-3	Chitinasen Klasse I, II, IV
PR-4	Chitinasen Klasse I, II
PR-5	Thaumatococcus-ähnliche Proteine
PR-8	Klasse III Chitinasen
PR-10	Ribonuklease-ähnliche Proteine (Bet v 1-homologe Proteine)
PR-14	Lipid Transfer Proteine

Die im Wein bzw. in der Weintraube enthaltenen potentiellen Allergene, die alle der Gruppe der PR-Proteine zuzuordnen sind, werden im Folgenden diskutiert.

#### ***Thaumatococcus-ähnliche Proteine***

Thaumatococcus-ähnliche Proteine (TLP) enthalten sechzehn konservierte Cysteine, die acht Disulfidbrücken ausbilden, welche die Hitzestabilität sowie die Resistenz gegenüber Proteasen und pH-induzierter Denaturierung bedingen. Die Bildung der Disulfidbrücken scheint für die IgE-Bindungsfähigkeit wichtig zu sein [BREITENEDER 2004]. Wie der Sequenzvergleich und das Proteinmodell eines TLP aus der Weinbeere auf Grundlage des TLP aus der Banane in Abbil-

dung 39 (S. 111) zeigt, sind die sechzehn Cysteine konserviert und können theoretisch acht Disulfidbrücken ausbilden.

Aus der Familie der Thaumatin-ähnlichen Proteine sind die in Tabelle 28 gelisteten Proteine bereits als Nahrungsmittelallergene beschrieben.

**Tabelle 28: TLP-Allergene in Nahrungsmitteln** [www.allergen.org, Stand 01.10.2008]

Allergen	Spezies	Literatur
Mal d 2	Apfel ( <i>Malus domestica</i> )	HSIEH ET AL 1995, KREBITZ ET AL 2003
Pru av 2	Süßkirsche ( <i>Prunus avium</i> )	INSCHLAG ET AL 1998
Cap a 1	Paprika ( <i>Capsicum annuum</i> )	FUCHS ET AL 2002, JENSEN-JAROLIN ET AL 1998
Act d 2	Kiwi ( <i>Actinidia deliciosa</i> )	GAVROVIC-JANKULOVIC ET AL 2002
	Banane ( <i>Musa acuminata</i> )	LEONE ET AL 2006
Lyc e NP24	Tomate ( <i>Lycopersum esculentum</i> )	GHOSH/CHAKRABARTI 2008
	Traube ( <i>Vitis vinifera</i> )	PASTORELLO ET AL 2003

In Pollen sind bislang folgende TLP als Allergene beschrieben: Jun a 3 in der Bergzeder (*Juniperus ashei*), Cup a 3 in der Arizona-Zypresse (*Cupressus arizonica*), Cup s 3 in der Italienischen Zypresse (*Cupressus sempervirens*) sowie Jun v 3 im Virginischen Wacholder (*Juniperus virginiana*) [MIDORO-HORIUTI ET AL 2000, TOGAWA ET AL 2006, WWW.ALLERGEN.ORG].

Dass Thaumatin-ähnliche Proteine aus Weintrauben allergische Reaktionen auslösen können, wurde von PASTORELLO ET AL (2003) gezeigt, die in Weinbeeren ein TLP mit einem Molekulargewicht von 24 kDa als Minorallergen beschreiben, auf das drei der vierzehn untersuchten Traubenallergiker reagieren. Die N-terminale Sequenz zeigt große Übereinstimmungen zu den als Allergenen beschriebenen Thaumatin-ähnlichen Proteinen aus der Kirsche (Pru av 2) und dem Apfel (Mal d 2). Bei Personen, die eine allergische Reaktion nach Weinkonsum zeigen, löst das TLP keine Reaktion aus. Ob im Wein enthaltene Thaumatin-ähnliche Proteine allergene Reaktionen auslösen können, bedarf somit weiterer Untersuchungen. Während SBORNIK ET AL (2007) in einer Fallstudie die Ergebnisse von PASTORELLO ET AL bestätigen, wird bei Untersuchungen von VASSILOPOULOU ET AL (2007) hingegen keine allergische Reaktion durch Thaumatin-ähnliche Proteine aus der Weinbeere ausgelöst. Unterschiede beim Al-

ter der Patienten und der Region werden als Ursachen für die unterschiedlichen Ergebnisse diskutiert.

Die Sequenzidentitäten und /-ähnlichkeiten der in dem Portugieser Rotwein gefundenen Thaumatin-ähnlichen Proteine mit den bekannten Allergenen dieser Klasse aus Apfel, Kirsche, Kiwi, Banane, Paprika, Tomate, Bergzeder sowie Arizona-Zypresse sind in Tabelle 23 (S. 109) dargestellt. Es zeigt sich, dass die Sequenzidentitäten im Bereich von 31 bis 57 %, die Sequenzähnlichkeiten im Bereich von 44 bis 82 % liegen. Dies lässt vermuten, dass Kreuzreaktionen möglich sind. Die Sequenzidentität im Sequenzbereich der drei bekannten IgE-Bindungsepitope aus der Bergzeder [SOMAN ET AL 2000] liegt für die entsprechenden Peptide bei 50 %, 61,5 % und 21,4 %, so dass zwei der drei Peptide auch bei der Weintraube IgE-Bindungsfähigkeit besitzen könnten. Das vierte Peptid, dessen IgE-Bindungsfähigkeit noch nicht eindeutig zugewiesen werden konnte, stimmt in 63,6% mit der entsprechenden Aminosäureregion der Weintraube überein. Aussagen zur IgE-Bindungsfähigkeit lassen sich alleine anhand der Sequenzidentität jedoch nicht treffen, da die Struktur von entscheidender Bedeutung für die IgE-Bindungsfähigkeit ist. Kristallstrukturen von Thaumatin-ähnlichen Proteinen sind aus Mais, Tabacco, Kirsche, Banane und Tomate bekannt [HTTP://WWW.PDB.ORG/PDB/HOME/HOME.DO, BATALIA ET AL 2000, KOIWA ET AL 1999, LEONE ET AL 2006, GOSH/CHAKRABARTI 2008, DALL'ANTONIA ET AL 2005]. Diese zeigen große strukturelle Ähnlichkeiten, so dass auch von ähnlichen IgE-Bindungsepitopen ausgegangen werden kann.

Auch mit den Pollenallergenen aus der Bergzeder ist die Sequenzähnlichkeit der Thaumatin-ähnlichen Proteine, die in Portugieser Rotwein gefunden werden, mit 57 bis 66 % vergleichsweise hoch. Die Bergzeder ist in Mexiko und den USA heimisch und führt dort zu schwerwiegenden allergischen Reaktionen, in Deutschland findet sie jedoch keine Verbreitung. Eine Allergie gegenüber Thaumatin-ähnlichen Proteinen heimischer Pflanzen ist bislang nicht beschrieben.

Um mögliche Kreuzreaktivitäten zwischen bekannten Allergenen und der Weinbeere bzw. dem Wein zu testen müssten beispielsweise mit den aufgereinigten Thaumatin-ähnlichen Proteinen Inhibierungsassays durchgeführt werden. Eine darauf folgende Überprüfung der klinischen Relevanz könnte einerseits durch Laboruntersuchungen mit Blutseren von Patienten erfolgen, andererseits durch Hauttests direkt am Patienten.

### *Chitinasen*

In einigen Pflanzen sind Allergene aus der Gruppe der Chitinasen beschrieben. Bekannte Lebensmittelallergene sind in Tabelle 29 aufgeführt.

**Tabelle 29: Chitinase-Allergene in Nahrungsmitteln**

[ALLFAM ALLERGEN LIST, WWW.ALLERGEN.ORG, Stand 01.10.2008]

Allergen	Allergenquelle	Referenz
Cas s 5	Kastanie ( <i>Castanea sativa</i> )	DIAZ-PEREALES ET AL 1998
Mus xp	Banane ( <i>Musa x paradisiaca</i> )	SANCHEZ-MONGE ET AL 1999
Pers a 1	Avocado ( <i>Persea americana</i> )	SOWKA ET AL 1998
Ziz m 1	„Chinesische Dattel“, Jujube ( <i>Ziziphus mauritiana</i> )	LEE ET AL 2006
	Traube ( <i>Vitis vinifera</i> )	PASTORELLO ET AL 2003

Neben den in Tabelle 29 aufgeführten Nahrungsmitteln sind die Chitinasen Der f 15 und Der f 18 als Allergene aus der Milbe beschrieben (*Dermatophagoides farinae*). Außerdem findet sich eine als Allergen identifizierte Chitinase (Hev b 11) in Latex (*Hevea brasiliensis*) [WWW.ALLERGEN.ORG, WEBER ET AL 2003, MCCALL ET AL 2001].

PASTORELLO ET AL (2003) diskutieren die Klasse IV Endochitinase VVCHIA4 als das Protein, das zum Auslösen einer Allergie in jungem Rotwein (Vino Novello und Vino Fragolino) führt. Eine Isoform mit einem geringfügig niedrigerem Molekulargewicht – als VVCHIAB benannt – wird identifiziert, jedoch nicht mit einer immunologischen Reaktion in Verbindung gebracht. Während auch SBORNIK ET AL (2007) in einer Fallstudie die Endochitinase als Trauben-/bzw. Weinallergen bestätigen, führen VASSILOPOULOU ET AL (2007) allergische Reaktionen gegenüber Weintrauben nicht auf die Endochitinase zurück. Diese Diskrepanz, die bereits bei den Thaumatin-ähnlichen Proteinen beobachtet wurde, könnte auch hier auf Unterschiede beim Alter der Patienten sowie auf regionale Unterschiede zurückgeführt werden. Hier bedarf es jedoch noch weiterer Untersuchungen, die insbesondere die regionale Verbreitung im Blick haben sollten.

Ein interessanter Aspekt ist auch, dass Personen nicht auf gereiften und gelagerten Rotwein reagieren, sondern nur auf Wein, der nicht gereift ist. Die Vermutung der Autoren liegt im Polymerisierungsgrad der Polyphenole. Während bei der Reifung zunehmend Polyphenole mit den Proteinen Bindungen eingehen, liegt ein vergleichsweise großer Anteil der Proteine bei jungem Rotwein noch in Lösung vor.

Auch könnten Unterschiede in der Rebsorte und in der Traubenkultivierung möglicherweise einen Beitrag zur Erklärung der unterschiedlichen Allergenität liefern. Fragolino Wein, auf welchen bei PASTORELLO ET AL (2003) allergische Reaktionen beobachtet werden, wird aus Trauben der Art *Vitis labrusca* hergestellt. Es ist bekannt, dass *Vitis labrusca*-Trauben eine vierfach höhere Chitinaseaktivität aufweisen als *Vitis vinifera*-Trauben, woraus sich auch Unterschiede in der Allergenität ergeben könnten. In Deutschland sind Trauben der Art *Vitis labrusca* nicht verbreitet. VASSILOPOULOU ET AL (2007) setzen die Schale weißer Trauben der Art *Vitis vinifera* ein, eine allergische Reaktion auf Chitinasen wird nicht beobachtet.

In der vorliegenden Arbeit kann gezeigt werden, dass eine Klasse IV Endochitinase mit einem Molekulargewicht von 27 kDa auch in dem fertig ausgebauten Portugieser Rotwein gefunden wird. Untersuchungen zur allergenen Wirksamkeit stehen noch aus.

Für die allergene Wirkung der Chitinasen scheint die N-terminale Hevein-Domäne von entscheidender Bedeutung zu sein: Klasse I Chitinasen mit einer N-terminalen Hevein-Domäne zeigen allergene Wirksamkeit, während Klasse II Chitinasen, welchen diese Domäne fehlt, keine allergene Reaktion bewirken [DIAZ-PEREALES ET AL 1998, BLANCO ET AL 1999].

Hevein ist als Allergen, welches insbesondere in Latex aus dem Kautschukbaum *Hevea brasiliensis* weit verbreitet ist. Es wird im Zusammenhang mit dem Latex-Frucht-Syndrom diskutiert [DIAZ-PEREALES ET AL 1999, BEEZHOLD ET AL 1997]. Wie auch die Klasse IV Endochitinase aus der Weinbeere wird es der PR-Familie 4 zugeordnet. Mit dem entsprechenden Sequenzabschnitt der im Wein identifizierten Endochitinase zeigt Hevein eine Sequenzidentität von 30 % (siehe Abbildung 42). Im Bereich der zwei IgE-Bindungs epitope des Heveins liegt die Sequenzidentität bei 36,4 % und bei 25 %, so dass eine Kreuzreaktivität zwischen Latex und der Weinbeere der Sequenz nach zu urteilen nicht zu erwarten ist, wie dies beispielsweise für eine Chitinase aus Reis beschrieben ist [ALENIUS ET AL 1996, BEEZHOLD ET AL 1997].

KARISOLA ET AL (2005) konnten zeigen, dass die isolierten Hevein-ähnlichen Domänen aus Banane und Avocado eine allergische Reaktion auslösen konnten, nicht jedoch die entsprechende Endochitinase. Folglich sollte bei den Versuchen zur Allergenität sowohl die Endochitinase als auch die daraus isolierte Hevein-ähnliche Domäne eingesetzt werden.

### ***Lipid Transfer Proteine***

Lipid Transfer Proteine zeichnen sich durch eine hohe Stabilität gegenüber chemischen und physikalischen Behandlungen wie Hitze, niedrigem pH-Wert und Proteolyse aus. Diese Eigenschaften sind gute Voraussetzungen für die Wirksamkeit der Lipid Transfer Proteine als Nahrungsmittelallergene mit einer Sensibilisierung über den Gastrointestinaltrakt, da sie die

sauren und proteolytischen Bedingungen im Magen-Darm-Trakt nahezu unbeschadet überstehen können [SALCEDO ET AL 2004, ASERO ET AL 2002, BALLMER-WEBER 2002, PASTORELLO/ROBINO 2004]. Bislang konnten eine Reihe von Lipid Transfer Proteinen als Nahrungsmittelallergene identifiziert werden. Weite Verbreitung finden sie insbesondere in Früchten der *Rosaceae*- Familie. Da Kreuzreaktivitäten auch zwischen botanisch nicht verwandten Pflanzenfamilien beobachtet werden, werden sie als wichtige Pan-Allergene diskutiert. Im Gegensatz zu den meisten anderen Nahrungsmittelallergenen tritt eine Sensibilisierung über den Gastrointestinaltrakt bei Personen auf, die nicht auf die typischen Inhalationsallergene reagieren. [PASTORELLO ET AL 1999, ASERO ET AL 2000, DÍAZ-PERALES ET AL 2000, ASERO ET AL 2001, ASERO ET AL 2002, BALLMER-WEBER 2002, PASROTELLO/ROBINO 2004, ASERO ET AL 2007].

In Tabelle 30 sind als Nahrungsmittelallergene beschriebene Lipid Transfer Proteine gelistet.

**Tabelle 30: Allergene aus der Gruppe der LTP in Nahrungsmitteln**

[modifiziert nach PASTORELLO/ROBINO 2004, [www.allergen.org](http://www.allergen.org); Stand: 01.10.2008]

Allergen	Allergenquelle	Referenz
Pru p 3	Pfirsich ( <i>Prunus persica</i> )	PASTORELLO ET AL 1999
Pru av 3	Kirsche ( <i>Prunus avium</i> )	SCHEURER ET AL 2001
Pru d 3	Pflaume ( <i>Prunus domestica</i> )	PASTORELLO ET AL 2001
Pru ar 3	Aprikose ( <i>Prunus armeniaca</i> )	PASTORELLO ET AL 2000
Mal d 3	Apfel ( <i>Malus domestica</i> )	PASTORELLO ET AL 1999
Cor a 8	Haselnuss ( <i>Corylus avellana</i> )	PASTORELLO ET AL 2002
Jug r 3	Walnuss ( <i>Juglans regia</i> )	PASTORELLO ET AL 2004
Cas s 8	Kastanie ( <i>Castanea sativa</i> )	DIAZ-PERALES ET AL 2000
Vit v 1	Traube ( <i>Vitis vinifera</i> )	PASTORELLO ET AL 2003
Zea m 1	Mais ( <i>Zea mays</i> )	PASTORELLO ET AL 2000
Aspa o 1	Spargel ( <i>Asparagus officinalis</i> )	DIAZ-PERALES ET AL 2002
Lac s 1	Salat ( <i>Lactuca sativa</i> )	SAN MIGUEL-MONCIN ET AL 2003
Lyc e 3	Tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> )	WWW.ALLERGEN.ORG
Cit r 3	Mandarine ( <i>Citrus reticulata</i> )	EBO ET AL 2007
Rub i 3	Himbeere ( <i>Rubus idaeus</i> )	MARZBAN ET AL (unveröffentlicht; NCBI-Homepage)
Fra a 3	Erdbeere ( <i>Fragaria ananassa</i> )	WWW.ALLERGEN.ORG

Neben den in Tabelle 30 aufgeführten Nahrungsmittelallergenen der Lipid Transfer Proteine sind auch in Pollen und Latex Allergene dieser Familie bekannt, wie Amb a 6 in beifußblättriger Ambrosie (*Ambrosia artemisiifolia*), Art v 3 in Beifuss (*Artemisia vulgaris*), Par j 1 und Par j 2 in Mauer-Glaskraut (*Parietaria judaica*), Cas s 8 in Kastanie (*Castanea sativa*), Cor a 8 in Haselnuss (*Corylus avellana*), Pla a 3 in der Platane (*Platanus acerifolia*), Ole e 7 in Olive (*Olea europea*) sowie Hev b 12 in Latex (*Hevea brasiliensis*) [PASTORELLO/ROBINO 2004, WWW.ALLERGEN.ORG]. Weiterhin gibt es klinische Studien, die bei Patienten mit einer Allergie gegenüber Früchten der *Rosacea*-Familie auch allergische Reaktionen auf ein breites Spektrum an pflanzlichen Nahrungsmitteln, beispielsweise aus den Familien der Leguminosen (Hülsenfrüchte), Solanaceae (Nachtschattengewächse), Brassicaceae (Kreuzblütengewächse), Umbelliferae (Doldenblütler) sowie Rutaceae (Rautengewächse) finden [ASERO ET AL 2000, ASERO ET AL 2002].

Das Lipid Transfer Protein Vit v 1 ist das einzige Protein von *Vitis vinifera*, welches in der Allergendatenbank der International Union of Immunological Societies geführt wird [WWW.ALLERGEN.ORG]. Neben der von PASTORELLO ET AL beschriebenen Isoform P4 stufen VASSILOPOULOU ET AL eine weitere Isoform P1 (aus weißen Trauben) als allergen ein, welches als Vit v 1.0101 benannt wird [PASTORELLO ET AL 2003, VASSILOPOULOU ET AL 2007, WWW.ALLERGEN.ORG]. Es konnte gezeigt werden, dass die IgE-Bindungsfähigkeit der Lipid Transfer Proteine auch nach thermischer Behandlung noch vorhanden ist [BRENNNA ET AL 2000, PASTORELLO/ROBINO 2004]. Dies zeigt sich auch am Beispiel der allergischen Reaktionen gegenüber Bier, die auf das LTP der Gerste, das den Brauprozess übersteht, zurückgeführt werden [BREITENEDER/EBNER 2000].

Da eine allergische Reaktion bislang nur auf das Lipid Transfer Protein aus der Weinbeere gezeigt wurde, und nicht auf das LTP im Wein, gilt es zu prüfen, ob dieses Protein im Wein noch vollständig intakt ist und eine IgE-vermittelte Allergiereaktion auslösen kann.

Im Rahmen dieser Arbeit kann das Vorhandensein des Lipid Transfer Proteins Isoform 4 in Portugieser Rotwein des Jahrgangs 2005 als auch für Dornfelder Rotwein der Jahrgänge 2002, 2003, 2004 und 2005 gezeigt werden. Darauf aufbauend ist es Ziel, das LTP direkt aus dem Wein zu isolieren und auf die IgE-Bindungsfähigkeit zu überprüfen. Auch soll aufbauend auf den Ergebnissen dieser Arbeit überprüft werden, ob die Weinsorte, insbesondere der Unterschied zwischen Weiß- und Rotwein, einen Einfluss auf die Allergenität ausübt. Dies könnte von Bedeutung sein, da bei der Rotweinherstellung Proteine aus der Beerenschale wie das LTP im Vergleich zum Weißwein vermehrt in den Wein gelangen und für die Früchte der *Rosaceae* wie Apfel, Birne und Pfirsich gezeigt werden konnte, dass das allergene Potential des LTP in der Schale höher als im Fruchtfleisch ist [ASERO ET AL 2002, FERNÁNDEZ-

RIVAS/CUEVAS 1999, PASROTELLO/ROBINO 2004]. Auf den Wein übertragen würde dies bedeuten, dass Rotwein mit dem wesentlich höheren Gehalt an LTP möglicherweise auch ein höheres allergenes Potential besitzen könnte als Weißwein.

Ein interessanter Aspekt ist auch, ob die Lipid Transfer Proteine aus den Hybridreben, die in dem untersuchten Portugieser Rotwein gefunden wurden, allergenes Potential zeigen und somit die Art der Züchtung möglicherweise die Allergenität der Weinbeere und des Weins beeinflussen kann.

Die Allergie gegenüber dem LTP aus der Weinbeere beruht laut PASTORELLO ET AL (2003) auf einer primären Sensibilisierung gegenüber Pfirsich, da nur einige der IgE-Bindungsepitope von Pfirsich in der Traube vorhanden sind. VASSILOPOULOU ET AL (2007) hingegen postulieren eine primäre Reaktion gegenüber der Weinbeere, da bei vielen der untersuchten Patienten eine allergische Reaktion zunächst auf die Weinbeere auftritt.

Die Sequenzidentitäten und /-ähnlichkeiten der in Portugieser Rotwein gefundenen Lipid Transfer Proteine mit bekannten Allergenen dieser Klasse sind in Tabelle 22 (S. 105) dargestellt. Ein Sequenz-/ und Strukturvergleich des LTP Pru p 3 aus dem Pfirsich und Vit v 1 aus der Weinbeere ist in Abbildung 38 (S. 108) dargestellt. Die Sequenzidentität liegt bei 60 %, die Sequenzähnlichkeit bei 81 %. Während generell der Sequenzvergleich zur Vorhersage einer IgE-Reaktivität nur bedingt aussagekräftig ist, konnte für Lipid Transfer Proteine gezeigt werden, dass die Sequenzidentität als gute Aussage in Bezug zur Pan-Allergenität zu sehen ist [SANKIAN ET AL 2005, ASERO ET AL 2001]. Hohe Kreuzreaktivitäten werden zwischen Früchten der *Rosaceae*-Familie, insbesondere der *Prunoideae*, die sich durch Sequenzidentitäten um 90 % auszeichnen, beobachtet. Mit einer Reihe weiterer Nahrungsmittel wie beispielsweise auch der Weinbeere sind Kreuzreaktivitäten beschrieben, was zur Bezeichnung des LTP-Syndroms geführt hat. Eine vergleichsweise geringe Kreuzreaktivität hingegen besteht zwischen Pollen und Früchten wie beispielsweise dem Mauer-Graskraut und dem Pfirsich, wo eine Sequenzidentität kleiner 30 % besteht [PASTORELLO/ROBINO 2004, PASTORELLO ET AL 2003, VASSILOPOULOU ET AL 2007, PASTORELLO ET AL 2002, BALLMER-WEBER 2002]. Bezeichnend für eine LTP-Allergie ist das häufige Auftreten schwerwiegender systemischer Reaktionen. Zurückzuführen ist dies auf die hohe Stabilität bei sauren und proteolytischen Bedingungen, die es Lipid Transfer Proteinen ermöglichen, den Gastrointestinaltrakt nahezu unverändert zu passieren [FERNÁNDEZ-RIVAS ET AL 1997, FERNÁNDEZ-RIVAS ET AL 2003, PASTORELLO ET AL 2003, SCHOCKER ET AL 2004, PASTORELLO/ROBINO 2004].

Weiterhin charakteristisch für das sogenannte LTP-Syndrom ist die geographische Verteilung. Während es im Mittelmeerraum häufig auftritt, ist es in Nord- und Mitteleuropa vergleichs-

weise wenig verbreitet. In diesen Regionen ist eine Allergie gegenüber Früchten mit einer primären Sensibilisierung gegenüber Pollen verbunden, was beim LTP-Syndrom nicht der Fall ist [BALLMER-WEBER 2002, SCHEURER ET AL 2001, PASTORELLO/ROBINO 2004]. Dass sich das LTP-Syndrom nicht ausschließlich auf den Mittelmeerraum beschränkt, zeigt eine Fallstudie von SCHÄD ET AL (2005), die bei einer deutschen Patientin eine allergische Reaktion gegenüber Trauben und Wein auf das LTP zurückführen.

Da zunehmend Obst aus Mittelmeerländern auch in Deutschland während des gesamten Jahres konsumiert wird, könnte eine LTP-Allergie in Zukunft eine wachsende Rolle spielen.

### *Weitere potentielle Allergene der Weinbeere*

VASSILOPOULOU ET AL (2007) diskutieren neben dem Lipid Transfer Protein als Majorallergen eine Reihe weiterer Proteine als Minorallergene in der Weinbeere: Expansin mit einem Molekulargewicht von 28 kDa, ein Polygalacturonase-inhibierendes Protein (PIP) mit 37,5 kDa, eine  $\beta$ -1,3-Glukanase mit 39 kDa sowie ein nicht weiter identifiziertes Protein mit einem Molekulargewicht von 60 kDa. Diese Proteine können bei den in dieser Arbeit untersuchten Weinsorten nicht gefunden werden.

RODRÍGUEZ ET AL (2001) finden bei einem fünfjährigen Mädchen mit einer Traubenallergie als auslösendes Protein mittels Western Blot eines mit einem Molekulargewicht von 94 kDa, welches jedoch nicht weiter identifiziert wurde.

SANKIAN ET AL (2005) zeigen, dass die IgE-Bindungsfähigkeit des Profilins Cru m 2, einem Hauptallergen der Melone, durch Traubenextrakt inhibiert werden kann. Dies legt nahe, dass eine Kreuzallergenität zwischen dem Profilin der Melone und der Weinbeere besteht. In der Weinbeere selbst wurde Profilin bislang nicht beschrieben.

Gegenüber den bei der Weinherstellung teilweise eingesetzten proteinhaltigen Schönungsmitteln Eiweiß und Hausenblase wurde bei Ei- bzw. Fischallergikern keine klinisch relevante Reaktion beobachtet [ROLLAND ET AL 2006]. Eine weitere Studie findet in deutschen Weinen keine Rückstände der Schönungsmittel Hausenblase, Fischgelatine und Kasein, während Lysozym und Eiweiß in sehr geringen Mengen als Rückstände im Wein gefunden werden, so dass dahingehend eine Überprüfung möglicher Allergien notwendig erscheint [WEBER ET AL 2007].

**Fazit**

Untersuchungen zur Charakterisierung von Nahrungsmittelallergenen auf molekularer Ebene stellen die Grundlage einer fundamentierten Diagnostik und Therapie dar. Die Diagnostik mit kommerziellen Extrakten ist häufig nicht optimal, da die Konzentrationen der einzelnen Proteine im Gesamtextrakt zu niedrig sind, um detektiert zu werden. Aufgereinigte oder rekombinant hergestellte Extrakte sind somit für eine hohe Sensitivität und Spezifität anzustreben. Weiterhin gilt es neue Allergene zu charakterisieren und Kreuzreaktionen zu definieren [DIAZ-PEREALES ET AL 2002, PASTORELLO/ROBINO 2004, CHAPMAN ET AL 2000, EIGENMANN 2004].

Die beschriebenen Fälle der Wein-/ und Traubenallergiker zeigen, dass eine Wein-/ bzw. Traubenallergie möglicherweise nicht so selten ist wie häufig angenommen wird und ein ernst zu nehmendes Problem mit teils schwerwiegenden Symptomen darstellt. Auch können Symptome häufig nicht direkt der entsprechenden Allergie zugeordnet werden. Somit sind eine epidemiologische Erfassung, die Klärung des Mechanismus der Primärsensibilisierung sowie der molekularen Struktur allergieauslösender Proteine und eine Überprüfung der klinischen Relevanz von großer Wichtigkeit [KALOGEROMITROS ET AL 2005, VASSILOPOULOU ET AL 2007].

Durch die im Rahmen dieser Arbeit erlangten Kenntnisse der potentiell allergenen Proteine im Wein können diese nun weiter charakterisiert sowie immunologisch untersucht werden. Darauf basierend könnte ein diagnostisches Verfahren entwickelt werden, dass zu einer Erkennung von Weinallergenen führt. Da von systemischen Reaktionen wie dem anaphylaktischen Schock nach Weinkonsum berichtet wird, könnten betroffene Patienten sehr davon profitieren. Auf weintechnologischer Basis könnten durch Kenntnis der Proteine Verfahren entwickelt werden, die eine Entfernung der entsprechenden Proteine ermöglichen.

## 5. Zusammenfassung

Untersucht wird die Proteinzusammensetzung verschiedener Weinsorten der Anbauggebiete Rheinhessen, Rheingau und Pfalz. Es erfolgt erstmalig die Identifizierung der Proteine eines Rotweins (Portugieser 2005 aus der Pfalz). Hierzu werden die Proteine mittels Dialyse und Gefriertrocknung konzentriert, auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und mittels ESI-Q-TOF-Massenspektrometrie identifiziert. Von den identifizierten Proteinen des Rotweins stammen zwölf aus der Weinbeere und sechs werden im Laufe der Weinbereitung durch die Hefe eingebracht. Der Großteil der über die Weinbeere in den Wein gelangten Proteine ist der Gruppe der Pathogenese bezogenen Proteine zuzuordnen.

Ein Vergleich der Proteinzusammensetzung verschiedener Rotweine, Weißweine und Roséweine zeigt, dass ein gemeinsames Proteinspektrum in allen Weinsorten enthalten ist, es jedoch auch Unterschiede hinsichtlich der Proteinzusammensetzung und Konzentration der einzelnen Proteine zwischen den Rebsorten, insbesondere roten und weißen, gibt.

In Portugieser Rotwein des Jahrgangs 2005 aus der Pfalz sowie in Dornfelder Rotwein der Jahrgänge 2002, 2003, 2004 und 2005 kann das als Allergen beschriebene Lipid Transfer Protein (Isoform 4) nachgewiesen werden. In den untersuchten Weißweinsorten Riesling, Sauvignon Blanc, Morio Muskat sowie Gewürztraminer ist dieses nicht bzw. nur in sehr geringen Mengen enthalten. Ebenfalls nur in Rotwein wird eine Klasse IV Endochitinase identifiziert, die als Allergen in jungem Rotwein bereits beschrieben wurde. Außerdem bedingen Chitinasen zusammen mit den Thaumatin-ähnlichen Proteinen die Proteininstabilität. Thaumatin-ähnliche Proteine stellen in allen Weinsorten den größten Anteil der Proteine dar.

Viele der Weinproteine liegen in glykosylierter Form vor, was durch die Perjodsäurefärbung und den Lektinblot gezeigt werden kann.

Mit der Detektion von Thaumatin-ähnlichen Proteinen, Lipid Transfer Proteinen sowie einer Endochitinase werden potentielle Allergene im Wein nachgewiesen sowie strukturell mit bekannten Allergenen verglichen. Die Kenntnis der Proteinzusammensetzung im Wein bildet die Grundlage für weiterführende Untersuchungen zur Weinstabilität und zur Allergenität von Weinproteinen.

## 6. Literatur

- ALENIUS H, KALKKINEN N, REUNALA T, TURJANMAA K, PALOSUO T (1996). "The main IgE-binding epitope of a major latex allergen, prohevein, is present in its N-terminal 43-amino acid fragment, hevein." *J Immunol* **156**(4): 1618-25.
- ALLERGENDATENBANKEN: [HTTP://WWW.ALLERGEN.ORG](http://www.allergen.org) (ALLERGEN NOMENCLATURE DER INTERNATIONAL UNION OF IMMUNOLOGICAL SOCIETIES, ALLERGEN NOMENCLATURE SUBCOMMITTEE) UND [HTTP://WWW.MEDUNIWIEN.AC.AT/ALLERGENS/ALLFAM/](http://www.meduniwien.ac.at/allergens/allfam/) (ALL FAM-DATENBASE OF ALLERGEN FAMILIES)
- ALTMANN F (2007). "The Role of Protein Glycosylation in Allergy." *Int Arch Allergy Immunol* **142**: 99-115.
- ANO A., TAKAYANAGI T, UCHIBORI T, OKUDA T, YOKOTSUKA K (2003). "Characterization of a class III chitinase from *Vitis vinifera* cv. Koshu." *J Biosci Bioeng* **95**(6): 645-7.
- ARADHYA, MK, DANGL GS, PRINS BH, BOURSQUOT JM, WALKER MA, MEREDITH CP SIMON CJ (2003). "Genetic structure and differentiation in cultivated grape, *Vitis vinifera* L." *Genet Res* **81**(3): 179-92.
- ARMENTIA A (2008). "Adverse reactions to wine: think outside the bottle." *Curr Opin*
- ARNOLD K, BORDOLI L, KOPP J, SCHWEDE T (2006). "The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling." *Bioinformatics* **22**(2): 195-201.
- ASENSIO T, CRESPO JF, SANCHEZ-MONGE R, LOPEZ-TORREJON G, SOMOZA ML, RODRIGUEZ J, SALCEDO G (2004). "Novel plant pathogenesis-related protein family involved in food allergy." *J Allergy Clin Immunol* **114**(4): 896-9.
- ASERO R, MISTRELLO G, RONCAROLO D, AMATO S (2007). "Detection of some safe plant-derived foods for LTP-allergic patients." *Int Arch Allergy Immunol* **144**(1): 57-63.
- ASERO R, MISTRELLO G, RONCAROLO D, AMATO S, CALDIRONI G, BAROCCI F, VAN REE R (2002). "Immunological cross-reactivity between lipid transfer proteins from botanically unrelated plant-derived foods: a clinical study." *Allergy* **57**(10): 900-6.
- ASERO R, MISTRELLO G, RONCAROLO D, DE VRIES SC, GAUTIER MF, CIURANA CL, VERBEEK E, MOHAMMADI T, KNUL-BRETTLOVA V, AKKERDAAS JH, BULDER I, AALBERSE RC VAN REE R (2000). "Lipid transfer protein: a pan-allergen in plant-derived foods that is highly resistant to pepsin digestion." *Int Arch Allergy Immunol* **122**(1): 20-32.
- ASERO R, MISTRELLO G, RONCAROLO D, DE VRIES SC, GAUTIER MF, CIURANA CL, VERBEEK E, MOHAMMADI T, KNUL-BRETTLOVA V, AKKERDAAS JH, BULDER I, AALBERSE RC AND VAN REE R (2001). "Lipid transfer protein: a pan-allergen in plant-derived foods that is highly resistant to pepsin digestion." *Int Arch Allergy Immunol* **124**(1-3): 67-9.
- ASHCROFT AE (2003). "Protein and peptide identification: the role of mass spectrometry in proteomics." *Nat Prod Rep* **20**(2): 202-15.
- BALLMER-WEBER BK (2002). "Lipid transfer protein as a potential panallergen?" *Allergy* **57**(10): 873-5.
- BATALIA MA, MONZINGO AF, ERNST S, ROBERTS W, ROBERTUS JD (1996). "The crystal structure of the anti-fungal protein zeamatin, a member of the thaumatin-like, PR-5 protein family." *Nat Struct Biol* **3**(1): 19-23.
- BAUR JA, PEARSON KJ, PRICE NL, JAMIESON HA, LERIN H, KALRA A, PRABHU VV, ALLARD JS, LOPEZ-LLUCH G, LEWIS K, PISTELL PJ, POOSALA S, BECKER KG, BOSS O, GWINN D, WANG M, RAMASWAMY S, FISHBEIN KW, SPENCER RG, LAKATTA EG, LE COUTEUR D, SHAW RJ, NAVAS P, PUIGSERVER P, INGRAM DK, DE CABO R, SINCLAIR DA (2006). "Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet." *Nature* **444**(7117): 337-42.

- BAYLY F, BERG HW (1967). "GRAPE AND WINE PROTEINS OF WHITE WINE VARIETALS." American journal of Enology and Viticulture **18**(1): 18-32.
- BEEZHOLD DH, KOSTYAL DA, SUSSMAN GL (1997). "IgE epitope analysis of the hevein preprotein; a major latex allergen." Clin Exp Immunol **108**(1): 114-21.
- BEINTEMA JJ (1994). "Structural features of plant chitinases and chitin-binding proteins." FEBS Lett **350**(2-3): 159-63.
- BELLINGHAUSEN I, HARINGER B, LAFARGUE B, STRAND D, KONIG B, DECKER H, SALOGA J (2008). "Allergological implication of the quaternary hexameric structure of the cockroach allergen Per a 3." Clin Exp Allergy **38**(3): 539-48.
- BERGNER K-G, LEMPERLE E (2001). Weinkompodium: Botanik, Sorten, Anbau, Bereitung. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- BIRCHER A, BIGLIARDI JP, YILMAZ B (1999). "Anaphylaxis resulting from selective sensitization to Americana grapes." J Allergy Clin Immunol **104**(5): 1111-3.
- BLADE WH, BOULTON R (1988). "Adsorption of Protein by Bentonite in a Model Wine Solution " American journal of Enology and Viticulture **39**(3): 193-199.
- BLAKE MS, JOHNSTON KH, RUSSELL-JONES GJ, GOTSCHLICH EC (1984). "A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots." Anal Biochem **136**(1): 175-9.
- BLANCO C, DIAZ-PERALES A, COLLADA C, SANCHEZ-MONGE R, ARAGONCILLO C, CASTILLO R, ORTEGA N, ALVAREZ M, CARRILLO T, SALCEDO G (1999). "Class I chitinases as potential panallergens involved in the latex-fruit syndrome." J Allergy Clin Immunol **103**(3 Pt 1): 507-13.
- BLUM H, BEIER H, GROSS HJ (1987). "Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels." Electrophoresis **8**: 93-99.
- BORGHEGAN F, BASSO D, CHIECO BIANCHI F, FAVERO E, PLEBANI M (2004). "Allergy to wine." Allergy **59**(10): 1135-6.
- BRADFORD MM (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- BRÉAS O, RENIERO F, SERRINI G (1994). "Isotope Ratio Mass Spectrometry: Analysis of Wines from Different European Countries." Rapid Communications in Mass Spectrometry **8**: 967-970.
- BREITENEDER H, EBNER C (2000). "Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens." J Allergy Clin Immunol **106**(1 Pt 1): 27-36.
- BREDEHORST R, DAVID K (2001). "What establishes a protein as an allergen?" J Chromatogr B Biomed Sci Appl **756**(1-2): 33-40.
- BREITENEDER H (2004). "Thaumatococcus-like proteins - a new family of pollen and fruit allergens." Allergy **59**: 479-481.
- BREITENEDER H, MILLS C (2005). "Nonspecific lipid-transfer proteins in plant foods and pollens: an important allergen class." Curr Opin Allergy Clin Immunol **5**(3): 275-9.
- BREITENEDER H, MILLS EN (2005). "Molecular properties of food allergens." J Allergy Clin Immunol **115**(1): 14-23; quiz 24.
- BRISSONNET F, MAUJEAN A (1993). "Characterization of Foaming Proteins in a Champagne Base Wine." American journal of Enology and Viticulture **44**(3): 297-301.
- BUBLIN M, RADAUER C, KNULST A, WAGNER S, SCHEINER O, MACKIE AR, MILLS EN, BREITENEDER H (2008). "Effects of gastrointestinal digestion and heating on the allergenicity of the kiwi allergens Act d 1, actinidin, and Act d 2, a thaumatococcus-like protein." Mol Nutr Food Res **52**(10): 1130-9.

- BUSAM G, KASSEMAYER HH, MATERN U (1997). "Differential expression of chitinases in *Vitis vinifera* L. responding to systemic acquired resistance activators or fungal challenge." Plant Physiol **115**(3): 1029-38.
- CANALS JM, AROLA L, ZAMORA F (1998). "Protein Fraction Analysis of White Wine by FPLC." American journal of Enology and Viticulture **49**(4): 383-288.
- CARIDI A (2006). "Enological functions of parietal yeast mannoproteins." Antonie Van Leeuwenhoek **89**(3-4): 417-22.
- CASTRO AJ, CARAPITO C, ZORN N, MAGNE C, LEIZE E, VAN DORSSELAER A, CLEMENT C (2005). "Proteomic analysis of grapevine (*Vitis vinifera* L.) tissues subjected to herbicide stress." J Exp Bot **56**(421): 2783-95.
- CASTRO AJ, SALADIN G, BEZIER A, MAZEYRAT-GOURBEYRE F, BAILLIEUL F, CLEMENT C (2008). "The herbicide flumioxazin stimulates pathogenesis-related gene expression and enzyme activities in *Vitis vinifera*." Physiol Plant.
- CHAPMAN MD, SMITH AM, VAILES LD, ARRUDA LK, DHANARAJ V, POMES A (2000). "Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic disease." J Allergy Clin Immunol **106**(3): 409-18.
- CHATZI L, ALEGAKIS A, KRUGER-KRASAGAKIS S, LIONIS C (2006). "Skin symptoms and work-related skin symptoms among grape farmers in Crete, Greece." Am J Ind Med **49**(2): 77-84.
- CILINDRE C, JEGOU S, HOVASSE A, SCHAEFFER C, CASTRO AJ, CLEMENT C, VAN DORSSELAER A, JEANDET P, MARCHAL R (2008). "Proteomic approach to identify champagne wine proteins as modified by *Botrytis cinerea* infection." J Proteome Res **7**(3): 1199-208.
- CLAYTON DE, BUSSE W (1980). "Anaphylaxis to wine." Clin Allergy **10**(3): 341-3.
- CORDER R, MULLEN W, KHAN NQ, MARKS SC, WOOD EG, CARRIER MJ, CROZIER A (2006). "Red wine procyanidins and vascular health." Nature **444**(30): 566.
- DALL'ANTONIA Y, PAVKOV T, FUCHS H, BREITENEDER H, KELLER W (2005). "Crystallization and preliminary structure determination of the plant food allergen Pru av 2." Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun **61**(Pt 2): 186-8.
- DAMBROUCK T, MARCHAL R, MARCHAL-DELAHAUT L, PARMENTIER M, MAUJEAN A, JEANDET P (2003). "Immunodetection of proteins from grapes and yeast in a white wine." J Agric Food Chem **51**(9): 2727-32.
- DAMBROUCK T, MARCHAL R, CILINDRE C, PARMENTIER M, JEANDET P (2005). "Determination of the grape invertase content (using PTA-ELISA) following various fining treatments versus changes in the total protein content of wine. relationships with wine foamability." J Agric Food Chem **53**(22): 8782-9.
- DAVIES C, ROBINSON SP (1996). "Sugar accumulation in grape berries. Cloning of two putative vacuolar invertase cDNAs and their expression in grapevine tissues." Plant Physiol **111**(1): 275-83.
- DAWES H, BOYES S, KEENE J, HEATHERBELL D (1994). "Protein Instability of Wines: Influence of Protein Isoelectric Point." American journal of Enology and Viticulture **45**(3): 319-326.
- DE LA LASTRA CA, VILLEGAS I (2007). "Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications." Biochem Soc Trans **35**(Pt 5): 1156-60.
- DE LANGE DE (2007). "From red wine to polyphenols and back: A journey through the history of the French Paradox." Thrombosis Research **119**: 403-406.
- DE PERSON M, SEVESTRE A, CHAIMBAULT P, PERROT L, DUCHIRON F, ELFAKIR C (2004). "Characterization of low-molecular weight peptides in champagne wine by lipid chromatography/tandem mass spectrometry." Analytica Chimica Acta **520**: 149-158.
- DERCKEL J-P, LEGENDRE L., AUDRAN J-C, HAYE B, LAMBERT B (1996). "Chitinases of the grapevine (*Vitis vinifera* L.): five isoforms included in leaves by salicylic acid are constitutively expressed in other tissues." Plant Science **119**(1): 31-37.

- DIAZ-PERALES A, COLLADA C, BLANCO C, SANCHEZ-MONGE R, CARRILLO T, ARAGONCILLO C, SALCEDO G (1999). "Cross-reactions in the latex-fruit syndrome: A relevant role of chitinases but not of complex asparagine-linked glycans." J Allergy Clin Immunol **104**(3 Pt 1): 681-7.
- DIAZ-PERALES A, LOMBARDERO M, SANCHEZ-MONGE R, GARCIA-SELLES FJ, PERNAS M, FERNANDEZ-RIVAS M, BARBER D, SALCEDO G (2000). "Lipid-transfer proteins as potential plant panallergens: cross-reactivity among proteins of Artemisia pollen, Castanea nut and Rosaceae fruits, with different IgE-binding capacities." Clin Exp Allergy **30**(10): 1403-10.
- DORRESTEIN E, FERREIRA RB, LAUREANO O, TEIXEIRA AR (1995). "Electrophoretic and FPLC Analysis of Soluble Proteins in Four Portuguese Wines." American journal of Enology and Viticulture **46**(2): 235-242.
- DUPIN IV, MCKINNON BM, RYAN C, BOULAY M, MARKIDES AJ, JONES GP, WILLIAMS PJ, WATERS EJ (2000a). "Saccharomyces cerevisiae mannoproteins that protect wine from protein haze: their release during fermentation and lees contact and a proposal for their mechanism of action." J Agric Food Chem **48**(8): 3098-105.
- DUPIN IV, STOCKDALE VJ, WILLIAMS PJ, JONES GP, MARKIDES AJ, WATERS EJ (2000b). "Saccharomyces cerevisiae mannoproteins that protect wine from protein haze: evaluation of extraction methods and immunolocalization." J Agric Food Chem **48**(4): 1086-95.
- EBO DG, AHRAZEM O, LOPEZ-TORREJON G, BRIDTS CH, SALCEDO G, STEVENS WJ (2007). "Anaphylaxis from mandarin (Citrus reticulata): identification of potential responsible allergens." Int Arch Allergy Immunol **144**(1): 39-43.
- EIGENMANN PA (2004). "Do we have suitable in-vitro diagnostic tests for the diagnosis of food allergy?" Curr Opin Allergy Clin Immunol **4**(3): 211-3.
- ERLUND I, KOLI R, ALFTHAN G, MARNIEMI J, PUUKKA P, MUSTONEN P, MATTILA P, JULA A (2008). "Favorable effects of berry consumption on platelet function, blood pressure, and HDL cholesterol." Am J Clin Nutr **87**(2): 323-31.
- FERNANDEZ-RIVAS M, CUEVAS M (1999). "Peels of Rosaceae fruits have a higher allergenicity than pulps." Clin Exp Allergy **29**(9): 1239-47.
- FERNÁNDEZ-RIVAS M, VAN REE R, CUEVAS M (1997). "Allergy to *Rosaceae* fruits without related pollinosis." J Allergy Clin Immunol **100**: 728-733.
- FERREIRA RB, MONTEIRO S, PICARRA-PERREIRA MA, TANGANHO MC, LOUREIRO VB, TEIXEIRA AR (2000). "Characterization of the Proteins From Grapes and Wines by Immunological Methods." American journal of Enology and Viticulture **51**(1): 22-27.
- FERREIRA RB, PICARRA-PERREIRA MA, MONTEIRO S, LOUREIRO VB, TEIXEIRA AR (2002). "The wine proteins." Trends in Food Science and Technology **12**: 230-239.
- FLAMINI R, DE ROSSO M (2006). "Mass spectrometry in the analysis of grape and wine proteins." Expert Rev Proteomics **3**(3): 321-31.
- FRENCH-ITALIEN PUBLIC CONSORTIUM FOR GRAPEVINE GENOME CHARACTERIZATION (2007). "The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla." Nature **449**: 463-468
- FUCHS HC, HOFFMANN-SOMMERGRUBER K, WAGNER B, KREBITZ M, SCHEINER O, BREITENEDER H (2002). "Heterologous Expression in Nicotiana Benthamiana of Cap a 1, a Thaumatin-like Protein and Major Allergen from Bell Pepper (Capsicum Annuum)." J Allergy Clin Immunol **S134**: 390.
- FUKAO H, IJIRI Y, MIURA M, HASHIMOTO M, YAMASHITA T, FUKUNAGA C, OIWA K, KAWAI Y, SUWA M, YAMAMOTO J (2004). "Effect of trans-resveratrol on the thrombogenicity and atherogenicity in apolipoprotein E-deficient and low-density lipoprotein receptor-deficient mice." Blood Coagul Fibrinolysis **15**(6): 441-6.
- FUKUI M, YOKOTSUKA K (2003). "Content and Origin of Protein in White and Red Wines: Changes during Fermentation and MAuration." American journal of Enology and Viticulture **54**(3): 178-188.

- GARCIA-CASADO G, PACIOS LF, DIAZ-PERALES A, SANCHEZ-MONGE R, LOMBARDELO M, GARCIA-SELLES FJ, POLO F, BARBER D, SALCEDO G (2003). "Identification of IgE-binding epitopes of the major peach allergen Pru p 3." J Allergy Clin Immunol **112**(3): 599-605.
- GAVROVIC-JANKULOVIC M, IRKOVIC T, VUCKOVIC O, ATANASKOVIC-MARKOVIC M, PETERSEN A, GOJGIC G, BURAZER L, JANKOV RM (2002). "Isolation and biochemical characterization of a thaumatin-like kiwi allergen." J Allergy Clin Immunol **110**(5): 805-10.
- GERMAN JB, WALZEM RL (2000). "The health benefits of wine." Annu Rev Nutr **20**: 561-93.
- GHOSH R, CHAKRABARTI C (2008). "Crystal structure analysis of NP24-I: a thaumatin-like protein." Planta **228**(5): 883-90.
- GIANNOCCARO F, MUNNO G, RIVA G, PUGLIESE S, PARADISO MT, FERRANNINI A (1998). "Oral allergy syndrome to grapes." Allergy **53**(4): 451-2.
- GLOSSMANN H, NEVILLE DM (1971). "Glycoproteins of Cell Surfaces." The Journal of Biological Chemistry **246**(20): 6339-6346.
- GOLDSTEIN IJ, HOLLERMAN CE, MERRICK JM (1965). "Protein-Carbohydrate Interaction. I. the Interaction of Polysaccharides with Concanavalin A." Biochim Biophys Acta **97**: 68-76.
- GOLDSTEIN IJ, IYER RN (1966). "Interaction of concanavalin A, a phytohemagglutinin, with model substrates." Biochim Biophys Acta **121**(1): 197-200.
- GOLDSTEIN IJ, SO LL (1965). "Protein-carbohydrate interaction. 3. Agar gel-diffusion studies on the interaction of Concanavalin A, a lectin isolated from jack bean, with polysaccharides." Arch Biochem Biophys **111**(2): 407-14.
- GOMÈS E, SAGOT E, GAILLARD C, LAQUITAINE L, POINSSOT B, SANEJOUAND YH, DELROT S, COUTOS-THEVENOT P (2003). "Nonspecific lipid-transfer protein genes expression in grape (*Vitis* sp.) cells in response to fungal elicitor treatments." Mol Plant Microbe Interact **16**(5): 456-64.
- GONCALVES F, HEYRAUD A, DE PINHO MN, RINAUDO M (2002). "Characterization of white wine mannoproteins." J Agric Food Chem **50**(21): 6097-101.
- GONZALEZ R, CORREA I, POLO MC, MARTIN-ALVAREZ PJ, RAMOS M (1989). "Classification of Variety Musts by Statistical Analysis of their Electrophoretic Protein Pattern." Food Chem **34**: 103-110.
- GONZALEZ-LARA R, GONZALES LM (1991). "Analysis of the soluble proteins in grape must by two-dimensional electrophoresis." J Chromatogr **451**: 453-458.
- GONZALEZ-RAMOS D, GONZALEZ R (2006). "Genetic determinants of the release of mannoproteins of enological interest by *Saccharomyces cerevisiae*." J Agric Food Chem **54**(25): 9411-6.
- GRASSIN C, DUBOURDIEU D (1989). "Quantitative Determination of *Botrytis* Laccase in Musts and Wines by the Syringaldazine Test." J Sci Food Agric **48**: 369-376.
- GRUDEN-MOVSESIAN A, ILIC N, SOFRONIC-MILOSAVLJEVIC L (2002). "Lectin-blot analyses of *Trichinella spiralis* muscle larvae excretory-secretory components." Parasitol Res **88**(11): 1004-7.
- GUERBETTE F, GROSBOIS M, JOLLIOT-CROQUIN A, KADER JC, ZACHOWSKI A (1999). "Lipid-transfer proteins from plants: structure and binding properties." Mol Cell Biochem **192**(1-2): 157-61.
- GUEX N, PEITSCH MC (1997). "SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling." Electrophoresis **18**(15): 2714-23.
- GUTTMAN A (1996). "Capillary sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis of proteins." Electrophoresis **17**: 1333-1341.

HAYASAKA Y, ADAMS KS, POCOCK KF, BALDOCK GA, WATERS EJ, HOJ PD (2001). "Use of electrospray mass spectrometry for mass determination of grape (*Vitis vinifera*) juice pathogenesis-related proteins: a potential tool for varietal differentiation." J Agric Food Chem **49**(4): 1830-9.

HOFFMANN-SOMMERGRUBER K (2000). "Plant allergens and pathogenesis-related proteins. What do they have in common?" Int Arch Allergy Immunol **122**(3): 155-66.

HOFFMANN-SOMMERGRUBER K (2002). "Pathogenesis-related (PR)-proteins identified as allergens." Biochem Soc Trans **30**(Pt 6): 930-5.

HOLTZHAUER M (1997). "Biochemische Labormethoden". 3. Auflage. Springer Verlag, Berlin; Heidelberg

HORVATH Z, SAIKO P, ILLMER C, MADLENER S, HOECHTL T, BAUER W, ERKER T, JAEGER W, FRITZER-SZEKERES M, SZEKERES T (2006). "Resveratrol, an ingredient of wine, acts synergistically with Ara-C and tiazofurin in HL-60 human promyelocytic leukemia cells." Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids **25**(9-11): 1019-24.

HSIEH LS, MOOS M, LIN Y (1995). "Characterization of apple 18 and 31 kd allergens by microsequencing and evaluation of their content during storage and ripening." J Allergy Clin Immunol **96**(6 Pt 1): 960-70.

HSU JC, HEATHERBELL D (1987a). "Isolation and Characterization of Soluble Proteins in Grapes, Grape Juice, and Wine." American journal of Enology and Viticulture **38**(1): 6-10.

HSU JC, HEATHERBELL D (1987b). "Heat-Unstable Proteins in Wine. I. Characterization and Removal by Bentonite Fining and Heat Treatment." American journal of Enology and Viticulture **38**(1): 11-16.

HSU JC, HEATHERBELL D (1987c). "Heat-Unstable Proteins in Grape Juice and Wine. II. Characterization and Removal by Ultrafiltration." American journal of Enology and Viticulture **38**(1): 17-22.

INSCHLAG C, HOFFMANN-SOMMERGRUBER K, O'RIORDAIN G, AHORN H, EBNER C, SCHEINER O, BREITENEDER H (1998). "Biochemical characterization of Pru a 2, a 23-kD thaumatin-like protein representing a potential major allergen in cherry (*Prunus avium*)." Int Arch Allergy Immunol **116**(1): 22-8.

ISHIKAWA N, NAKAGAWA H, OGURA N (1989). "Isoforms of Invertase in Grape Berries." Agric Biol Chem **53**(3): 837-838.

JANEWAY C, TRAVERS P, WALPORT M, SHLOMCHIK M (2002): „Immunologie“. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; Berlin

JAKOB LL (Hrsg.), Hamatschek J, Scholten G: Der Wein. 10. Auflage 1997, Eugen Ulmer Verlag

JENKINS JA, GRIFFITHS-JONES S, SHEWRY PR, BREITENEDER H, MILLS EN (2005). "Structural relatedness of plant food allergens with specific reference to cross-reactive allergens: an in silico analysis." J Allergy Clin Immunol **115**(1): 163-70.

JENSEN-JAROLIM E, SANTNER B, LEITNER A, GRIMM R, SCHEINER O, EBNER C, BREITENEDER H (1998). "Bell peppers (*Capsicum annuum*) express allergens (profilin, pathogenesis-related protein P23 and Bet v 1) depending on the horticultural strain." Int Arch Allergy Immunol **116**(2): 103-9.

JOHANNES C, MAJCHERCZYK A (2000). "Laccase activity tests and laccase inhibitors." J Biotechnol **78**(2): 193-9.

JONES CJ, WOODING FB, DANTZER V, LEISER R, STODDART RW (1999). "A lectin binding analysis of glycosylation patterns during development of the equine placenta." Placenta **20**(1): 45-57.

KADER JC (1996). "Lipid-Transfer Proteins in Plants." Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **47**: 627-654.

KALOGEROMITROS D, RIGOPOULOS D, GREGORIOU S, MOUSATOU V, LYRIS N, PAPAIOANNOU D, KATSAROU-KATSARI A (2004). "Asymptomatic sensitisation to grapes in a sample of workers in the wine industry." Occup Environ Med **61**(8): 709-11.

KALOGEROMITROS CD, MAKRIS MP, GREGORIOU SG, MOUSATOU VG, LYRIS NG, TARASSI KE, PAPASTERIADES CA (2005). "Grape Anaphylaxis: A Study of 11 Adult Onset Cases." Allergy and Asthma Proceedings **26**(1): 53-58.

- KALOGEROMITROS DC, MAKRIS MP, GREGORIOU SG, KATOULIS AC, STRAURIANEAS NG (2006). "Sensitization to other foods in subjects with reported allergy to grapes." Allergy Asthma Proc **27**(1): 68-71.
- KANEKO R, KITABATAKE N (2001). "Structure-sweetness relationship in thaumatin: importance of lysine residues." Chem Senses **26**(2): 167-77.
- KANG D, GHO YS, SUH M, KANG C (2002). "Highly sensitive and fast protein detection with coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis." Bull. Korean Chem. Soc. **23**(11): 1511-1512.
- KARAKAYA G, KALYONCU AF (2000). "Allergy to grapes." Ann Allergy Asthma Immunol **84**(2): 265.
- KARISOLA P, KOTOVUORI, A, POIKONEN S, NISKANEN E, KALKKINEN N, TURJANMAA K, PALOSUO T, REUNALA T, ALENUS H, KULOMAA MS (2004). "Isolated hevein-like domains, but not 31-kd endochitinases, are responsible for IgE-mediated *in vitro* and *in vivo* reactions in latex-fruit syndrome " J Allergy Clin Immunol **115**: 598-605.
- KAUR G, ROBERTI M, RAUL F PENDURTHI UR (2007). "Suppression of human monocyte tissue factor induction by red wine phenolics and synthetic derivatives of resveratrol." Thromb Res **119**(2): 247-56.
- KHYSE-ANDERSEN J (1984). "Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose." J Biochem Biophys Methods **10**: 203-209.
- KOCH J, SAJAK E (1959). "A review and some studies on grape protein." American journal of Enology and Viticulture **10**: 114-123.
- KOIWA H, KATO H, NAKATSU T, ODA J, YAMADA Y, SATO F (1999). "Crystal structure of tobacco PR-5d protein at 1.8 Å resolution reveals a conserved acidic cleft structure in antifungal thaumatin-like proteins." J Mol Biol **286**(4): 1137-45.
- KOPP J, SCHWEDE T (2004). "The SWISS-MODEL Repository of annotated three-dimensional protein structure homology models." Nucleic Acids Res **32**(Database issue): D230-4.
- KREBITZ M, WAGNER B, FERREIRA F, PETERBAUER C, CAMPILLO N, WITTY M, KOLARICH D, STEINKELLNER H, SCHEINER O, BREITENEDER H (2003). "Plant-based heterologous expression of Mal d 2, a thaumatin-like protein and allergen of apple (*Malus domestica*), and its characterization as an antifungal protein." J Mol Biol **329**(4): 721-30.
- KWON SW (2004). "Profiling of soluble proteins in wine by nano-high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry." J Agric Food Chem **52**(24): 7258-63.
- LABORDE B, MOINE-LEDOUX V, RICHARD T, SAUCIER C, DUBOURDIEU D, MONTI JP (2006). "PVPP-polyphenol complexes: a molecular approach." J Agric Food Chem **54**(12): 4383-9.
- LAEMMLI UK (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- LAMIKANRA O, INYAG ID (1988). "Temperature Influence on Muscadine Wine Protein Characteristics." American journal of Enology and Viticulture **39**(2): 113-116.
- LANDRAULT N, POUCHERET P, RAVEL P, GASC F, CROS G, TEISSEDRE PL (2001). "Antioxidant capacities and phenolics levels of French wines from different varieties and vintages." J Agric Food Chem **49**(7): 3341-8.
- LEE MF, HWANG GY, CHEN YH, LIN HC, WU CH (2006). "Molecular cloning of Indian jujube (*Zizyphus mauritiana*) allergen Ziz m 1 with sequence similarity to plant class III chitinases." Mol Immunol **43**(8): 1144-51.
- LEE MF, TSAI JJ, HWANG GY, LIN SJ, CHEN YH (2008). "Identification of immunoglobulin E (IgE)-binding epitopes and recombinant IgE reactivities of a latex cross-reacting Indian jujube Ziz m 1 allergen." Clin Exp Immunol **152**(3): 464-71.

- LEONE P, MENU-BOUAOUICHE L, PEUMANS WJ, PAYAN F, BARRE A, ROUSSEL A, VAN DAMME EJ, ROUGE P (2006). "Resolution of the structure of the allergenic and antifungal banana fruit thaumatin-like protein at 1.7-Å." Biochimie **88**(1): 45-52.
- LOOMIS WD, BATTAILE J (1966). "Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes." Phytochemistry **5**: 423-438.
- LOTTSPREICH F, ZORBUS H (1998). „Bioanalytik“. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; Berlin
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-75.
- LUGUERA C, MORENO-ARRIBAS V, PUEYO E, BARTOLOMÉ B, POLO MC (1998). "Fractionation and partial characterization of protein fractions present at different stages of the production of sparkling wines." Food Chemistry **63**(4): 465-471.
- MARCHAL R, BOUQUELET S, MAUJEAN A (1996). "Purification and Partial Biochemical Characterization of Glycoproteins in a Champenois Chardonnay Wine." J Agric Food Chem **44**: 1716-1722.
- MARCHAL R, SEGUIN V, MAUJEAN A (1997). "Quantification of Interferences in the Direct Measurement of Proteins in Wines From the Champagne Region Using the Bradford Method." American journal of Enology and Viticulture **48**(3): 303-309.
- MCCALL C, HUNTER S, STEDMAN K, WEBER E, HILLIER A, BOZIC C, RIVOIRE B, OLIVRY T (2001). "Characterization and cloning of a major high molecular weight house dust mite allergen (Der f 15) for dogs." Vet Immunol Immunopathol **78**(3-4): 231-47.
- MCGOVERN PE, GLUSKER DL, EXNER LJ (1996). "Neolithic resinated wine." nature **381**: 480-481.
- MESQUITA PR, PICARRA-PERREIRA MA, MONTEIRO S, LOUREIRO VB, TEIXERA AR, FERREIRA RB (2001). "Effect of Wine Composition on Protein Stability." American journal of Enology and Viticulture **52**(4): 324-330.
- MESROB B, GORINOVA N, TZAKOV D (1983). "Charakterisierung der elektrischen Eigenschaften und der Molmassen der Eiweißstoffe in Wein." Die Nahrung **27**(8): 727-733.
- MIDORO-HORIUTI T, GOLDBLUM RM, KUROSKY A, WOOD TG, BROOKS EG (2000). "Variable expression of pathogenesis-related protein allergen in mountain cedar (*Juniperus ashei*) pollen." J Immunol **164**(4): 2188-92.
- MILLER GC, AMON JM, GIBSON RL, SIMPSON RF (1985). "Loss of wine aroma attributable to protein stabilization with bentonite or ultrafiltration." Australien Grapepower and Winemaker **256**: 46-50.
- MONTEIRO S, PICARRA-PEREIRA, M. A, TANGANHO MC, RENTE JP, LOUREIRO VB, TEIXERA AR, FERREIRA RB (1999). "Preparation of polyclonal antibodies specific for wine proteins." J Sci Food Agric **79**: 772-778.
- MONTEIRO S, PICARRA-PEREIRA MA, MESQUITA PR, LOUREIRO VB, TEIXEIRA A, FERREIRA RB (2001). "The wide diversity of structurally similar wine proteins." J Agric Food Chem **49**(8): 3999-4010.
- MONTEIRO S, BARAKAT M, PICARRA-PEREIRA MA, TEIXERA AR, FERREIRA RB (2003a). "Osmotin and Thaumatin from Grape: A Putative Defense Mechanism Against Pathogenic Fungi." Phytopathology **93**(12): 1505-1512.
- MONTEIRO S, PICARRA-PEREIRA MA, TEIXEIRA AR, LOUREIRO VB, FERREIRA RB (2003b). "Environmental conditions during vegetative growth determine the major proteins that accumulate in mature grapes." J Agric Food Chem **51**(14): 4046-53.
- MONTEIRO S, PICARRA-PEREIRA MA, LOUREIRO VB, TEIXEIRA AR, FERREIRA RB (2007). "The diversity of pathogenesis-related proteins decreases during grape maturation." Phytochemistry **68**(4): 416-25.
- MORENO-ARRIBAS MV, PUEYO E, POLO MC (2002). "Analytical methods for the characterization of proteins and peptides in wines." Analytica Chimica Acta **458**: 63-75.

- MURPHEY JM, POWERS JR, SPAYD SE (1989a). "Estimation of Soluble Protein Concentration of White Wines Using Coomassie Brilliant Blue." American journal of Enology and Viticulture **40**(3): 189-193.
- MURPHEY JM, SPAYD SE, POWERS JR (1989b). "Effect of Grape Maturation on Soluble Protein Characteristics of Gewürztraminer and White Riesling Juice and Wine." American journal of Enology and Viticulture **40**(3): 199-207.
- NAKANISHI K, WU W, YOKOTSUKA K (1991). "Purification and some properties of thermostable Invertase from winw." J Ferment. Technol **71**(1): 66-68.
- NICHOLAS KB, NICHOLAS HB, DEERFIELD DW (1997). "GeneDoc. Analysis and Visualization of Genetic Variation." embnet.news **4**(2): 1-4.
- OGATA CM, GORDON PF, DE VOS AM, KIM SH (1992). "Crystal structure of a sweet tasting protein thaumatin I, at 1.65 Å resolution." J Mol Biol **228**(3): 893-908.
- OKUDA T, FUKUI M, TAKAYANAGI T, YOKOTSUKA K (2006). "Characterization of Major Stable Proteins in Chardonnay Wine." Food Science Technol Res **12**(2): 131-136.
- OPIE LH, LECOUR S (2007). "The red wine hypothesis: from concepts to protective signalling molecules." Eur Heart J **28**(14): 1683-93.
- OZOL D, METE E (2008). "Asthma and food allergy." Curr Opin Pulm Med **14**(1): 9-12.
- PASHOVA V, GÜELL C, PUEYO E, LÓPEZ-BARAJAS M, POLO MC, LÓPEZ F (2004). "White Wine Protein Stabilization by a Continuous Process Using a Packed Column." American journal of Enology and Viticulture **55**(2): 195-198.
- PASQUATO N, BERNI R, FOLLI C, FOLLONI S, CIANCI M, PANTANO S, HELLIWELL JR, ZANOTTI G (2006). "Crystal structure of peach Pru p 3, the prototypic member of the family of plant non-specific lipid transfer protein pan-allergens." J Mol Biol **356**(3): 684-94.
- PASTORELLO EA, PRAVETTONI V, FARIOLI L, ISPANO M, FORTUNATO D, MONZA M, GIUFFRIDA MG, RIVOLTA F, SCIBOLA E, ANSALONI R, INCORVAIA C, CONTI A, ORTOLANI C (1999). "Clinical role of a lipid transfer protein that acts as a new apple-specific allergen." J Allergy Clin Immunol **104**(5): 1099-106.
- PASTORELLO EA, FARIOLI L, PRAVETTONI V, ISPANO M, SCIBOLA E, TRAMBAIOLI C, GIUFFRIDA MG, ANSALONI R, GODOVAC-ZIMMERMANN J, CONTI A, FORTUNATO D, ORTOLANI C (2000). "The maize major allergen, which is responsible for food-induced allergic reactions, is a lipid transfer protein." J Allergy Clin Immunol **106**(4): 744-51.
- PASTORELLO EA, VIETHS S, PRAVETTONI V, FARIOLI L, TRAMBAIOLI C, FORTUNATO D, LUTTKOPF D, CALAMARI M, ANSALONI R, SCIBILIA J, BALLMER-WEBER BK, POULSEN LK, WUTRICH B, HANSEN KS, ROBINO AM, ORTOLANI C, CONTI A (2002). "Identification of hazelnut major allergens in sensitive patients with positive double-blind, placebo-controlled food challenge results." J Allergy Clin Immunol **109**(3): 563-70.
- PASTORELLO EA, FARIOLI L, PRAVETTONI V, ORTOLANI C, FORTUNATO D, GIUFFRIDA MG, PERONO GAROFFO L, CALAMARI AM, BRENNNA O, CONTI A (2003). "Identification of grape and wine allergens as an endochitinase 4, a lipid-transfer protein, and a thaumatin." J Allergy Clin Immunol **111**(2): 350-9.
- PASTORELLO EA, ROBINO AM (2004). "Clinical role of lipid transfer proteins in food allergy." Mol Nutr Food Res **48**(5): 356-62.
- PASTORELLO EA, FARIOLI L, PRAVETTONI V, ROBINO AM, SCIBILIA J, FORTUNATO D, CONTI A, BORGONOVO L, BENGSTSSON A, ORTOLANI C (2004). "Lipid transfer protein and vicilin are important walnut allergens in patients not allergic to pollen." Asthma and Immunology **114**: 908-914.
- PDB-PROTEINDATENBANK: [HTTP://WWW.PDB.ORG/PDB/HOME/HOME.DO](http://www.pdb.org/pdb/home/home.do)
- PELLERIN P, WATERS E, BRILLOUET J.-M (1993). "Characterization of two arabinogalactan-proteins from red wine." Carbohydrate Polymers **22**: 187-192.

- PENG Z, POCOCK KF, WATERS EJ, FRANCIS IL, WILLIAMS PJ (1997). "Taste Properties of Grape (*Vitis vinifera*) Pathogenesis-Related Proteins Isolated from Wine." *J Agric Food Chem* **45**: 4639-4643.
- PITT A (1998). "Application of electrospray mass spectrometry in biology." *Nat Prod Rep* **15**: 59-72.
- POCOCK KF, HAYASAKA Y, MCCARTHY MG, WATERS EJ (2000). "Thaumatococin-like proteins and chitinases, the haze-forming proteins of wine, accumulate during ripening of grape (*Vitis vinifera*) berries and drought stress does not affect the final levels per berry at maturity." *J Agric Food Chem* **48**(5): 1637-43.
- POUR NIKFARDJAM MS (2001). „Polyphenole in Weißweinen und Traubensäften und ihre Veränderung im Verlauf der Herstellung. *Dissertation* im Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotropologie und Umweltmanagement der Justus von Liebig-Universität Giessen.
- PUBMED-PROTEINDATENBANK: [HTTP://WWW.NCBI.NLM.NIH.GOV/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)
- PUEYO E, MARTÍN-ALVAREZ PJ, POLO C (1995). "Relationship Between Foam Characteristics and Chemical Composition in Wines and Cavas (Sparkling Wines)." *American journal of Enology and Viticulture* **46**(4): 518-524.
- RAJDL D, RACEK J, TREFIL L, SIALA K (2007). "Effect of white wine consumption on oxidative stress markers and homocysteine levels." *Physiol Res* **56**(2): 203-12.
- RATHEL TR, SAMTLEBEN R, VOLLMAR AM, DIRSCH VM (2007). "Activation of endothelial nitric oxide synthase by red wine polyphenols: impact of grape cultivars, growing area and the vinification process." *J Hypertens* **25**(3): 541-9.
- REHM H (2002). « Der Experimentator : Proteinbiochemie/Proteomics. » 4., überarbeitete Auflage. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin
- RIBÉREAU-GAYON R, GLORIES Y, MAUJEAN A, DUBOURDIEU D (2006). "Handbook of Enology: The Chemistry of wine." 2. Auflage. Wiley, Chichester; San Fransisco
- RICHARD T, LEFEUVRE D, DESCENDIT A, QUIDEAU S, MONTI JP (2006). "Recognition characters in peptide-polyphenol complex formation." *Biochim Biophys Acta* **1760**(6): 951-8.
- RIEBE D, THORN W (1991). "Influence of carbohydrate moieties of human serum transferrin on the determination of its molecular mass by polyacrylamide gradient gel electrophoresis and staining with periodic acid-Schiff reagent." *Electrophoresis* **12**: 287-293.
- ROBINSON SP, JACOBS AK, DRY IB (1997). "A class IV chitinase is highly expressed in grape berries during ripening." *Plant Physiol* **114**(3): 771-8.
- ROBINSON SP, DAVIES C (2000). "Molecular biology of grape berry ripening." *AGJWR* **6**(2): 175-188.
- RODRIGUEZ A, TRUJILLO MJ, MATHEU V, BAEZA ML, ZAPATERO L, MARTINEZ M (2001). "Allergy to grape: a case report." *Pediatr Allergy Immunol* **12**(5): 289-90.
- RODRIGUEZ A, MATHEU V, TRUJILLO MJ, MARTINEZ MI, BAEZA ML, BARRANCO R, FRUTOS C, ZAPATERO L (2004). "Grape allergy in paediatric population." *Allergy* **59**(3): 364.
- ROLLAND JM, APOSTOLOU E, DECKERT K, DE LEON MP, DOUGLASS JA, GLASPOLE IN, BAILEY M, STOCKLEY CS, O'HEHIR E (2006). "Potential food allergens in wine: Double-blind, placebo-controlled trial and basophil activation analysis." *Nutrition* **22**(9): 882-8.
- ROMEO J, WARNBERG J, NOVA E, DIAZ LE, GOMEZ-MARTINEZ S, MARCOS A (2007). "Moderate alcohol consumption and the immune system: a review." *Br J Nutr* **98** Suppl 1: S111-5.
- RUF JC (2004). "Alcohol, wine and platelet function." *Biol Res* **37**(2): 209-15.
- Ruiz-Larrea F, López R, Santamaría P, Sacristán M, Ruiz MC, Zarazaga M, Guitiérrez AR, Torres C (1998). "Soluble proteins and free amino nitrogen content in must and wine of cv. Viura in la Rioja." *Vitis* **37**(3): 139-142.

- RUSSO P, TEDESCO I, RUSSO M, RUSSO GL, VENEZIA A, CICALA C (2001). "Effects of de-alcoholated red wine and its phenolic fractions on platelet aggregation." Nutr Metab Cardiovasc Dis **11**(1): 25-9.
- SAKUTA H, SUZUKI T (2005). "Alcohol consumption and plasma homocysteine." Alcohol **37**(2): 73-7.
- SALCEDO G, SANCHEZ-MONGE R, DIAZ-PERALES A, GARCIA-CASADO G, BARBER D (2004). "Plant non-specific lipid transfer proteins as food and pollen allergens." Clin Exp Allergy **34**(9): 1336-41.
- SALZMAN RA, TIKHONOVA I, BORDELON BP, HASEGAWA PM, BRESSAN RA (1998). "Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape." Plant Physiol **117**(2): 465-72.
- SAN MIGUEL-MONCIN M, KRAIL M, SCHEURER S, ENRIQUE E, ALONSO R, CONTI A, CISTERO-BAHIMA A, VIETHS S (2003). "Lettuce anaphylaxis: identification of a lipid transfer protein as the major allergen." Allergy **58**(6): 511-7.
- SANCHEZ-MONGE R, BLANCO C, DIAZ-PERALES A, COLLADA C, CARRILLO T, ARAGONCILLO C, SALCEDO G (1999a). "Isolation and characterization of major banana allergens: identification as fruit class I chitinases." Clin Exp Allergy **29**(5): 673-80.
- SANCHEZ-MONGE R, LOMBARDELO M, GARCIA-SELLES FJ, BARBER D, SALCEDO G (1999b). "Lipid-transfer proteins are relevant allergens in fruit allergy." J Allergy Clin Immunol **103**(3 Pt 1): 514-9.
- SANCHEZ-MONGE R, BLANCO C, LOPEZ-TORREJON G, CUMPLIDO J, RECAS M, FIGUEROA J, CARRILLO T, SALCEDO G (2006). "Differential allergen sensitization patterns in chestnut allergy with or without associated latex-fruit syndrome." J Allergy Clin Immunol **118**(3): 705-10.
- SANKIAN M, VARASTEH A, PAZOUKI N, MAHMOUDI M (2005). "Sequence homology: a poor predictive value for profilins cross-reactivity." Clin Mol Allergy **3**: 13.
- SANTORO M (1995). "Fractionation and Characterization of Must and Wine Proteins." American journal of Enology and Viticulture **46**(2): 250-354.
- SARRY JE, SOMMERER N, SAUVAGE FX, BERGOIN A, ROSSIGNOL M, ALBAGNAC G, ROMIEU C (2004). "Grape berry biochemistry revisited upon proteomic analysis of the mesocarp." Proteomics **4**(1): 201-15.
- SAULNIER L, BRILLOUET JM, MOUTOUNET M, HERVE DU PENHOAT C, MICHON V (1992). "New investigations of the structure of grape arabinogalactan-protein." Carbohydr Res **224**: 219-35.
- SBORNIK M, RAKOSKI J, MEMPEL M, OLLERT M, RING J (2007). "IgE-mediated type-I-allergy against red wine and grapes." Allergy **62**(11): 1339-40.
- SCALBERT A, MANACH C, MORAND C, REMESY C, JIMENEZ L (2005). "Dietary polyphenols and the prevention of diseases." Crit Rev Food Sci Nutr **45**(4): 287-306.
- SCHÄD SG, TRCKA J, VIETHS S, SCHEURER S, CONTI A, BROCKER EB, TRAUTMANN A (2005). "Wine anaphylaxis in a German patient: IgE-mediated allergy against a lipid transfer protein of grapes." Int Arch Allergy Immunol **136**(2): 159-64.
- SCHEURER S, PASTORELLO EA, WANGORSCH A, KASTNER M, HAUSTEIN D, VIETHS S (2001). "Recombinant allergens Pru av 1 and Pru av 4 and a newly identified lipid transfer protein in the in vitro diagnosis of cherry allergy." J Allergy Clin Immunol **107**(4): 724-31.
- SCHINDLER M (2006). "Die 2D-Gelelektrophorese als Methode zur Identifizierung von Trauben- und Weinproteinen." Diplomarbeit am Institut für Molekulare Biophysik, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- SCHMEIL O, FITSCHEN J (1996). „Die Flora von Deutschland und angrenzender Länder.“ 90., durchgesehene Auflage. Quelle und Meyer, Wiesbaden
- SCHNEIDER V (1999). "Gesamtphenole in Rotwein." Die Winzer-Zeitung **12**: 31.

- SCHÜTT P, SCHUCK HJ, STIMM B [Hrsg] (2002): Lexikon der Baum- und Straucharten. 2. Auflage. Nikol Verlagsgesellschaft mbH & Co KG, Hamburg
- SCIANCELEPORE V (1989). "Extraction of Protein From Wine Lees." American journal of Enology and Viticulture **40**(1): 65-66.
- SEE Y, JACKOWSKI G (1995). Estimating Molecular Weights of Polypeptides by SDS Gel Elektrophoresis. New York, Oxford University.
- SENA G, MISTRELLO G, RONCAROLO D, CRIVELLARO M, BONADONNA P, SCHIAPPOLI M, PASSALACQUA G (2001). "Exercise-induced anaphylaxis to grape." Allergy **56**: 1235-1236.
- SHIMIZU T, NAKAZATO T, XIAN MJ, SAGAWA M, IKEDA Y, KIZAKI M (2006). "Resveratrol induces apoptosis of human malignant B cells by activation of caspase-3 and p38 MAP kinase pathways." Biochem Pharmacol **71**(6): 742-50.
- SICHERER SH, SAMPSON HA (2006). "9. Food allergy." J Allergy Clin Immunol **117**(2 Suppl Mini-Primer): S470-5.
- SIEBERT KJ, CARRASCO A, LYNN PY (1996). "Formation of Protein-Polyphenol Haze in Beverages." J Agric Food Chem **44**: 1997.
- SMITH PK, KROHN RI, HERMANSON GT, MALLIA AK, GARTNER FH, PROVENZANO MD, FUJIMOTO EK, GOEKE NM, OLSON BJ, KLENK DC (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." Anal Biochem **150**(1): 76-85.
- SOLEAS GJ, DIAMANDIS EP, GOLDBERG DM (1997). "Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention." J Clin Lab Anal **11**(5): 287-313.
- SOMAN KV, MIDORO-HORIUTI T, FERREON JC, GOLDBLUM RM, BROOKS EG, KUROSKY A, BRAUN W, SCHEIN CH (2000). "Homology modeling and characterization of IgE binding epitopes of mountain cedar allergen Jun a 3." Biophys J **79**(3): 1601-9.
- SOWKA S, HSIEH LS, KREBITZ M, AKASAWA A, MARTIN BM, STARRETT D, PETERBAUER CK, SCHEINER O, BREITENEDER H (1998). "Identification and cloning of prs a 1, a 32-kDa endochitinase and major allergen of avocado, and its expression in the yeast *Pichia pastoris*." J Biol Chem **273**(43): 28091-7.
- SZILÁGYI Z, VAS G, MÁDY G, VÉKEY K (1996). "Investigation of Macromolecules in Wines by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry." Rapid Communications in Mass Spectrometry **10**: 1141-1143.
- TAL M, SILBERSTEIN A, NUSSER, E (1985). "Why does Coomassie Brilliant Blue R interact differently with different proteins? A partial answer." J Biol Chem **260**(18): 9976-80.
- TATTERSALL DB, VAN HEESWIJK R, HOJ PB (1997). "Identification and Characterization of a Fruit-Specific, thaumatin-Like Protein That Accumulates at Very High Levels in Conjunction with the Onset of Sugar Accumulation and Berry Softening in Grapes " Plant Physiol **114**: 759-769.
- THOMPSON JD, GIBSON TJ, PLEWNIK F, JEANMOUGIN F, HIGGINS DG (1997). "The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools." Nucleic Acids Res **25**(24): 4876-82.
- TOGAWA A, PANZANI RC, GARZA MA, KISHIKAWA R, GOLDBLUM RM, MIDORO-HORIUTI T (2006). "Identification of italian cypress (*Cupressus sempervirens*) pollen allergen Cup s 3 using homology and cross-reactivity." Ann Allergy Asthma Immunol **97**(3): 336-42.
- TOMERA J (1999). "Current knowledge of the health benefits and disadvantages of wine consumption." Trends in Food Science and Technology **10**: 129-138.
- TYSON PJ, LUIS ES, DAY WR, WALKER B, LEE TH (1981). "Estimation of Soluble Protein in Must and Wine by High-Performance Liquid Chromatography." American journal of Enology and Viticulture **32**(3): 241-243.

- VAN DER WEL H, LOEVE K (1972). "Isolation and characterization of thaumatin I and II, the sweet-tasting proteins from *Thaumatococcus daniellii* Benth." Eur J Biochem **31**(2): 221-5.
- VAN LOON LC, VAN STRIEN EA (1999). "The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins." Physiological and Molecular Plant Pathology **55**: 85-97.
- VAN REE R (2004). "Clinical importance of cross-reactivity in food allergy." Curr Opin Allergy Clin Immunol **4**(3): 235-40.
- VASSILOPOULOU EV, ZUIDMEER L, AKKERDAAS J, RIGBY N, MORENO FJ, PAPADOPOULOS NG, SAXONI-PAPAGEORGIOU P, MILLS C, VAN REE R (2007a). "Optimized techniques for the extraction of grape allergens appropriate for in vivo and in vitro testing and diagnosis." Mol Nutr Food Res **51**(3): 360-6.
- VASSILOPOULOU E, ZUIDMEER L, AKKERDAAS J, TASSIOS I, RIGBY NR, MILLS EN, VAN REE R, SAXONI-PAPAGEORGIOU P, PAPADOPOULOS NG (2007b). "Severe immediate allergic reactions to grapes: part of a lipid transfer protein-associated clinical syndrome." Int Arch Allergy Immunol **143**(2): 92-102.
- VASWANI SK, CHANG BW, CAREY RN, HAMILTON RG (1999). "Adult onset grape hypersensitivity causing life threatening anaphylaxis." Ann Allergy Asthma Immunol **83**(1): 25-6.
- VIETHS S (2004). "Food allergy: towards understanding allergenic structures?" Mol Nutr Food Res **48**(5): 343.
- VINCENT D, ERGUL A, BOHLMAN MC, TATTERSALL EA, TILLET RL, WHEATLEY MD, WOOLSEY R, QUILICI DR, JOETS J, SCHLAUCH K, SCHOOLEY DA, CUSHMAN JC, CRAMER GR (2007). "Proteomic analysis reveals differences between *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay and cv. Cabernet Sauvignon and their responses to water deficit and salinity." J Exp Bot **58**(7): 1873-92.
- VINCENZI S, MOSCONI S, ZOCCATELLI G, PELLEGRINA CD, VENERI G, CHIGNOLA R, PERUFFO A, CURIONI A, RIZZI C (2005). "Development of a New Procedure for Protein Recovery and Quantification in Wine." American journal of Enology and Viticulture **56**(2): 182-187.
- WALLERATH T, DECKERT G, TERNES T, ANDERSON H, LI H, WITTE K, FORSTERMANN U (2002). "Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase." Circulation **106**(13): 1652-8.
- WALLERATH T, POLEO D, LI H, FORSTERMANN U (2003). "Red wine increases the expression of human endothelial nitric oxide synthase: a mechanism that may contribute to its beneficial cardiovascular effects." J Am Coll Cardiol **41**(3): 471-8.
- WALLERATH T, LI H, GODTEL-AMBRUST U, SCHWARZ PM, FORSTERMANN U (2005). "A blend of polyphenolic compounds explains the stimulatory effect of red wine on human endothelial NO synthase." Nitric Oxide **12**(2): 97-104.
- WATERHOUSE AL (2002). "Wine phenolics." Ann N Y Acad Sci **957**: 21-36.
- Waters EJ, H. Y., Tattersall DB, Adams KS, Williams PJ (1998). "Sequence Analysis of Grape (*Vitis vinifera*) Berry Chitinases That Cause Haze Formation in Wines." J Agric Food Chem **46**: 4950-4957.
- WATERS EJ, WALLACE W, WILLIAMS PJ (1992). "Identification of Heat-Unstable Wine Proteins and Their Resistance to Peptidases." J Agric Food Chem **40**: 1514-1519.
- WATERS EJ, WALLACE W, TATE ME, WILLIAMS PJ (1993). "Isolation and Characterization of a Natural Haze Protective Factor from Wine." J Agric Food Chem **41**: 724-730.
- WATERS EJ, P. P., BRILLOUET J-M (1994). "A *Saccharomyces* mannoprotein that protects wine from protein haze." Carbohydrate Polymers **23**: 185-191.
- WATERS EJ, PENG Z, POCOCK KF, WILLIAMS PJ (1995a). "Proteins in white wine, I: Procyanidin occurrence in soluble proteins and insoluble protein hazes and its relationship to protein instability." AGJWR **1**(2): 86-93/94-99.

- WATERS EJ, PENG Z, POCOCK KF, WILLIAMS PJ (1995b). "Proteins in white wine, II: Their resistance to proteolysis is not due to either phenolic association or glycosylation." Australian Journal of Grape and Wine Research: 94-99.
- WATERS EJ, SHIRLEY NJ, WILLIAMS PJ (1996). "Nuisance Proteins of Wine Are Grape Pathogenesis-Related Proteins." J Agric Food Chem **44**: 3-5.
- WEBER E, HUNTER S, STEDMAN K, DREITZ S, OLIVRY T, HILLIER A, MCCALL C (2003). "Identification, characterization, and cloning of a complementary DNA encoding a 60-kd house dust mite allergen (Der f 18) for human beings and dogs." J Allergy Clin Immunol **112**(1): 79-86.
- WEBER P, STEINHART H, PASCHKE A (2007). "Investigation of the allergenic potential of wines fined with various proteinogenic fining agents by ELISA." J Agric Food Chem **55**(8): 3127-33.
- WEISS KC, YIP T-T, HUTCHENS TW, BISSON LF (1998). "Rapid and Sensitive Fingerprinting of Wine Proteins by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry." American journal of Enology and Viticulture **49**(3): 231-239.
- WIECHELMANN K, BRAUN RD, FITZPATRICK D (1988). "Investigation of the Bicinchoninic Acid Protein Assay: Identification of the Groups Responsible for Color Formation." Anal Biochem **175**: 231-237.
- YOKUTSUKA K, YOSHII M, AIHARA T, KUSHIDA T (1977). "Isolation and Characterization of Proteins from Juices, Musts, and Wines from Japanese Grapes." J Ferment. Technol **55**(5): 510-515.
- YOKUTSUKA K, EBIHARA T, SATO T (1991). "Comparison of Soluble Proteins in Juice and Wine from Koshu Grapes." J Ferment. Technol **71**(4): 248-253.
- YOKUTSUKA K, NOZAKI K, TAKAYANAGI T (1994). "Characterization of Soluble Glykoproteins in Red Wine." American journal of Enology and Viticulture **45**(4): 410-416.
- YOKUTSUKA K, SINGLETON V (1997). "Glycoproteins: Characterization in a Hybrid Grape Variety (Muscat Bailey A) Juice, Fermenting Must, and Resultant Red Wine." American journal of Enology and Viticulture **48**(1): 100-114.
- ZERN TL, FERNANDEZ L (2005). "Cardioprotective effects of dietary polyphenols." J Nutr **135**(10): 2291-4.
- ZUBERBIER T, EDENHARTER G, WORM M, EHLERS I, REIMANN S, HANTKE T, ROEHR CC, BERGMANN KE, NIGGEMANN B (2004). "Prevalence of adverse reactions to food in Germany - a population study." Allergy **59**(3): 338-45.

## 7. Verzeichnisse

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Aminosäure
BCA	Bicinchinonsäure (Bicinchoninic Acid)
BCIP	Brom-4-Chlor-3-indoxylphosphat-p-toluidinsalz
BSA	Bovines Serum Albumin
CHAPS	[(3-Cholamidopropyl)dimethylamino]-1-propansulfonat
DMF	Dimethylformamid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay
ESI-Q-TOF	Electrospray ionization-quadrupole time-of-flight
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IgE	Immunglobulin E
IL-4	Interleukin 4
IL-5	Interleukin 5
IPG	Immobiler pH-Gradient
kDa	Kilodalton
KDS	Kalium Dodecylsulfat
LC	Liquid Chromatography
LTP	Lipid Transfer Proteine
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation
MBTH	3-Methyl-2-Benzothiazolinon-Hydrazon
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MWCO	Molecular Weight Cut Of
NBT	p-Nitrobluetetrazolium
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS	Periodic Acid (Perjodsäure)
PR-Proteine	Pathogenesis-related Proteins
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RT	Raumtemperatur

SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecalsulfate)
SEC	Größenausschlusschromatographie (Size-exclusion chromatography)
SELDI	Surface-enhanced Laser Desorption/Ionization
TCA	Trichloressigsäure
TBS	Tris-buffered Saline
TBST	Tris-buffered Saline mit Tween
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TOF	Time of Flight
TLP	Thaumatococcus-ähnliche Proteine (Thaumatococcus-like Protein)
TRIS	Tris[hydroxymethyl]-aminomethan
UZ	Ultrazentrifuge
VVTL1	Vitis Vinifera Thaumatococcus-like Protein

### Aminosäuren

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparaginsäure	Asp	D
Asparagin	Asn	N
Cystein	Cys	C
Glutaminsäure	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Systemische Einordnung der Weinrebe .....	1
Abbildung 2: Schritte der Weinbereitung .....	4
Abbildung 3: Klassifizierung der im Wein enthaltenen Phenole .....	8
Abbildung 4: Mögliche Quellen der Einbringung und Entfernung von Proteinen im Wein .....	12
Abbildung 5: Einflussfaktoren auf die Proteinzusammensetzung im Verlauf der Weinbereitung.....	14
Abbildung 6: Verbreitung der Wein-/ und Traubenallergie in Europa .....	19
Abbildung 7: Versuchsprotokoll zur Extraktion der Proteine aus lyophilisierten Weinproben mittels Polyvinylpyrrolidon (PVP).....	40
Abbildung 8: Versuchsprotokoll zur Extraktion der Weinproteine mittels Polyvinylpyrrolidon (PVP)....	41
Abbildung 9: Schritte der Traubenaufreinigung der Rebsorten Riesling und Cabernet Sauvignon .....	41
Abbildung 10: Absorptionsspektren verschiedener Weinsorten im Vergleich. ....	67
Abbildung 13: Coomassie-gefärbte SDS-PAGE [12,5%] zum Vergleich der Proteinzusammensetzung verschiedener Weinsorten. ....	70
Abbildung 16: Glykoproteine in Riesling 2006 (Rheinhessen). ....	73
Abbildung 18: SDS-PAGE [10 – 17,5 %] mit Portugieser Rotwein des Jahrgangs 2005 aus der Pfalz.....	76
Abbildung 19: Sequenzalignment der identifizierten Proteine unbekannter Funktion .....	79
Abbildung 20: Silbergefärbte SDS-PAGE [15%] nach der PVP-Behandlung von dialysiertem und lyophilisiertem Rotwein.....	81
Abbildung 21: Silbergefärbte SDS-PAGE [15%] nach der PVP-Behandlung von dialysiertem und lyophilisiertem Rotwein.....	82
Abbildung 22: SDS-PAGE [12,5%] mit ethanolgefälltem Dornfelder des Jahrgangs 2005 aus Rheinhessen. ....	83
Abbildung 23: Glykoproteine im Portugieser Rotwein 2005 aus der Pfalz.....	85
Abbildung 24: Coomassie-gefärbte SDS-PAGE [12,5%] zur Proteinzusammensetzung von Spätburgunder Weißherbst 2007, Portugieser Weißherbst 2007 sowie Portugieser Weißherbst 2006. ....	87
Abbildung 26: Vergleich der Proteinzusammensetzung zwischen einem Portugieser Rotwein, einem Portugieser Weißherbst und einem Riesling Weißwein. ....	89
Abbildung 27: SDS-PAGE zur Proteinzusammensetzung der Weinbeere der weißen Rebsorte Riesling des Jahrgangs 2005 aus dem Rheingau. ....	92
Abbildung 28: Proteinzusammensetzung von Weinbeeren der roten Rebsorte Cabernet Sauvignon des Jahrgangs 2005 aus Rheinhessen.....	93
Abbildung 29: SDS-PAGE [12,5 %] der Proteinzusammensetzung von Most der Rebsorten Riesling und Cabernet Sauvignon aus dem Rheingau. ....	94
Abbildung 30: SDS-PAGE [12,5 %] zum Vergleich der Proteinzusammensetzung zwischen Wein, Most und Weinbeeren der Rebsorte Riesling des Jahrgangs 2005 aus dem Rheingau. ....	95
Abbildung 31: Anionenaustauschchromatographie (UNO-Q12 – Säule) mit Riesling 2007 aus der Pfalz..	97
Abbildung 32: Anionenaustauschchromatographie (UNO Q12 – Säule) zum Vergleich der Weißweinsorten Riesling und Sauvignon Blanc .....	99

Abbildung 33: Anionenaustausch (UNO-Q1 – Säule) zum Vergleich zwischen einem Portugieser Rotwein und einem Riesling Weißwein, beide Jahrgang 2006 aus Rheinhessen. ....	100
Abbildung 34: SEC-Lauf der Rotweinsorten Portugieser 2006 (Pfalz) und Dornfelder 2005 (Rheinhessen) nach der Behandlung mit PVP.....	101
Abbildung 35: SEC-Lauf mit Portugieser des Jahrgangs 2006 aus der Pfalz im Anschluss an eine Fällung mit PVP .....	102
Abbildung 36: Kationenaustauschchromatographie (UNO S-6) mit PVP-behandeltem Dornfelder 2003 aus Rheinhessen.....	103
Abbildung 37: Proteinmodell des Lipid Transfer Proteins P4 aus <i>Vitis vinifera</i> . ....	107
Abbildung 38: Vergleich der Proteinstruktur zwischen dem LTP aus der Weinbeere und dem LTP aus dem Pfirsich mit den IgE-Bindungs epitopen. ....	108
Abbildung 39: Proteinmodell des Thaumatin-ähnlichen Proteins ( gi 89242712) aus <i>Vitis vinifera</i> , erstellt mit Swiss Modell und bearbeitet mit Chimera. ....	111
Abbildung 40: Vergleich der Proteinstruktur zwischen dem TLP (gi 89242712) aus der Weinbeere und des TLP aus der Banane (gi 88191901).....	112
Abbildung 41: IgE-Bindungs epitope des TLP (gi 6940772) aus der Bergzeder [nach SOMAN ET AL 2000], übertragen auf ein Proteinmodell des TLP (gi 89242712) aus der Weinbeere. ....	113
Abbildung 42: Vergleich der Proteinstruktur zwischen einem Sequenzabschnitt der Endochitinase aus der Weinbeere und dem Hevein. ....	115
Abbildung 43: Sequenzalignment zwischen Thaumatin aus <i>Thaumatococcus daniellii</i> und den im Wein enthaltenen TLP aus <i>Vitis vinifera</i> . ....	117
Abbildung 44: Western Blot mit einem Thaumatin-Antikörper. ....	118
Abbildung 45: Testung der Zytokinausschüttung mittels ELISA mit Blutseren von zwei Gräserallergikern sowie zwei Probanden mit unbekannter Allergie bei dem Einsatz von Trauben-/ und Weinextrakten der Rebsorten Cabernet Sauvignon und Riesling als Antigen. ....	119
Abbildung 46: Überprüfung der T-Zell-Proliferation nach Beladung der dendritischen Zellen mit Trauben-/ und Weinextrakten der Rebsorten Cabernet Sauvignon und Riesling als Antigen im Blutserum von zwei Gräserallergikern und zwei Probanden mit nicht bekannter Allergie. ....	120
Abbildung 47: Sequenzalignment mit den im Rotwein enthaltenen Lipid Transfer Proteine und als Allergenen bekannten LTP anderer Pflanzen. ....	181
Abbildung 48: Sequenzalignment mit den im Rotwein enthaltenen Thaumatin-ähnlichen Proteine und als Allergenen bekannten TLP anderer Pflanzen. ....	182
Abbildung 49: Sequenzalignment mit der im Rotwein enthaltenen Endochitinase und als Allergenen bekannten Chitinasen anderer Pflanzen. ....	183

### 7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ziele des Einsatzes von Schönungs- und Behandlungsmitteln in Most und Wein .....	5
Tabelle 2: Verwendete Weinsorten .....	29
Tabelle 3: Verwendete Weintrauben und Most.....	30
Tabelle 4: Proben für die Ethanol-fällung mit unbehandeltem Wein.....	38
Tabelle 5: Durchführung der Ethanol-fällung .....	39
Tabelle 6: Durchführung der TCA/Aceton-Fällung.....	39
Tabelle 7: Zusammensetzung des Trenngels für je zwei Minigele einer SDS-PAGE.....	44
Tabelle 8: Zusammensetzung des Sammelgels für je zwei Minigele (3%) einer SDS-PAGE .....	44
Tabelle 9: Protokoll der Silberfärbung.....	47
Tabelle 10: Durchführung der PAS-Färbung.....	49
Tabelle 11: Durchführung des Lektinblots .....	50
Tabelle 12: Durchführung des Western Blots.....	54
Tabelle 13: Proteingehalt von Riesling 2006 sowie Sauvignon Blanc 2006 aus Rheinhessen vor und nach Dialyse und Gefriertrocknung .....	58
Tabelle 14: Analysedaten Weißer Riesling 2005 .....	58
Tabelle 15: Proteingehalt von Weinbeeren, Most und Wein der Rebsorte Riesling des Jahrgangs 2005 aus dem Rheingau, ermittelt mit Hilfe des Bradford-Assays .....	59
Tabelle 16: Proteingehalt von Riesling und Sauvignon Blanc, ermittelt mittels Bradford-Assay, Lowry- Assay und BCA-Assay .....	61
Tabelle 17: Anteil basischer Aminosäuren in BSA und Weinproteinen .....	63
Tabelle 18: Proteingehalt von Weinen der weißen Rebsorten Riesling und Sauvignon Blanc, des Portugieser Weißherbstes sowie der roten Rebsorten Portugieser, Dornfelder und Cabernet Sauvignon, ermittelt mit Hilfe des BCA-Assays .....	65
Tabelle 19: Identifizierte Proteine in Riesling des Jahrgangs 2004 aus dem Rheingau .....	69
Tabelle 20: Identifizierte Proteine eines Portugieser Rotweins 2005 aus der Pfalz.....	76
Tabelle 21: Prozentuale Aufteilung der Beerenbestandteile.....	91
Tabelle 22: Sequenzidentitäten und Ähnlichkeiten zwischen Lipid Transfer Proteinen aus der Weinbeere und als Allergen beschriebenen LTP aus Nahrungsmitteln (Apfel, Pfirsich, Süßkirsche, Pflaume, Aprikose, Mais) sowie Pollen (Ambrosie, Beifuß, Parietaria) .....	105
Tabelle 23: Sequenzidentitäten und Ähnlichkeiten zwischen Thaumatin-ähnlichen Proteinen aus der Weinbeere und den als Nahrungsmittelallergenen bekannten Thaumatin-ähnlichen Proteinen aus Apfel, Süßkirsche, Kiwi, Banane und Paprika sowie mit den Pollenallergenen aus der Bergzeder und der Arizona-Zypresse .....	109
Tabelle 24: Sequenzidentitäten und Ähnlichkeiten zwischen der Klasse IV Endochitinase aus der Weinbeere und den als Nahrungsmittelallergenen bekannten Chitinasen aus Avocado, Banane und Jujube (Chinesische Dattel) sowie aus Latex und Milbe. ....	114
Tabelle 25: Sequenzidentitäten und Ähnlichkeiten zwischen Thaumatin-ähnlichen Proteinen aus der Traube und dem Thaumatin aus der südafrikanischen Staude ( <i>Thaumatococcus daniellii</i> ). ....	116

<b>Tabelle 26: Sequenzidentitäten und Ähnlichkeiten zwischen den Thaumatin-ähnlichen Proteinen aus der Weinbeere, die in dem untersuchten Portugieser Rotwein 2005 aus der Pfalz enthalten sind.....</b>	<b>132</b>
<b>Tabelle 27: Studien zum Auftreten von Trauben- und Weinallergien.....</b>	<b>146</b>
<b>Tabelle 28: TLP-Allergene in Nahrungsmitteln .....</b>	<b>149</b>
<b>Tabelle 29: Chitinase-Allergene in Nahrungsmitteln .....</b>	<b>151</b>
<b>Tabelle 30: Allergene aus der Gruppe der LTP in Nahrungsmitteln.....</b>	<b>153</b>
<b>Tabelle 31: Protokoll für den Anionentausch von Riesling und Sauvignon Blanc mit dem UNO Q-12-Ionenaustauscher.....</b>	<b>179</b>
<b>Tabelle 32: Protokoll für den Anionentausch von Riesling und Portugieser mit dem UNO Q-1-Ionenaustauscher.....</b>	<b>179</b>
<b>Tabelle 33: Protokoll für den Kationentausch von Dornfelder 2003 nach PVP-Fällung mit dem UNO S-6-Ionenaustauscher.....</b>	<b>180</b>
<b>Tabelle 34: Protokoll für die Größenausschlusschromatographie zur Auftrennung der Rotweinextrakte nach PVP-Fällung und Lyophilisation sowie zur Aufreinigung der Weißweinproteine nach der Anionenaustauschchromatographie .....</b>	<b>180</b>

## 8. Anhang

### 8.1 Protokolle der FPLC

**Tabelle 31: Protokoll für den Anionentausch von Riesling und Sauvignon Blanc mit dem UNO Q-12-Ionenaustauscher**

Schritt-Nr.	Schritt	Volumen	Geschwindigkeit	Puffer
1	Isokratischer Fluss	4 ml	3 ml/min	Niedrigsalzpuffer
2	Baseline			
3	Probenauftrag	8 ml	3 ml/min	
4	Linearer Gradient 0 – 60 %	120 ml	3 ml/min	Niedrigsalzpuffer → Hochsalzpuffer
5	Isokratischer Fluss	24 ml	3 ml/min	Hochsalzpuffer
6	Isokratischer Fluss	24 ml	3 ml/min	Niedrigsalzpuffer

**Tabelle 32: Protokoll für den Anionentausch von Riesling und Portugieser mit dem UNO Q-1-Ionenaustauscher**

Schritt-Nr.	Schritt	Volumen	Geschwindigkeit	Puffer
1	Isokratischer Fluss	2 ml	2 ml/min	Niedrigsalzpuffer
2	Baseline			
3	Probenauftrag	2 ml	2 ml/min	
4	Linearer Gradient 0 – 60 %	13 ml	2 ml/min	Niedrigsalzpuffer → Hochsalzpuffer
5	Linearer Gradient 60 % - 100 %	5,2 ml	2 ml/min	Niedrigsalzpuffer → Hochsalzpuffer
6	Isokratischer Fluss	5,2 ml	2 ml/min	Hochsalzpuffer
7	Isokratischer Fluss	6,6 ml	2 ml/min	Niedrigsalzpuffer

**Tabelle 33: Protokoll für den Kationentausch von Dornfelder 2003 nach PVP-Fällung mit dem UNO S-6-Ionenaustauscher**

Schritt-Nr.	Schritt	Volumen	Geschwindigkeit	Puffer
1	Isokratischer Fluss	6 ml	2 ml/min	Niedrigsalzpuffer
2	Baseline			
3	Isokratischer Fluss	6 ml	2 ml/min	Niedrigsalzpuffer
4	Probenauftrag	8 ml	2 ml/min	
5	Isokratischer Fluss	6 ml	2 ml/min	Niedrigsalzpuffer
6	Linearer Gradient 0 – 100 %	36 ml	2 ml/min	Niedrigsalzpuffer → Hochsalzpuffer
7	Isokratischer Fluss	12 ml	2 ml/min	Hochsalzpuffer
8	Isokratischer Fluss	12 ml	2 ml/min	Niedrigsalzpuffer

**Tabelle 34: Protokoll für die Größenausschlusschromatographie zur Auftrennung der Rotweinxtrakte nach PVP-Fällung und Lyophilisation sowie zur Aufreinigung der Weißweinproteine nach der Anionenaustauschchromatographie**

Schritt-Nr.	Schritt	Volumen	Geschwindigkeit
1	Isokratischer Fluss	5 ml	0,6 ml/min
2	Baseline		0,6 ml/min
3	Probenauftrag	8 ml	0,6 ml/min
4	Isokratischer Fluss	160 ml	0,6 ml/min

## 8.2 Sequenzalignments

### 8.2.1 Sequenzalignment LTP zu Tabelle 21

		*	20	*	40	*	60	
Traube1	:	MGSSGAVKLACVMVICMVVAAPAVVEATVTCGQVASALS	PCI	SYLQKGGAVPAG-CCSGI	:	59		
Traube2	:	MGSSGAVKLACVMVICMVMAAPAAVEAAITCGQVASALS	PCI	SYLQKGGAVPPA-CCSGI	:	59		
Traube3	:	MGSSGAVKLACVMVICMVVAAPAAVEAAITCGQVSSALS	SCLGYLKNGGAVPPG-CCSGI	:	59			
Traube4	:	MAGSVAVKVSCLVLMCMLVASPMAVEG-LSCGDVATQLAPCINYLRSAGPLPPA-CCNGV	:	58				
Apfel	:	-----ITCGQVTS	SLAPCI	GYVRS	GGAVP-	PACCNGI	:	31
Pfirsich	:	-----ITCGQVSS	NLAPCI	PYVVR	VGGAVPPA-CCNGI	:	31	
Süßkirsche	:	MACSAMTKLALVVALCMVVSVPIAQA--LTCGQVSS	NLAPCI	AYVRG	GGGAVPPA-CCNGI	:	57	
Pflaume	:	-----ITCGQVSS	NLAPCIN	VYV	GGGAVPPA-CCNGI	:	31	
Aprikose	:	-----ITCGQVSS	SLAPCI	GYVRG	GGGAVPPA-CCNGI	:	31	
Mais	:	MARTQQLAVVATAVVALVLLAAATSEAAISCGQVASAIAPCI	SYARG	QGS	GPSAGCCSGV	:	60	
Ambrosie	:	-MDCIRILWSVAVGLLLVSWRPTMFAASPTCDTVQNILAPCAGFLT--GQEPSKACCTGV	:	57				
Beifuß	:	-----ALTCSDVSNKIS	PCLSYL	KQG	GEVPAD-CCAGV	:	32	
Parietaria	:	-----MVRALMPCLPFVQ	KEKE	PSK	GCCSGA	:	27	
		*	80	*	100	*	120	
Traube1	:	KSLNSAAKTTGDRQAACKCLKTFSSSVSGINYLASGLPGKCGVSVPY--KISPSTDCSK	:	117				
Traube2	:	KSLNSAAKTTADRQAACKCLKNFSSSTVSGINLSLASGLPGKCGVSVPY--KISPSTDCSK	:	117				
Traube3	:	KNLNSAAQTADRQAACKCLKTFNSIPGINLGLASGLPGKCGVSVPY--KISPSTDCSK	:	117				
Traube4	:	KNLNSAATTQDRRTACKCLINASKSISGVNFGLAAGLPGKCGVNIPIY--KISPSTNCD-	:	115				
Apfel	:	RTINGLARTTADRQTACNCLKNLAGSISGVNPNNAAGLPGKCGVNIPIYKISTSTNCATVK	:	91				
Pfirsich	:	RNVNNLARTTPDRQAACNCLKQLSASVPGVNPNNAAALPGKCGVHIPIY--KISASTNCAT	:	89				
Süßkirsche	:	RNINNLARTTADRQTACNCLKQLSASVPGVNPNNAAALPGKCGVNIPIY--KISPSTNCAT	:	115				
Pflaume	:	RNVNNLARTTADRRAACNCLKQLSGSIPGVNPNNAALPGKCGVNIPIY--KISASTNCAT	:	89				
Aprikose	:	RNVNNLARTTPDRRTACNCLKQLSGSISGVNPNNAALPGKCGVNIPIY--KISASTNCAT	:	89				
Mais	:	RSLNNAARTTADRRAACNCLKNAAGVSLNAGNAASIPSKCGVSIPIY--TIISTDCSR	:	118				
Ambrosie	:	NNLNNSRKTADRVAVCNICKELTKSIA-YDPKRMPLLSKCGVKPDFP-AVDKNLDCSK	:	115				
Beifuß	:	KGLND-----	:	37				
Parietaria	:	KRLDGETKTGPQRVHACECIQTAMKTYSDIDGKLVSEVPKHCGIVDSKLPPIIDVNMDCKT	:	87				
		*	140	*	160	*		
Traube1	:	VT-----	:	119				
Traube2	:	VT-----	:	119				
Traube3	:	VT-----	:	119				
Traube4	:	-----	:	-				
Apfel	:	-----	:	-				
Pfirsich	:	V-----	:	90				
Süßkirsche	:	VK-----	:	117				
Pflaume	:	VK-----	:	91				
Aprikose	:	VK-----	:	91				
Mais	:	VN-----	:	120				
Ambrosie	:	LPV-----	:	118				
Beifuß	:	-----	:	-				
Parietaria	:	VGVVPRQPQLPVSLRHGPVTGPSRSRPPTKHGWRDPRLEFRPPEHRKKENPAFSTLG	:	143				

**Abbildung 47: Sequenzalignment mit den im Rotwein enthaltenen Lipid Transfer Proteinen und als Allergenen bekannten LTP anderer Pflanzen.**

Traube 1: LTP P4 *Vitis vinifera* (gi 28194086); Traube 2: LTP *Vitis aestivalis* (gi37625029); Traube 3: LTP (*Vitis berlandieri x Vitis vinifera* (gi 28193997); Traube 4: LTP *Vitis vinifera* (gi 147802122)

## 8.2.2 Sequenzalignment TLP zu Tabelle 22

		*	20	*	40	*	60																																																					
Traube1	:	MRFTTTL	--ILIP	LLLSLL	LFTSTHA	ATFDIL	NKCTY	TVWAAAS	P-----GGGRRLD : 50																																																			
Traube2	:	MGLCKIL	--ISSF	LFTAP	FFTPSY	AATFII	QNHCS	YTVWAA	AVP-----GGGMQLG : 50																																																			
Traube3	:	MRFTTTL	--ILIP	LLLSLL	LFTSTH	EATFDI	LNKCT	YTVWAA	ASP-----GGGRRLD : 50																																																			
Traube4	:	-----	-----	-----	-----	LIQ-----	VAAP	-----	GGGMQLG : 15																																																			
Traube5	:	MGLCKIL	--ISSF	LLTTL	LFTSSY	AATFNI	QNRCS	YTVWAV	AIP-----GGGMRLG : 50																																																			
Banane	:	-----	-----	-----	-----	ATFEIV	NRCST	YTVWAA	AVP-----GGGRQLN : 26																																																			
Apfel	:	--MMKS	QVASL	LGLTL	AILFF	SGAHA	AKITF	TNNCP	NTVWPG	TLTGDQ	KPQLS	LTGF	ELA : 58																																															
Süßkirsche	:	-----	-----	-----	-----	ATISF	KNNCP	YMWPG	TLTSDQ	KPQLS	LTGF	ELA : 34																																																
Kiwi	:	MSTFKS	LSALL	FIAFL	EFTCA	RGATF	NIINN	CPFTV	WAAAV	P-----GGGKRLD : 50																																																		
Paprika	:	---MGY	LR--	SSFVL	LLAF	VTYTY	YAATF	EVRRN	CPYTV	WAAAS	TPV-----GGGRRLD : 48																																																	
Tomate	:	MGY---	LTSS	FVLF	LLCV	TYTYA	ATIEV	RNNCP	YTVWA	AAS	TPIGG	RRLN	RQTW	VINA : 57																																														
Bergzeder	:	MARVSE	LAFLL	AATL	AI	SLHM	QEA	GVV	KFDI	KNQC	GYTV	WAA	GLP-----GGGKRLD : 52																																															
Zypresse	:	-----	-----	-----	-----	VKFDI	KNQC	GYTV	WAA	GLP-----GGGKEFD : 26																																																		
		*	80	*	100	*	120																																																					
Traube1	:	SGQSWT	ITVNP	PGTTN	ARIW	GRTS	CTFD	ANGR	GKCE	TGDCN	-GLLEC	QGYGS	-PPNT	LAEF : 108																																														
Traube2	:	SGQSW	SLNVN	AGTTG	GRVWA	RTNCN	FDAS	GN	GKCE	TGDCG	-GLLQ	CTAY	GT-PPNT	LAEF : 108																																														
Traube3	:	SGQSWT	ITVNP	PGTTN	ARIW	GRTS	CTFD	ANGR	GKCE	TGDCN	-GLLEC	QGYGS	-PPNT	LAEF : 108																																														
Traube4	:	SGQSW	SLNVN	AGTTG	GRVWA	RTNCN	FDAS	GN	GKCE	TRDCG	-GLLQ	CTAY	GT-PPNT	LAEF : 73																																														
Traube5	:	SGQSW	SLDVK	AGTTG	GRVWA	RTGCS	FDAS	GN	GKCE	TGDCG	-GRLQ	CKAF	GT-PPNT	LAEF : 108																																														
Banane	:	QGQSWT	INVN	AGTTG	GRW	GRTG	CSFD	GS	GRG	QCTG	DCG-G	VLS	CTAY	GN-PPNT	LAEF : 84																																													
Apfel	:	SKASR	SVDAP	S-PW	SGR	FWR	TRC	STDA	AGK	FTCET	ADCG	S	QVAC	NGAG	AVPP	ATLVEI : 117																																												
Süßkirsche	:	SQASF	QLD	TPV- PW	NGR	FWA	RTGC	STDA	SGK	FVCAT	ADC	ASG	QVM	CN	NGAI	PPAT	LAEF : 93																																											
Kiwi	:	RGQNW	IIN	PGAG	TGAR	VW	PTG	CNF	D	AGR	GK	CQ	TGDCN	-GLLQ	CQAF	GQ-PPNT	LAEY : 108																																											
Paprika	:	RGQTW	TIN	APP	GTAM	ARIW	GRTNC	NFD	GS	GRG	S	CQ	TGDCG	-GVL	QCTG	WGK-PPNT	LAEY : 106																																											
Tomate	:	PRG	T	KMAR	IW	GRTG	CNF	NA	AGR	GT	CQ	TGDC	GGV	LQ	CTG	WGK	PPNT	LAEY	ALDQ	F	SNL	DFW : 117																																						
Bergzeder	:	QGQTW	T	VN	LA	AGT	A	SARE	FWR	TG	CTF	DAS	GK	G	S	CQ	TGDCG	-GQL	S	CTV	S	GA-VP	AT	LAEY : 110																																				
Zypresse	:	QGQTW	T	VN	LA	AGT	A	SARE	FWR	TG	CTF	DAS	GK	G	S	CR	S	GDCG	-GQL	S	CTV	S	GA-VP	AT	LAEY : 84																																			
		*	140	*	160	*	180																																																					
Traube1	:	ALNQPN	NLDY	IDI	SLVD	GFNI	PMDF	S-----GC	-RGI	QCS	V	DING	QC	PSEL	KAP	GG--- : 158																																												
Traube2	:	ALNQF	SNL	DFDI	SLVD	GFNV	PMAFN	PT--S	NGC	T	R	G	S	CTA	DIV	G	ECP	AAL	KTT	GG--- : 163																																								
Traube3	:	ALNQPN	NLDY	IDI	SLVD	GFNI	PMDF	S-----GC	-RGI	QCS	A	DING	QC	PSEL	KAP	GG--- : 158																																												
Traube4	:	ALNQF	SNL	DFDI	SLVD	GFNV	PMAFN	PT--S	NGC	T	R	G	S	CTA	DIV	G	ECP	AAL	KTT	GG--- : 128																																								
Traube5	:	ALNQF	SNL	DFDI	SLVD	GFNV	PMAFN	PT--S	GGC	-R	G	I	C	A	A	D	I	N	G	Q	C	P	G	A	L	K	T	A	G	--- : 163																														
Banane	:	ALNQF	N	NLD	F	F	D	I	S	L	V	D	G	F	N	V	P	M	D	F	S	P	--S	G	G	C	-R	G	I	R	C	A	A	D	I	N	G	Q	C	P	G	A	L	K	A	P	G	--- : 138												
Apfel	:	TIA	ANG	Q	D	Y	D	V	S	L	V	D	G	F	N	L	E	M	S	V	A	P	Q	-G	T	G	E	C	K	P	S	S	C	P	A	N	V	N	K	V	C	P	A	P	L	Q	V	K	A	A	D	G	S : 176							
Süßkirsche	:	NI	P	A	G	G	Q	D	F	Y	D	V	S	L	V	D	G	F	N	L	E	M	S	V	T	P	Q	-G	T	G	D	C	T	A	S	C	P	A	N	V	N	A	V	C	P	S	E	L	Q	K	K	G	S	D	G	S : 152				
Kiwi	:	ALNQF	N	NLD	F	F	D	I	S	L	V	D	G	F	N	V	A	M	E	F	S	P	--S	G	G	C	T	R	G	I	K	T	A	D	I	N	G	Q	C	P	N	E	L	R	A	P	G	--- : 163												
Paprika	:	ALNQF	N	NLD	F	W	D	I	S	L	V	D	G	F	N	I	P	M	T	F	A	P	T	N	P	S	G	G	K	C	H	A	I	Q	C	T	A	N	I	N	G	E	C	P	G	S	L	R	V	P	G	--- : 163								
Tomate	:	D	I	S	L	V	D	G	F	N	I	P	M	T	F	A	P	T	K	P	S	G	G	K	C	H	A	I	H	C	T	A	N	I	N	G	E	C	P	R	A	L	K	V	P	G	C	N	N	P	C	T	T	F	G	G	Q	Q	Y	C : 177
Bergzeder	:	TQ---	SD	Q	Y	D	V	S	L	V	D	G	F	N	I	P	L	A	I	N	P	T---N	A	Q	C	T	A	P	A	C	K	A	D	I	N	A	V	C	P	S	E	L	K	V	D	G	--- : 161													
Zypresse	:	TQ---	SD	Q	Y	D	V	S	L	V	D	G	F	N	I	P	L	A	I	N	P	T---N	T	K	C	T	A	P	A	C	K	A	D	I	N	A	V	C	P	S	E	L	K	V	D	G	--- : 135													

**Abbildung 48: Sequenzalignment mit den im Rotwein enthaltenen Thaumatin-ähnlichen Proteinen und als Allergenen bekannten TLP anderer Pflanzen.**

Traube 1: VVTL1 (gi 2213852); Traube 2: TLP (gi 89242712); Traube 3: putatives TLP (gi 7406716); Traube 4: putatives TLP (gi 7406714); Traube 5: hypothetisches TLP (gi 147784586); alle *Vitis vinifera*

## 8.2.3 Sequenzalignment Chitinase zu Tabelle 23

		*	20	*	40	*	60	
Traube	:	-----		-----		-----	MA	: 2
Avocado	:	-----		-----		-----	MVYCTAS	: 7
Kastanie	:	--MKLFSLLLFLAFLLLGTSAEQCGRQAGGAACANNLCCSQFGWCGNTAEYCGAGCQSQCS		-----		-----		: 58
Banane	:	-----		-----		-----	MHQSHVQ	: 7
Jujube	:	-----		-----		-----	MVPQAK	: 6
Latex	:	-----		-----		-----		: -
Milbe	:	-----		-----		-----	MKTIYAILSIMAC	: 13
		*	80	*	100	*	120	
Traube	:	AKLLTVLLVG---	ALFGAAVAQNC	-----		-----	GCAS	: 27
Avocado	:	LPLLLLLLVG---	LLAGEAFAEQC	-----		-----	GRQA	: 32
Kastanie	:	SPTTTTSSPTASSGGGGDVGSLISASLFDQMLKYRNDPRCKSNGFYTYNAFIAAARFNG		-----		-----		: 118
Banane	:	SVNYLLFSVL---	LLGIDKDGEC	-----		-----	GRQA	: 32
Jujube	:	LVVASLILTS---	ALIQTSEAVGG	-----		-----		: 27
Latex	:	-----	EQC	-----		-----	GRQA	: 7
Milbe	:	IGLMNASIKRDHNDYSKNPMRIVCYVG	-----	-----		-----	TWSVYHKV	: 48
		*	140	*	160	*	180	
Traube	:	G-----	LCCSKYGYCGTGSDYCGD	--GCQSGPCDS	-----	-----	SGSSV	: 60
Avocado	:	GGALCPGG---	LCCSQFGWCGSTSDYCGP	--TCQSQCGGV	-----	-----	TPSPGGSVAS	: 77
Kastanie	:	FGTTGDVTTTRKRELAFLAQTSHETTGGWATAPDGPYAWGYCFVMENN		--KQTYCTS	--K			: 174
Banane	:	GGALCASGKESLCCSQFGWCGNTDDYCGSQEGCQSQCPGHKISTLPSLKKVIDTDTNFSA						: 92
Jujube	:	-----	IATYWQYETEETEEGLAEACASNLYSYIN	-----		-----		: 56
Latex	:	GGALCPGG---	LCCSQYGCANTPEYCGS	--GCQSQCDGG	-----	-----		: 42
Milbe	:	DPYTIEDIDPFKCTHLMYGFAKIDEYKYTIQVFDQDDNHNSWEKRGYERFNNLRLKNP						: 108
		*	200	*	220	*	240	
Traube	:	SDIVTQSFDFGII SQAAS-	SCAGK	-----		-----	NFYTRAAFLSALNS--	YSGF : 101
Avocado	:	--LISQSVFNQMLKHRNDAACQAK	-----	-----		-----	GFYTYNAFIAAANS--	FNGF : 117
Kastanie	:	SWPCVFGKQYYGRGPIQLTHNYNYGQAGKAIGADLINNPDLVATNPTISFKTAIWFWMT						: 234
Banane	:	NKLYVKYFVDQMLKHRNDNSCEGKF	-----	-----		-----	LFYSYSAFICASAR--	FRYF : 135
Jujube	:	-----	IAYLNIFGEGRYLSLNI	SGHCSDCTFLGEEIK	-----	-----		: 88
Latex	:	-----	VGEGGCVDLGSII	SRSTFEMLKHRNNAACPAK	-----	-----		: 76
Milbe	:	ELTTMISLGGWYEGSEKYSDMAANPTYRQQFIQSVLDFLQEYKFDGLDLDWEYPGSRLGN						: 168
		*	260	*	280	*	300	
Traube	:	GNDGSTD--	ANKREIAAFFAHVTHETG	-----		-----		: 126
Avocado	:	ASVGDTA--	TRKREIAAFLAQTSHETTGG	-----		-----	WATAPDGPYAW	: 155
Kastanie	:	QANKPSSHDVII GNWRPSAADT	SAGRVPSYGVITNI	INGGLECGHGSDDRANRIGFYKR				: 294
Banane	:	GTTGDTTRLARKREIAAFFAQT	SHETTGGT	-----		-----	WATAPDGPYAW	: 176
Jujube	:	-----	ACQSQGVKIFLSLGGPYGDYHLTTDGDADRVAEQLWSSSFLGGS					: 131
Latex	:	-----	GFYTYDAFISAACA	--FPAFGTTGDVD	--	-----	TCKREIAAFEGQTS	: 115
Milbe	:	PKIDKQNYLALVRELKDAFEPHGYYLLTA	AVS---	PGKDKIDRAYDIKELNKLFDWMNVMT				: 225

**Abbildung 49: Sequenzalignment mit der im Rotwein enthaltenen Endochitinase und als Allergenen bekannten Chitinasen anderer Pflanzen.**

## 9. Veröffentlichungen

WIGAND P, TENZER S, SCHILD H, DECKER H (2008): Analysis of the Protein composition of Red Wine in comparison with Rosé and White Wine by Electrophoresis and HPLC/Mass Spectrometry. Eingereicht.

WIGAND P, DECKER H (2007): Proteine im Wein. Deutsche Lebensmittel-Rundschau. 103 (2): 52-57

WIGAND P, SALZBRUNN U, DECKER H (2006): Identifizierung von Proteinen im Wein. Poster bei der Mosel-Weinbautagung in Kröv

SALZBRUNN U, WIGAND P, DECKER H (2006): Einfluss verschiedener Weinhaltstoffe auf die Gesundheit. Poster bei der Mosel-Weinbautagung in Kröv





## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst und alle verwendeten Hilfsmittel angegeben habe.

Mainz, Dezember 2008

Petra Wigand