

Untersuchungen zur Bindung kontaktallergener Substanzen an nukleophile Aminosäureseitenketten

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Dresden

von

Diplom-Lebensmittelchemiker (staatl. geprüft) Janko Pickert
geboren am 3. April 1975 in Saalfeld / Saale

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. T. Henle
Prof. Dr. rer. nat. T. J. Simat
Prof. Dr. med. H. F. Merk

Eingereicht am: 28. Juli 2004

Disputation am: 16. Dezember 2004

„Forschung ist das simple Vergnügen,
etwas zu finden, was man vorher nicht wusste.“

Carl Friedrich von Weizsäcker

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen	3
2.1	Die Allergie	3
2.1.1	Definition	3
2.1.2	Formen	4
2.2	Allergische Kontaktdermatitis	5
2.2.1	Hintergrund und Bedeutung	5
2.2.2	Entstehung und Verlauf	5
2.2.3	Klinisches Bild	7
2.2.4	Kontaktallergene	8
2.2.5	Einflussfaktoren auf die Sensibilisierung	11
2.3	Möglichkeiten der Vorhersage der Sensibilisierungsfähigkeit	12
2.3.1	In vivo - Modelle	13
2.3.2	In vitro - Modelle	14
2.3.3	Datenbankmodelle	15
2.4	Die Hapten-Carrier-Konjugation	15
2.5	Carrier-Modelle	17
2.5.1	Bisherige Studien	17
2.5.2	Peptid-Modelle	18
2.5.3	Proteine	19
2.6	Ausgewählte kontaktallergene Substanzen	21
2.6.1	Tulipalin A - ein bedeutendes Phytoallergen	21
2.6.2	Kontaktallergene Duftstoffe	22
2.6.3	Einstufung der ausgewählten Kontaktallergene	26
2.7	Mögliche Reaktionsmechanismen	28
2.7.1	Kovalente Bindungen	28
2.7.2	Elektrostatische Bindungen	31
3	Material und Methoden	33
3.1	Chemikalien und Geräte	33
3.1.1	Chemikalien	33
3.1.2	Geräte und Materialien	34
3.2	Analytische Methoden	34
3.2.1	Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	34
3.2.2	Aminosäureanalyse (ASA)	37
3.2.3	Flüssigchromatographie/Massenspektrometrie (LC-MS)	38
3.2.4	Massenspektrometrie	39
3.2.5	Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR)	39

3.3	Semipräparative HPLC	39
3.3.1	Umsetzung von N ^α -Hippuryl-lysin mit Tulipalin A	40
3.3.2	Umsetzung von N ^α -Hippuryl-histidin-leucin mit Tulipalin A	40
3.3.3	Umsetzung von N ^α -Acetyl-histidin mit Tulipalin A	41
3.3.4	Umsetzung von N ^α -Hippuryl-lysin mit 7-Hydroxycitronellal	42
3.3.5	Umsetzung von N ^α -Hippuryl-lysin mit Zimtaldehyd	42
3.4	Vorversuche zur Reaktivität	43
3.4.1	Inkubation in wässrig-methanolischer Lösung	43
3.4.2	Reaktionsansätze in Methanol unter Rückfluss	43
3.5	Rückflussansätze mit N ^α -Hippuryl-Derivaten und Glutathion	43
3.6	Inkubation in methanolischer Lösung	44
3.7	Vergleichsansätze mit Acetyl-Derivaten	45
3.7.1	Rückflussansätze	45
3.7.2	Inkubationsansätze	45
3.8	Einfluss des pH-Wertes	46
3.8.1	Qualitativer Einfluss des pH-Wertes	46
3.8.2	Quantitativer Einfluss des Natriumhydroxidzusatzes	46
3.9	Syntheseansätze zur Strukturaufklärung von Reaktionsprodukten	47
3.9.1	N ^α -Hippuryl-lysin und Tulipalin A	47
3.9.2	N ^α -Hippuryl-histidin-leucin und Tulipalin A	48
3.9.3	N ^α -Acetyl-histidin und Tulipalin A	50
3.9.4	N ^α -Hippuryl-lysin und 7-Hydroxycitronellal	51
3.9.5	N ^α -Hippuryl-lysin und Zimtaldehyd	52
3.10	LC-MS-Experimente mit Lysin-Derivaten	53
3.11	Konjugationen an Proteine	53
4	Ergebnisse und Diskussion	55
4.1	Methodische Aspekte	55
4.1.1	HPLC	55
4.1.2	Aminosäureanalyse	55
4.2	Vorversuche zur Reaktivität	56
4.2.1	Inkubation in wässrig-methanolischer Lösung	56
4.2.2	Reaktionsansätze in Methanol unter Rückfluss	58
4.2.3	Zusammenfassung der Vorversuche	61
4.3	Rückflussansätze mit Modellpeptiden als Screening	61
4.3.1	Rückflussansätze mit N ^α -Hippuryl-lysin	61
4.3.2	Rückflussansätze mit N ^α -Hippuryl-histidin-leucin	63
4.3.3	Rückflussansätze mit N ^α -Hippuryl-arginin	64

4.3.4	Rückflussansätze mit Glutathion	64
4.3.5	Zusammenfassung der Rückflussansätze mit Modellpeptiden	65
4.4	Inkubationsansätze in methanolischer Lösung	66
4.4.1	N ^α -Hippuryl-lysin und Tulipalin A	66
4.4.2	N ^α -Hippuryl-lysin und 7-Hydroxycitronellal	68
4.4.3	N ^α -Hippuryl-lysin und Zimtaldehyd	70
4.4.4	N ^α -Hippuryl-histidin-leucin und Tulipalin A	72
4.4.5	Zusammenfassung der Inkubationsansätze	73
4.5	Vergleich der analytischen Methoden	75
4.6	Reaktionen mit Acetyl-Derivaten als Screening	76
4.6.1	Rückflussansätze	76
4.6.2	Inkubationsansätze	79
4.6.3	Zusammenfassung	80
4.7	Einfluss des pH-Wertes am Beispiel der Reaktion von Tulipalin A	81
4.7.1	Qualitativer Einfluss des pH-Wertes	81
4.7.2	Quantitativer Einfluss des Natriumhydroxidzusatzes	82
4.8	Isolierung und Strukturaufklärung von Reaktionsprodukten	84
4.8.1	N ^α -Hippuryl-lysin und Tulipalin A	84
4.8.2	N ^α -Hippuryl-histidin-leucin und Tulipalin A	86
4.8.3	N ^α -Acetyl-histidin und Tulipalin A	92
4.8.4	N ^α -Hippuryl-lysin und 7-Hydroxycitronellal	96
4.8.5	N ^α -Hippuryl-lysin und Zimtaldehyd	99
4.8.6	LC-MS-Experimente mit verschiedenen Lysin-Derivaten	100
4.9	Reaktion von Tulipalin A mit Proteinen	110
4.9.1	Nachweis einer Konjugation am Beispiel Rinderserumalbumin	110
4.9.2	Inkubationsversuche mit ausgewählten Proteinen	111
5	Zusammenfassung	117
6	Literaturverzeichnis	121

Erklärung

Danksagung

Abkürzungsverzeichnis

7-HC	7-Hydroxycitronellal
Abb.	Abbildung
Ac-Arg	N ^α -Acetyl-arginin
Ac-Cys	N ^α -Acetyl-cystein
Ac-His	N ^α -Acetyl-histidin
Ac-Lys	N ^α -Acetyl-lysin
Alk.	Alkohol
ASA	Aminosäureanalyse
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
Boc-Lys	N ^α -Boc-lysin
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
COSY	correlated spectroscopy
Da	Dalton
DAD	Dioden-Array-Detektion
DEREK	deductive estimation of risk from existing knowledge
DKG	Deutsche Kontaktallergie-Gruppe
DMSO	Dimethylsulfoxid
ESI	electrospray ionisation
GPMT	guinea pig maximization test
GSH	Glutathion
Hip	Hippuryl-
Hip-Arg	N ^α -Hippuryl-arginin
Hip-His-Leu	N ^α -Hippuryl-histidin-leucin
Hip-Lys	N ^α -Hippuryl-lysin
His-1H-Tu	2-Amino-3-[1-(2-oxo-tetrahydro-furan-3-ylmethyl)-1H-imidazol-4-yl]-propansäure (27)
His-3H-Tu	2-Amino-3-[1-(2-oxo-tetrahydro-furan-3-ylmethyl)-3H-imidazol-4-yl]-propansäure
HMBC	heteronuclear multiple bond connectivity
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
IFRA	International Fragrance Association
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
IVDK	Informationsverbund Dermatologischer Kliniken
λ	Wellenlänge
LC-MS	Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie
LLNA	local lymph node assay

LTT	Lymphozyten-Transformations-Test
LysTu	2-Amino-6-[(2-oxo-tetrahydro-furan-3-ylmethyl)-amino]-hexansäure
M	molar
MEST	mouse ear swelling test
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
N	normal
NMR	Kernresonanzspektroskopie
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PTFE	Polytetrafluorethylen (Teflon)
QSAR	Quantitative structure-activity relationships
RAI	relative alkylation index
rel.	relativ
RP-HPLC	Umkehrphasen-Hochdruckflüssigchromatographie
SCCNFP	Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products
SI	Stimulationsindex
Tab.	Tabelle
TOF	time of flight
TOPS	topological substructural molecular descriptors
Tul A	Tulipalin A (α -Methylen- γ -butyrolacton)
UV	ultraviolett
(v/v)	Volumenverhältnis
Vas.	Vaseline

1 Einleitung

In der heutigen Zeit sind ca. 4000 Verbindungen bekannt, denen die Fähigkeit nachgesagt wird, eine Kontaktallergie auslösen zu können. Die Entscheidung, ob ein Stoff hautsensibilisierende Eigenschaften besitzt, wird dabei meist auf der Grundlage von Beobachtungen am Menschen und/oder von tierexperimentellen Befunden getroffen. Bedingt durch den vermehrten Einsatz exotischer Pflanzen und neu entwickelter synthetischer Substanzen im Bereich der Kosmetikindustrie besteht der Bedarf an einer einfachen Methode zur Vorhersage des kontaktallergen Potentials einer Verbindung.

Als zentraler Schritt bei der Manifestierung einer Kontaktallergie wird die Bildung eines Hapten-Carrier-Komplexes aus dem niedermolekularen Kontaktallergen (Hapten) und Hautproteinen (Carrier) angesehen. Zur Abschätzung der Sensibilisierungsfähigkeit kann daher auch die Reaktivität der Substanz oder ihrer Metaboliten gegenüber Proteinen herangezogen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit werden neben dem bedeutenden Phytoekzematogen Tulipalin A die bisher wenig untersuchten kontaktallergen Duftstoffe Geraniol, 7-Hydroxycitronellal, Benzaldehyd, Salicylaldehyd, Vanillin, Zimtaldehyd, α -Amylzimtaldehyd und Benzylcinnamat hinsichtlich ihrer Reaktivität gegenüber peptidgebundenen Aminosäuren untersucht. Verwendet werden für diese Modellversuche Hippuryl-Derivate und Acetyl-Derivate der Aminosäuren Lysin, Histidin, Arginin bzw. Cystein sowie zusätzlich Glutathion. Die dabei gewählten Bedingungen sollen eine Adaption an physiologische Gegebenheiten erlauben.

Ziel ist es, zu klären, ob die mit diesen Modellversuchen zu gewinnenden Ergebnisse mit dem bekannten kontaktallergen Potential der eingesetzten Haptene korrelieren und somit geeignet sind, die Sensibilisierungsfähigkeit einer Substanz vorherzusagen.

Über Konjugationsprodukte von Kontaktallergenen mit Peptiden oder Proteinen ist in der Literatur sehr wenig bekannt. Daher ist es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, individuelle Produkte der Reaktionen der kontaktallergen Substanzen mit den nukleophilen Aminosäureseitenketten zu isolieren und zu charakterisieren, um so definierte Hapten-Carrier-Konjugate, die unter physiologisch relevanten Bedingungen entstehen können, zu beschreiben. Aufbauend auf den gefundenen Strukturen sollte es auch möglich sein, Hinweise auf eventuelle Reaktionsmechanismen zu erhalten.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Die Allergie

Eine Allergie beruht auf der Überempfindlichkeit gegenüber Reizen, welche anderen Menschen nichts ausmachen. Daher wird sie von Nichtbetroffenen oft verharmlost, so, als könnte der Kranke sich einfach zusammennehmen, um weniger empfindlich zu sein. Dabei gibt es kaum einen Stoff, gegen den man nicht allergisch sein könnte. Heuschnupfen bis hin zu Heuasthma ist wohl die bekannteste, aber bei weitem nicht die einzige Allergieform. So reagieren manche Menschen allergisch auf den Kontakt mit Metallen, andere auf Sporen von Schimmelpilzen. Auch Allergien gegen verschiedene Nahrungsmittel, Tierhaare, Hausstaub, Medikamente (z.B. Penicillin), Insektengift oder Latex sind bekannt. Die Ergebnisse des Bundes-Gesundheitssurveys 1998 bestätigen die weite Verbreitung allergischer Krankheiten in Deutschland. Insgesamt haben oder hatten 40 bis 43 % der erwachsenen Bevölkerung schon einmal eine Allergie (*Hermann-Kunz, 2000*). Die Allergien sind jedoch, trotz ihres vermehrten Auftretens, kein ausschließlich neuzeitliches Problem. Übersteigerte Reaktionen des Körpers kannte man schon vor mehreren tausend Jahren. So soll der ägyptische Pharaos Menes an einem Wespenstich gestorben sein, im alten Rom laborierte Kaiser Augustus an Asthma und im Mittelalter litt man an Rosenfieber, wohl einem Vorläufer unseres Heuschnupfens (*IGfBM, 2004*).

2.1.1 Definition

Die Allergie (griech. *allos*, anders; *ergon*, Tätigkeit) bezog sich nach Clemens von Pirquet (1874-1929) zunächst nur auf die Serumkrankheit. Nach ihm stellte sie „eine andersartige Reaktionsweise des Organismus als die erwartete und zwar nach einer im Körper vorangegangenen Immunreaktion“ dar (*von Pirquet, 1906*). Normalerweise schützt unser Immunsystem den Körper vor eindringenden Fremdproteinen und Mikroorganismen. Schon beim ersten Kontakt werden diese durch spezifische und unspezifische Abwehrreaktionen unschädlich gemacht. Anders bei Allergikern. Beim Erstkontakt mit einem Fremdstoff, dem Allergen, entwickelt sich statt einer Immunität eine Überempfindlichkeit, eine sog. Sensibilisierung. Während der Erstkontakt noch klinisch stumm verläuft, kommt es bei jedem weiteren Kontakt zumeist zu einer überschießenden Reaktion des Immunsystems, der sog. allergischen Reaktion. Heute wird unter Allergie die erworbene Überempfindlichkeitsreaktion des Immunsystems gegenüber normalerweise harmlosen Stoffen des natürlichen und beruflichen Lebensraums verstanden, sogenannten Allergenen. Somit definiert man die Allergie nach heutigen Erkenntnissen als „eine in zeitlicher, qualitativer und quantitativer

Hinsicht erworbene spezifische Reaktionsveränderung des Organismus auf der Basis einer pathologischen Immunreaktion“ (*Hausen und Vieluf, 1997*).

2.1.2 Formen

Nach *Gell und Coombs (1975)* werden allergische Reaktionen in vier Haupttypen eingeteilt, jedoch werden klinisch manifeste Allergien meist durch eine Kombination allergischer Reaktionsformen hervorgerufen (*Bundschuh, 1986*):

Typ I : Soforttyp

Durch übermäßige Bildung von Antikörpern vom Typ des Immunglobulins E (IgE) nach dem Erstkontakt mit dem Allergen kommt es Sekunden bis Minuten (selten auch Stunden) nach dem Zweitkontakt zu einer überschießenden Entzündungsreaktion, der anaphylaktischen Reaktion. Typische Reaktionen des Körpers sind - je nach primär betroffenem Organ - beispielsweise Augenjucken/-tränen, Niesanfalle, Nasenlaufen, Atemnot, rote Flecken (Flush) oder Quaddeln (Urtikaria) an der Haut, aber auch Durchfälle und Kreislaufbeschwerden. Der anaphylaktische Schock ist die Maximalform des Soforttyps auf Grund einer Generalisierung der allergischen Reaktion und kann im schlimmsten Fall zum Tod führen.

Typ II : Zytotoxischer Typ

Zytotoxische Reaktionen werden durch Bindung von IgG- und IgM-Antikörpern an zellständige Antigene ausgelöst. Diese Zellen werden zumeist innerhalb von Minuten bis Stunden nach dem Allergenkontakt zerstört. Ein Beispiel sind die nach Transfusion gruppenungleichen Blutes auftretenden Unverträglichkeitsreaktionen.

Typ III : Immunkomplextyp

Zum Typ III werden Reaktionen zusammengefasst, bei denen Antigen und Antikörper Immunkomplexe bilden, welche lokal das Komplementsystem aktivieren. Eine Reaktion tritt verzögert nach etwa sechs Stunden auf und äußert sich in einer Nekrose des Gewebes, auf dem sich Immunkomplexe anlagern konnten. Ein Beispiel für diesen Typ ist die milchinduzierte Alveolitis bei Kindern.

Typ IV : verzögerter Typ

Im Gegensatz zu den drei vorgenannten Allergietypen sind bei der Allergie vom verzögerten Typ keine Antikörper, sondern T-Lymphozyten Ursache der allergischen Reaktion. Nach Erstkontakt mit dem Allergen sind diese Zellen sensibilisiert und führen bei Zweitkontakt nach mehreren Tagen zu einer Entzündungsreaktion (z.B. allergisches Kontaktekzem bei Modeschmuckunverträglichkeit). Dieser Allergietyp, und dabei speziell die Kontaktdermatitis, hat für den Hintergrund der vorliegenden Arbeit besondere Bedeutung und wird unter Abschnitt 2.2 näher erläutert.

2.2 Allergische Kontaktdermatitis

2.2.1 Hintergrund und Bedeutung

Neben der allergischen Rhinitis (Heuschnupfen) ist die allergische Kontaktdermatitis die bedeutendste Allergieform. Zusätzlich gehört sie zu den häufigsten Erkrankungen der Haut. In Deutschland wird die Lebenszeitprävalenz der erwachsenen Bevölkerung für eine Kontaktallergie auf 15 % geschätzt. Hierbei sind Frauen signifikant häufiger betroffen als Männer. Gerade beim allergischen Kontaktekzem haben Frauen eine zwei- bis fast dreifach höhere Prävalenz (*Hermann-Kunz, 2000*). Eine dänische Studie erbrachte mit 15,9 % im Jahr 1990 und 18,6 % im Jahr 1998 ähnliche Werte. Zusätzlich zeigte sich hier eine Zunahme der Prävalenzrate in einem Zeitraum von 8 Jahren um rund 2,7 % (*Nielsen et al., 2001*). Darüber hinaus ist die allergische Kontaktdermatitis ein zentrales Problem in der Berufsdermatologie, da der Bundesrepublik Deutschland durch Arbeitsausfall, ärztliche Betreuung, Begutachtung und Umschulungsmaßnahmen jährlich Kosten in Höhe von ca. 3 Mrd. Euro entstehen (*Diepgen, zitiert in: Merk, 2002*). Berufe mit hohem Risiko für eine allergische Kontaktdermatitis sind Coiffeur- und Reinigungsberufe, Heil- und Pflegeberufe sowie Metall- und Bauberufe (*Büchner, 2001*).

2.2.2 Entstehung und Verlauf

Die allergische Kontaktdermatitis ist eine zellvermittelte Reaktion vom verzögerten Typ, die eine spezifische Sensibilisierung auf einen Stoff (Kontaktallergen) voraussetzt. Bei der Ausbildung einer Kontaktallergie unterscheidet man nach heutigen Erkenntnissen zwischen zwei zeitlich aufeinanderfolgenden Phasen: Die Induktions- oder Sensibilisierungsphase und die Expressions- bzw. Effektorphase.

In der Induktionsphase passiert die allergene Substanz nach Hautkontakt das Stratum corneum und penetriert in die Epidermis. Dort bindet sie an epidermale Proteine, sogenannte Carrierproteine. Der durch diese Kopplung (Haptenisierung) entstehende Hapten-Carrier-Komplex ist das eigentliche Antigen, welches vom Körper als "fremd" erkannt wird und somit von den in der Epidermis lokalisierten Langerhans-Zellen aufgenommen wird. In diesen wird das Antigen in kleinere Peptide zerlegt und an Moleküle der MHC-Klasse II (major histocompatibility complex) gebunden. Die Peptid-Antigen-MHC-Komplexe werden an die Oberfläche der Langerhans-Zellen transportiert, wodurch diese sich verändern bzw. aktiviert werden. Die so Allergen-beladenen Langerhanszellen wandern aus der Epidermis aus und gelangen über afferente Lymphbahnen in die peripheren Lymphknoten, wo es zu einer selektiven Aktivierung antigen-spezifischer naiver T-Zellen kommt, welche nach Proliferation und Differenzierung in der Lage sind, eine Reihe von Zytokinen zu produzieren.

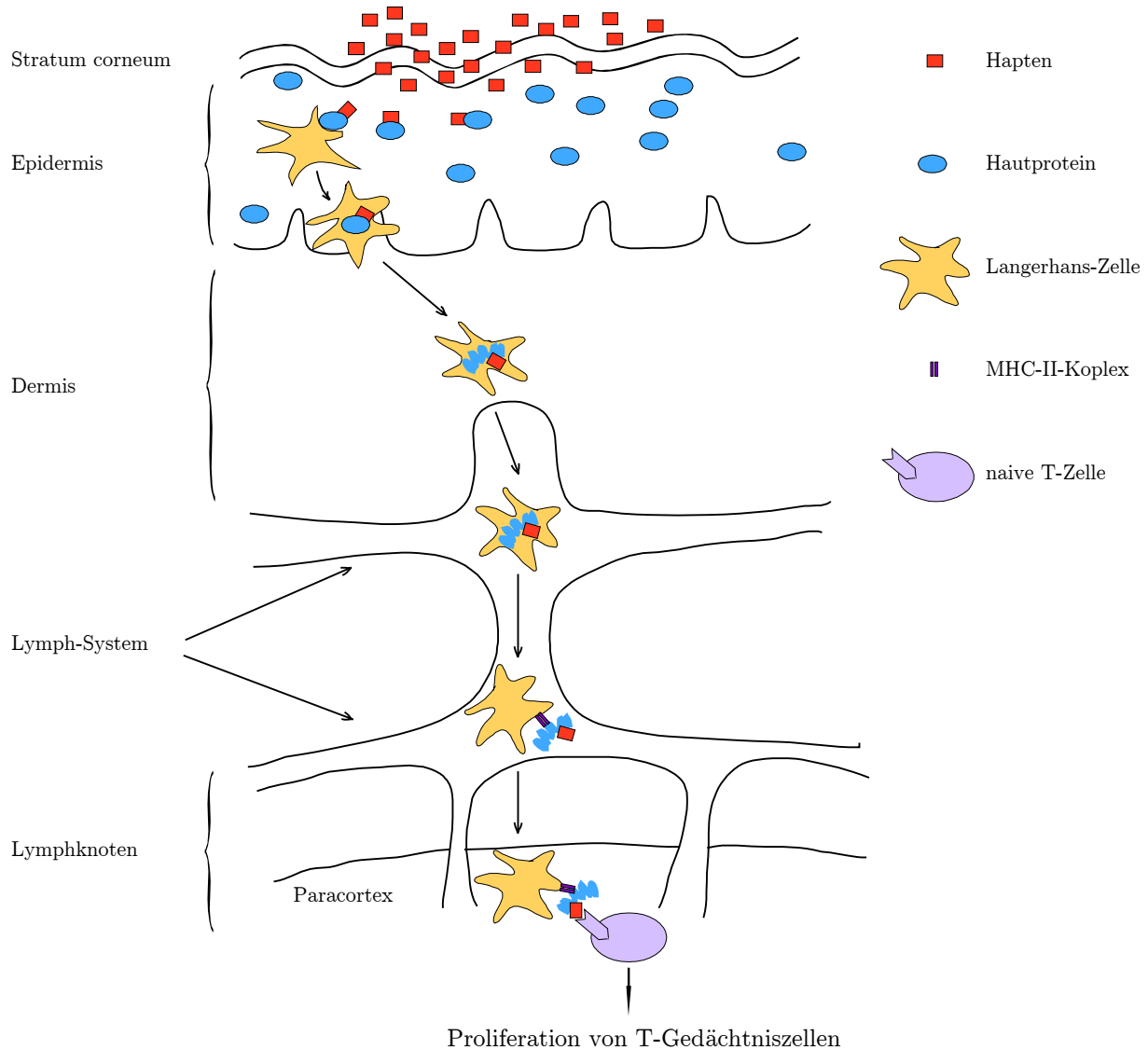


Abb. 2.2-1 Mechanismus der Sensibilisierung (nach Smith Pease et al., 2003)

Die Reaktion von T-Zell-Rezeptor mit dem antigentragenden MHC-Klasse-II-Molekül führt unter Beteiligung der Interleukine IL-1 und IL-2 zur Umwandlung in Effektor- und Memory-(Gedächtnis)-Zellen. Bei den Memoryzellen handelt es sich um $CD4^+$ -Zellen, welche alle den gleichen Antigenrezeptor in ihrer Oberflächenmembran tragen. Von diesen spezifischen Gedächtniszellen gelangt eine große Anzahl über efferente Lymphe in die Blutzirkulation. In der Regel ist die Sensibilisierungsphase beim Menschen nach 7 bis 14 Tagen damit abgeschlossen, dass Effektor- und Memoryzellen im Organismus zirkulieren, um das Allergen bei erneutem Kontakt zu erkennen und zu bekämpfen. Parallel zu diesen Vorgängen werden Keratinozyten durch die Penetration des Haptens in die Epidermis aktiviert. Diese Zellen produzieren auf den exogenen Stimulus hin proinflammatorische Zytokine wie IL-1, $TNF-\alpha$ und Zelladhäsionsmoleküle, welche dann andere T-Lymphozyten aktivieren, jedoch ohne dass eine sichtbare Entzündung auftritt.

In der sog. Effektorphase oder Auslösephase genügen bereits geringste Mengen des betreffenden Allergens an der Haut zur Auslösung einer Ekzemreaktion im Sinne einer allergischen Spättypreaktion. Der zunächst gebildete Hapten-Carrier-Komplex wird den T-Zellen von Langerhans-Zellen, dermalen dendritischen Zellen und Makrophagen der Dermis präsentiert. Bei den Effektorzellen des allergischen Kontaktekzems handelt es sich sowohl um CD4⁺ Helfer-T-Zellen als auch um CD8⁺ zytotoxische T-Zellen. Die T-Zellen erkennen dann über Antigen-spezifische Rezeptoren ihr Allergen und werden aktiviert. Dies ist verbunden mit der Freisetzung verschiedener proinflammatorischer Zytokine, die entweder direkt oder durch Aktivierung anderer Zellen, wie z.B. Makrophagen und Mastzellen, eine Kaskade in Gang setzt, welche spätestens 48 Stunden nach Allergenkontakt eine Entzündung im Sinne eines allergischen Kontaktekzems auslöst (*Dupuis und Benezra, 1982; Katz, 1993; Simon, 1994; Lappin, et al., 1996; Basketter et al., 1999a; Rustemeyer et al., 2001; Streit und Braathen, 2001; Fujita et al., 2003; Smith Pease et al., 2003*).

2.2.3 Klinisches Bild

Bei der allergischen Kontaktdermatitis lösen eigentlich untoxische Substanzen nach wiederholtem Kontakt bei bestimmten Personen ein Ekzem aus. Dabei wird eine Sensibilisierung gegenüber der jeweiligen Substanz vorausgesetzt. Die einsetzende Hautreaktion nach dem Kontakt ist dabei bei einem sensibilisierten Individuum reproduzierbar. Bei nicht sensibilisierten Personen führt der Kontakt mit dem Stoff zu keiner nachweisbaren entzündlichen Hautreaktion.

Das akute allergische Kontaktekzem entwickelt sich in der Regel in denjenigen Hautbereichen, in denen das Allergen mit der Haut in Berührung gekommen ist. Es kommt zu einer Entzündungsreaktion, in deren Verlauf die betroffenen Zellen absterben und vom Körper eliminiert werden. Sie beginnt etwa 24 bis 48 Stunden nach Allergenkontakt mit ausgeprägter Hautrötung (Erythem) und vielen kleinen Vesikeln (Bläschen, Papeln). Besonders im Bereich der Hände können die Vesikel ineinander laufen und größere Blasen (Ödeme) bilden. Wenn sie platzen, hinterlassen sie eine erodierte und nässende Oberfläche. Begleitet wird dies meist von einem starken Juckreiz. Die Hautveränderungen sind zur Umgebung hin unscharf abgegrenzt und neigen zu Streureaktionen. Diese können auch an Körperstellen auftreten, wo kein direkter Allergenkontakt stattgefunden hat. Bei fortgesetztem Allergenkontakt geht die akute allergische Kontaktdermatitis in ein subakutes und schließlich in ein chronisches Stadium über, welches durch eine synchrone Polymorphie der Hauterscheinungen gekennzeichnet ist. Man findet nun Rötungen, Papeln, Bläschen, Erosionen, Krusten und Schuppen nebeneinander. Außerdem kommt es zu einer Vergrößerung der Hautfelderung, Flechtenbildung und zu entzündlichen Verdickungen. Dies ist entweder die Folge von andauerndem Kratzen, hervorgerufen durch den Juckreiz, oder aber von der konstanten Freisetzung von Mediatoren (in diesem Falle Wachstumsfaktoren)

durch den chronischen Entzündungsherd. Die Verdickung kann die Haut reißen oder zerklüften lassen, wobei diese Risse (Brennrisse) oft schmerzhaft sind und sich sekundär entzünden können. Auch Trockenheit und Überpigmentierung wurden schon als Krankheitsbilder beobachtet. Die für die Ausbildung einer Kontaktallergie häufigsten Bereiche sind Hände, Unterarme und Kopf, hier vor allem das Gesicht. Der Ausgangsherd lässt hierbei meist Schlüsse auf das auslösende Allergen zu. (*Basketter et al., 1999a; Büchner, 2001*). Die Unterscheidung der allergischen von der irritativen Kontaktdermatitis ist oft schwierig, da diese ein ähnliches klinisches Bild zeigt. Erschwerend kommt hinzu, dass viele kontaktallergene Stoffe, je nach Konzentration, auch eine irritative Wirkung haben.

2.2.4 Kontaktallergene

Substanzen, welche in der Lage sind eine Kontaktallergie auszulösen, sind in der Regel niedermolekular mit einer Molmasse unter 500 Da (*Katz, 1993; Smith Pease et al., 2003*). In der heutigen Zeit sind annähernd 4000 niedermolekulare Verbindungen mit allergenen Eigenschaften bekannt (*Ahlfors et al., 2003*). Grundsätzlich lassen sich diese in natürliche und synthetische Stoffe unterteilen. Bei den Substanzen natürlichen Ursprungs sind vor allem die sogenannten Phytoekzematogene von Bedeutung. Diese werden im Sekundärstoffwechsel der Pflanze gebildet. Sie dienen u.a. als Abwehrstoffe und haben bakterizide, fungizide oder antiseptische Eigenschaften. Etwa ein Drittel der bekannten Phytoekzematogene entfallen auf die Gruppe der Sesquiterpenlactone (siehe auch Abb. 2.2-2). Diese Naturstoffe sind das allergene Prinzip der Asteraceen, von denen etwa 200 Arten Kontaktallergien auslösen können. Beispiele für diese Pflanzenfamilie sind Arnika, Kamille und Schafgarbe (*Hausen und Vieluf, 1997*).

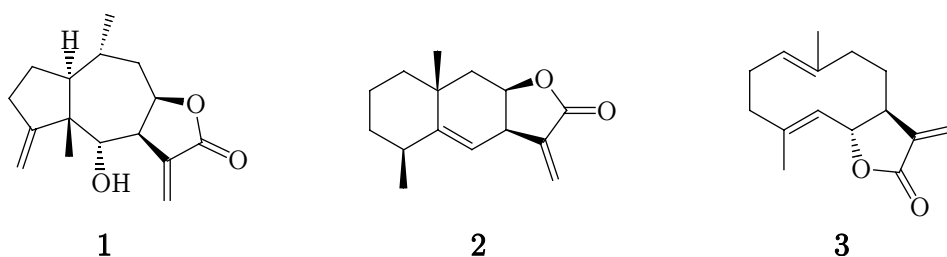


Abb. 2.2-2 Strukturen ausgewählter allergener Sesquiterpenlactone (**1** Helenalin aus *Arnica montana* L.; **2** Alantolacton aus *Inula helenium* L.; **3** Costunolid aus *Saussurea lappa* C.B. Clarke) (*Ducombs und Schmidt, 2001*)

Wichtig für die allergene Potenz der Sesquiterpenlactone ist das Vorhandensein eines α -Methylen- γ -butyrolactonrings (*Schmalle und Jarchow, 1983*). Glykosidisch gebunden bildet α -Methylen- γ -butyrolacton die sogenannten Tuliposide, welche in Liliaceen und Alstroemeriaceen die Prohaptene für die eigentlichen kontaktallergenen zyklischen Tulipaline darstellen. Die bekannteste und älteste allergische Kontaktdermatitis bei

Pflanzen wird durch bestimmte Primelarten wie die Becherprimel (*Primula obdonica*) verursacht. Als Allergen wurde unter anderem das 2-Methoxy-6n-pentyl-1,4-benzochinon (Primin) **4** (Abb. 2.2-3) identifiziert (*Aplin und Lovell, 2001*).

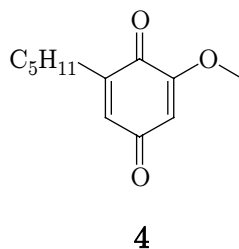


Abb. 2.2-3 Primin

Als stärkstes pflanzliches Sensibilisierungsmittel gilt der Milchsaft von *Rhus toxicodendron* L. (Giftsumach, poison ivy). In den USA sind 60-80 % der Bevölkerung allergisch gegen diese Pflanzen. Als toxisches Prinzip sind Urushiole erkannt worden, Brenzcatechinderivate mit einer langen aliphatischen Kette in ortho-Stellung (*Westendorf, 1997*). Weitere Stoffgruppen von Phytoallergenen sind ätherische Öle (Teebaum, Lavendel), Terpene (Perubalsam, Gewürznelke), Kaffeate (Propolis), Polyacetylene (Efeu), die zum Beispiel in Knoblauch und Zwiebel vorkommenden Disulfide (*Schempp et al., 2002*) und einfachere Strukturen wie Aldehyde, Ketone, Hydrocarbone usw. Die Kenntnis der in den verschiedenen Pflanzen enthaltenen Allergene erlaubt eine Aussage über mögliche Kreuzreaktionen (*Benezra und Ducombs, 1987*). Viele Pflanzenextrakte finden auch Verwendung in Phytotherapie und Kosmetika. Dort können vor allem Auszüge der oben genannten Pflanzen neben anderen Kosmetikinhaltsstoffen Ursache einer Kontaktdermatitis sein.

Zu den synthetischen Kontaktallergenen zählt man eine Vielzahl chemischer Verbindungen, z.B. Aldehyde, Phenole und Thiole, welche als Bestandteile von Haushaltschemikalien, Kunststoffen, Farben, Desinfektionsmitteln, Textilien und kosmetischen Mitteln mit der Haut in Berührung kommen. Allergene kommen in Sprays, Parfüms, Cremes, Salben, Nagellack und Sonnencreme vor. Dabei sind es Basissubstanzen (z.B. Wollwachsalkohol Lanolin), zugesetzte Wirkstoffe und/oder Konservierungsmittel (Methylchloroisothiazolinon, Parabene, Formaldehyd). Die größte Bedeutung kann man aber den Duftstoffen beimessen. Praktisch sind alle Kosmetika und Toilettenartikel parfümiert, selbst als "unparfümiert" deklarierte Kosmetika enthalten in der Regel einen "überdeckenden" Duftstoff. Nicht nur Kosmetikprodukte wie Parfüms, Aftershave und Deodorants, welche vorwiegend wegen ihres Geruches Verwendung finden, sondern auch Waschmittel, Weichspüler, Produkte für Mundhygiene, Gesichtstücher, Windeln, Toilettenpapier, Haushaltsreiniger, Polituren und Wachse enthalten Duftstoffe. Die Folge ist ein häufiger Kontakt mit Duftstoffen. Daher spielen Duftstoffe als Inhaltsstoffe gerade von Kosmetika, aber auch in weit

geringerem Ausmaß als Zusatzstoffe zu topischen Dermatika als häufige Auslöser von Kontaktallergien weltweit eine bedeutende Rolle (*Erdmann und Merk, 2003*). Heute finden in der Herstellung von Parfüms und Düften annähernd 3000 Duftstoffe Verwendung. Diese werden jedoch in der Regel nicht einzeln eingesetzt, sondern aus 10-300 verschiedenen Substanzen zusammengestellt. Diese Kompositionen sind ein wohlgehütetes Geheimnis in der Parfümherstellung, was bedeutet, dass diese Informationen für betroffene Kontaktallergiker leider nicht zur Verfügung stehen (*Rastogi, et al., 1998a*). Kürzlich wurde jedoch vom Gesetzgeber eine Regelung für die 23 häufigsten kontaktallergenen Duftstoffe getroffen. Mit Inkrafttreten der Richtlinie 2003/15 EG des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 27. Februar 2003 sind diese Duftstoffe auf dem Behältnis oder der Verpackung eines kosmetischen Mittels mit der obligaten Angabe "Enthält..." zu kennzeichnen (*RL 2003/15 EG*). Die Information des Verbrauchers wird dadurch verbessert und das Risiko von Allergien eingeschränkt. Zur Diagnose einer Kontaktallergie wird im Allgemeinen ein Epikutantest ("Patch-Test") durchgeführt. Durch Applikation einer nicht reizenden Stoffkonzentration mit einem Testpflaster auf die normale Rückenhaut wird bei entsprechend sensibilisierten Personen im Laufe des 24 bzw. 48 Stunden bestehenden Stoffkontaktes im Testareal eine ekzematöse Reaktion hervorgerufen, welche die spezifische Sensibilisierung des Individuums anzeigt. In Deutschland geschieht dies nach den Empfehlungen der Deutschen Kontaktallergie-Gruppe (*DKG, 2003*). In der Standardtestreihe sind als "screening agents" für Duftstoffe Perubalsam und der Duftstoffmix enthalten. Der Ende der 70er Jahre eingeführte Duftstoffmix erfasst in seiner jetzigen Zusammensetzung (siehe Tab. 2.2-1) lediglich 60-70 % der Duftstoff-Allergie-Patienten (*Larsen et al., 2002*).

Tab. 2.2-1 Bestandteile des Duftstoffmixes (*SCCNFP, 1999; DeGroot und Frosch, 2001*)

Bestandteil	Test - Konzentration
1 α -Amylzimtaldehyd	1 % Vas.
2 Zimtaldehyd	1 % Vas.
3 Zimtalkohol	1 % Vas.
4 Eugenol	1 % Vas.
5 Geraniol	1 % Vas.
6 Hydroxycitronellal	1 % Vas.
7 Isoeugenol	1 % Vas.
8 Eichenmoos absolue	1 % Vas.
9 Sorbitansesquioleat	5 % Vas.

Daher wird bei vermuteter Kontaktallergie gegen Duftstoffe eine weitere Testreihe von der Deutschen Kontaktallergie-Gruppe (*DKG, 2003*) empfohlen (siehe Tab. 2.2-2).

Tab. 2.2-2 Testreihe weitere Riechstoffe nach (DKG, 2003)

	Bestandteil	Test - Konzentration
1	Benzylsalicylat	1 % Vas.
2	Nelkenöl	2 % Vas.
3	Orangenöl	2 % Vas.
4	Vanillin	10 % Vas.
5	Benzaldehyd	5 % Vas.
6	Benzylcinnamat	5 % Vas.
7	Zedernholzöl	10 % Vas.
8	Eukalyptusöl	2 % Vas.
9	Lorbeerblätteröl	2 % Vas.
10	Lemongrasöl	2 % Vas.
11	Zitronenöl	2 % Vas.
12	Pomeranzenblütenöl	2 % Vas.
13	Pfefferminzöl	2 % Vas.
14	Salicylaldehyd	2 % Vas.

Da Kosmetika in ihrer Zusammensetzung und damit natürlich auch in den verwendeten Duftstoffkomponenten Veränderungen erfahren, nicht zuletzt aus dermatologischen Erkenntnissen (Rastogi et al., 2003), verlieren einige allergene Duftstoffe an Bedeutung während neue hinzukommen. Daher ist es wichtig, die Epikutantestreihen von Zeit zu Zeit zu aktualisieren. In Deutschland ist dies u.a. die Arbeit des Informationsverbundes Dermatologischer Kliniken (IVDK) (Aberer et al., 2003). Jüngstes Beispiel ist die Aufnahme von Lyrall, einem synthetischen Duftstoff, in die Standardtestreihe (Geier et al., 2002). Auch Nahrungsmittel, Getreidemehl, Öle und Fette, Lösungsmittel, Terpentin, Lacke, Klebstoffe, Kalk, Zement, Pflanzenschutzmittel und Farbstoffe können vor allem berufsbedingt bei wiederkehrendem Hautkontakt zu allergischen Kontaktdermatiden führen. Die häufigsten oder die durch ihre berufsdermatologische Bedeutung sozioökonomisch wichtigsten Kontaktallergene sind Metallsalze, hierbei vor allem Nickelsulfat, sowie die Duftstoffe und p-Phenylendiamin (Merk, 2002). In einer anderen Studie von Schäfer et al. (2001) wird wiederum den Duftstoffen in Deutschland die größte Bedeutung beigemessen.

2.2.5 Einflussfaktoren auf die Sensibilisierung

Nach Kontakt der Haut mit einer kontaktallergenen Substanz erfolgt nicht zwangsläufig eine Sensibilisierung. Ob es zur Induktion einer allergischen Kontaktdermatitis kommt, hängt dabei von mehreren Faktoren ab. Zum einen besteht eine Abhängigkeit von der individuell unterschiedlichen Sensibilisierungsbereitschaft

gegenüber Kontaktallergenen. Deren Ursachen und Bedeutung sind bisher wenig erforscht und daher noch nicht hinreichend geklärt. Eindeutige Hinweise auf Zusammenhänge konnten bisher noch nicht bewiesen werden (*Menne und Holm, 1986; Basketter et al., 1999a*). Phänomene, wie das Überwiegen der Chromatallergie bei Männern (z.B. durch Zement) und der Nickelallergie bei Frauen (z.B. durch Modeschmuck) (*Schnuch und Geier, 1995*) sind auch nicht Folge einer geschlechtsspezifischen Reaktionslage, sondern einer geschlechtsdiffernten Exposition. Von größerer Bedeutung ist jedoch die Sensibilisierungsfähigkeit einer Substanz. Diese ist in der Hauptsache abhängig von deren Hautpenetrationsvermögen (Lipophilie und Molekülgröße) und ihrer Reaktivität gegenüber Hautproteinen (*Dupuis und Benezra, 1982*). Ausschlaggebend für das Auftreten einer Sensibilisierung sind auch die Expositionsbedingungen, d.h. Häufigkeit und Art des Kontaktes sowie die Stoffkonzentration. Sensibilisierungsfähigkeit und Expositionsbedingungen stehen dabei in wechselseitiger Beziehung zueinander. Bei hohen Stoffkonzentrationen oder längerem Kontakt insbesondere auf vorgeschädigter Haut bzw. gleichzeitigem Kontakt mit einem starken Allergen können auch relativ schwache Allergene sensibilisieren. Andererseits induzieren stark wirksame Kontaktallergene selbst bei geringerer Konzentration eine Kontaktallergie.

2.3 Möglichkeiten der Vorhersage der Sensibilisierungsfähigkeit

Durch die rasante Entwicklung immer neuer chemischer Verbindungen erkannte man die Notwendigkeit der Entwicklung alternativer Tests zur Bestimmung pharmakologischer und/oder toxischer Wirkungen dieser neu geschaffenen Stoffe. Dies gilt besonders für den Bereich der Kontaktallergien auf Inhaltsstoffe kosmetischer Mittel. Gerade die Synthese und Kreation neuer Duftstoffe birgt dabei große Risiken. Lyral [4-(4-Hydroxy-4-methylpentyl)-3-cyclohexen-1-carboxaldehyd] ist ein aktuelles Beispiel für einen synthetischen Duftstoff, welcher in kurzer Zeit weltweite Verwendung fand und der nun in den Blickpunkt rückt, da in den vergangenen Jahren gehäuft Fälle von Kontaktallergien auftraten. Lyral führt in 2,7 % aller Fälle zu Spättypreaktionen (*Erdmann und Merk, 2003*). Mit einem System zur Vorhersage des allergenen Potentials einer Substanz wäre eine Sensibilisierung der Verbraucher gegen solche neuartigen Duftstoffe vermeidbar. Möglich sind natürlich auch Tests an Versuchspersonen, diese sind jedoch teuer und zumindest ethisch bedenklich. Im folgenden werden einige Alternativen zu Humantests vorgestellt.

2.3.1 In vivo - Modelle

Versuchstier Meerschweinchen

Über viele Dekaden war das Meerschweinchen das Tier der Wahl für Studien zur Vorhersage des Sensibilisierungspotentials einer Substanz. In der Literatur wurden verschiedene Versuchsanordnungen beschrieben, beispielsweise der Maximierungstest am Meerschweinchen (GPMT - guinea pig maximization test) (*Magnusson und Kligman, 1969*) und der Buehler-Test (*Basketter et al., 1999a*). Diese beiden Tests sind auch in der EU-Richtlinie zur Einstufung, Verpackung und Kennzeichnung gefährlicher Stoffe (*RL 67/548/EWG*) als Bestimmungsmethode für die Sensibilisierung der Haut angegeben. In der Regel werden die Versuchstiere (10 bis 20 Meerschweinchen) zunächst einer epidermalen Applikation und/oder intradermalen Injektion der Prüfsubstanz ausgesetzt. Nach dieser Induktionsexposition folgt eine Ruhephase von 10 bis 14 Tagen, in deren Verlauf sich eine Immunreaktion entwickeln kann. Anschließend werden die Tiere einer Provokationsdosis ausgesetzt und das Ausmaß und der Grad der Hautreaktion nach 24 bis 48 Stunden mit der Reaktion bei nicht vorsensibilisierten Kontrolltieren verglichen. Die Tests am Meerschweinchen haben jedoch auch Schwächen. Problematisch ist einerseits die schlechte Reproduzierbarkeit (*Basketter et al., 1999a*), andererseits lässt sich keine Aussage über eine relative Potenz treffen. So wurden verschiedene Versuche durchgeführt um eine Dosis-Wirkungs-Beziehung herzustellen, jedoch mit geringem Erfolg (*Basketter und Kimber, 2001b*).

Versuchstier Maus

Der potentielle Nutzen der Maus für Studien zur Kontaktsensibilisierung wurde von *Asherson und Ptak (1968)* dargelegt. Sie demonstrierten, dass die Kontaktreaktionen bei sensibilisierten Mäusen anhand der Verdickung oder Schwellung der Ohren messbar sind. Daraus entwickelte sich der mouse ear swelling test (MEST), der in einer Studie 71 von 72 Substanzen richtig als sensibilisierend bzw. nicht sensibilisierend einordnete (*Gad et al., 1986*). Die bisher beschriebenen in vivo - Modelle bestimmen und bewerten Vorgänge der Effektorphase der Kontaktallergie. Eine andere Herangehensweise ist die Beobachtung von Vorgängen während der Induktionsphase, wie beim Lokalen Lymphknotentest (LLNA - local lymph node assay). Dieser beruht auf dem Prinzip, dass sensibilisierende Stoffe eine primäre Lymphozytenproliferation im drainierenden Lymphknoten an der Stelle der Applikation des chemischen Stoffes induzieren. Diese Proliferation verläuft proportional zur applizierten Dosis (3 mal 25 µl mit variabler Konzentration) und zur Wirksamkeit des Allergens. Mit Hilfe des LLNA wird die Proliferation als Dosis-Wirkungs-Beziehung bewertet. Zu diesem Zweck wird sie in den Testgruppen mit der in den mit Vehikel (Lösungsmittel) behandelten Gruppen verglichen. Der als Stimulationsindex (SI) bezeichnete Proliferationsquotient zwischen den Testgruppen und den mit Vehikel behandelten Gruppen wird ermittelt und muss

mindestens 3 betragen, ehe eine Prüfsubstanz für eine weitere Bewertung als potenzieller Hautsensibilisator infrage kommt. Die Bewertung der Proliferation beruht auf der Nutzung der radioaktiven Markierung zur Messung der Zellproliferation (*OECD, 2001*). Dafür wird der Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin in die DNA sich teilender Zellen erfasst (*Kimber et al., 2002*). Der LLNA unterscheidet sich von anderen in vivo-Tests insbesondere dadurch, dass die langwierige und für die Tiere qualvolle Prozedur der Allergieerzeugung und der späteren Auslösung vermieden wird und die subjektive Hautreizungsbefundung am Ende des Tests durch eine objektive Messmethode ersetzt wird (*BAA, 2003*). Auch lassen sich nun die verschiedenen kontaktallergenen Stoffe hinsichtlich ihres kontaktallergen Potentials anhand des SI vergleichen und einordnen. Eine einheitliche Kenngröße wurde mit dem EC3-Wert geschaffen. Dieser gibt die Konzentration der Substanz an, die benötigt wird, um im LLNA einen SI von 3 zu erzielen (*Basketter et al., 1999b*). Nach *Basketter et al. (2000)* und *Gerberick et al. (2001)* lassen Kontaktallergene nach ihrem EC3 in 5 Klassen (strong, moderate, weak, extremely weak, non-sensitizing - stark, mäßig stark, schwach, extrem schwach, nicht sensibilisierend) einteilen. Diese korrelieren recht gut mit den am Menschen gemachten Beobachtungen. Eine ausführliche Beschreibung des LLNA, seiner Vorteile und Nachteile und der sehr aufwendigen Validierung, welcher er unterzogen wurde, wurde vom National Institute of Environmental Health Sciences der USA veröffentlicht (*NIEHS, 1999*).

2.3.2 In vitro - Modelle

Das Anliegen der bisher durchgeführten in vitro-Studien ist es, Zusammenhänge zwischen der chemischen Struktur und ihrem allergenen Potential aufzuzeigen. Diese quantitativen Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (QSAR - quantitative structure-activity relationships) sollen nicht nur vorhersagen, ob eine Substanz kontaktallergen wirken wird, sondern auch eine Aussage über die zu erwartende Intensität zulassen (*Lepoittevin, 1999*). Eines der bisher am weitesten entwickelten Modelle ist der relative alkylation index (RAI). Dieses Modell vereint drei Parameter: die auf die Haut applizierte Dosis, die Lipophilität und die Reaktivität der Substanz gegenüber Proteinen. Diese Parameter wurden gewählt, da experimentell festgestellt worden ist, dass eine Erhöhung eines der drei Parameter auch zu einer Erhöhung der Allergenität führt (*Lepoittevin, 2001*). Die Lipophilität wird dabei über einen Verteilungskoeffizienten zwischen einem polaren und einem unpolaren Lösungsmittel (in der Regel Wasser/Oktanol) berechnet und die chemische Reaktivität wird bei diesem Modell gegen ein Standardnukleophil, das Butylamin, bestimmt. Studien mit Nitrobenzyl-Verbindungen, Sul-tonen (*Goodwin und Roberts, 1986*) und Tulipalin A verwandten α -(ω -substituierten-Alkyl)- γ,γ -dimethyl- γ -butyrolactonen (*Franot et al., 1994a; 1994b*) zeigen auch eine gute Korrelation des RAI mit in vivo gewonnenen

Sensibilisierungsdaten. Das RAI-Modell unterliegt jedoch gewissen Einschränkungen. So lassen sich zwar gute Ergebnisse in einer Reihe von homologen Verbindungen erzielen, doch Vorhersagen über andere Stoffklassen lassen sich nicht treffen. Weiterhin berücksichtigt dieses Modell auch nicht die Hautpenetrationseigenschaften der Substanzen, welche die Dosis am Reaktionsort in der Epidermis stark beeinflussen (*Lepoittevin, 2001*). Ein weiterer in vitro-Test ist der Lymphozyten-Transformations-Test (LTT). Der LTT beruht ähnlich wie der LLNA auf der Messung der Proliferation von spezifischen T-Lymphozyten mit Hilfe von radioaktiv markiertem Thymidin. Als Inkubationsmedium dienen jedoch u.a. Monozyten des peripheren Blutes (PBMC - peripheral blood mononuclear cells) von Kontaktallergie-Patienten. Von *Sieben et al. (2001)* wurden kürzlich LTT-Versuche mit kontaktallergenen Duftstoffen beschrieben. Dabei konnten bei 10 von 32 Patienten mit positiven Patch-Test-Reaktionen auch signifikante T-Lymphozyten-Proliferationen festgestellt werden.

2.3.3 Datenbankmodelle

Die Vorhersage des kontaktallergenen Potentials einer Substanz allein auf der Grundlage ihrer chemischen Struktur ist das Ziel von Datenbanksystemen wie z.B. DEREK (deductive estimation of risk from existing knowledge). Dieses System beinhaltet Kontrollprogramme, welche die Struktur von Molekülen analysieren und mit Datenbanken, die Strukturmerkmale mit bekannter kontaktallergener Aktivität enthalten, vergleichen und bewerten (*Lepoittevin, 2001*). Solche Strukturmerkmale, verknüpft mit der zu erwartenden Reaktion gegenüber Proteinen, werden beispielsweise von *Payne und Walsh (1994)* diskutiert. Stoffgruppen mit potentiell sensibilisierenden Strukturmerkmalen sind u.a. Aldehyde, Ketone und α,β -ungesättigte Aldehyde, Ketone und Ester. *Rastogi et al. (1998b)* untersuchten 71 Deodorants und identifizierten mit Hilfe von DEREK 84 potentiell kontaktallergene Strukturen. Ein aktueller Ansatz ist die TOPS-MODE-Näherung (topological substructural molecular descriptors), welche den Beitrag der Molekülstruktur zur Hautsensibilisierung einbezieht (*Estrada et al. 2003; Estrada et al., 2004*). Leider können solche Systeme eine eventuelle Metabolisierung nicht berücksichtigen und die evaluierte Struktur ist nicht zwangsläufig jene, die dann mit dem Protein reagiert.

2.4 Die Hapten-Carrier-Konjugation

Die meisten kontaktallergenen Substanzen sind kleine, chemisch reaktive Moleküle mit einer Molmasse unter 500 Da (*Katz, 1993; Smith Pease et al., 2003*). Damit sind diese als Haptene bezeichneten Substanzen zu klein, um allein eine Immunantwort auslösen zu können. Für die Induktion oder Auslösung einer Kontaktallergie bedarf es einer Kopplung an hauteigene Proteine, sogenannte Carrierproteine. Durch die Kopplung

verändert sich die Struktur des Proteins und es wird vom Körper als "fremd" erkannt. Die Bildung des Hapten-Carrier-Komplexes ist also der entscheidende erste Schritt zur Ausbildung einer Kontaktallergie. Dies geschieht in den tiefer liegenden Schichten der Haut, nachdem die Haptene, bedingt durch ihre geringe Molekülgröße, das Stratum corneum (Hornschicht der Haut) durchdrungen haben.

Als Bindungsorte in der Epidermis können alle möglichen Hautproteine, beispielsweise Keratin und Kollagen (siehe auch 2.5.3), dienen. Von besonderer Bedeutung sind auch die Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC - engl. major histocompatibility complex), die eine zentrale Rolle bei der Immunregulation wie auch der Einleitung und dem Ablauf immunologischer Vorgänge einnehmen und ebenfalls als direkte Bindungsorte für Haptene diskutiert werden (*Rustemeyer et al., 2001*). Die MHC-Glykoproteine wurden bei Untersuchungen von Transplantatabstoßungsreaktionen entdeckt. Ihre eigentliche Bedeutung liegt dabei in ihrer Funktion als Identitätsmarker der Zelle. T-Zellen sind hier die Partner für eine zellvermittelte Immunantwort. Prinzipiell unterscheidet man die MHC-Moleküle in Klasse I und Klasse II. Diese Unterscheidung spiegelt nicht nur strukturelle Unterschiede wieder, sondern basiert auch auf funktionellen Differenzen im Bereich der Antigenprozessierung und Antigenpräsentation. Die Klasse-I-MHC-Glycoproteine binden Peptide aus fremden Proteinen, die meist von viralen Infektionen der Zelle stammen und im Cytosol abgebaut werden. Diese präsentieren sie CD8-T-Zellen oder cytotoxischen T-Zellen, werden erkannt und abgetötet. Da alle kernhaltigen Zellen von viralen Infektionen betroffen sein können, werden MHC-Klasse-I-Moleküle auf fast allen Zellen exprimiert. Die Klasse-II-MHC-Glycoproteine kommen dagegen nur auf B-Zellen, aktivierten Makrophagen oder speziellen Antigen-präsentierenden Zellen wie z.B. den Langerhans-Zellen vor. Sie präsentieren CD4⁺-Zellen Peptide von Proteinen, welche in den lysosomalen Vesikeln abgebaut werden. Die Struktur dieser MHC-Klasse-II-Moleküle besteht aus einer α - und einer β -Kette, die in der Zellmembran verankert sind. Diese beiden Ketten bilden eine Art Rinne, die heute als Bindungsstelle für Allergene angesehen wird. Jede Kette bietet zwei Domänen: $\alpha 1$ und $\alpha 2$ sowie $\beta 1$ und $\beta 2$. Die Rinne zur Haptenbindung wird vor allem durch die $\alpha 1$ - und $\beta 1$ -Domänen gebildet. Die schematische Struktur ist in Abb. 2.4-1 dargestellt. Im Gegensatz zur α -Kette hat die β -Kette ein entscheidendes Merkmal. Sie kann in ihrer Aminosäuresequenz variieren und auch polare Aminosäuren wie Lysin, Arginin, Histidin, Asparagin und Glutamin enthalten. Die Seitenketten dieser Aminosäuren ragen dann in die Rinne hinein. Deshalb wird die β -Kette als wichtiger Bindungsort für Kontaktallergene diskutiert. Da diese Kette nun sehr unterschiedlich in der Aminosäuresequenz sein kann, lässt sich dieses Phänomen als Erklärung dafür anführen, dass Menschen so verschieden auf die Vielzahl der Allergene reagieren (*Kaufman et al., 1984; Brown et al., 1993, Bowers, 2003*).

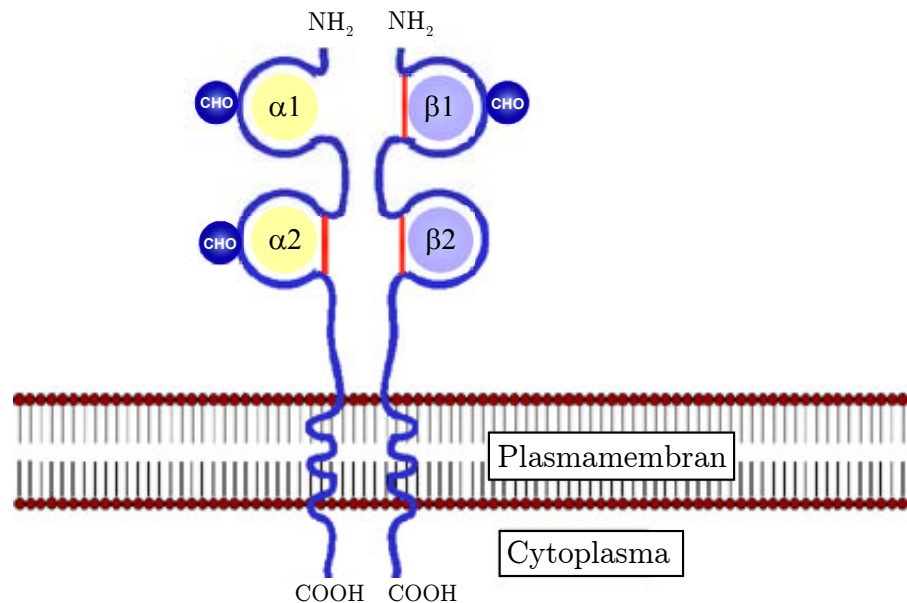


Abb. 2.4-1 Struktur des MHC-Klasse-II-Moleküls (*Bowers, 2003*)

2.5 Carrier-Modelle

2.5.1 Bisherige Studien

Bei bisher durchgeführten Untersuchungen zu Struktur-Aktivitäts-Beziehungen bei Kontaktallergenen wurden in der Regel Modellnukleophile wie Butylamin (*Goodwin und Roberts, 1986; Franot et al., 1994a; 1994b*), Hexylamin (*Helling, 1996*), Imidazol, Natriumphenolat (Modell für Tyrosin) und Natriumpropanthiolat (Modell für Cystein) (*Alvarez-Sanchez et al., 2003*) eingesetzt. Diese berücksichtigen jedoch nicht die besonderen Verhältnisse im Peptid- bzw. Proteinverband. Arbeiten mit Peptiden als nukleophile Partner sind wenig bekannt. *Ahlfors et al., (2003)* untersuchten beispielsweise die Umsetzung von kontaktallergenen Benzochinonen mit dem Modellpeptid H-Pro-His-Cys-Lys-Arg-Met-OH, einem synthetischen Peptid, welches alle wesentlichen nukleophilen Aminosäureseitenketten vereinigt. Strukturaufklärung mittels kernmagnetischer Resonanzspektroskopie (NMR) zeigte eine ausschließliche Addition an die Seitenkette des Cysteins. Dabei konnten zwei Produkte isoliert und strukturell aufgeklärt werden (siehe auch Abb. 2.5-1).

Als weiteres Peptidmodell mit Cystein wurde von *Alvarez-Sanchez et al. (2003)* N^α-Acetyl-cystein verwendet. Konjugationsstudien mit Proteinen sind in der Literatur bisher nicht bekannt.

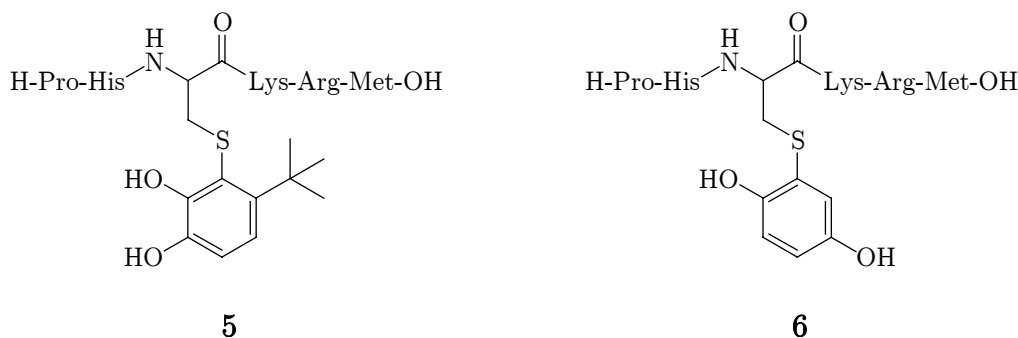


Abb. 2.5-1 Strukturen isolierter Additionsprodukte an die Seitenkette des Cysteins im Peptidverband: *L*-Prolyl-*L*-histidyl-3-*S*-(2-(1,4-hydrochinon))-3-thio-*L*-cysteinyl-*L*-lysyl-*L*-arginyl-*L*-methionin **5** und *L*-Prolyl-*L*-histidyl-3-*S*-(6-(4-*t*-butylcatechol))-3-thio-*L*-cysteinyl-*L*-lysyl-*L*-arginyl-*L*-methionin **6** (Ahlfors et al., 2003).

2.5.2 Peptid-Modelle

Um gezielt Reaktionen an nukleophilen Aminosäureseitenketten im Peptidverband untersuchen zu können, muss man Nebenreaktionen an den ebenfalls nukleophilen α -Aminogruppen der Aminosäuren unterbinden. Dies kann durch das Einführen von Schutzgruppen geschehen. Eine geeignete Schutzgruppe mit verschiedenen Vorteilen ist der Hippurylrest (N^{α} -Benzoyl-glycyl-gruppe). Zum einen macht er die entstandenen Peptide durch sein Absorptions-Maximum bei 230 nm für UV-Detektoren erfassbar und zum anderen entsteht bei Säurehydrolyse der Hippuryl-Derivate zusätzlich zu der jeweiligen nukleophilen Aminosäure Glycin, welches bei einer Aminosäureanalyse nach Säurehydrolyse als interner Standard dienen kann.

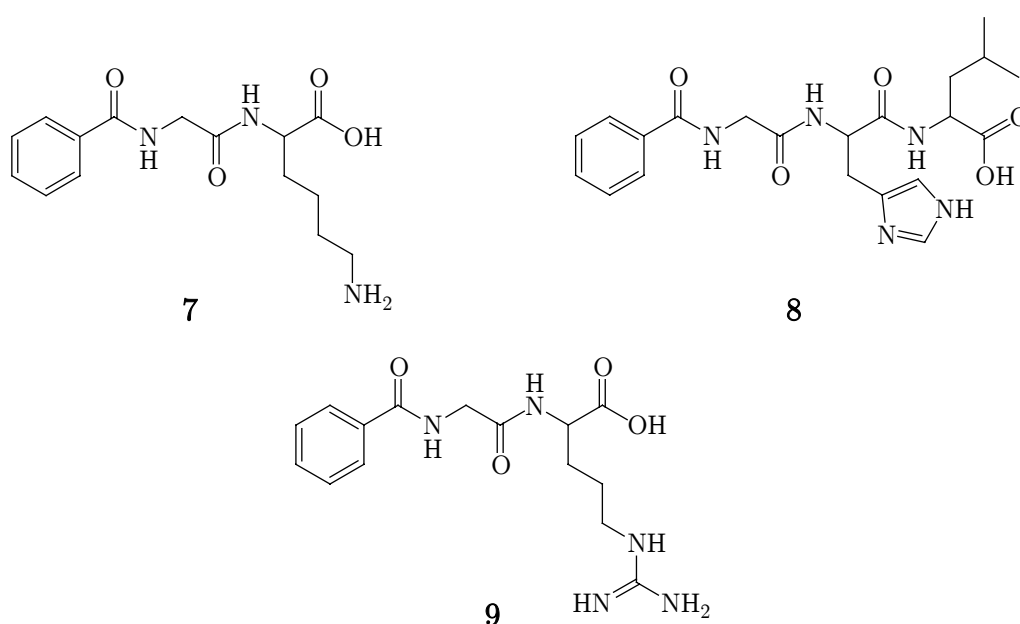


Abb. 2.5-2 N^{α} -Hippuryl-lysine **7**, N^{α} -Hippuryl-histidin-leucine **8** und N^{α} -Hippuryl-arginine **9**

Im Rahmen dieser Arbeit fanden die käuflich erhältlichen Hippurylpeptide N^α-Hippuryl-lysin (Hip-Lys, **7**), N^α-Hippuryl-histidin-leucin (Hip-His-Leu, **8**) und N^α-Hippuryl-arginin (Hip-Arg, **9**) Verwendung (siehe Abb. 2.5-2). Ein Hippuryl-Derivat von Cystein ist leider nicht erhältlich, daher wurde als Modellpeptid Glutathion (siehe Abb. 2.5-3 **10**) gewählt. Glutathion, ein Tripeptid aus Glutaminsäure, Cystein und Glycin, ist in tierischen Organismen, in Pflanzen und in Mikroorganismen weit verbreitet (*Belitz und Grosch, 1992*). An diesem Peptidmodell sind jedoch Nebenreaktionen an der α-Aminogruppe der Glutaminsäure zu berücksichtigen.

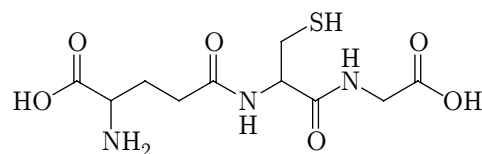
**10**

Abb. 2.5-3 Glutathion

Eine weitere einfache Schutzgruppe ist der Acetylrest. Im Rahmen dieser Arbeit werden die Acetyl-Derivate N^α-Acetyl-lysin **11**, N^α-Acetyl-histidin **12**, N^α-Acetyl-arginin **13** und N^α-Acetyl-cystein **14** (siehe Abb. 2.5-4) verwendet, um die Reaktionen der verschiedenen Kontaktallergene gegenüber nukleophilen Aminosäuren unter gleichen Reaktionsbedingungen zu untersuchen. Dadurch sollten Aussagen über die eventuelle Bevorzugung einzelner nukleophiler Aminosäureseitenketten möglich sein.

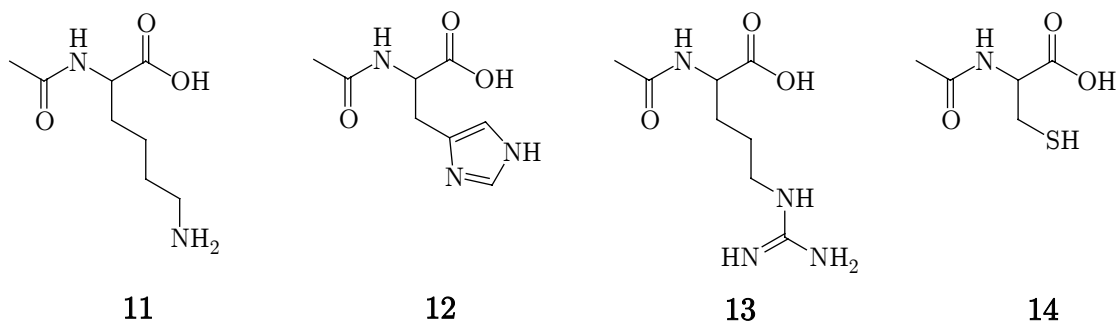


Abb. 2.5-4 Acetyl-Derivate der Aminosäuren Lysin, Histidin, Arginin und Cystein

2.5.3 Proteine

Um Konjugationen von Haptene nicht nur an Carrierpeptiden, sondern auch an in nativen Proteinen eingebetteten Aminosäureseitenketten nachweisen zu können, sind verschiedene Proteine als Inkubationspartner denkbar. So wurden Proteine ausgewählt, die bei der Ausbildung der Kontaktallergie mit dem Hapten in Berührung kommen und unterschiedliche Gehalte an den nukleophilen Aminosäuren Lysin, Histidin, Arginin

und Cystein besitzen. Hierzu zählen Collagen, Elastin und Keratin, welche wichtige Strukturproteine in der Haut darstellen. Auf Grund ihrer Aminosäurezusammensetzung sind die Proteine Insulin und β -Lactoglobulin ebenfalls von Interesse. Beim Insulin z.B. konnten in einer vorangegangenen Diplomarbeit (*Höpner, 1996*) mittels Kapillarelektrophorese Proteinveränderungen nachgewiesen werden. Die Anteile an nukleophilen Aminosäuren ausgewählter Proteine sind in Tab. 2.5-1 zusammengestellt.

Tab. 2.5-1 Anteil nukleophiler Aminosäuren in ausgewählten Proteinen

Aminosäure	BSA	Keratin	Gelatine (Collagen)	Elastin	Rinder- insulin	β -Lacto- globulin
	absolut von 607	g / 100 g	g / 100 g	g / 100 g	absolut von 50	absolut von 162
Lys	60	2-3	3-4	0,4	1	15
His	16	1	1-2	0,1	2	2
Arg	26	9-11	8-9	1,2	1	3
Cys	35	17	Spuren	0,3	6	5

(*Tristram, 1949; Bear, 1952; Ward und Lundgren, 1954; Belitz und Grosch, 1992; Friedli, 1996*)

Rinderserumalbumin

Rinderserumalbumin (BSA - engl. bovine serum albumin) ist besonders reich an Lysin und enthält neben Histidin und Arginin zusätzlich freie Cysteinreste. Serumalbumin stellt mit 5 g/100 ml das Hauptprotein des Blutserums dar und ist eines der wenigen kohlenhydratfreien Proteine des Blutplasmas. Seine Hauptfunktionen sind die Regulation des kolloidosmotischen Druckes und die Aufrechterhaltung des pH-Wertes im Blut. BSA hat ein relativ niedriges Molekulargewicht (ca. 67 kd) und unter physiologischen Bedingungen (pH 7,4) eine hohe Nettoladung (isoelektrischer Punkt 4,9) (*Jakubke und Jeschkeit, 1975*).

Keratin

Das Keratin wird zu den Strukturproteinen gezählt. In einer festen Form kommt Keratin als Wolle oder Haar vor, in seiner weicheren Form ist es Bestandteil der Epidermis. Im Rahmen dieser Arbeit diente eine menschliche Haarprobe als Untersuchungsmaterial.

Collagen

Vom Gesamtprotein bei Säugetieren macht allein das Collagen einen Anteil von ca. 20 - 25 % aus. Dabei werden je nach Aufgaben im Organismus verschiedene Collagentypen unterschieden. Collagen ist Bestandteil der Haut, der Knochen, der Muskeln und der

unterschiedlichsten Membranarten. Für die Untersuchungen wurde ein Abbauprodukt des Collagens, die Gelatine ausgewählt. Gewonnen wird Gelatine durch alkalische oder saure Hydrolyse von Collagen aus Tierhäuten oder -knochen. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Gelatine ASF der Firma Roussellout wurde zusätzlich enzymatisch gespalten. Gelatine enthält praktisch kein Cystein, so dass zu erwarten ist, dass die Haptene vor allem mit Amino- oder Iminofunktionen reagieren. Von Nachteil sind die durch die Hydrolyse zusätzlich entstandenen α -Aminogruppen, die ebenfalls von Haptenen angegriffen werden können (*Paulick, 1998*).

Elastin

Elastin kommt im Vergleich zum Collagen nur in kleineren Mengen im Bindegewebe vor. Dieses Protein ist nicht quellbar, zeigt gummiartige Eigenschaften und zeichnet sich durch seine starke Resistenz aus. Der Gehalt an Aminosäuren mit nukleophilen Seitenketten, die für die Haptendonjugation in Frage kommen, ist sehr gering. Als in der Haut vorkommendes Protein ist es für die Untersuchungen von Interesse.

Insulin

Insulin wird von den β -Zellen der Langerhans-Inseln in der Bauchspeicheldrüse produziert. Es senkt den Blutzuckerspiegel, indem es die Zellwände durchlässig für Glucose macht und fördert die Herstellung von Glykogen, der Speicherform der Glucose (*Jakubke und Jeschkeit, 1969*). Insulin enthält zwar Cysteinseitenketten, jedoch stehen diese für eine Reaktion mit Haptenen nicht zur Verfügung, da sie in Form von Disulfidbrücken vorliegen. In den Untersuchungen wird vor allem das Rinderinsulin betrachtet, da es einfacher und preiswerter als Humaninsulin zu erhalten ist.

β -Lactoglobulin

β -Lactoglobulin ist ein Molkenprotein und kommt in mehreren genetischen Varianten vor. Es enthält eine Sulfhydrylgruppe, die im nativen Protein in der Struktur verborgen ist und durch partielle Denaturierung freigelegt werden kann (*Belitz und Grosch, 1992*).

2.6 Ausgewählte kontaktallergene Substanzen

2.6.1 Tulipalin A - ein bedeutendes Phytoallergen

Seit langem sind typische Hautveränderungen bekannt, welche bei intensivem Kontakt mit Tulpenzwiebeln beim Roden, Putzen und Sortieren besonders in den Niederlanden, dem klassischen Land der Blumenzwiebelzucht, beobachtet wurden. Beschrieben wurde u.a. von *Welker et al. (1932)* und *Chronin (1972)* eine auf den Fingerkuppen und in der Fingernagelumgebung auftretende, unter die freien Nagelränder greifende Rötung und Schuppung, sowie Hyperkeratosen und schmerzhaftes Einrisse. Außerdem wurden

Abszesse und Nagelveränderungen beschrieben. *Bertwistle (1935)* prägte für dieses Krankheitsbild den Begriff "tulip fingers". *Verspyck Minjssen (1969)* wies Tulipalin A (α -Methylen- γ -butyrolacton - Abb. 2.6-1 **15**) durch positive Epikutantests in Konzentrationen bis 0,005 % als Ursache der Tulpendermatitis nach. Arbeiten von *Christensen und Kristiansen (1999)* zeigten, dass der Gehalt an freiem Tulipalin A in Pflanzenteilen der Gattung *Tulipa* bis zu 0,56 % bezogen auf das Frischgewicht betragen kann. Ein weitaus größerer Teil liegt jedoch glykosidisch gebunden vor, hauptsächlich in Form des 6-Tuliposid A **16** (bis zu 1,3 % bezogen auf das Frischgewicht). *Hausen et al. (1983)* bestimmten in Alstroemerien Gehalte an Tuliposid A zwischen 0,023 und 0,04 %. Die Glykoside dienen als Speicherform für das Tulipalin A, welches fungizide und antibakterielle Eigenschaften besitzt.

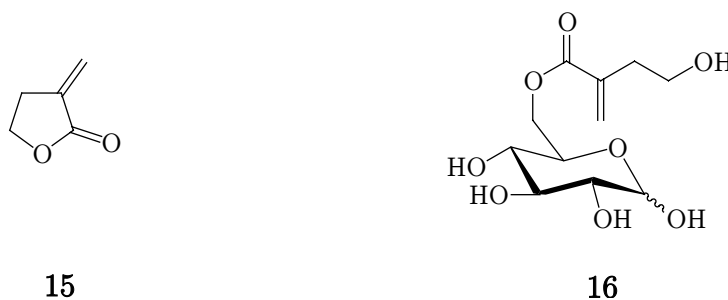


Abb. 2.6-1 Tulipalin A **15** (α -Methylen- γ -butyrolacton) und 6-Tuliposid A **16**

Freigesetzt wird Tulipalin A durch enzymatische Hydrolyse als Antwort auf Pilzinfektionen und mechanische Beschädigung des Pflanzengewebes. An Schnittstellen ist also mit einer hohen Konzentration des Kontaktallergens zu rechnen, welches auch als Ursache für luftübertragene Kontaktdermatitis gegen Tulpen und Alstroemerien diskutiert wird (*Christensen, 1999*). Eine Studie von *Santucci et al. (1985)* zeigte, dass auch das 6-Tuliposid A bei sensibilisierten Personen eine positive Patch-Test-Reaktion hervorruft. Andere getestete Lactone (u.a. γ -Methylen- γ -butyrolacton) gaben ein negatives Ergebnis. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Methylgruppe in α -Stellung entscheidend für die Allergenität ist. Auch in jüngster Vergangenheit wurde über Kontaktallergien bei Floristen berichtet (*Mascarenhas et al., 2001*). Die Problematik ist also immer noch aktuell. In der vorliegenden Arbeit dient diese gut untersuchte hoch reaktive Verbindung mit zyklischer vinyloger Carbonylstruktur als Referenzallergen.

2.6.2 Kontaktallergene Duftstoffe

Für die Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Haptene betrachtet, die hauptsächlich als Duftstoffallergene in der Kosmetikindustrie bedeutsam sind. Es wurden Haptene gewählt, deren Struktur bei Versuchen zur Hapten-Carrier-Konjugation bislang wenig beachtet wurden. Sie weisen Strukturanalogien auf und

tragen zum Teil mehrere reaktive Gruppen im Molekül. Damit sollte eine Bewertung der kontaktallergenen Wirkung in Abhängigkeit von der Struktur des Substitutionsgrades der jeweiligen Strukturgruppe möglich sein. Die untersuchten Duftstoffe unterteilen sich in drei Gruppen: Moleküle mit terpenoider Grundstruktur (Geraniol, 7-Hydroxycitronellal), Derivate des Benzaldehyds (Benzaldehyd, Salicylaldehyd und Vanillin) und Zimtaldehyd-Derivate (Zimtaldehyd, α -Amylzimtaldehyd und Benzylcinnamat). Die Stoffe werden im Folgenden einzeln vorgestellt.



Abb. 2.6-2 Kontaktallergene mit terpenoider Grundstruktur

Geraniol

Geraniol **17** (3,7-Dimethyl-2,6-octadien-1-ol) (Abb. 2.6-2) ist ein primärer Alkohol und bildet den Hauptbestandteil von Rosenöl und Palmarosaöl. In nennenswerten Anteilen findet man es auch in anderen ätherischen Ölen wie Geranium-, Citronella- und Lemonöl. In der Parfümerie ist es weit verbreitet als Bestandteil von Rosen- und Blumenduftkompositionen. In einer Studie von *Rastogi et al. (1998a)* wurde der Duftstoff in 76 % der untersuchten Deodorants gefunden. Eine ähnliche Untersuchung von Reinigungsmitteln aus Haushalt und Beruf zeigte, dass Geraniol zu den fünf häufigsten in solchen Produkten eingesetzten Duftstoffen gehört (*Rastogi et al., 2001*). In der klinischen Literatur ist jedoch nur eine kleine Zahl von Einzelfallbeschreibungen zu finden. Über Fälle von Hautreaktionen nach Kontakt mit Geraniol berichteten in jüngster Zeit *Yamamoto et al. (2002)* und *Murphy und White (2003)*.

7-Hydroxycitronellal

Hydroxycitronellal **18** (7-Hydroxy-3,7-dimethyloctan-1-al) (Abb. 2.6-2) ist ein synthetischer Duftstoff und kommt als solcher in der Natur nicht vor und wird in der Regel durch Hydratisierung aus Citronellal gewonnen. Es wird als Maiglöckchenduftersatz eingesetzt, da es bis heute mit keinem industriellen Verfahren möglich ist, brauchbare Duftkonzentrate direkt aus Maiglöckchenblüten zu gewinnen. Hydroxycitronellal findet man als Duftstoffkomponente in etwa 50 % der kosmetischen Produkte (*DeGroot und Frosch, 1997; Rastogi et al., 1998a*). Das kontaktallergene Potential von Hydroxycitronellal ist bekannt und wurde vor kurzer Zeit in einer Studie von *Svedman et al. (2003)* erneut unter Beweis gestellt. Diese Studie weist nach, dass die Verwendung von Deodorants mit einem Gehalt an Hydroxycitronellal zwischen

0,032 und 0,32 % auf gesunder Haut innerhalb weniger Wochen zur Ausbildung einer Achselhöhlen-Dermatitis führen kann. Auf Grund des kontaktallergen Potentials von Hydroxycitronellal hat die International Fragrance Association (*IFRA, 2003*) in ihren Anwendungsrichtlinien die Konzentration von Hydroxycitronellal in Produkten mit Hautkontakt auf 1 % begrenzt.

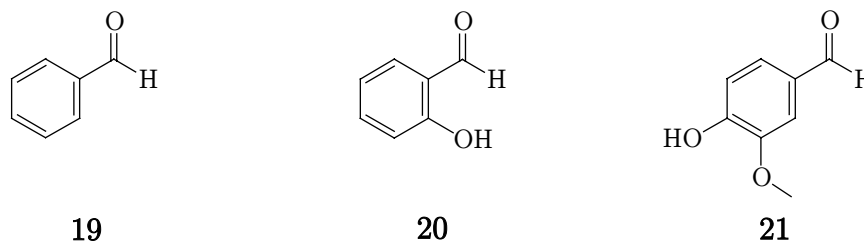


Abb. 2.6-3 Kontaktallergene Benzaldehyd-Derivate

Benzaldehyd

Benzaldehyd **19** (Abb. 2.6-3) ist die überwiegende Komponente in ätherischem Bittermandelöl. Bittere Mandeln enthalten es glykosidisch gebunden in Form von Amygdalin. Weiterhin ist Benzaldehyd in zahlreichen anderen ätherischen Ölen (von Zimtrinde, Cassia, Patchouli, Makassarsamen u.a.) enthalten. Als blausäurefreies Bittermandelöl findet es Verwendung als Duftstoff in der Parfümerie, als Aromastoff für Liköre und Lebensmittel sowie in pharmazeutischen Präparaten. Trotz der durch diese Anwendungsvielfalt bedingte breite Exposition sind allergische Hautreaktionen beim Menschen sehr selten (*BfR, 2001*).

Salicylaldehyd

Untersuchungen am Weidenblattkäfer *Phratora vitellinae* zeigten, dass Salicylaldehyd **20** (2-Hydroxy-Benzaldehyd) (Abb. 2.6-3), die Hauptkomponente des larvalen Drüsensekretes, antibakteriell und stark antifugal aktiv ist (*Gross und Schumacher, 2003*). Salicylaldehyd ist außerdem noch Bestandteil des ätherischen Öls von *Filipendula ulmaria* ("Mädesüß"). In der Parfümerie findet synthetisches Salicylaldehyd Verwendung als Nuancierungsmittel (*Fey und Otte, 1991*).

Vanillin

Vanillin **21** (4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd) (Abb. 2.6-3) kommt in der Natur als Duftstoff vielfach vor. Es ist Bestandteil von ätherischen Ölen, Absolues (z.B. Jasmin) und natürlichen Aromen. Am bekanntesten ist wohl die Vanilleschote, in welcher das Vanillin der Hauptaromastoff ist. In der Parfümerie findet Vanillin eine breite Verwendung als Fixateur, Modifikateur und zur Abrundung von Kompositionen der Richtung süß-balsamisch. Es ist ebenso ein wichtiger Aromastoff in der

Lebensmittelindustrie, z.B. für die Herstellung von Schokoladeprodukten, Speiseeis, Backwaren und Süßigkeiten. Obwohl Vanillin weit verbreitet ist, sind Fallberichte wie der einer Kontaktsensibilisierung nach Verwendung eines Lippenbalsams (*Ferguson und Beck, 1995*) sehr selten.

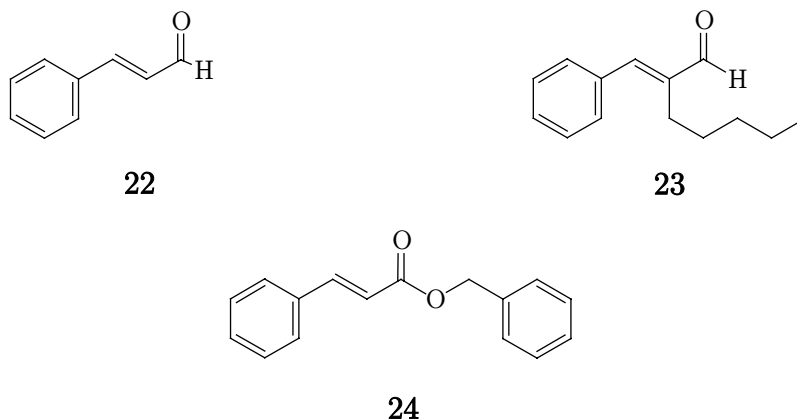


Abb. 2.6-4 Kontaktallergene Zimtaldehyd-Derivate

Zimtaldehyd

Zimt zählt zu den ältesten Gewürzen der Welt. Es ist seit etwa 5000 Jahren in China als *kwei*, wie Zimt (oder Cassia) dort genannt wurde, bekannt. Verwendung findet es vielfältig als Gewürz zum Beispiel in süßen Speisen, Milchreis, Gebäck, Glühwein und Likören. Als Zimtöl wird es für Aromatherapien verwendet. Hauptbestandteil des chinesischen Zimt- oder Cassiaöls ist Zimtaldehyd **22** (3-Phenyl-2-propenal) (Abb. 2.6-4) in seiner trans-Form. Als Reinsubstanz ist es ein bedeutender Duftstoff in der Kosmetikindustrie. Er wird hier vor allem für würzige und orientalische Parfümkompositionen eingesetzt. In einer Untersuchung von Deodorants auf dem europäischen Markt konnte es in 17 % der untersuchten Produkte nachgewiesen werden (*Rastogi et al., 1998a*). Ebenso ist Zimtaldehyd in Haushaltsprodukten (2 von 59 untersuchten bei *Rastogi et al., 2001*) und Seifen als kostengünstige Beduftungskomponente enthalten. Eine experimentelle Studie zeigte, dass Deodorants, welche Zimtaldehyd in einer Konzentration von 0,01 bis 0,32 % enthalten, in der Lage sind, innerhalb weniger Wochen eine Achselhöhlendermatitis auszulösen (*Bruze et al., 2003*). Auch Fallberichte über durch Zimtaldehyd ausgelöste allergische Kontaktekzemata sind in der Fachliteratur bekannt. So berichten beispielsweise *De Benito und Alzaga (1999)* von einer beruflich bedingten Kontaktallergie. Werden Zimtaldehyd enthaltenden Parfümerieprodukten die Duftstoffe Eugenol oder D-Limonen zugefügt, so verbessert sich deren Hautverträglichkeit, durch die Verminderung der sensibilisierenden Eigenschaften von reinem Zimtaldehyd. Die International Fragrance Association (*IFRA, 2003*) empfiehlt daher in ihren

Anwendungsrichtlinien, dass Zimtaldehyd nur in Verbindung mit diesen Substanzen einzusetzen ist.

α -Amyl-zimtaldehyd

α -Amyl-zimtaldehyd **23** (2-Pentyl-3-phenyl-2-propenal) (Abb. 2.6-4) ist ein rein synthetischer Duftstoff und kommt in der Natur nicht vor. Er wird durch eine basisch katalysierte Aldol-Kondensationsreaktion aus Benzaldehyd und n-Heptanal gewonnen. Als sogenannter Jasminaldehyd spielt er in der Riechstoffindustrie eine große Rolle. Er wird hier für Blumenparfüms mit Jasmincharakter, aber auch in Fliederkompositionen eingesetzt. Insbesondere wird er zur Parfümierung im Bereich der Massenprodukte, wie z.B. Seifen, Haushaltsprodukten und Detergentien eingesetzt. α -Amyl-zimtaldehyd war in 71 % der untersuchten Deodorants des Europäischen Marktes nachweisbar (*Rastogi et al., 1998a*). Dagegen jedoch nur in 5 % der untersuchten Haushaltsprodukte (*Rastogi et al., 2001*).

Benzylcinnamat

Benzylcinnamat **24** oder Zimtsäure-Benzylester (3-Phenyl-propensäure-benzylester) (Abb. 2.6-4) ist Bestandteil von Perubalsam (20 - 25 %) und wird als Additiv und/oder Fixativ in Kosmetika verwendet.

2.6.3 Einstufung der ausgewählten Kontaktallergene

Um eine chemische Reaktivität mit dem jeweiligen kontaktallergenen Potential einer Substanz in Korrelation zu bringen, ist es notwendig, die verwendeten Kontaktallergene hinsichtlich ihres Sensibilisierungspotentials einzuordnen. Dies kann durch eine Zusammenstellung aus Daten von Patch-Tests und den unter 2.3 beschriebenen Verfahren zur Vorhersage (siehe Tab. 2.6-1) geschehen. Hilfreich hierbei ist auch die Datenbank "Chemikalien und Kontaktallergie" des Bundesinstitutes für Risikobewertung (*BfR, 2001*), die Informationen zu 244 chemischen Stoffen enthält und diese im Hinblick auf ihr Kontaktallergie auslösendes Potential in drei Kategorien einstuft:

Kategorie A: Bedeutendes Kontaktallergen;

Kategorie B: Begründeter Hinweis auf kontaktallergene Wirkung;

Kategorie C: Unbedeutendes Kontaktallergen oder fragliche kontaktallergene Wirkung.

Das Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products (*SCCNFP, 1999*) unterteilt Duftstoffe lediglich in 2 Listen:

Liste A: Duftstoff-Chemikalien, welche nach bisherigen Kenntnissen als Kontaktallergene in Konsumenten bekannt sind und von denen Fallberichte häufig sind.

Liste B: Duftstoff-Chemikalien, bei denen Fallberichte selten und die nicht als Kontaktallergene gelten.

Weiterhin lassen sich auch die EC3-Werte, welche aus dem LLNA gewonnen werden, (siehe auch 2.3.1) zur Einschätzung des kontaktallergen Potentials heranziehen. Man unterscheidet durch Vergleich mit Humantestdaten in fünf Klassen. Nach *Basketter et al. (2000)* zeigen starke Allergene (Klasse 1) EC3-Werte im Bereich von 0,01-0,08 %. Klasse 2 Allergene (mäßig stark) besitzen EC3-Werte um die 1 % und schwache Allergene der Klasse 3 EC3-Werte um die 10 %. Substanzen, welche auch sonst nicht als sensibilisierend bekannt sind, zeigen im LLNA ebenfalls keinen großen Effekt. Die Klassen 4 (extrem schwach) und 5 (nicht sensibilisierend) lassen sich mit Hilfe des LLNA nur schwer zuordnen. Klasse 4 wird mit EC3-Werten über 35 % angegeben und Klasse 5 würde beim LLNA den Einsatz so hoher Konzentrationen erfordern, dass die EC3-Werte rechnerisch über 100 % liegen würden.

Tab. 2.6-1 Einschätzung des allergenen Potentials ausgewählter Haptene

Substanz	<i>BfR</i>	<i>SCCNF</i>	LLNA*		Patch-Test-Konzentration**
	(2001)	(1999)	EC3	Klasse	
Tulipalin A	A	-	-	-	0,001 % Alk.
Geraniol	B	A	> 50	4	2 % Vas.
7-Hydroxycitronellal	B	A	20-33	3	2-5 % Vas.
Benzaldehyd	C	-	-	-	5 % Vas.
Salicylaldehyd	-	-	-	-	2 % Vas.
Vanillin	-	-	> 50	4	10 % Vas.
Zimtaldehyd	A	A	2.0-3.1	2	1 % Vas.
α -Amyl-zimtaldehyd	C	A	10.6	3	2 % Vas.
Benzylcinnamat	B	B	-	-	5 % Vas.

* Zusammengestellt aus verschiedenen Literaturstellen (*NIEHS, 1999; Basketter und Kimber, 2001a; Basketter et al. 2001; Patlewicz et al., 2001; Patlewicz et al., 2002*)

** (*DeGroot und Frosch, 2001*)

Als zusätzlichen Anhaltspunkt für die Einschätzung des kontaktallergen Potentials lässt sich die für Patch-Tests der Einzelsubstanzen eingesetzte Konzentration heranziehen. Je höher die anzuwendende Patch-Test-Konzentration, desto niedriger das Sensibilisierungspotential. Insgesamt lassen sich trotz teilweise widersprüchlicher Angaben folgende Aussagen treffen: Tulipalin A ist unter den untersuchten Kontaktallergenen wohl das potenteste. Gefolgt wird es in seiner Sensibilisierungsfähigkeit von den Zimtaldehyd-Derivaten, wobei bei diesen eine Abnahme der Kontaktallergenität mit zunehmender Größe des Substituenten an der β -

Position zu verzeichnen ist. Interessant ist hierbei die vom BfR getroffene Einordnung von α -Amyl-zimtaldehyd in Kategorie C, die im Gegensatz zu den anderen Angaben steht. Die hier diskutierten Substanzen mit terpenoider Grundstruktur sind insgesamt als schwache Kontaktallergene einzuschätzen, wobei das 7-Hydroxycitronellal im direkten Vergleich wohl das potentere ist. Die Derivate des Benzaldehyds sind nach der Literatur bis auf Vanillin quasi nicht sensibilisierend.

2.7 Mögliche Reaktionsmechanismen

Wie in 2.2.4 beschrieben, gehören die Kontaktallergie induzierenden Substanzen sehr unterschiedlichen Stoffklassen an. Daher werden für eine Wechselwirkung zwischen Hapten und Carrierprotein verschiedene chemische und physikalisch-chemische Kopplungsmechanismen diskutiert. In der Literatur wird dabei entweder zwischen schwachen und starken Wechselwirkungen unterschieden, wobei die Bindungsenergie als Kriterium herangezogen wird (*Lepoittevin, 2001*) oder man trifft wie *Dupuis und Benezra (1982)* eine Einteilung nach der Bindungsart in kovalente und elektrostatische Bindungen.

2.7.1 Kovalente Bindungen

Vor allem für organische Verbindungen mit einem hohen Sensibilisierungspotential wird die Bildung einer kovalenten Bindung zwischen Hapten und Carrierprotein als Konjugationsmechanismus angenommen. Bei vielen Kontaktallergenen handelt es sich um elektrophile Verbindungen, die als Strukturmerkmal Mehrfachbindungen, aromatische Ringe mit elektronenziehenden Substituenten oder stark elektronegativen Zentren aufweisen. Als Bindungspartner für die elektrophilen Haptene sind in erster Linie nukleophile Gruppen in den Aminosäureseitenketten der Carrierproteine prädestiniert. Bevorzugt sind dabei Aminosäuren, die in ihren Seitenketten Heteroatome mit freien Elektronenpaaren aufweisen (z.B. Stickstoff, Schwefel). Solche Aminosäuren sind z.B. Cystein, Lysin, Arginin und Histidin. Als Reaktionsmechanismen werden nukleophile Substitutions- oder Additionsreaktionen, aber auch Radikalreaktionen diskutiert (*Lepoittevin, 2001*).

Nukleophile Addition

Die nukleophile Addition ist der bei einer Hapten-Carrier-Konjugation am häufigsten zu erwartende Reaktionsmechanismus. Als allergene Elektrophile reagieren dabei Aldehyde, Ketone, α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen, ortho- und para-Chinone (*Raddatz und Henle, 2000*). α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen reagieren in der Regel über eine einfache Additionsreaktion am partiell positivierten vinylogon

Carbonylkohlenstoff (Michael-Addition). Dabei entstehen gesättigte Verbindungen (siehe Abb. 2.7-1).

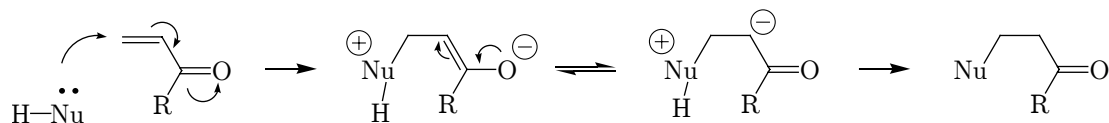


Abb. 2.7-1 Nukleophile Addition an vinyloge Carbonylverbindungen (Michael-Addition)

Ein Beispiel für eine α,β -ungesättigte Carbonylverbindung mit bekannter kontaktallergener Wirkung ist das α -Methylen- γ -butyrolacton oder Tulipalin A (siehe 2.6.1). In der Literatur sind verschiedene Michael-Addukte dieser Verbindung beschrieben. *Franot et al. (1993)* erhielten in einem ethanolischen Reaktionsansatz ein Aminobutan-Addukt. *Helling (1996)* gelang im Rahmen einer Diplomarbeit die Umsetzung von Tulipalin A mit 1-Aminohexan bzw. 6-Aminohexansäure als Modelle für die ϵ -Aminogruppe des Lysins in wässrig-ethanolischer Lösung. Peptid- oder proteingebundene Derivate sind von dieser Verbindung bisher aber nicht bekannt. Reaktionen dieser Art von α -Methylen- γ -butyrolactonstrukturen mit Thiolen wurden von *Kupchan et al. (1970)* beschrieben. Für Zimtaldehyd und α -Amyl-zimtaldehyd postulieren *Patlewicz et al. (2002)* eine Michael-Addition für die Reaktion mit Proteinen.

Bei einfachen Aldehyden kann sich an die Addition ein Kondensationschritt anschließen, wenn sich am nukleophilen Zentrum noch ein Wasserstoffatom befindet. Beispiel hierfür ist die Addition von primären Aminen an Aldehyde oder Ketone (siehe Abb. 2.7-2).

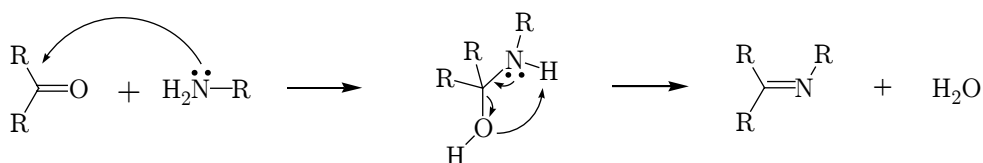


Abb. 2.7-2 Nukleophile Addition von Aminen an Aldehyde (Schiff-Base-Reaktion)

Helling (1996) konnte mittels spektroskopischer Methoden (NMR, MS) Imine (Schiff-Basen) beispielsweise als Reaktionsprodukte von 4-Hydroxy-3-methoxy-benzaldehyd (Vanillin) mit 1-Aminohexan bzw. 6-Aminohexansäure nachweisen. *Zaugg et al. (1977)* berichten über Schiff-Base-Addukte von aromatischen Aldehyden (u.a. Benzaldehyd, Salicylaldehyd und Vanillin) mit Aminogruppen des Hämoglobins. Für Hydroxycitronellal als aliphatisches Aldehyd wird eine Reaktion mit Proteinen nach Art der Schiff-Base-Reaktion vorhergesagt (*Patlewicz et al., 2002*).

Chinone konjugieren prinzipiell auch über nukleophile Addition, können jedoch anschließend zum Hydrochinon umlagern und sich durch Dehydrierung wieder in ein

Chinon zurückbilden. Durch die dabei erhalten gebliebene Doppelbindung sind Mehrfachreaktionen möglich. Bekannte Vertreter dieser Verbindungsklasse sind das Hauptkontaktallergen der Primelpflanze, Primin, und der färbende Hennawirkstoff Lawson (*Raddatz und Henle, 2000*).

Nukleophile Substitution

Eine nukleophile Substitution kann an einem gesättigten oder einem ungesättigten Zentrum stattfinden. Die nukleophile Substitution an einem gesättigten Zentrum ist vor allem bei halogenierten Haptenen von Bedeutung. Das Halogen löst sich unter Mitnahme des Elektronenpaares ab und wird durch das Nukleophil ersetzt (siehe Abb. 2.7-3) (*Lepoittevin, 2001*). Dabei spielt die Stabilität des gebildeten Anions eine wesentliche Rolle für den Verlauf der Reaktion. Durch das in der Haut vorliegende polare Milieu ist eine Solvatisierung der Abgangsgruppe begünstigt und ein S_N1 -Mechanismus zu erwarten. Als Beispiele sind Jodoform, Chloracetamid und Chloramphenicol zu nennen (*Raddatz und Henle, 2000*).

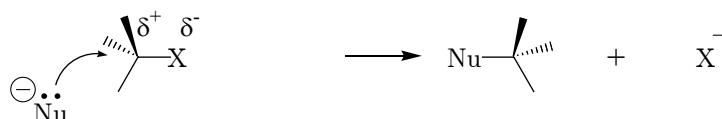


Abb. 2.7-3 Nukleophile Substitution am gesättigten Zentrum

Ester, Amide, Lactone und Aromaten mit elektronenziehenden Substituenten reagieren über eine nukleophile Substitution am ungesättigten Zentrum (Abb. 2.7-4). Bei Carbonylverbindungen erfolgt die Substitution am Carbonylkohlenstoff. Aktivierte Aromaten reagieren bevorzugt, wenn sich die Abgangsgruppe in ortho- oder para-Stellung zum elektronenziehenden Substituenten (z.B. $-\text{NO}_2$, $-\text{CN}$, $-\text{COCH}_3$) befindet. Beispiele für Allergene sind 1-Fluor-2,4-dinitrobenzen, Parathion, Atropin und Penicillin.

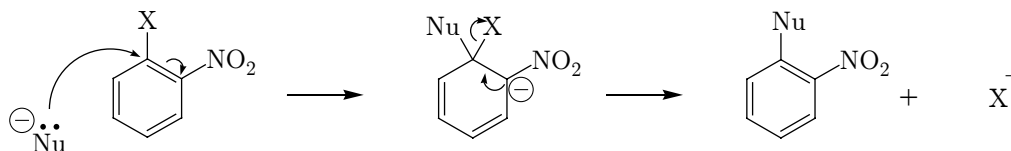


Abb. 2.7-4 Nukleophile Substitution am ungesättigten Zentrum

Radikalreaktionen

Radikalreaktionen haben ihre Ursache in der homolytischen Spaltung von kovalenten Bindungen. Die Bindung bricht derart, dass jedes Fragment ein Elektron der Bindung behält. Betroffen sind schwach polare und unpolare Bindungen und es bedarf in der Regel einer Induktion, beispielsweise durch UV-Strahlung. Radikalreaktionen spielen

besonders bei der Metabolisierung einer inaktiven Vorstufe (Prohaptten) zum eigentlich wirksamen Haptten eine Rolle (*Raddatz und Henle, 2000*). Es wird vermutet, dass Vanillin ein Precursor für Catechole ist und dass mit Hilfe von Cytochrom P450 durch Demethylierung und anschließende Oxidation Orthochinone entstehen können (*Patlewicz et al., 2001*).

2.7.2 Elektrostatische Bindungen

Koordinative Bindungen

Eine sehr stabile, in ihrer Bindungsstärke mit der kovalenten Bindung vergleichbare Ionenbeziehung ist die koordinative Bindung. Sie bildet sich zwischen Metallen bzw. Metallsalzen und elektronenreichen Atomen (in der Regel Heteroatome wie Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel und Phosphor) (*Lepoittevin, 2001*). Kontaktallergene Metalle (z.B. Nickel oder Chrom) bilden mit Heteroatomen der Carrierproteine als Liganden koordinative Komplexe. *Carter und Ho (1994)* zeigten, dass bei Serumalbumin die Thiolgruppe des Cysteins und der N-Terminus des Proteins an den genannten Komplexen beteiligt sind.

Hydrophobe Wechselwirkungen

Die hydrophoben Wechselwirkungen beruhen auf der Fähigkeit organischer Moleküle, sich so anzuordnen, dass der Kontakt mit wässrigen Medien minimiert wird. Obwohl sie keine große Stabilität aufweisen, spielen sie doch eine wichtige Rolle bei Allergien gegen sehr lipophile Verbindungen, beispielsweise gegen die Urushiole des Giftefeus (*Lepoittevin, 2001*).

Andere elektrostatische Wechselwirkungen

Weitere mögliche elektrostatische Wechselwirkungen sind beispielsweise van der Waals-Kräfte, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen. Inwieweit diese Wechselwirkungen in der Lage sind, Haptten-Carrier-Komplexe zu stabilisieren, ist bislang nicht bekannt. Lediglich *Mikheeva et al. (1998)* beschreiben eine Verbindung von Vanillin mit Proteinen in Nahrungsmitteln, die in der Hauptsache elektrostatischer Natur ist.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Geräte

3.1.1 Chemikalien

Verwendete Chemikalien unter Angabe von Bestellnummer und Hersteller, soweit im Text nichts anderes vermerkt ist:

Acetonitril Chromasolv HPLC	34851	Riedel de-Haën, Seelze
N ^α -Acetyl-arginin	E-1025	Bachem, Heidelberg
N ^α -Acetyl-cystein	1.12422	Merck Eurolab, Darmstadt
N ^α -Acetyl-histidin-monohydrat	22797	Acros Organics, Geel, Belgien
N ^α -Acetyl-lysin	E-1120	Bachem, Heidelberg
Ameisensäure 85 % rein	27002	Riedel de-Haën, Seelze
α-Amyl-zimtaldehyd	28,899-3	Aldrich, St. Louis, USA
Benzaldehyd	12010	Fluka, Buchs, Schweiz
Benzylcinnamat	96370	Fluka, Buchs, Schweiz
N ^α -Boc-lysin	A-1920	Bachem, Heidelberg
Bovines Serumalbumin (BSA)	A 7906	Sigma, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid-d ₆	1.03424	Merck, Darmstadt
Essigsäureethylester	109623	Merck Eurolab, Darmstadt
Geraniol	G 5135	Sigma, Taufkirchen
Glutathion	1.04090	Merck, Darmstadt
N ^α -Hippuryl-arginin	G-2265	Bachem, Heidelberg
N ^α -Hippuryl-histidin-leucin	M-1485	Bachem, Heidelberg
N ^α -Hippuryl-lysin	G-2275	Bachem, Heidelberg
7-Hydroxycitronellal	26968	Acros Organics, Geel, Belgien
Methanol Chromasolv HPLC	34860	Riedel de-Haën, Seelze
Methanol-d ₄	15,194-7	Aldrich, St. Louis, USA
α-Methylen-γ-butyrolacton (Tulipalin A)	41426	Acros Organics, Geel, Belgien
tri-Natriumcitrat-dihydrat	106430	Merck Eurolab, Darmstadt
Natriumhydroxid	71689	Fluka, Buchs, Schweiz
Salicylaldehyd	13206	Acros Organics, Geel, Belgien
Salzsäure 37 %, für Hydrolysen	6011	Baker, Deventer, Holland
tert.-Butylmethylether	101849	Merck Eurolab, Darmstadt
Vanillin	14082	Acros Organics, Geel, Belgien
Zimtaldehyd	11035	Acros Organics, Geel, Belgien

3.1.2 Geräte und Materialien

Liste der verwendeten Geräte, sofern nicht an anderer Stelle detailliert beschrieben:

Analysenwaage	BP 121S und BP 3100S, Sartorius, Göttingen
Brutschrank	ICP 400, Memmert, Schwabach
Kolbenhubpipetten	Eppendorf Reference und Research, unterschiedliche Volumina, Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Laborzentrifuge	Eppendorf Cetrifuge 5804, Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Reagenzglasschüttler	MS1 Minishaker, IKA-Labortechnik, Staufen
Rotationsverdampfer	Laborota 4002, Heidolph, Schwabach
Rühr- und Heizwerk	IKAMAG RET basic, IKA-Labortechnik, Staufen
Trockenschrank	ULM 500, Memmert, Schwabach
Ultraschallbad	Transsonic T460, Elma, Singen
Vakuumkonzentrator	Speed Vac Plus SC 100 AR mit Universal Vacuum System Plus UVS400A, Savant, Farmingdale, USA

Weitere Materialien:

Membranfilter	Einmalfiltereinheiten mit Celluloseacetat, Durchmesser 13 mm, Porengröße 0,45 µm und 0,2 µm, Schleicher & Schüll, Dassel
NMR-Probenröhrchen	Schott Glaswerke, Mainz
pH-Messpapier	Stuphan, VEB Feinchemie Sebnitz
Reaktionsgefäße	4 ml Braunglasvials, Roth
Schraubreagenzgläser	Duran 12 mm x 100 mm, GL 14, Schott Glaswerke, Mainz

3.2 Analytische Methoden

3.2.1 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

System:	Knauer WellChrom HPLC-System 4-Kanal Degasser Solvent Organizer K-1500 HPLC-Pumpe K-1001 Dioden-Array-Detektor K-2700/K-2701 Säulenofen Autosampler
Datenaufnahme:	rechnergestützt mittels Knauer Wellchrom
Säule:	Eurospher 100 C18, 5 µm, 250 x 4,6 mm, mit integrierter 10 mm-Vorsäule, Knauer, Berlin

Injektionsvolumen: 20 µl der verdünnten Proben

Elution: binärer Gradient

Eluent A: Wasser, reinst

Eluent B: Methanol

Ansätze der Hippuryl-Derivate mit kontaktallergenen Duftstoffen

Säulentemperatur: 30 °C

Flussrate: 1,0 ml/min

Gradient:

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	80	20
10	80	20
40	0	100
43	0	100
45	80	20
50	80	20

Detektion: DAD: $\lambda_1 = 205$ nm, $\lambda_2 = 230$ nm, $\lambda_3 = 254$ nm, $\lambda_4 = 280$ nm

Ansätze von Glutathion mit kontaktallergenen Duftstoffen

Säulentemperatur: 30 °C

Flussrate: 1,0 ml/min

Gradient:

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	90	10
10	90	10
40	0	100
43	0	100
45	90	10
50	90	10

Detektion: DAD: $\lambda_1 = 205$ nm, $\lambda_2 = 230$ nm, $\lambda_3 = 254$ nm, $\lambda_4 = 280$ nm

Ansätze von N^α-Hippuryl-lysin mit Tulipalin A

Säulentemperatur: 30 ° C

Flussrate: 1,0 ml/min

Gradient:	Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
	0	95	5
	10	95	5
	30	50	50
	35	5	95
	40	5	95
	43	95	5
	50	95	5

Detektion: DAD: $\lambda_1 = 205$ nm, $\lambda_2 = 230$ nm*Ansätze von N^α-Hippuryl-lysin mit Zimtaldehyd*

Säulentemperatur: 30 ° C

Flussrate: 1,0 ml/min

Gradient:	Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
	0	80	20
	20	80	20
	40	2	98
	43	2	98
	45	80	20
	50	80	20

Detektion: DAD: $\lambda_1 = 230$ nm, $\lambda_2 = 250$ nm, $\lambda_3 = 290$ nm, $\lambda_4 = 330$ nm*Ansätze von N^α-Hippuryl-histidin-leucin mit Tulipalin A*

Säulentemperatur: 40 ° C

Flussrate: 0,8 ml/min

Gradient:	Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
	0	60	40
	15	60	40
	20	0	100
	25	0	100
	30	60	40
	35	60	40

Detektion: DAD: $\lambda_1 = 205$ nm, $\lambda_2 = 230$ nm

Ansätze von Acetyl-Derivaten mit Tul A bzw. kontaktallergenen Duftstoffen

Säulentemperatur: 30 °C

Flussrate: 1,0 ml/min

Gradient:

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	80	20
10	80	20
40	0	100
43	0	100
45	80	20
50	80	20

Detektion: DAD: $\lambda_1 = 205$ nm, $\lambda_2 = 230$ nm, $\lambda_3 = 254$ nm, $\lambda_4 = 280$ nm**3.2.2 Aminosäureanalyse (ASA)***Säurehydrolyse für Hippuryl-Derivate und Proteine*

Die entsprechende Menge der Probe (siehe Tab. 3.2-1) wird in ein Schraubreagenzglas (Schott-Duran mit PTFE-Dichtung) pipettiert bzw. eingewogen. Organische Lösungsmittel werden mit Stickstoff vorsichtig ausgeblasen. Anschließend wird die trockene Probe mit Salzsäure ($c = 6$ mol/l) versetzt. Die verschlossenen Gefäße werden für 23 Stunden in ein auf 110 °C vorgeheiztes Sandbad, welches sich in einem Trockenschrank befindet, gestellt. Nach einer Stunde werden die Gefäße nochmals gut durchgeschüttelt. Nach der Hydrolyse werden die Probengefäße aus dem Sandbad entfernt und unter fließendem Wasser abgekühlt. Ein Aliquot der Probe wird nun in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und im Vakuumkonzentrator zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird bei -18 °C gelagert oder sofort für die Aminosäureanalyse weiterverarbeitet.

Säurehydrolyse für Acetyl-Derivate

Das Vorgehen zur Hydrolyse der Acetyl-Derivate erfolgt analog zur Säurehydrolyse der Hippuryl-Derivate und Proteine. Jedoch wird hier 2 molare Salzsäure verwendet und die Hydrolysedauer auf 3 Stunden verringert.

Tab. 3.2-1: Probenmengen für Salzsäurehydrolyse

Probe	Menge	zugesetzte Salzsäure [ml]
Peptide (Inkubationsansätze)	80 μ l	1,0
Peptide (Rückflussansätze)	20 μ l	1,0
Proteine	10 mg	10,0

Probenvorbereitung

Die zur Trockne eingedampften hydrolysierten Proben werden in einem definierten Volumen Natriumcitratpuffer (0,2 mol/l, pH 2,2) aufgenommen, membranfiltriert (Celluloseacetat, 0,2 μm) und zur Aminosäureanalyse eingesetzt.

Gerätesystem

Aminosäureanalysator: 4151 Alpha Plus, LKB-Biochrom, Pharmacia-LKB, Freiburg
Trennsäule: analytischer Kationenaustauscher, 125 x 4,6 mm, 6 μm
Analystechnik K. Grüning, München
Arbeitsdruck: ca. 60 bar
Temperatur: 48 - 93 ° C
Injektionsvolumen: 20 - 40 μl
Flussrate: 16 ml/h
Detektion: UV $\lambda = 570 \text{ nm}$ und 440 nm, nach Ninhydrin-Nachsäulen-derivatisierung
Trennprogramm: Durchführung nach *Henle et al. (1991)*

3.2.3 Flüssigchromatographie/Massenspektrometrie (LC-MS)

Die getrockneten Proben werden mit bidest. Wasser/Methanol 50:50 (v/v) mit 1 % Essigsäure aufgenommen und auf eine Konzentration von ca. 1 pmol/ μl verdünnt.

System: Agilent 1100 Series HPLC-System
4-Kanal Degasser
Solvent Organizer
HPLC-Pumpe
Säulenofen
Autosampler
Dioden-Array-Detektor
ESI-TOF-MS MarinerTM Biospectrometry Workstation (PerSeptive Biosystems)
Datenaufnahme: rechnergestützt
Säule: Eurospher 100 C18, 5 μm , 250 x 4,6 mm, mit integrierter 10 mm-Vorsäule, Knauer, Berlin
Injektionsvolumen: 20 μl der verdünnten Proben
Säulentemperatur: 30 ° C
Elution: binärer Gradient
Eluent A: 0,1 % Ameisensäure
Eluent B: 85 % Methanol in 0,1 % Ameisensäure
Flussrate: 0,8 ml/min
Detektion: DAD, $\lambda_1 = 215 \text{ nm}$; $\lambda_2 = 230 \text{ nm}$; $\lambda_3 = 280 \text{ nm}$

Ionisierung: Positiv-Modus

Nozzle-Potential: 90-200 V

Die Gradienten werden dem jeweiligen Trennproblem angepasst. Dazu wird anhand des HPLC-Trennbildes der Ansätze mit reinem Methanol als Eluent der Methanolgehalt der jeweiligen Retentionszeit in 85 %iges Methanol umgerechnet.

3.2.4 Massenspektrometrie

Eine in reiner Form vorliegende Substanz wird in Wasser/Acetonitril 50:50 (v/v) mit 1 % Eisessig gelöst und direkt im Massenspektrometer [ESI-TOF-MS Mariner™ Biospectrometry Workstation (Per Septive Biosystems)] vermessen.

3.2.5 Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR)

Alle Spektren wurden mit dem Gerät Bruker DRX 500 (¹H-NMR: 500 MHz; ¹³C-NMR: 125 MHz) in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Gruner am Institut für Organische Chemie der TU Dresden gemessen. Die Auswertung und Berechnung der Kopplungskonstanten erfolgte unter Zuhilfenahme der Programme WIN-NMR der Firma BRUKER und MestRe-C 2.3. Als Lösungsmittel für die Messungen wurden deuteriertes Methanol und deuteriertes Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet. Für die Aufnahme der ¹³C-NMR-Spektren dienten die Lösungsmittel gleichzeitig als interner Standard zur Kalibrierung der ppm-Skala der chemischen Verschiebung. Die Proben wurden nach der Trocknung im Stickstoffstrom zusätzlich zwei bis drei Tage unter Vakuum im Exsikkator getrocknet. Dann wurden jeweils mindestens 10 mg in 1 ml deuteriertem Lösungsmittel gelöst und in ein NMR-Messröhrchen eingefüllt. Um die Interpretation der Spektren abzusichern, wurden sie mit denen der jeweiligen Edukte verglichen.

3.3 Semipräparative HPLC

System: Knauer WellChrom HPLC-System

4-Kanal Degasser

Solvent Organizer K-1500

2 HPLC-Pumpen K-1001

UV-Detektor K-2501

Säulenofen

Fraktionierventil K-16

Datenaufnahme: rechnergestützt mittels Knauer Wellchrom

Säule: Eurospher 100 C18, 10 µm, 250 x 16 mm, mit externer Vorsäule
(10 mm-Vorsäule, Knauer, Berlin)

3.3.1 Umsetzung von N^α-Hippuryl-lysin mit Tulipalin A

Injektionsvolumen: 500 µl der nach 3.9.1 vorbereiteten Probe

Säulentemperatur: 30 °C

Elution: binärer Gradient

Eluent A: Wasser, reinst

Eluent B: Methanol

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Fluss [ml/min]
0	95	5	8
20	95	5	8
81	75	25	5
90	5	95	5
96	5	95	5
100	95	5	5
110	95	5	5

Detektion: UV: $\lambda = 230$ nm**3.3.2 Umsetzung von N^α-Hippuryl-histidin-leucin mit Tulipalin A***Syntheseansatz (Rückfluss)*

Injektionsvolumen: 500 µl der nach 3.9.2 vorbereiteten Probe

Säulentemperatur: 40 °C

Elution: binärer Gradient

Eluent A: Wasser, reinst

Eluent B: Methanol

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Fluss [ml/min]
0	80	20	8
25	73	27	8
42	73	27	8
43	70	30	8
55	70	30	8
90	60	40	8
100	0	100	5
106	0	100	5
110	80	20	5
120	80	20	5

Detektion: UV: $\lambda = 230$ nm

Syntheseansatz (Inkubation bei 37 °C)

Injektionsvolumen: 500 µl der nach 3.9.2 vorbereiteten Probe

Säulentemperatur: 40 °C

Elution: binärer Gradient
 Eluent A: Wasser, reinst
 Eluent B: Methanol
 Fluss: 8 ml /min

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	75	25
55	65	35
65	0	100
70	0	100
73	75	25
85	75	25

Detektion: UV: $\lambda = 230$ nm

3.3.3 Umsetzung von N^α-Acetyl-histidin mit Tulipalin A

Injektionsvolumen: 500 µl der nach 3.9.3 vorbereiteten Probe

Säulentemperatur: 30 °C

Elution: binärer Gradient
 Eluent A: Wasser, reinst
 Eluent B: Methanol
 Fluss: 5 ml /min

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	100	0
25	100	0
35	5	95
45	5	95
47	100	0
60	100	0

Detektion: UV: $\lambda = 205$ nm

3.3.4 Umsetzung von N^α-Hippuryl-lysin mit 7-Hydroxycitronellal

Injektionsvolumen: 500 µl der nach 3.9.4 vorbereiteten Probe

Säulentemperatur: 30 °C

Elution: binärer Gradient

Eluent A: Wasser, reinst

Eluent B: Methanol

Fluss: 8 ml /min

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	85	15
20	85	15
40	80	20
85	5	95
90	5	95
95	85	15
105	85	15

Detektion: UV: $\lambda = 230$ nm**3.3.5 Umsetzung von N^α-Hippuryl-lysin mit Zimtaldehyd**

Injektionsvolumen: 500 µl der nach 3.9.5 vorbereiteten Probe

Säulentemperatur: 30 °C

Elution: binärer Gradient

Eluent A: Wasser, reinst

Eluent B: Methanol

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Fluss [ml/min]
0	70	30	8
11	65	35	8
80	25	75	8
86	20	80	8
90	70	30	8
100	70	30	5

Detektion: UV: $\lambda = 230$ nm

3.4 Vorversuche zur Reaktivität

3.4.1 Inkubation in wässrig-methanolischer Lösung

Lösungen von Hip-Lys bzw. Hip-His-Leu (5 mM in Methanol/Wasser 50:50 v/v) werden mit äquimolaren Zusätzen an Tulipalin A, Benzaldehyd bzw. Zimtaldehyd bei 37 ° C fünf Wochen im Brutschrank inkubiert. Zum Vergleich werden Blindansätze der einzelnen Reaktionspartner analog behandelt. Wöchentlich wird ein Aliquot abgenommen und mittels analytischer HPLC (3.2.1) und ASA (3.2.2) untersucht.

3.4.2 Reaktionsansätze in Methanol unter Rückfluss

In einen 5 ml-Rundkolben werden 50 mg Hip-Lys (bzw. 80 mg Hip-His-Leu) eingewogen und unter Erwärmen in 4,0 ml Methanol gelöst (entspricht einer 40 mM-Lösung). Anschließend werden 16,7 µl (entspricht einem äquimolaren Zusatz) bzw. 33,4 µl (entspricht einem einfachen Überschuss) Tul A zupipettiert und unter ständigem Rühren 6 Stunden unter Rückfluss gekocht. Die Temperatur des Wasserbades wird auf ca. 75 ° C eingestellt. Nach definierten Zeitabständen werden Proben für eine Aminosäureanalyse entnommen. Zusätzlich werden die Ansätze nach Beendigung der Reaktion mittels analytischer HPLC (3.2.1) untersucht.

3.5 Rückflussansätze mit N^α-Hippuryl-Derivaten und Glutathion

Für die Reaktionsversuche unter Rückfluss werden die Peptide Hip-Lys, Hip-His-Leu, Hip-Arg und Glutathion mit den Haptenen Tul A, Geraniol, 7-Hydroxycitronellal, Benzaldehyd, Salicylaldehyd, Vanillin, Zimtaldehyd, α -Amyl-zimtaldehyd bzw. Benzylcinnamat umgesetzt. Die methanolischen Reaktionsansätze werden mit einer Konzentration von 40 mM Peptid und einfachem Überschuss an Hapten (80 mM) hergestellt und unter Rückfluss gekocht. Als Vergleich werden Blindansätze der Peptide und Haptene analog behandelt. Dazu werden 25 mg Hip-Lys (bzw. 40 mg Hip-His-Leu, 27 mg Hip-Arg, 25 mg Glutathion) in einen 5 ml-Rundkolben eingewogen und unter Erwärmen in 2,0 ml Methanol gelöst. Anschließend wird die Menge an Hapten zupipettiert, sodass im Ansatz eine Konzentration von 80 mM an Hapten erreicht wird. Nichtflüssige Haptene (Vanillin und Benzylcinnamat) werden vor dem Lösen eingewogen. Die Reaktionsansätze werden unter ständigem Rühren 4 Stunden unter Rückfluss gekocht. Die Temperatur des Wasserbades wird auf ca. 75 ° C eingestellt. Anschließend erfolgt nach Verdünnung mit Methanol/Wasser (20:80 v/v) (Ausnahme: α -Amyl-zimtaldehyd und Benzylcinnamat Methanol/Wasser (50:50 v/v) auf Grund der Unlöslichkeit der Haptene) eine Untersuchung mittels analytischer HPLC. Parallel dazu wird mit einem Aliquot des unverdünnten Ansatzes eine Aminosäureanalyse nach Säurehydrolyse durchgeführt.

3.6 Inkubation in methanolischer Lösung

Die methanolischen Inkubationsansätze werden mit einer Konzentration von 10 mM Peptid hergestellt. Addiert werden äquimolare (10 mM) Zusätze an Hapten bzw. ein einfacher molarer Überschuss (20 mM). Im Falle des Tulipalin A wird zusätzlich ein Ansatz mit einem vierfachen molaren Überschuss (50 mM) hergestellt. Die Inkubationsansätze werden bis zu 6 Wochen bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Als Vergleich werden Blindansätze der Peptide und Haptene analog behandelt. Zur Herstellung der Inkubationsansätze werden zunächst 12 mM methanolische Stammlösungen der Peptide und 600 mM methanolische Stammlösungen der Haptene hergestellt. Dazu werden 48 mg Hip-Lys (bzw. 78 mg Hip-His-Leu) unter leichtem Erwärmen in 13,0 ml Methanol gelöst und 106 µl Tul A (bzw. 225 µl 7-Hydroxycitronellal oder 151 µl Zimtaldehyd) mit 2,0 ml Methanol gemischt. Anschließend werden die Lösungen nach dem Pipettierschema entsprechend Tab. 3.6-1 in 4 ml-Probenfläschchen gefüllt und durch intensives Schütteln gemischt.

Tab. 3.6-1: Pipettierschema Inkubation in methanolischer Lösung

		Hapten- Stammlösung	Peptid- Stammlösung	Methanol
Stoffmengenverhältnis Peptid : Hapten	1:1	0,06 ml	3,00 ml	0,54 ml
	1:2	0,12 ml	3,00 ml	0,48 ml
	1:5	0,30 ml	3,00 ml	0,30 ml
Blindwerte	Hapten	0,12 ml	-	3,48 ml
	Peptid	-	3,00 ml	0,60 ml

Die Reaktions- und Blindansätze werden im Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert. Nach definierten Zeitabständen werden Aliquote entnommen und zum Abstoppen der Reaktion mit Methanol-Wasser-Gemisch (20:80 v/v) verdünnt. Aus den Ansätzen mit Hip-Lys werden jeweils 100 µl entnommen und im Verhältnis 1:10 verdünnt. Aus den Ansätzen mit Hip-His-Leu werden jeweils 50 µl im Verhältnis 1:20 verdünnt. Der Verdünnungsschritt erfolgt direkt in den für die HPLC zu verwendenden Probenvials. Anschließend werden Reaktions- und Blindansätze mittels analytischer HPLC hinsichtlich der Abnahme der Ausgangsstoffe bzw. der Zunahme der Reaktionsprodukte untersucht. Auf Grund von apparativ bedingten Verzögerungen nicht sofort untersuchte Proben werden in verschlossenen Vials im Kühlschrank gelagert.

3.7 Vergleichsansätze mit Acetyl-Derivaten

3.7.1 Rückflussansätze

Die Rückflussansätze mit den Acetyl-Derivaten werden analog zu den Rückflussansätzen mit den Hippuryl-Derivaten bzw. Glutathion durchgeführt. Die methanolischen Reaktionsansätze werden mit einer Konzentration von 50 mM Acetyl-Derivat und mit einfachem Überschuss an Hapten (100 mM) hergestellt und unter Rückfluss gekocht. Als Vergleich werden Blindansätze der Acetyl-Derivate und Haptene analog behandelt. Dazu werden 18,8 mg Ac-Lys (bzw. 21,5 mg Ac-His (Monohydrat), 21,6 mg Ac-Arg, 16,4 mg Ac-Cys) in einen 5 ml-Rundkolben eingewogen und unter Erwärmen in 2,0 ml Methanol gelöst. Anschließend wird die Menge an Hapten zupipettiert, sodass im Ansatz eine Konzentration von 100 mM an Hapten erreicht wird. Nichtflüssige Haptene (Vanillin und Benzylcinnamat) werden vor dem Lösen eingewogen. Die Reaktionsansätze werden unter ständigem Rühren 4 Stunden unter Rückfluss gekocht. Die Temperatur des Wasserbades wird auf ca. 75 °C eingestellt. Anschließend erfolgt nach Verdünnung mit Methanol/Wasser (20:80 v/v) [Ausnahme: α -Amyl-zimtaldehyd und Benzylcinnamat Methanol/Wasser (50:50 v/v) bedingt durch die Unlöslichkeit der Haptene] eine Untersuchung mittels analytischer HPLC (3.2.1).

3.7.2 Inkubationsansätze

Die methanolischen Inkubationsansätze werden wie die Rückflussansätze mit einer Konzentration von 50 mM Acetyl-Derivat und einem einfachen molaren Überschuss an Hapten (100 mM) hergestellt. Dazu werden 283 mg Ac-Lys (bzw. 323 mg Ac-His (Monohydrat), 324 mg Ac-Arg, 245 mg Ac-Cys) unter Erwärmen in 30,0 ml Methanol gelöst. Jeweils 3,0 ml davon werden in ein 4 ml-Reaktionsgefäß pipettiert. Anschließend wird die Menge an Hapten zupipettiert, sodass im Ansatz eine Konzentration von 100 mM an Hapten erreicht wird. Nichtflüssige Haptene (Vanillin und Benzylcinnamat) werden vor dem Pipettieren der Acetyl-Derivat-Lösung genau eingewogen. Die Reaktionsgefäße werden nach Verschließen kräftig geschüttelt, um eine gute Durchmischung zu gewährleisten. Zum Vergleich werden Blindansätze der Acetyl-Derivate und Haptene analog behandelt. Anschließend wird von jedem Ansatz ein Aliquot mittels analytischer HPLC untersucht. Die hier ermittelten Ergebnisse stellen den Startwert dar. Nach einer bzw. 4 Wochen Inkubation bei einer Temperatur von 37 °C werden ebenfalls Aliquote entnommen und mittels analytischer HPLC untersucht.

3.8 Einfluss des pH-Wertes

3.8.1 Qualitativer Einfluss des pH-Wertes

0,07 mmol Acetyl-Derivat (13 mg Ac-Lys bzw. 15 mg Ac-His) werden in einen 5 ml-Rundkolben eingewogen und unter Erwärmen in 3,5 ml Methanol gelöst. Anschließend werden 0,28 mmol Tul A (24,5 µl) zupipettiert. Zur Untersuchung des pH-Wert-Einflusses auf die Reaktivität der Aminosäurederivate erfolgt ein Zusatz von 100 µl 1 N Salzsäure bzw. 100 µl 1 N Natriumhydroxidlösung (Konzentration im Probengefäß: ca. 0,03 mol/l). Um die Auswirkungen von Säure- und Basenzusatz auf die Acetyl-Derivate abschätzen zu können, werden in gleicher Weise Blindwerte ohne Tulipalin A angefertigt. Die Ansätze werden 14 Tage bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Ihre Untersuchung erfolgt mit Hilfe der Aminosäureanalyse nach Säurehydrolyse.

3.8.2 Quantitativer Einfluss des Natriumhydroxidzusatzes

Bisher wurde nur eine definierte Menge an Natriumhydroxid zugesetzt. Ergänzend dazu soll der Einfluss von Alkali in Form von Natriumhydroxid in abgestuften Konzentrationen auf die Reaktion von Tul A mit Lysin bzw. Histidin überprüft werden. Für diese Untersuchung werden 13 mg Ac-Lys bzw. 15 mg Ac-His in einen 5 ml-Rundkolben eingewogen und unter Erwärmen in 3,5 ml Methanol gelöst. Anschließend werden 24,5 µl Tul A zupipettiert und jeweils 100 µl Natriumhydroxidlösung unterschiedlicher Konzentration (siehe Tab. 3.8-1) zugesetzt.

Tab. 3.8-1 Natriumhydroxidzusatz zu Ac-Lys- und Ac-His-Inkubationsansätzen

Probengefäß	Konzentration der NaOH [N]	Konzentration der NaOH im Probengefäß [N]	pH – Wert im Probengefäß*
1 (Leerwert)	0	0	6-7
2	0,5	0,01	7
3	1,0	0,03	7-8
4	1,5	0,04	7-8
5	2,5	0,07	8-9
6	3,5	0,10	8-9
7	5,0	0,14	9-11
8	7,5	0,21	12

* Der pH-Wert im Probengefäß wurde mit Stuphan-pH-Papier gemessen, um eine Orientierung über den Einfluss des Natriumhydroxidzusatzes auf den pH-Wert zu erhalten.

Die Inkubationsansätze werden nun 2 Wochen bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert und anschließend mit Hilfe der ASA (3.2.2) untersucht.

3.9 Syntheseansätze zur Strukturaufklärung von Reaktionsprodukten

3.9.1 N^α-Hippuryl-lysin und Tulipalin A

Der Syntheseansatz von N^α-Hippuryl-lysin mit Tul A wird analog zu den Rückflussansätzen (siehe 3.5) durchgeführt. Dazu werden 250 mg Hip-Lys (0,8 mmol) in einen 25 ml-Rundkolben eingewogen und in der Wärme in 20 ml Methanol gelöst. Anschließend werden 150 µl (1,6 mmol) Tul A zupipettiert und der Ansatz unter ständigem Rühren für 4 Stunden unter Rückfluss gekocht. Um die Trennung der Produkte mittels semipräparativer HPLC zu vereinfachen, wird der Ansatz durch Extraktion mit Essigsäureethylester von überschüssigem Tul A befreit. Dazu wird der methanolische Rückflussansatz quantitativ in einen 50 ml-Scheidetrichter übergeführt und im Stickstoffstrom zur Trockne gebracht. Anschließend wird der Rückstand in 20 ml Wasser aufgenommen, 20 ml Essigsäureethylester hinzugefügt und geschüttelt. Die organische Phase wird abgetrennt und verworfen. Die wässrige Phase wird insgesamt fünf mal mit Essigsäureethylester extrahiert und anschließend in ein Probengefäß überführt. Der nun von Tul A befreite Ansatz wird im Stickstoffstrom getrocknet und der Rückstand in 10 ml Methanol aufgenommen. Die so vorbereitete Probenlösung wird anschließend mit Hilfe der semipräparativen HPLC (siehe 3.3.1) aufgetrennt. Anhand des Trennbildes werden die Peaks in getrennten Fraktionen gesammelt. Die aufgefangenen Fraktionen werden nun am Rotationsverdampfer weitestgehend eingengt und mittels analytischer HPLC auf ihre Reinheit überprüft. Bei ausreichender Reinheit werden die Substanzen im Stickstoffstrom zur Trockene gebracht und anschließend die Ausbeuten für die einzelnen Fraktionen ermittelt:

unverbrauchtes Hip-Lys: 171 mg

Fraktion F1: 42 mg (weißes Pulver)

Fraktion F2: 6 mg (weißes Pulver)

Die von Lösungsmittel befreite Fraktion F1 wird in deuteriertem Methanol gelöst und einer Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie unterzogen. Die NMR-Daten der Fraktion F1 und, zum Vergleich, die der Ausgangsstoffe sind im Folgenden aufgeführt. Zur Nummerierung der Kohlenstoffatome siehe Abb. 3.9-1.

Hippuryl-Lysin:

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ = 7.96 (d, J = 7.6 Hz, 2 H, 2-H, 6-H), 7.62 (t, J = 6.78 Hz, 1 H, 4-H), 7.55 (t, J = 7.09 Hz, 2 H, 3-H, 5-H), 4.36 (t, J = 6.15 Hz, 1 H, 10-H), 4.11 (dd, J₁ = 30.9 Hz, J₂ = 17 Hz, 2 H, 8-H), 2.96 (t, J = 7.09 Hz, 2 H, 15-H), 2.02 - 1.94 (m, 1 H, 12-H_a), 1.82 - 1.75 (m, 1 H 12-H_b), 1.75 - 1.64 (m, 2 H, 14-H), 1.49 (tt, J₁ = 15.03 Hz, J₂ = 7.50 Hz, 2 H, 13-H).

¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD): δ = 179.17 (S), 171.7 (S), 171.3 (S), 135.84 (S), 133.83 (D), 130.47 (D), 129.30 (D), 56.31 (D), 45.15 (T), 41.35 (T), 33.87 (T), 28.79 (T), 23.94 (T).

Tulipalin A:

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): $\delta = 6.21$ (t, $J = 2.84$ Hz, 1 H, 5^*-H_a), 5.78 (t, $J = 2.52$ Hz, 1 H, 5^*-H_b), 4.44 (t, $J = 7.41$ Hz, 2 H, 4^*-H), 3.07 (tt, $J_1 = 7.25$ Hz, $J_2 = 2.84$ Hz, 2 H, 3^*-H).

Hip-LysTu:

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): $\delta = 7.96$ (d, $J = 7.57$ Hz, 2 H, 2-H, 6-H), 7.63 (t_{br}, $J = 7.41$ Hz, 1 H, 4-H), 7.55 (t, $J = 7.41$ Hz, 2 H, 3-H, 5-H), 4.48 (t_{br}, $J = 8.35$ Hz, 1 H, 4-H_a), $4.41 - 4.35$ (m, 1 H, 10-H), $4.35 - 4.28$ (m, 2 H, 4^*-H), 4.13 (dd, $J_1 = 20.9$ Hz, $J_2 = 16.55$ Hz, 2 H, 8-H), $3.46 - 3.40$ (m, 1 H, 5^*-H_a), 3.26 (dd, $J_1 = 13.08$ Hz, $J_2 = 7.72$ Hz, 1 H, 5^*-H_b), $3.22 - 3.14$ (m, 1 H, 2^*-H), 3.09 (t, $J = 7.41$ Hz, 2 H, 15-H), 2.58 (dt, $J_1 = 11$ Hz, $J_2 = 6.46$ Hz, 1 H, 3^*-H_a), 2.17 (dt, $J_1 = 20.80$ Hz, $J_2 = 11$ Hz, 1 H, 3^*-H_b), $2.06 - 1.94$ (m, 1 H, 12-H_a), 1.79 (m_c, 3 H, 12-H_b , 14-H), 1.51 (m_c, 2 H, 13-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD): $\delta = 179.46$ (S), 171.9 (S), 171.3 (S), 135.81 (S), 133.81 (D), 130.43 (D), 129.30 (D), 69.31 (T), 56.31 (D), 50.14 (T), 49.29 (T), 45.20 (T), 38.89 (D), 33.79 (T), 29.20 (T), 27.28 (T), 24.14 (T).

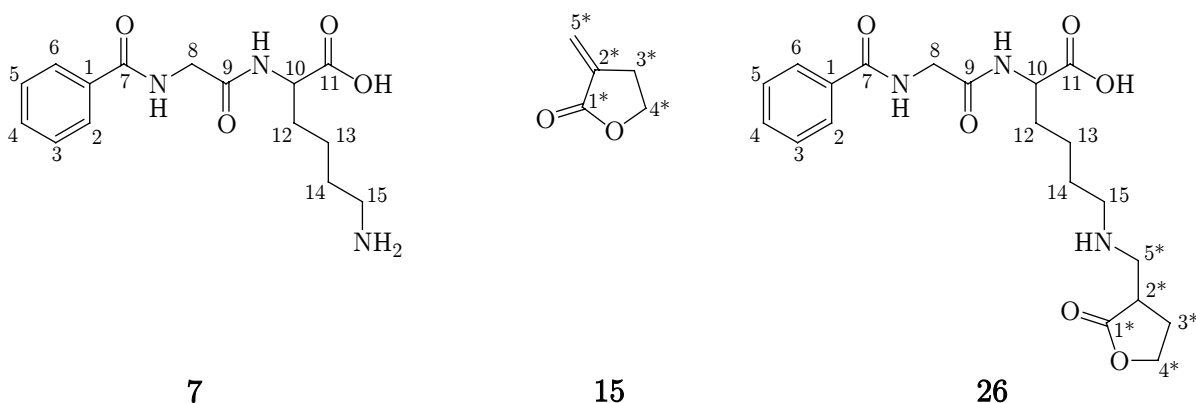


Abb. 3.9-1 Nummerierung der C-Atome für die Zuordnung der NMR-Daten für Hip-Lys (7), Tul A (15) und Hip-LysTu (26)

3.9.2 N^α-Hippuryl-histidin-leucin und Tulipalin A

Syntheseansatz unter Rückflussbedingungen

400 mg N^α-Hippuryl-histidin-leucin (Hip-His-Leu) (0,8 mmol) werden in einen 25 ml-Rundkolben eingewogen und in 20 ml Methanol gelöst. Anschließend werden 150 μl (1,6 mmol) Tul A zupipettiert und der Ansatz unter ständigem Rühren für 4 Stunden unter Rückfluss gekocht. Nach Abschluss der Reaktion wird der Ansatz im Stickstoffstrom auf ein Volumen von ca. 10 ml eingengt. Diese Lösung wird direkt zur Trennung mittels semipräparativer HPLC (3.3.2) eingesetzt.

Syntheseansatz unter Inkubationsbedingungen

400 mg Hip-His-Leu (0,8 mmol) werden in eine 50 ml Probenflasche eingewogen und in 20 ml Methanol gelöst. Anschließend werden 375 μ l (4,0 mmol) Tul A zupipettiert. Nach Verschließen der Flasche wird der Ansatz 40 Tage bei einer Temperatur von 37 °C im Brutschrank inkubiert. Alle 24 Stunden ist die Flasche einmal kräftig zu schütteln. Nach Abschluss der Inkubation wird der Ansatz im Stickstoffstrom auf ein Volumen von etwa 10 ml eingengt. Die so vorbereitete Probenlösung wird anschließend mit Hilfe der semipräparativen HPLC (3.3.2) aufgetrennt.

Isolierung und Strukturaufklärung

Anhand des Trennbildes, welches sich für die Reaktionsgemische mit dem jeweiligen Gradienten an der präparativen HPLC ergab, werden die einzelnen Peaks getrennt gesammelt. Die aufgefangenen Fraktionen werden am Rotationsverdampfer weitestgehend eingengt und mittels analytischer HPLC auf ihre Reinheit überprüft. Bei ausreichender Reinheit werden die Substanzen im Stickstoffstrom zur Trockene gebracht und anschließend die Ausbeuten für die einzelnen Fraktionen ermittelt:

Rückflussansatz:	Hip-His-Leu:	190 mg
	Fraktion F1:	43 mg
	Fraktion F2:	12 mg
	Fraktion F3:	23 mg
Inkubationsansatz:	Fraktion F1:	43 mg
	Fraktion F2:	39 mg
	Fraktion F3:	81 mg
	Fraktion F4:	3 mg

Alle isolierten Fraktionen sind, wie der Ausgangsstoff Hip-His-Leu, weiße pulverförmige Feststoffe. Die von Lösungsmittel befreite Fraktion F3 des Inkubations-Syntheseansatzes wird in deuteriertem Methanol gelöst und einer Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie unterzogen. Die NMR-Daten der Fraktion F3 und Hip-His-Leu sind im Folgenden aufgeführt. Zur Nummerierung der Kohlenstoffatome siehe Abb. 3.9-2.

Hip-His-Leu in Methanol- d_4 -Lösung:

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): δ = 8.46 (s, 1 H, 14-H), 7.95 - 7.93 (d, 2 H, 2-H, 6-H), 7.64 - 7.61 (d, 1 H, 4-H), 7.56 - 7.53 (d, 2 H, 3-H, 5-H), 7.34 (s, 1 H, 13-H), 4.99 - 4.81 (q, 1 H, 10-H), 4.41 - 4.38 (q, 1 H; 16-H), 4.16 - 4.08 (d, 2 H, 8-H), 3.39 - 3.33 (t, 2 H, 11-H) 1.82 - 1.71 (m, 3 H, 17-H, 18-H), 1.02 - 0.97 (d, 6 H, 19-H, 20-H)

Hip-HisTu-Leu(OMe) in Methanol- d_4 -Lösung:

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): δ = 7.96 (d, 2 H, 2-H, 6-H), 7.66 - 7.62 (d, 1 H, 4-H), 7.58 - 7.55 (d, 2 H, 3-H, 5-H), 7.46 - 7.43 (d, 1 H, 14-H), 7.00 (s, 1 H, 13-H), 4.75 - 4.72. (q, 1 H, 10-H), 4.52 - 4.49 (d, 1 H, 16-H), 4.36 - 4.21 (m, 4 H, 5*-H, 4*-H), 4.14 -

4.09 (d, 2 H, 8-H), 3.76 - 3.69 (s, 3 H, 22-H), 3.19 - 2.99 (m, 3 H, 11-H, 2*-H), 2.35 - 2.33 (q, 1 H, 3*-H), 1.99 - 1.96 (q, 1 H, 3*-H), 1.75 - 1.63 (m, 3 H, 17-H, 18-H), 0.99 - 0.92 (d, 6 H, 19-H, 20-H).

^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD): $\delta = 179.0$ (S), 174.3 (S), 173.5 (S), 170.8 (S), 170.4 (S), 138.6 (D), 138.5 (S), 134.9 (S), 133.0 (D), 129.6 (S), 128.6 (S), 118.9 (D), 68.1 (T), 54.5 (D), 54.2 (D), 52.7 (Q), 48.5 (T), 44.3 (T), 42.2 (D), 41.3 (T), 31.1 (T), 27.2 (T), 25.7 (D), 23.3 (Q), 21.7 (Q).

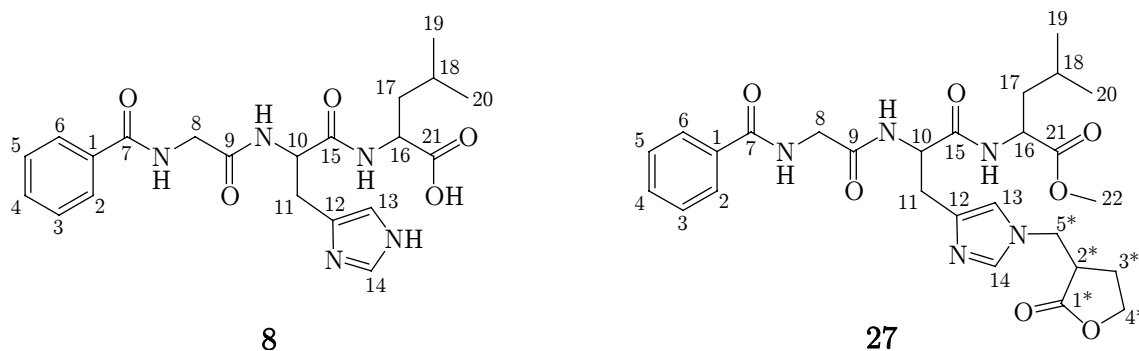


Abb. 3.9-2 Nummerierung der C-Atome für die Zuordnung der NMR-Daten für Hip-His-Leu (8) und Hip-HisTu-Leu(OMe) (27)

3.9.3 N^α -Acetyl-histidin und Tulipalin A

225 mg Ac-His-Monohydrat (1,1 mmol) werden in eine 50 ml Probenflasche eingewogen und in 21 ml Methanol gelöst. Anschließend werden 200 μl (2,2 mmol) Tul A zupipettiert. Nach Verschließen der Flasche wird der Ansatz 28 Tage bei einer Temperatur von 37°C im Brutschrank inkubiert. Alle 24 Stunden wird die Flasche einmal kräftig geschüttelt. Nach Abschluss der Inkubation wird der Ansatz im Stickstoffstrom auf ein Volumen von etwa 10 ml eingengt. Die so vorbereitete Probenlösung wird anschließend mit Hilfe der semipräparativen HPLC (siehe 3.3.3) aufgetrennt. Die aufgefängenen Fraktionen werden am Rotationsverdampfer weitestgehend eingengt und mittels analytischer HPLC auf ihre Reinheit überprüft. Bei ausreichender Reinheit werden die Substanzen im Stickstoffstrom zur Trockene gebracht und anschließend die Ausbeuten für die einzelnen Fraktionen ermittelt:

Fraktion F1: 9 mg

Fraktion F2: 87 mg

Beide isolierten Fraktionen sind weiße pulverförmige Feststoffe, ähnlich dem Ac-His. Sie werden nachfolgend mittels Aminosäureanalyse nach Säurehydrolyse sowie massenspektroskopisch untersucht.

3.9.4 N^α-Hippuryl-lysin und 7-Hydroxycitronellal

Der Synthesansatz von N^α-Hippuryl-lysin und 7-Hydroxycitronellal wird analog zu den Rückflussansätzen (siehe 3.5) durchgeführt. Dazu werden 250 mg Hip-Lys (0,8 mmol) in einen 25 ml-Rundkolben eingewogen und unter Erwärmen in 20 ml Methanol gelöst. Anschließend werden 305 μ l (1,6 mmol) 7-Hydroxycitronellal zupipettiert und der Ansatz unter ständigem Rühren für 4 Stunden unter Rückfluss gekocht. Dabei färbt sich die Lösung relativ schnell blassgelb und erreicht zum Ende der Reaktion ein kräftiges Gelb. Nach Beendigung der Reaktion wird der Ansatz in einen 100 ml-Scheidetrichter übergeführt und das Lösungsmittel im Stickstoffstrom entfernt. Nach Zugabe von 20 ml Reinstwasser wird drei mal mit je 20 ml tert.-Butylmethylether extrahiert. Die farblos bleibende organische Phase wird verworfen. Die wässrige Phase wird direkt zur semipräparativen HPLC (3.3.4) eingesetzt. Nach Auftrennung werden die aufgefangenen Fraktionen am Rotationsverdampfer weitestgehend eingengt und mittels analytischer HPLC auf ihre Reinheit überprüft. Anschließend werden die Ausbeuten für die einzelnen Fraktionen ermittelt:

Fraktion F1:	3,9 mg
Fraktion F2:	7,8 mg
Fraktion F3:	12,9 mg
Fraktion F4:	7,1 mg
Fraktion F5:	25,4 mg

Alle isolierten Fraktionen sind weiße pulverförmige Feststoffe und damit dem Ausgangsstoff Hip-Lys ähnlich. Lediglich Fraktion F2 weist zusätzlich eine leichte gelbliche Färbung auf. Für eine Untersuchung mittels NMR-Spektroskopie ist hier nur die Fraktion F5 hinsichtlich Reinheit und Stoffmenge geeignet. Zu diesem Zweck wird sie in deuteriertem Dimethylsulfoxid gelöst. Die NMR-Daten von 7-Hydroxycitronellal und Fraktion F5 sind im Folgenden aufgeführt. Zur Nummerierung der Kohlenstoffatome siehe Abb. 3.9-3.

7-Hydroxycitronellal in Dimethylsulfoxid-d₆

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ = 9.66 (t, 1 H, 10^X-H), 2.38 (t, 2 H, 9^X-H), 1.88 (m, 1 H, 7^X-H), 1.50 - 1.47 (m, 6 H, 4^X-H, 5^X-H, 6^X-H), 1.24 (s, 6 H, 2^X-H, 3^X-H), 0.99 - 0.98 (d, 3 H, 8^X-H).

Fraktion F5 in Dimethylsulfoxid-d₆

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ = 8.90 (s, 1 H, 10^A-H), 8.35 (s, 1 H, 10^B-H), 7.89 (d, 2 H, 2-H, 6-H), 7.54 (t, 1 H, 4-H), 7.46 (t, 2 H, 3-H, 5-H), 4.53 (m, 2 H, 14-H), 3.92 - 3.71 (m, 3 H, 8-H, 10-H), 3.13 - 2.91 (m, 4 H, 7^A-H, 7^B-H, 9^C-H), 1.90 - 1.70 (m, 5 H, 11-H, 13-H, 7^C-H), 1.69 - 1.51 (m, 4 H, 6^A-H, 6^B-H), 1.43 - 1.20 (m, 22 H, 12-H, 4^A-H, 5^A-H, 8^A-H, 4^B-H, 5^B-H, 8^B-H, 4^C-H, 5^C-H, 6^C-H), 1.07 - 0.96 (m, 18 H, 2^A-H, 3^A-H, 2^B-H, 3^B-H, 2^C-H, 3^C-H), 0.92 - 0.87 (s, 3 H, 8^C-H).

^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 172.46$ (S), 167.58 (S), 166.57 (S), 152.81 (S), 147.72 (S), 145.25 (S), 143.16 (S), 142.82 (D), 134.17 (D), 131.37 (S), 128.33 (D), 127.33 (D), 68.59 (S), 58.21 (T), 53.64 (D), 43.49 (T), 43.19 (T), 37.34 (T), 37.18 (T), 36.57 (T), 36.28 (D), 34.32 (T), 34.19 (D), 31.28 (T), 31.28 (T), 29.29 (Q), 21.78 (T), 21.59 (T), 21.43 (T), 21.13 (Q), 20.60 (Q), 18.69 (Q).

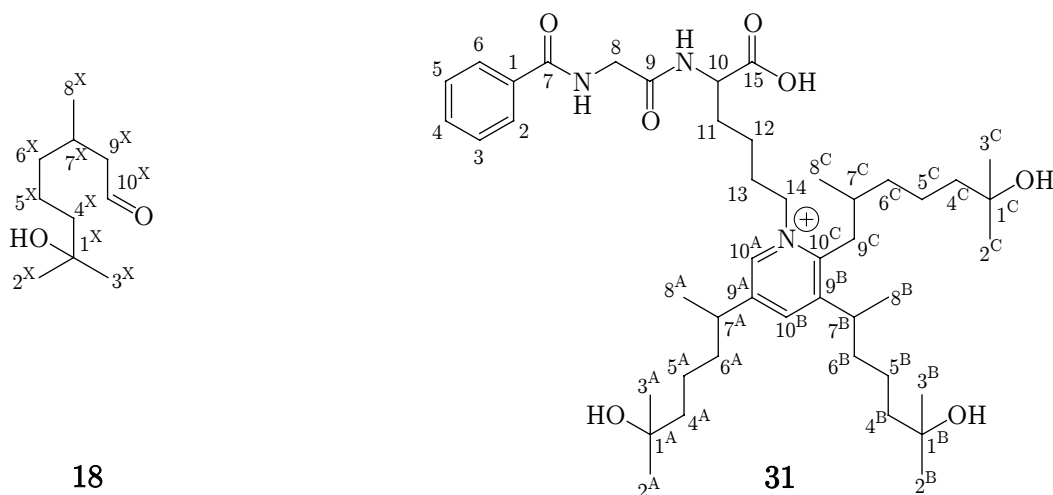


Abb. 3.9-3 Nummerierung der C-Atome für die Zuordnung der NMR-Daten für 7-Hydroxycitronellal (**18**) und dem aus Fraktion F5 isolierten Reaktionsprodukt (**31**)

Zusätzlich werden die Fraktionen mittels Massenspektroskopie untersucht.

3.9.5 N^α -Hippuryl-lysin und Zimtaldehyd

Der Synthesansatz von N^α -Hippuryl-lysin und Zimtaldehyd wird analog zu den Rückflussansätzen (siehe 3.5) durchgeführt. Dazu werden 250 mg Hip-Lys (0,8 mmol) in einen 25 ml-Rundkolben eingewogen und unter Erwärmen in 20 ml Methanol gelöst. Anschließend werden 205 μl (1,6 mmol) Zimtaldehyd zupipettiert und der Ansatz unter ständigem Rühren für 4 Stunden unter Rückfluss gekocht. Schon relativ kurz nach Beginn der Reaktion verfärbt sich die Lösung. Sie nimmt einen leichten Orangeton an, welcher im Verlauf der Reaktion kräftiger wird. Am Ende besitzt die Lösung eine orange-braune Färbung. Nach Beendigung der Reaktion wird der Reaktionsansatz in einen 100 ml-Scheidetrichter übergeführt und das Lösungsmittel im Stickstoffstrom entfernt. Nach Zugabe von 20 ml Reinstwasser wird drei mal mit je 20 ml Essigsäureethylester extrahiert. Beide Phasen, sowohl die organische als auch die wässrige, besitzen eine gelbliche Färbung. Die organische Phase, die eine vergleichsweise dunklere Färbung besitzt, wird verworfen. Die wässrige Phase wird direkt zur semipräparativen HPLC (3.3.5) eingesetzt. Nach Auftrennung werden die Fraktionen am Rotationsverdampfer weitestgehend eingengt und mittels analytischer

HPLC auf ihre Reinheit überprüft. Anschließend werden die Ausbeuten für die einzelnen Fraktionen ermittelt:

Fraktion F1:	3,9 mg
Fraktion F2:	3,8 mg
Fraktion F3:	1,9 mg
Fraktion F4:	7,1 mg
Fraktion F5:	10,4 mg
Fraktion F6:	8,3 mg
Fraktion F7:	18,2 mg
Fraktion F8:	19,2 mg

Die isolierten Fraktionen weisen nicht die für eine NMR-Spektroskopie nötige Reinheit und Stoffmenge auf. Aus diesem Grund werden sie massenspektroskopisch untersucht.

3.10 LC-MS-Experimente mit Lysin-Derivaten

30 mg Hip-Lys bzw. 19 mg Ac-Lys oder 25 mg Boc-Lys (ca. 0,1 mmol) werden in einen 5 ml-Rundkolben eingewogen und in unter Erwärmen 2 ml Methanol gelöst. Anschließend werden 37 μ l 7-Hydroxycitronellal bzw. 25 μ l Zimtaldehyd (ca. 0,2 mmol) zupipettiert und der Ansatz unter ständigem Rühren 4 Stunden unter Rückfluss gekocht. Nach Beendigung der Reaktion wird je ein Aliquot der Ansätze abgenommen, mit Methanol / Wasser 20:80 (v/v) verdünnt und mittels LC-MS (3.2.3) untersucht.

3.11 Konjugationen an Proteine

Reaktionsbedingungen unter Rückfluss

10 mg BSA (ca. 0,15 μ mol) werden in einen 5 ml-Rundkolben eingewogen und in 4 ml Methanol suspendiert. Anschließend werden 15 μ l Tul A (0,16 mmol) zupipettiert und der Ansatz unter ständigem Rühren 6 Stunden unter Rückfluss gekocht. Nach Beendigung der Reaktion wird das Lösungsmittel im Stickstoffstrom entfernt und das verbleibende Protein einer Aminosäureanalyse nach Säurehydrolyse (3.2.2) unterzogen. Entsprechende Blindansätze der Proteine werden analog behandelt.

Inkubationsbedingungen

Für diesen Versuch fanden die Proteine BSA, Keratin, Gelatine (Collagen), Elastin, Rinderinsulin und β -Lactoglobulin Verwendung. Zur Ermittlung der ursprünglichen Aminosäurezusammensetzung der Proteine wird zunächst eine Aminosäureanalyse nach Säurehydrolyse durchgeführt (siehe 3.2.2). Für die Inkubation werden 4 mal je 10 mg des entsprechenden Proteins in ein Reaktionsgefäß eingewogen und mit 4 ml Methanol sowie mit 15 μ l Tul A versetzt. Die so suspendierten Reaktionslösungen werden über

einen Zeitraum von bis zu vier Wochen bei einer Temperatur von 37 °C im Brutschrank inkubiert. In Abständen von 7 Tagen wird jeweils ein Reaktionsgefäß entnommen und der enthaltene Reaktionsansatz mit Hilfe der Aminosäureanalyse nach Säurehydrolyse untersucht. Dazu wird das als Überstand über dem Protein vorhandene Lösungsmittel abpipettiert und verbliebene Reste im Stickstoffstrom entfernt. Der Rückstand wird nun direkt mit Hilfe der Aminosäureanalyse nach Säurehydrolyse (3.2.2) auf seine Aminosäurezusammensetzung hin untersucht.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Methodische Aspekte

4.1.1 HPLC

Für die Untersuchung der Reaktionen von kontaktallergenen Duftstoffen mit Modellpeptiden ist es notwendig, zuerst eine Methode zu etablieren, welche in der Lage ist, sowohl die Ausgangsstoffe als auch mögliche Reaktionsprodukte parallel zu erfassen. Ein geeignetes Mittel hierfür stellt die RP-HPLC dar. Mit ihrer Hilfe lassen sich verhältnismäßig polare Soluten, beispielsweise Aminosäuren und Peptide aber auch, unter Verwendung eines entsprechenden organischen Modifiers im Eluens, wenig polare Soluten auftrennen. Als Eluenten wurden Wasser und Methanol verwendet, Medien, welche ebenfalls Lösungsmittel der Reaktionsansätze sind. Auf Verwendung von Puffern und anderen Zusätzen wurde bewusst verzichtet, um eine Adaption von analytischer HPLC auf die präparative HPLC zu vereinfachen.

Für die verwendeten Peptide und kontaktallergenen Substanzen ist die Detektion im UV-Bereich geeignet. Bis auf 7-Hydroxycitronellal besitzen alle Substanzen mindestens ein Absorptionsmaximum im Bereich von 200 - 300 nm. Da diese sich zum Teil aber stark unterscheiden (Geraniol - 205 nm; Hippurylgruppe - 230 nm; Benzaldehyd - 254 nm; Zimtaldehyd - 280 nm), wurde ein Diodenarray-Detektor eingesetzt. Dieser erlaubt es, den genannten Wellenlängenbereich abzudecken.

4.1.2 Aminosäureanalyse

Unter der Voraussetzung, dass bei den Reaktionen der kontaktallergenen Stoffe mit den Modellpeptiden säurestabile Produkte entstehen, wäre es möglich, diese modifizierten Aminosäuren mit Hilfe der Aminosäureanalyse aufzutrennen und zu detektieren. Die Verwendung der Hippuryl-Funktion (Benzoyl-Glycyl-gruppe) als Schutzgruppe für die α -Aminogruppe der Aminosäure birgt bei dieser Analysenmethode weiterhin den Vorteil, dass bei Säurehydrolyse des Hippurylpeptides zusätzlich Glycin freigesetzt wird, welches als interner Standard herangezogen werden kann. So sind quantitative Aussagen über die Umsetzung leicht möglich. Im Rahmen dieser Arbeit konnte auf eine von *Henle et al. (1991)* etablierte Methode für die Aminosäureanalyse zurückgegriffen werden. Detektiert werden können hier jedoch lediglich Verbindungen, welche sich mit Ninhydrin anfärben lassen.

4.2 Vorversuche zur Reaktivität

4.2.1 Inkubation in wässrig-methanolischer Lösung

Die Reaktionsbedingungen für die Umsetzung der als Carrier fungierenden Modellpeptide mit den kontaktallergenen Substanzen sollten denen eines Hauttests angenähert sein. Die untersuchten kontaktallergenen Stoffe sind jedoch wegen ihres unpolaren Charakters in Wasser nahezu unlöslich und neigen zur Phasenbildung. Daher schied reines Wasser als Reaktionsmedium aus. In Anlehnung an Arbeiten im Rahmen einer Diplomarbeit von *Helling (1996)*, wo Tulipalin A mit Hexylamin bzw. 6-Aminohexansäure in einer Lösung von Wasser/Ethanol (50:50 v/v) umgesetzt wurde, wurde als Reaktionsmedium eine wässrig-alkoholische Lösung gewählt. Ethanol ist hier zweifellos eine gute Wahl für die alkoholische Komponente, da es auch in verschiedenen kosmetischen Formulierungen wie Rasierwasser oder Eau de Toilette Anwendung findet. Aus Kostengründen wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit Methanol verwendet, welches als Homologes des Ethanols ähnliche Eigenschaften besitzt.

Für diesen Vorversuch wurden die Kontaktallergene Tulipalin A (Tul A), Zimtaldehyd, 7-Hydroxycitronellal und Vanillin eingesetzt. Tul A und Zimtaldehyd sind nach vorliegenden Erkenntnissen potente Kontaktallergene (siehe auch 2.6.3) und Vanillin wurde bereits in Vorarbeiten von *Helling (1996)* mit Hexylamin erfolgreich umgesetzt. Als Carriermodelle wurden N^α-Hippuryl-lysin (Hip-Lys) und N^α-Hippuryl-histidin-leucin (Hip-His-Leu) verwendet, da die Seitenketten von Lysin und Histidin die größte Reaktivität gegenüber den gewählten kontaktallergenen Substanzen versprachen. Für die Inkubation wurde eine Temperatur von 37 °C festgelegt, welche der Körpertemperatur entspricht.

Die Kontrolle einer Umsetzung erfolgte einerseits mittels analytischer HPLC nach 3.2.1 und andererseits mittels Aminosäureanalyse nach Säurehydrolyse (3.2.2). Mit Hilfe der analytischen HPLC konnten im Verlauf der fünfwöchigen Inkubation weder eine signifikante Abnahme der Konzentrationen der Hippuryl-Derivate noch zusätzliche neue Peaks, welche auf eine Reaktion hindeuten würden, detektiert werden. Gleiches gilt für die Aminosäureanalyse nach Säurehydrolyse der Ansätze der Hippuryl-Derivate mit Zimtaldehyd bzw. Vanillin. Bei den Inkubationen mit Tul A konnten dagegen Veränderungen festgestellt werden (siehe auch Abb. 4.2-1). Im Ansatz von Tul A mit Hip-Lys konnte eine Abnahme des Lysin-Peaks um ca. 5 % gegenüber dem Blindwert verzeichnet werden. Gleichzeitig wurde im basischen Bereich des ASA-Chromatogramms ein neuer Peak detektiert, welcher auf eine Modifikation der Aminosäureseitenkette des Lysins hinweist. Eine noch deutlichere Veränderung war im Ansatz von Tul A mit Hip-His-Leu zu verzeichnen. Hier verringerte sich die Peakfläche von Histidin um 28 % gegenüber der Blindinkubation. Zusätzlich konnten zwei neue Peaks im ASA-Chromatogramms detektiert werden. Dieser deutliche Umsatz hätte

auch mittels HPLC festgestellt werden müssen. Spätere Untersuchungen zeigten, dass der verwendete Elutionsgradient nicht zur Trennung der modifizierten Derivate von Hip-His-Leu geeignet war, die neuen Peaks versteckten sich als Schultern des Peaks von Hip-His-Leu.

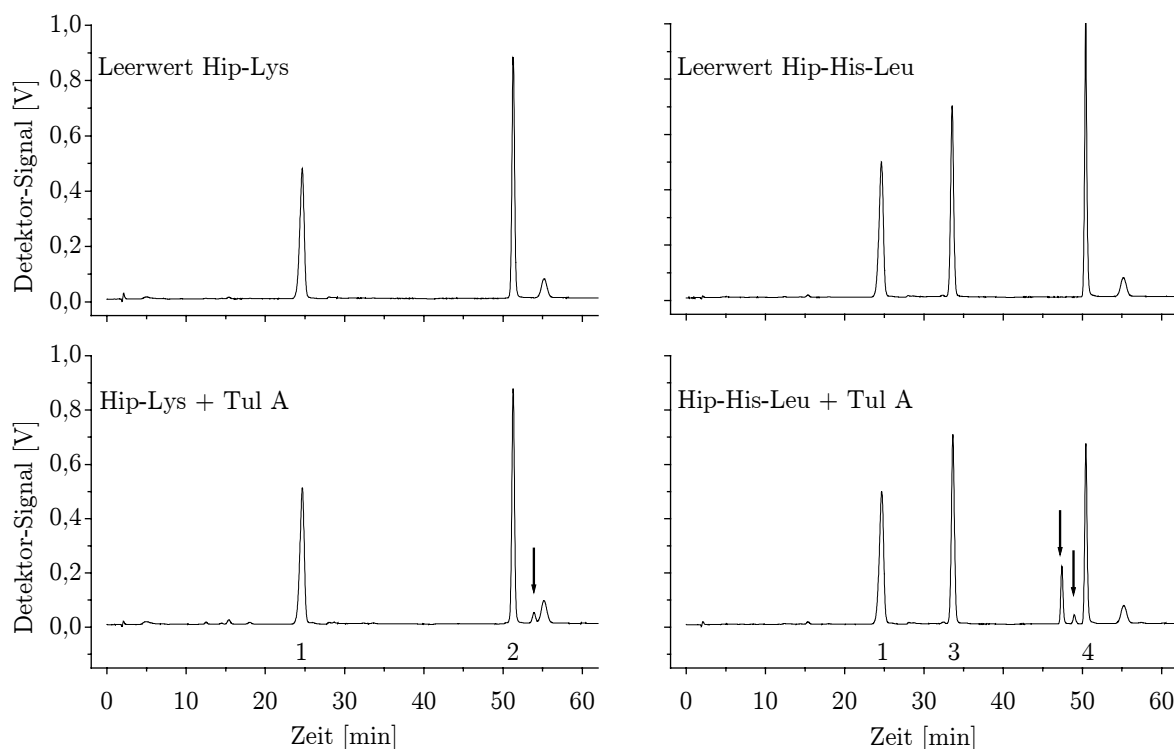


Abb. 4.2-1 ASA-Chromatogramme (Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrin; Detektion: $\lambda = 570$ nm) der Hydrolysate der Inkubationsansätze in wässrig-methanolischer Lösung (1 - Glycin; 2 - Lysin; 3 - Leucin; 4 - Histidin). Unbekannte neue Peaks sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Insgesamt ist die Reaktivität der Hippuryl-Derivate gegenüber den untersuchten kontaktallergenen Substanzen in einem wässrig-methanolischen Medium jedoch als sehr gering einzuschätzen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte der störende Einfluss des Wassers sein. Im Falle des Tul A wäre durch Anlagerung von Wasser eine Aufspaltung des Lactonringes denkbar, welche zu einer starken Herabsetzung der Reaktivität führt. 7-Hydroxycitronellal wiederum reagiert nach Vorhersagen von *Patlewicz et al. (2002)* mit der ϵ -Aminogruppe des Lysins nach Art einer Schiff-Base-Reaktion. Da bei dieser Reaktion Wasser freigesetzt wird, könnte sich das im Lösungsmittel enthaltene Wasser dahingehend auswirken, dass es das Reaktionsgleichgewicht auf die Seite der Ausgangsstoffe drängt. Gleiches gilt auch für Vanillin, welches nach Vorarbeiten von *Helling (1996)* ebenfalls Schiff-Base-Reaktionen mit Aminogruppen eingeht.

4.2.2 Reaktionsansätze in Methanol unter Rückfluss

Nach den in Bezug auf die Reaktivität unbefriedigenden Vorversuchen mit Inkubationen in wässrig-methanolischer Lösung wurde in den folgenden Experimenten auf den Wasseranteil verzichtet und reines Methanol als Lösungsmittel für die Reaktionsansätze verwendet. Weiterhin wurden die Konzentrationen der Reaktionspartner auf 40 mM erhöht. Limitierender Faktor ist hier die Löslichkeit von Hip-Lys in Methanol. Um eine 40 mM methanolische Lösung dieses Hippuryl-Derivates herzustellen, bedarf es einer Erwärmung. Zusätzlich wurde die Inkubation bei 37 °C durch Erhitzen bzw. Kochen unter Rückfluss ersetzt. Durchgeführt wurde dieser Versuch lediglich mit Tul A als Haptenkomponente, da hiermit bereits Reaktionsprodukte detektiert wurden. Im Vergleich zum Inkubationsansatz (4.2.1) wurden zwei verschiedene Konzentrationen von Tul A eingesetzt. Einmal der äquimolare Zusatz wie bei den Inkubationsansätzen und zusätzlich ein einfacher Überschuss an Tul A, da theoretisch jeweils zwei Moleküle Tul A mit den Aminosäureseitenketten reagieren können. Es wurden somit 40 mM methanolische Lösungen von Hip-Lys bzw. Hip-His-Leu mit Zusätzen von 40 bzw. 80 mM an Tul A insgesamt 6 Stunden unter Rückfluss gekocht. Chromatogramme der Aminosäureanalysen nach Säurehydrolyse der Rückflussansätze mit einfachem Überschuss an Tul A sind in Abb. 4.2-2 dargestellt.

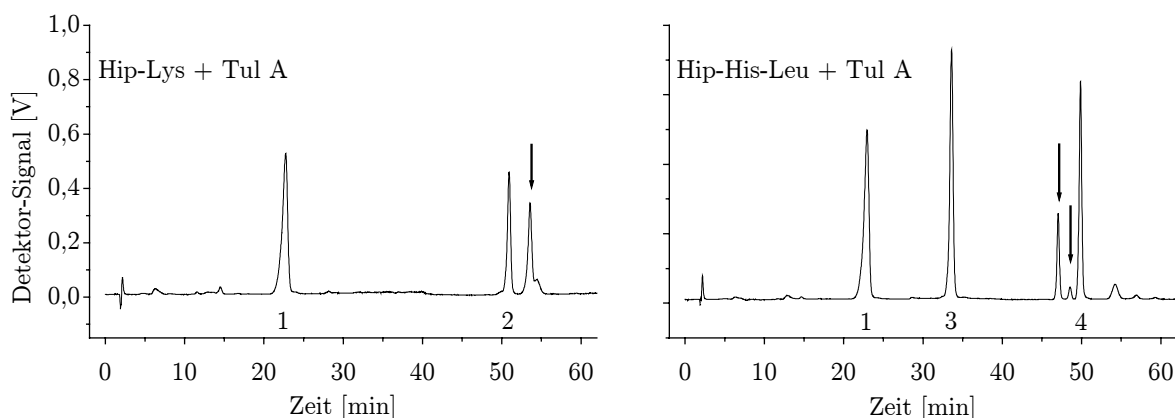


Abb. 4.2-2 ASA-Chromatogramme (Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrin; Detektion: $\lambda = 570 \text{ nm}$) der Hydrolysate der methanolischen Rückflussansätze mit einfachem Überschuss an Tul A nach 6 h (1 - Glycin; 2 - Lysin; 3 - Leucin; 4 - Histidin). Unbekannte neue Peaks sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Im Vergleich zur Inkubation in wässrig-methanolischer Lösung (siehe auch Abb. 4.2-1) fällt auf, dass das Peakspektrum unverändert ist. Jedoch sind deutliche Unterschiede bei den Peakflächen festzustellen. Im Ansatz von Tul A mit Hip-Lys konnte nun eine Abnahme des Lysin-Peaks um ca. 58 % gegenüber dem Blindwert verzeichnet werden. Der bereits im Inkubationsansatz detektierbare neue Peak im basischen Bereich des

ASA-Chromatogramms ist deutlich größer geworden. Im Ansatz von Tul A mit Hip-His-Leu ist die Veränderung gegenüber dem wässrig-methanolischen Inkubationsansatz weniger deutlich. Die Peakfläche von Histidin verringerte sich bei der Reaktion unter Rückfluss nur um 35 % gegenüber der Blindinkubation. Dem entsprechend veränderten sich auch die Peakflächen der neuen Peaks nur geringfügig. Um den Verlauf der Reaktion von Tulipalin A mit den Peptiden während des Kochens unter Rückfluss verfolgen zu können, wurden nach definierten Zeitabständen Proben für eine Aminosäureanalyse entnommen. Eine Entnahme von Aliquoten mit definierten Konzentrationen aus den heißen methanolischen Ansätzen ist nicht möglich. Ein Vergleich der Zusammensetzung der Ansätze zu den verschiedenen Zeitpunkten, über mittels analytischer HPLC bestimmter Peakflächen schließt sich daher aus. Der Vorteil der Aminosäureanalyse gegenüber der HPLC ist, dass bei der salzsauren Hydrolyse freigesetztes Glycin als innerer Standard verwendet werden kann. Nachteilig ist, dass hier nur säurestabile und ninhydrinpositive Reaktionsprodukte erfasst werden können. Der zeitliche Verlauf der Reaktionen unter Rückfluss ist in Abb. 4.2-3 grafisch dargestellt.

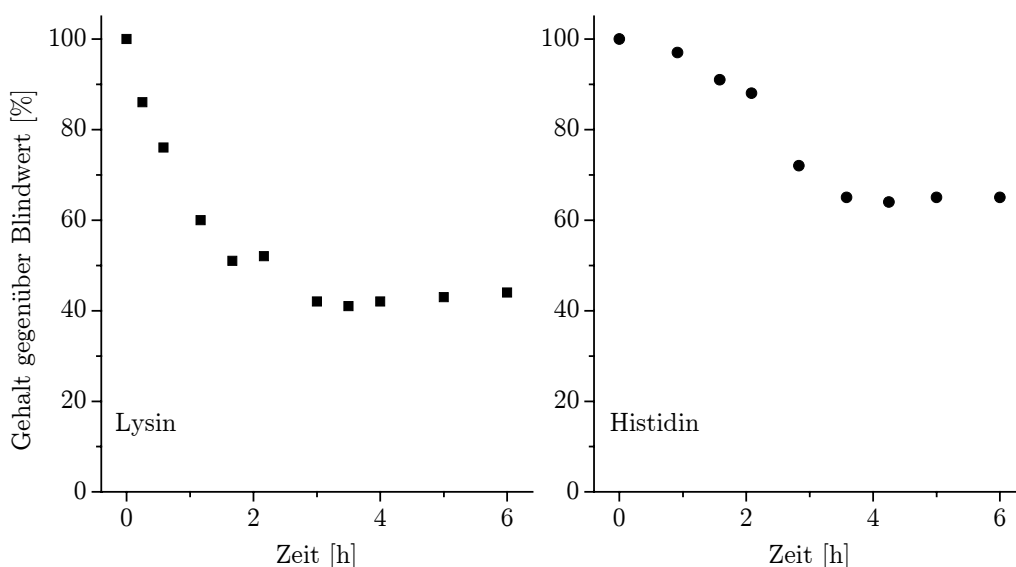


Abb. 4.2-3 Abnahme der Gehalte der Aminosäuren Lysin und Histidin in Rückflussansätzen der Hippuryl-Derivate mit einfachem Überschuss an Tul A; Ergebnis der Aminosäureanalyse nach Säurehydrolyse

Die Aminosäureanalyse des Rückflussansatzes von Hip-Lys mit Tul A zeigte, dass sich gleich zu Beginn der Reaktion die Konzentration von Lysin gegenüber Glycin schnell verringert. Bereits nach 3,5 Stunden konnten nur noch ca. 40% unmodifiziertes Lysin wiedergefunden werden. Dieses Ergebnis spricht für eine hohe Reaktivität von Tul A gegenüber der ϵ -Aminogruppe dieser Aminosäure im Peptidverband. Im weiteren Verlauf der Reaktion veränderte sich die Konzentration an Lysin nicht mehr. Im

Vergleich zum Reaktionsansatz mit Hip-His-Leu fällt auf, dass die Reaktivität von Tul A gegenüber Histidin unter diesen Reaktionsbedingungen geringer als gegenüber Lysin ist. So lagen nach ca. 3,5 Stunden Reaktionsdauer noch 65% des zu Beginn eingesetzten Histidin unverändert vor. Nach ca. 4 Stunden war im Reaktionsansatz keine weitere Abnahme der Konzentration an Histidin festzustellen. Die deutlichen Umsetzungen an der Lysinseitenkette und nach Umstellung des Elutionsgradienten auch die an der Histidinseitenkette waren nun auch mittels analytischer HPLC detektierbar (siehe Abb. 4.2-4).

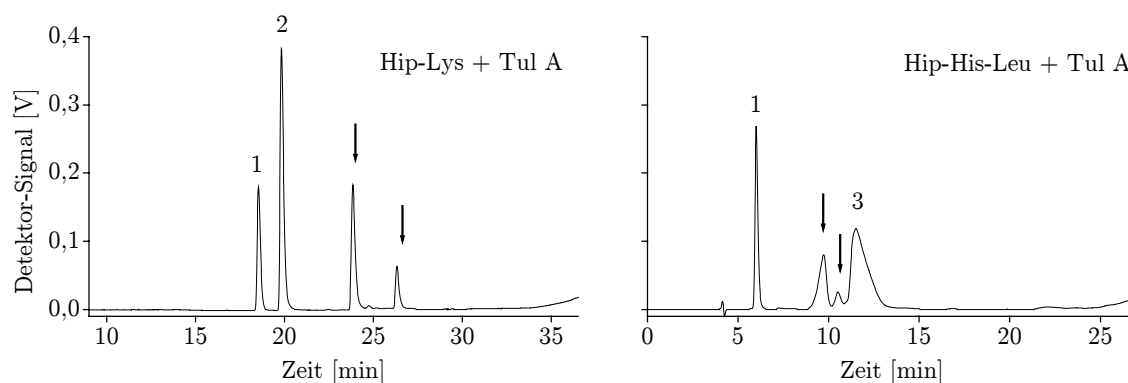


Abb. 4.2-4 HPLC-Chromatogramme (UV-Detektion: $\lambda = 230$ nm) der Rückflussansätze der Hippuryl-Derivate mit einfachem Überschuss an Tul A (1 - Tul A; 2 - Hip-Lys; 3 - Hip-His-Leu). Unbekannte neue Peaks sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Das mittels ASA bestimmbare Konzentrationsverhältnis von Leucin zu Glycin blieb während der gesamten Reaktionsdauer konstant, was dafür spricht, dass hier wie erwartet keine Reaktion stattfindet. Im HPLC-Chromatogramm des Rückflussansatzes aus Tul A und Hip-Lys sind neben den Ausgangsstoffen zwei zusätzliche Peaks erkennbar. Diese weisen jeweils ein Absorptionsmaximum bei 230 nm auf und sind somit wahrscheinlich modifizierte Hippuryl-Peptide. Bemerkenswert ist hier der Unterschied zur Aminosäureanalyse, wo lediglich ein neuer Peak detektiert werden konnte. Das HPLC-Chromatogramm des Rückflussansatzes von Tul A und Hip-His-Leu zeigt neben den Ausgangsstoffen ebenfalls zwei neue Peaks die jeweils ein Absorptionsmaximum bei 230 nm aufweisen. Neben der Anzahl entspricht auch das Peakflächenverhältnis dieser Peaks in etwa dem Verhältnis der im Chromatogramm der Aminosäureanalyse detektierten modifizierten Aminosäuren. Die gleichfalls untersuchten Rückflussansätze der Hippuryl-Derivate mit einem äquimolaren Zusatz an Tul A ergab ein qualitativ gleiches Ergebnis, jedoch blieben die Umsatzraten hinter denen mit einfachem molaren Überschuss an Tul A zurück.

4.2.3 Zusammenfassung der Vorversuche

Zusammenfassend lässt sich aussagen, dass Wasser als Bestandteil des Lösungsmittels bei der Reaktion von kontaktallergenen Substanzen mit nukleophilen Aminosäureseitenketten ungeeignet ist. Lediglich bei einem sehr potenten Kontaktallergen, dem Tul A, ließen sich bei Anwesenheit von Wasser Reaktionsprodukte nachweisen, wenn auch nur in geringer Menge. Ein Wechsel auf reines Methanol als Lösungsmittel und eine Verschärfung der Reaktionsbedingungen, bewirkte eine wesentliche Erhöhung des Umsatzes. Qualitativ waren aber die gleichen Reaktionsprodukte detektierbar.

4.3 Rückflussansätze mit Modellpeptiden als Screening

Nach den Erkenntnissen aus den Vorversuchen mit Tul A und Hip-Lys bzw. Hip-His-Leu wurde der Reaktionsansatz unter Rückflussbedingungen nun als Screening-Test eingesetzt. Ziel war es dabei, festzustellen ob die untersuchten kontaktallergenen Substanzen Geraniol, 7-Hydroxycitronellal, Benzaldehyd, Salicylaldehyd, Vanillin, Zimtaldehyd, α -Amyl-zimtaldehyd und Benzylcinnamat in der Lage sind mit den nukleophilen Aminosäureseitenketten in den jeweiligen Modellpeptiden zu reagieren. Ausgewählt wurden zusätzlich zu den bereits verwendeten Peptiden Hip-Lys und Hip-His-Leu die Peptide N ^{α} -Hippuryl-Arginin (Hip-Arg) und Glutathion als Modelle für die nukleophilen Aminosäuren Arginin und Cystein im Proteinverband. Zum Nachweis eventueller Reaktionsprodukte bietet dabei die analytische HPLC die Möglichkeit, die Zusammensetzung der Reaktionsansätze schnell und einfach zu erfassen. Zusätzlich wurden die Ansätze mit Hilfe der Aminosäureanalyse nach Säurehydrolyse untersucht. Als Vergleich dienten Blindreaktionsansätze der jeweiligen Reaktionspartner.

4.3.1 Rückflussansätze mit N ^{α} -Hippuryl-lysin

7-Hydroxycitronellal

Im Verlauf der Reaktion nimmt die Lösung eine recht deutliche Gelbfärbung an. Die Untersuchung des Ansatzes mit Hilfe der analytischen HPLC zeigt, dass sich die Peakfläche des Hip-Lys-Peaks gegenüber einem Blindansatz von Hip-Lys um ca. 35 % verringert (siehe Abb. 4.3-1). Eine solche Abschätzung durch Vergleich mit einem Blindansatz ist für 7-Hydroxycitronellal leider nicht möglich, da es nicht in der Lage ist, UV-Licht zu absorbieren. Es ist daher auch im Chromatogramm "unsichtbar". Neben dem Ausgangsstoff Hip-Lys sind im Chromatogramm des Rückflussansatzes mehrere neue Peaks detektierbar, welche darauf hinweisen, dass eine Reaktion zwischen 7-Hydroxycitronellal und dem Peptid stattgefunden hat. Durch die Vielzahl der Peaks lässt sich an dieser Stelle nur über die Art der Reaktion spekulieren. Es scheint, dass

mehrere Reaktionswege und eventuelle Folgereaktionen möglich sind. Da eine Untersuchung des Rückflussansatzes mittels Aminosäureanalyse nach Säurehydrolyse keinen Unterschied zum Blindansatz des Hip-Lys zeigte, ist jedoch die Aussage möglich, dass die entstehenden Produkte nicht säurestabil sind.

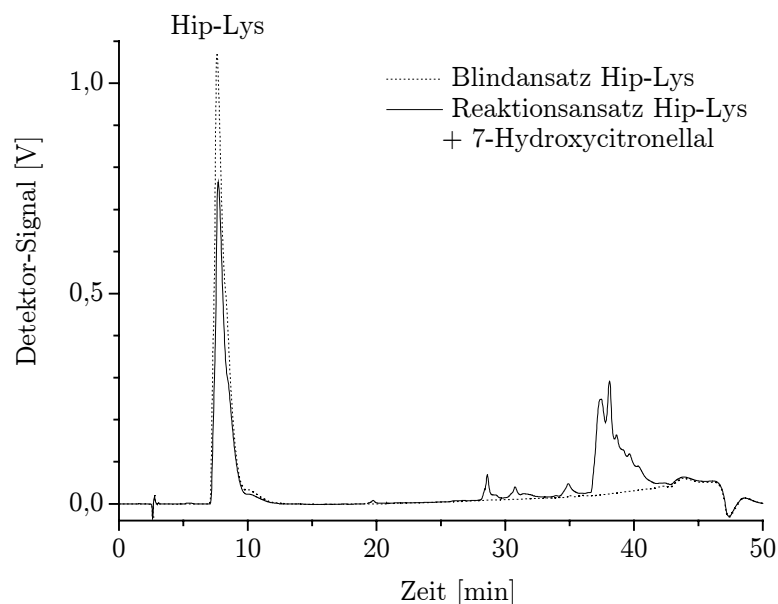


Abb. 4.3-1 RP-HPLC-Chromatogramm (UV-Detektion: $\lambda = 230 \text{ nm}$) des Rückflussansatzes von Hip-Lys mit einfachem Überschuss an 7-Hydroxycitronellal (nicht UV-aktiv) im Vergleich zum Blindansatz des Ausgangsstoffes

Zimtaldehyd

Bereits wenige Minuten nach Beginn der Reaktion war eine Verfärbung der Lösung nach Orange zu beobachten. Im weiteren Verlauf wurde die Farbe stetig intensiver und dunkler, bis sie am Ende einen dunklen Brauntönen annahm. Das RP-HPLC-Chromatogramm des Rückflussansatzes (siehe Abb. 4.3-2) zeigt gegenüber dem Blindansatz von Hip-Lys eine Verringerung der Peakfläche des Hip-Lys-Peaks um rund 40 %. Beim Vergleich der Peakflächen der Zimtaldehydpeaks ist sogar eine Verringerung um 75 % gegenüber dem Blindansatz festzustellen (berechnet aus den Peakflächen bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum von Zimtaldehyd). Diese ungleichen Umsatzraten sprechen dafür, dass wahrscheinlich mehrere Zimtaldehyd-Moleküle mit einem Hip-Lys-Molekül reagieren. Durch verschiedene Reaktionsmechanismen und eventuelle Folgereaktionen ist eine Vielzahl an Reaktionsprodukten denkbar, was sich auch an Hand der Anzahl neuer Peaks im Reaktionsansatz zu bestätigen scheint. Der zweite Peak, der neben Zimtaldehyd im Blindansatz detektierbar ist, ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf Zimtsäure, ein Oxidationsprodukt des Zimtaldehyds, zurückzuführen. Eine Untersuchung des Reaktionsansatzes mittels Aminosäureanalyse nach Säurehydrolyse zeigte wie im Falle

des 7-Hydroxycitronellals keine Veränderung des Peakspektrums gegenüber dem Blindansatz von Hip-Lys. Dies spricht auch hier dafür, dass bei der Reaktion von Zimtaldehyd mit Hip-Lys keine säurestabilen Konjugationsprodukte entstehen.

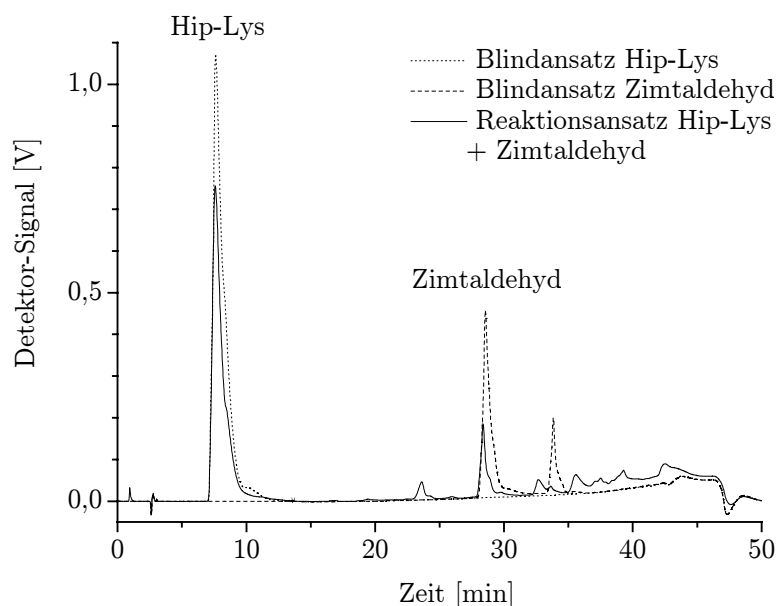


Abb. 4.3-2 RP-HPLC-Chromatogramm (UV-Detektion: $\lambda = 230 \text{ nm}$) des Rückflussansatzes von Hip-Lys mit einfachem Überschuss an Zimtaldehyd im Vergleich zu den Blindansätzen der Ausgangsstoffe

Geraniol, Benzaldehyd, Salicylaldehyd, Vanillin, α -Amyl-zimtaldehyd, Benzylcinnamat

Mit Ausnahme des Benzylcinnamat war bei allen Rückflussansätzen dieser Substanzen mit Hip-Lys, wie beim Zimtaldehyd oder beim 7-Hydroxycitronellal, im Verlauf der Reaktion eine Verfärbung der Lösung beobachtbar, welche in den Blindansätzen nicht zu beobachten war. Geraniol, Benzaldehyd, Vanillin und α -Amyl-zimtaldehyd gaben eine blassgelbe Färbung. Salicylaldehyd, welches selbst eine gelbe Flüssigkeit ist, ergab im Laufe der Reaktion eine intensive Gelbfärbung. Reaktionsprodukte ließen sich aber weder mit Hilfe der HPLC, noch mittels Aminosäureanalyse nach Säurehydrolyse nachweisen. Auch eine Verringerung des Gehaltes an den Ausgangsstoffen war im Vergleich zu gleich behandelten Blindansätzen nicht feststellbar.

4.3.2 Rückflussansätze mit N^α-Hippuryl-histidin-leucin

Im Gegensatz zu dem im Rahmen der Vorversuche durchgeführten Rückflussansatz mit Tul A und Hip-His-Leu konnte in keinem der entsprechenden Rückflussansätze aus Hip-His-Leu mit Geraniol, 7-Hydroxycitronellal, Benzaldehyd, Salicylaldehyd, Vanillin, Zimtaldehyd, α -Amyl-zimtaldehyd bzw. Benzylcinnamat ein Hinweis auf eine eventuell stattfindende Reaktion gefunden werden. Lediglich beim Zimtaldehyd war eine leichte gelbliche Verfärbung der Lösung zu bemerken, aber auch hier konnten mit Hilfe der

analytischen HPLC bzw. der Aminosäureanalyse nach Säurehydrolyse keine Reaktionsprodukte oder eine Verringerung der Konzentration der Ausgangsstoffe festgestellt werden.

4.3.3 Rückflussansätze mit N^α-Hippuryl-arginin

Bei den Rückflussansätzen der kontaktallergenen Substanzen Tulipalin A, Geraniol, 7-Hydroxycitronellal, Benzaldehyd, Salicylaldehyd, Vanillin, Zimtaldehyd, α -Amyl-zimtaldehyd bzw. Benzylcinnamat mit dem Modellpeptid Hip-Arg konnten mit Hilfe der verwendeten Untersuchungsmethoden keine Hinweise auf eine Reaktion an dieser nukleophilen Aminosäureseitenkette gefunden werden.

4.3.4 Rückflussansätze mit Glutathion

Die UV-Detektion von Glutathion (GSH) und eventuellen Reaktionsprodukten gestaltet sich etwas schwieriger als bei den Hippuryl-Peptiden, da GSH kein spezifisches Absorptionsmaximum im UV-Bereich besitzt. Für die Detektion wurde daher eine Wellenlänge von 205 nm verwendet. In den Rückflussansätzen von GSH mit den untersuchten kontaktallergenen Substanzen wurden lediglich im Falle des Tul A Hinweise auf eine Reaktion festgestellt. Hier konnte im HPLC-Chromatogramm des Rückflussansatzes ein neuer Peak detektiert werden (siehe Abb. 4.3-3). Zur Absicherung, dass es sich hier nicht um die oxidierte Form des GSH handelt, wurde der Reaktionsansatz zusätzlich mit Hilfe der LC-MS untersucht.

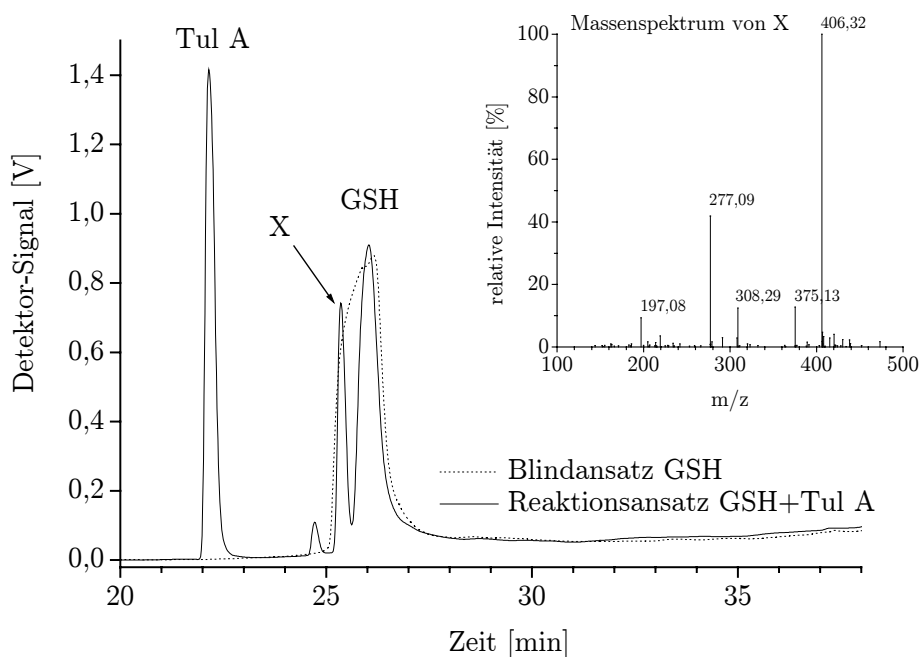
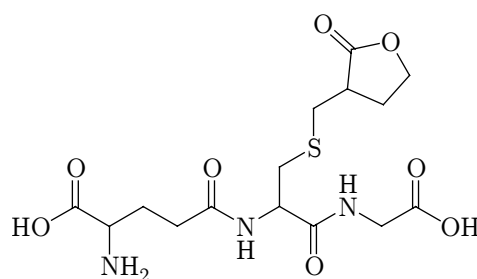


Abb. 4.3-3 RP-HPLC-Chromatogramm (UV-Detektion: $\lambda = 205$ nm) des Rückflussansatzes von Glutathion (GSH) mit einfachem Überschuss an Tul A im Vergleich zum Blindansatz von GSH mit Massenspektrum des unbekanntes Peaks X

Für den unbekanntenen Peak wurde dabei eine Molekülion-Massenzahl von 406,32 ermittelt. Dies deutet auf ein Monoaddukt von Tul A an GSH hin. Denkbar wären hier Reaktionen nach Art der Michael-Addition (vgl. 2.7.1) sowohl an der Thiolgruppe des Cysteins als auch an der α -Aminogruppe der Glutaminsäure. Reaktionen von α,β -ungesättigten γ -Lactonen oder Ketonen mit Thiolen sind in der Literatur seit langem bekannt (*Kupchan et al., 1970; Nilsson et al., 2001*). Auch Reaktionen der Thiolgruppe des Glutathions mit Sesquiterpenlactonen, welche eine α -Methylen- γ -butyrolacton-gruppe als Strukturmerkmal aufweisen, sind in der Literatur beschrieben (*Hall et al., 1977; Picman et al., 1979*). Nebenreaktionen an der α -Aminogruppe der Glutaminsäure scheinen dabei keine Bedeutung zu haben. Es ist daher wahrscheinlich, dass es sich bei der detektierten Substanz X um das "Michael-Addukt" von Tul A an die Thiolgruppe des Cysteins handelt (siehe Abb. 4.3-4).



25

Abb. 4.3-4 Strukturvorschlag für die im Rückflussansatz von GSH und Tul A detektierte Substanz X

4.3.5 Zusammenfassung der Rückflussansätze mit Modellpeptiden

Insgesamt haben nur drei der ausgewählten kontaktallergenen Substanzen Tulipalin A, Geraniol, 7-Hydroxycitronellal, Benzaldehyd, Salicylaldehyd, Vanillin, Zimtaldehyd, α -Amyl-zimtaldehyd und Benzylcinnamat mit den Modellpeptiden Hip-Lys, Hip-His-Leu, Hip-Arg und Glutathion reagiert. Es sind dies mit Tul A, Zimtaldehyd und 7-Hydroxycitronellal auch die nach Literaturdaten (vgl. auch 2.6.3) potentesten Kontaktallergene unter den untersuchten Stoffen. Während Zimtaldehyd und 7-Hydroxycitronellal lediglich mit peptidgebundenem Lysin reagieren, ist beim Tul A auch eine Reaktion mit peptidgebundenem Histidin bzw. Cystein möglich. Bezüglich der Umsatzraten gegenüber Lysin ist sogar eine Korrelation zu dem kontaktallergenen Potential des Stoffes zu erkennen. Unter den gewählten Bedingungen (4 Stunden Kochen unter Rückfluss in methanolischer Lösung bei einfachem molaren Überschuss an Hapten) reagiert Tul A deutlich stärker als Zimtaldehyd und dieses geringfügig stärker als 7-Hydroxycitronellal. Die Aminosäure Arginin scheint bei den hier untersuchten Stoffen keine Rolle bei Konjugationsreaktionen an Proteine zu spielen.

4.4 Inkubationsansätze in methanolischer Lösung

Mit Ausnahme des Tulipalin A, für das Reaktionsprodukte mittels Aminosäureanalyse detektierbar und mit Hilfe des internen Standards Glycin auch quantifizierbar sind, ist mit den Rückflussansätzen in methanolischer Lösung lediglich eine Aussage bezüglich der Reaktivität gegenüber den nukleophilen Aminosäureseitenketten möglich. Über den zeitlichen Verlauf der Reaktion lässt sich auf Grund der ungenauen Aliquotentnahme aus heißen methanolischen Medien keine Aussage treffen. Um dennoch eine Aussage über den zeitlichen Verlauf der Reaktionen treffen zu können und zusätzlich zu überprüfen, ob die gleichen Reaktionsprodukte auch bei mildereren, physiologisch angenäherten Bedingungen entstehen, wurden methanolische Reaktionsansätze mehrere Wochen bei 37 ° C inkubiert. Auf Grund der geringeren Löslichkeit von N^α-Hippuryl-lysin in methanolischer Lösung in der Kälte wurde die Konzentration an Peptid auf 10 mM verringert. Die Haptene wurden dabei im äquimolaren Verhältnis bzw. im einfachen Überschuss zugesetzt, bei Inkubationen mit Tul A zusätzlich noch im vierfachen Überschuss. Um die Reaktion der Peptide Hip-Lys bzw. Hip-His-Leu mit den kontaktallergenen Substanzen unter physiologisch angenäherten Bedingungen verfolgen zu können, wurden nach definierten Zeitabständen Aliquote der Ansätze abgenommen und bezüglich ihrer Zusammensetzung untersucht. Da vor allem zu Beginn der Inkubation die Aliquote aus den Ansätzen in sehr kurzen Zeitabständen entnommen wurden, konnte die Messung mittels analytischer HPLC in der Regel nicht unmittelbar nach Entnahme durchgeführt werden. Eine Messung der Proben konnte sich dabei bis zu mehreren Tagen verzögern. Auf Grund der in den vorangegangenen Versuchen gewonnenen Erkenntnis, dass die Anwesenheit von Wasser die Reaktivität zumindest stark herabsetzt, wurden die entnommenen Aliquote sofort nach Entnahme mit einem Methanol-Wasser-Gemisch (20:80 v/v) verdünnt. Dies führte zu einem Abbruch der Reaktion, ohne dass die Zusammensetzung der Komponenten beeinflusst wurde. Die Lagerstabilität dieser verdünnten Proben, wurde dadurch sichergestellt, dass bereits analysierte verdünnte Proben nach mehreren Wochen erneut untersucht wurden. Dabei wurden die gleichen Peakflächen wiedergefunden. Nachfolgereaktionen bei der Lagerung zwischen Entnahme und Messung der Proben konnten somit weitestgehend ausgeschlossen werden.

4.4.1 N^α-Hippuryl-lysin und Tulipalin A

Das Peakspektrum im HPLC-Chromatogramm des Inkubationsansatzes (Abb. 4.4-1) insgesamt unterscheidet sich von dem des Rückflussansatzes (vergleiche Abb. 4.2-4) lediglich hinsichtlich eines Peaks, welcher auch bei der Blindinkubation des Tul A detektierbar ist. Er zeigte sich bei der Inkubation von N^α-Hippuryl-lysin und Tulipalin A in methanolischer Lösung bei 37 ° C bereits nach einer Stunde neben den Ausgangsstoffen im HPLC-Chromatogramm. Er besitzt, ebenso wie Tul A, ein

Absorptionsmaximum bei 210 nm. Außerdem fehlt im UV-Spektrum (DAD) des Peaks das für den Hippurylsäurerest charakteristische Profil mit dem Absorptionsmaximum bei 230 nm. Somit kann ausgeschlossen werden, dass es sich um ein Konjugationsprodukt von Tul A an Hip-Lys handelt. Es kann vielmehr angenommen werden, dass hier ein Autolyseprodukt des Tul A vorliegt.

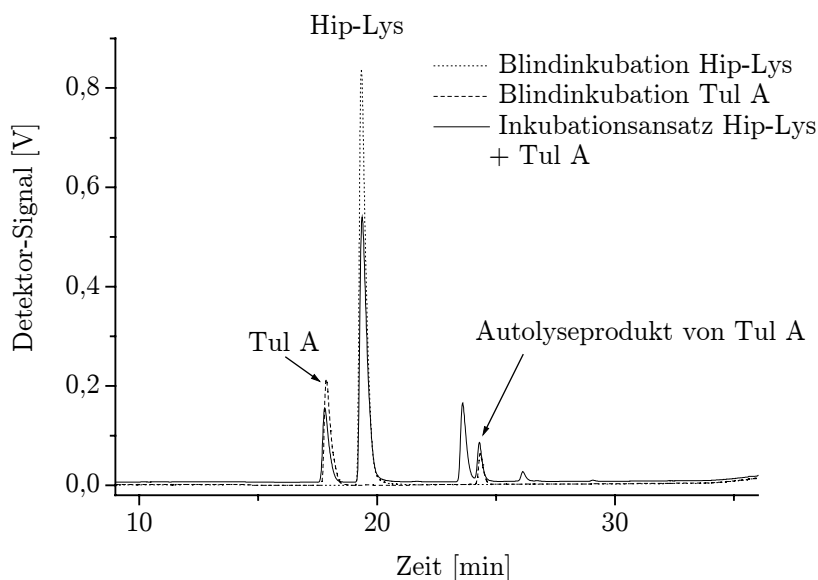


Abb. 4.4-1 RP-HPLC-Chromatogramm (Ausschnitt; UV-Detektion: $\lambda = 230$ nm) der Inkubation von Hip-Lys mit einfachem Überschuss an Tul A im Vergleich mit denen der Blindinkubationen der Ausgangsstoffe Hip-Lys und Tul A nach vier Wochen Inkubation bei 37°C

Nach zwei Stunden Inkubationszeit konnte in den Inkubationsansätzen aller drei Konzentrationsverhältnisse der erste Produktpeak bei einer Retentionszeit von 23,8 min detektiert werden. Seine Peakfläche war dabei abhängig von der im Ansatz vorhandenen Konzentration an Tul A. Je mehr Tul A im Ansatz vorhanden war, desto größer war die Peakfläche. Der zweite Produktpeak mit einer Retentionszeit von 25,9 min war dann nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden erstmals in den Ansätzen mit einfachem und vierfachem Überschuss an Tul A bestimmbar und nach einer weiteren Stunde Inkubationszeit auch im Ansatz mit dem äquimolaren Zusatz. Gleichzeitig konnte eine signifikante Verringerung der Peakflächen der Ausgangsstoffe festgestellt werden. Im Ansatz mit äquimolarem Zusatz an Tul A nahm die Konzentration des Peptids bereits nach ca. 7 Tagen nicht weiter ab, wohingegen sich die Konzentration an Hip-Lys im Ansatz mit fünffachem Haptenüberschuss bis zum 20. Tag verringerte. Nach insgesamt vier Wochen wurde die Inkubation beendet, da in den Ansätzen keine weitere Abnahme der Konzentration an Hip-Lys zu verzeichnen war. Bezüglich der Umsatzrate ist ebenfalls eine deutliche Abhängigkeit von der Menge des zugesetzten Haptens festzustellen. So bleiben in dem Ansatz mit äquimolarem

Haptenzusatz 82 % und bei einfachem Haptenüberschuss ca. 66 % des Hippuryl-Lysin unverändert. Der größte Umsatz wurde im Ansatz mit vierfachem Überschuss an Tul A gemessen. So wurden nach 28 Tagen Inkubation nur noch knapp 53 % des ursprünglich eingesetzten Hip-Lys wiedergefunden (siehe Abb. 4.4-2).

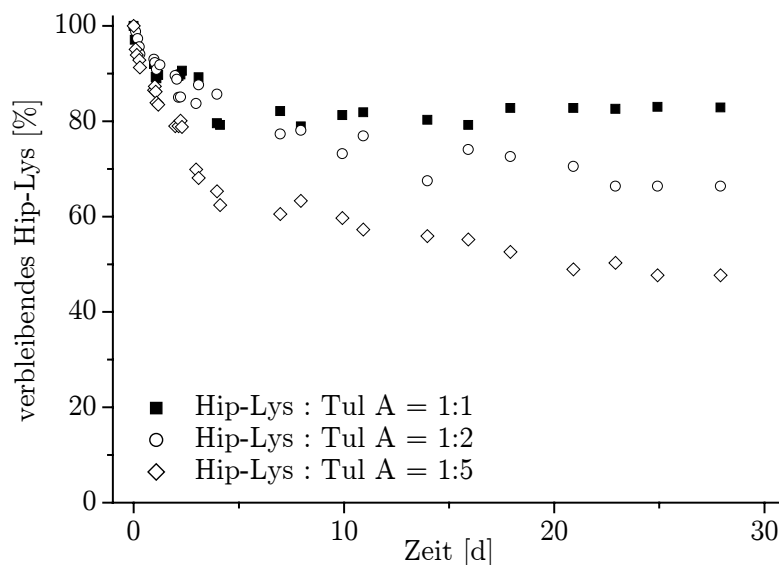


Abb. 4.4-2 Abnahme des Gehaltes an Hip-Lys während der Inkubation in methanolischer Lösung bei 37 °C mit Tul A in verschiedenen molaren Verhältnissen

Wenn man die im Blindansatz von Tul A festgestellte Autolysereaktion in die Berechnung einbezieht, ergibt sich für die Abnahme des Gehaltes an Tul A ein nahezu gleicher Kurvenverlauf. Dies spricht dafür, dass jeweils ein Molekül Tul A mit einem Molekül Hip-Lys reagiert. Vergleicht man die erzielten Umsatzraten mit denen des Rückflussansatzes, so wird deutlich, dass die Reaktivität von Tul A gegenüber Hip-Lys bei physiologischen Temperaturbedingungen geringer ist.

4.4.2 N^α-Hippuryl-lysin und 7-Hydroxycitronellal

Ein Vergleich des HPLC-Chromatogramms des Inkubationsansatzes (Abb. 4.4-3) mit dem des Rückflussansatzes (Abb. 4.3-1) zeigt eine scheinbare Veränderung in der Zusammensetzung des Peakspektrums. Jedoch muss erwähnt werden, dass bei der Untersuchung der Inkubationsansätze eine geringere Stoffmenge im Einspritzvolumen enthalten war. Dies und die Verwendung einer neuen HPLC-Säule bewirken eine bessere Auftrennung und somit auch eine Veränderung des Chromatogramms. Gleichbleibend ist die im Vergleich zur Reaktion von Tul A mit Hip-Lys deutlich höhere Anzahl an in den Blindansätzen nicht feststellbaren Peaks. Bis auf eine Ausnahme, den Peak bei einer Retentionszeit von 38,5 min, besitzen alle Peaks ein Absorptionsmaximum bei 230 nm, was dafür spricht, dass es sich hierbei um Derivate

von Hip-Lys handelt. Darauf deutet auch die starke Verringerung des Gehaltes an Hip-Lys im Inkubationsansatz hin.

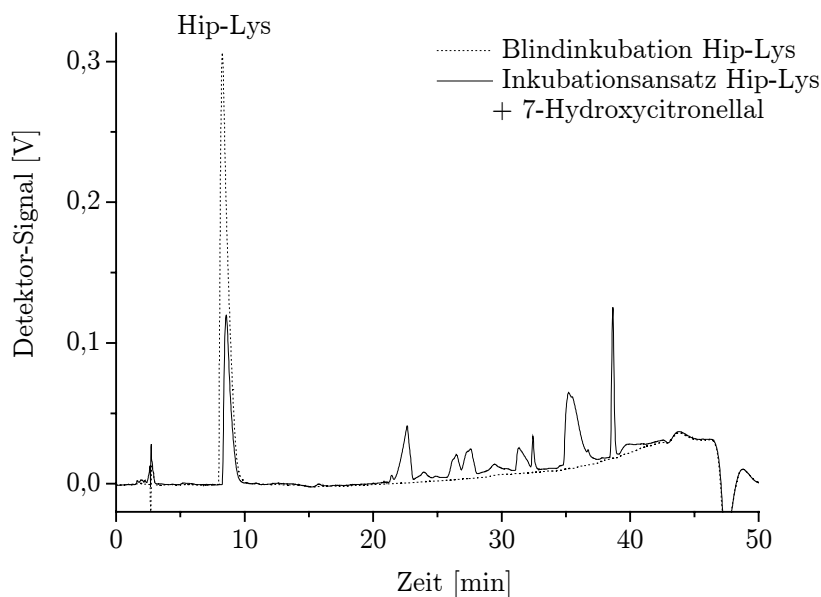


Abb. 4.4-3 RP-HPLC-Chromatogramm (UV-Detektion: $\lambda = 230 \text{ nm}$) der Inkubation von Hip-Lys mit einfachem Überschuss an 7-Hydroxycitronellal im Vergleich mit dem der Blindinkubation von Hip-Lys nach 16 Tagen Inkubation bei 37°C

Betrachtet man den Zeitverlauf der Abnahme des Hip-Lys-Gehaltes (siehe Abb. 4.4-4), so fällt auf, dass das Hip-Lys im Inkubationsansatz mit 7-Hydroxycitronellal wesentlich schneller abgebaut wird als im vergleichbaren Ansatz mit Tul A.

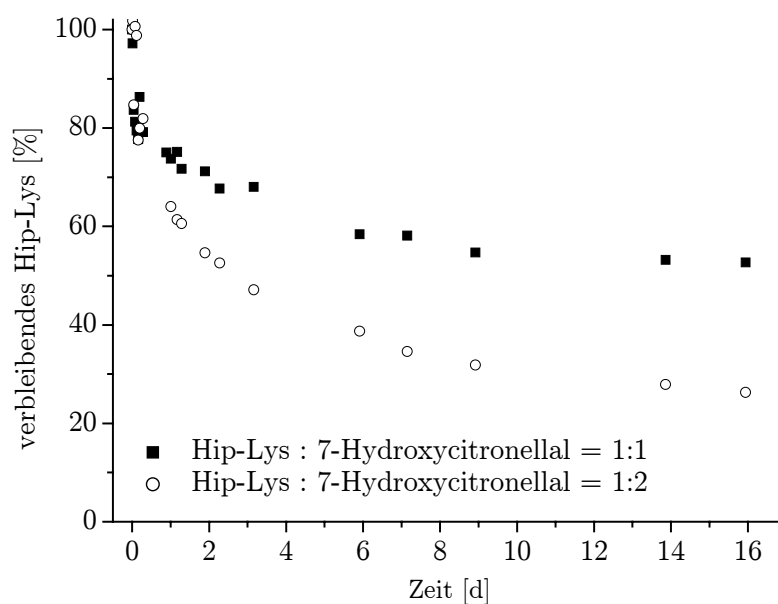


Abb. 4.4-4 Abnahme des Gehaltes an Hip-Lys während der Inkubation in methanolischer Lösung bei 37°C mit 7-Hydroxycitronellal in verschiedenen molaren Verhältnissen

Im äquimolaren Inkubationsansatz sind zu diesem Zeitpunkt lediglich noch 53 % des ursprünglich eingesetzten Hip-Lys detektierbar. Bei einem einfachen molaren Überschuss an 7-Hydroxycitronellal sind es sogar nur noch 26 %. Ein Vergleich mit dem Konzentrationsverlauf des 7-Hydroxycitronellal ist an dieser Stelle leider nicht möglich, da es mit Hilfe eines UV-Detektors nicht detektierbar ist. Insgesamt wird jedoch deutlich, dass im Falle des 7-Hydroxycitronellal die physiologischen Temperaturbedingungen im Gegensatz zu Tul A höhere Umsatzraten in der Reaktion mit Hip-Lys bewirken.

4.4.3 N^α-Hippuryl-lysin und Zimtaldehyd

Während der Inkubation war, wie schon beim Rückflussansatz, eine deutliche Verfärbung der Lösung zu beobachten. Erst blassgelb und im weiteren Verlauf bis hin zu kräftigem braun-orange. Bei der Untersuchung der Inkubationsansätze wurde der Elutionsgradient zur Verbesserung der Auftrennung gegenüber dem Rückflussansatz geringfügig modifiziert. Daher rührt auch die Veränderung des Trennbildes im HPLC-Chromatogramm (siehe Abb. 4.4-5).

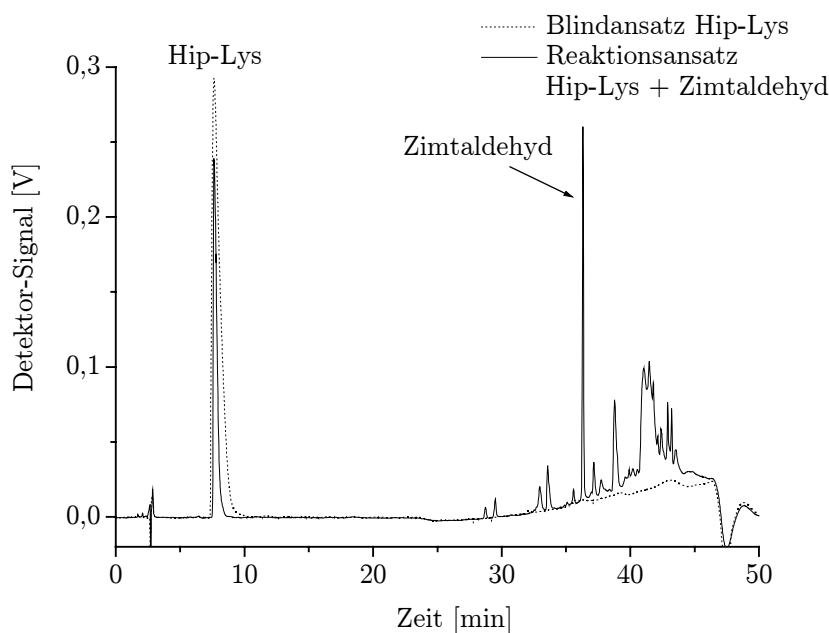


Abb. 4.4-5 RP-HPLC-Chromatogramm (UV-Detektion: $\lambda = 230 \text{ nm}$) der Inkubation von Hip-Lys mit einfachem Überschuss an Zimtaldehyd im Vergleich mit dem der Blindinkubation des Ausgangsstoffes Hip-Lys nach 10 Tagen Inkubation bei 37°C

Ein Vergleich mit der Blindinkubation von Zimtaldehyd wurde hier bewusst unterlassen, da die Peakhöhe des Zimtaldehydpeaks mit 0,7 V die oben stehende Abbildung durch die erforderliche veränderte Achseneinteilung weniger aussagekräftig gemacht hätte. Der Zimtaldehydpeak im Inkubationsansatz weist dagegen lediglich noch eine Peakhöhe von 0,26 V auf. Dies und die ebenfalls im Verlauf der Inkubation

festzustellende starke Abnahme der Konzentration an Hip-Lys weist auf eine hohe Reaktivität des Zimtaldehyds gegenüber Hip-Lys auch bei physiologischen Temperaturbedingungen hin. Bestätigt wird dieser Hinweis durch die Vielzahl neuer Peaks im Chromatogramm, von denen die Mehrzahl ein Absorptionsmaximum bei 230 nm besitzt, was für Hip-Lys-Derivate spricht. Betrachtet man den Zeitverlauf der Abnahme des Gehaltes an Hip-Lys (siehe Abb. 4.4-6), so ist auffallend, dass bereits nach 7 Tagen keine signifikante Verringerung mehr feststellbar ist. Erreicht werden hier trotzdem sehr hohe Umsatzraten. So sind im äquimolaren Inkubationsansatz nach einer Inkubationsdauer von 10 Tagen lediglich noch 57 % des ursprünglich eingesetzten Hip-Lys detektierbar. Bei einem einfachen molaren Überschuss an Zimtaldehyd sind es sogar nur noch 36 %. Damit wird der beim Rückflussansatz erzielte Umsatz wie beim 7-Hydroxycitronellal deutlich übertroffen. Vom Zimtaldehyd sind im Inkubationsansatz mit einfachem molaren Überschuss an Zimtaldehyd nach 10 Tagen noch ca. 40 % wiederzufinden. Das bedeutet, dass bei der Inkubation im Vergleich zum Hip-Lys etwa die doppelte Stoffmenge an Zimtaldehyd verbraucht wird. Dies spricht für Mehrfach- bzw. Folgereaktionen an der nukleophilen Aminosäureseitenkette des Lysins, was wiederum durch die große Anzahl an neuen Peaks im Chromatogramm bestätigt wird.

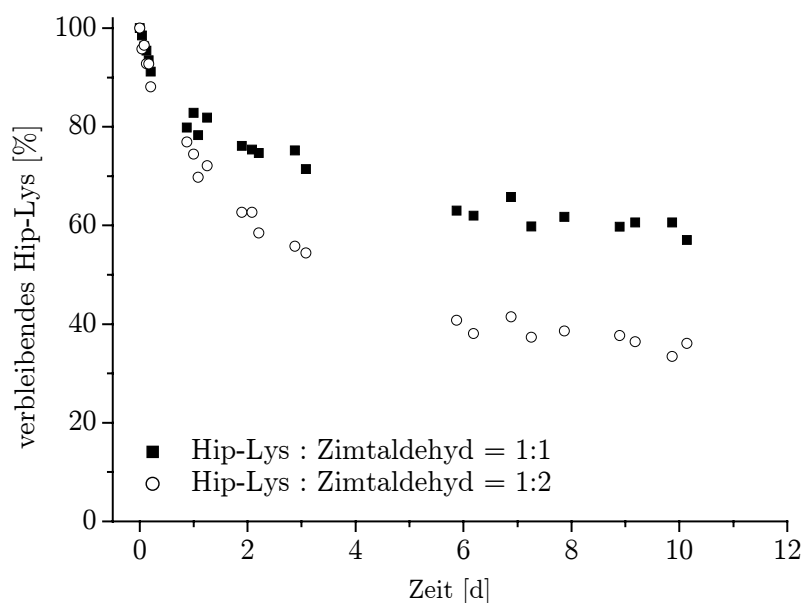


Abb. 4.4-6 Abnahme des Gehaltes an Hip-Lys während der Inkubation in methanolischer Lösung bei 37 °C mit Zimtaldehyd in verschiedenen molaren Verhältnissen

Wie schon im Falle des 7-Hydroxycitronellal bewirken die physiologischen Temperaturbedingungen im Gegensatz zu Tul A höhere Umsatzraten in der Reaktion mit Hip-Lys gegenüber denen unter Rückflussbedingungen.

4.4.4 N^α-Hippuryl-histidin-leucin und Tulipalin A

Wie schon im HPLC-Chromatogramm des Rückflussansatzes von Tul A und Hip-His-Leu (siehe Abb. 4.2-4) sind auch im Chromatogramm des Inkubationsansatzes (siehe Abb. 4.4-7) die zwei bisher detektierbaren Produktpeaks bei Retentionszeiten von 9,9 und 10,9 min festzustellen. Das erste Reaktionsprodukt (9,9 min) konnte in dem äquimolaren Ansatz nach bereits ca. einem Tag Inkubationsdauer detektiert werden. Entsprechend den Betrachtungen zur Abnahme an Hip-Lys während der Inkubation (vgl. 4.4.1), entsteht im Ansatz mit fünffachen Haptenüberschuss wesentlich mehr Produkt, als in den beiden anderen Ansätzen. Das zweite Reaktionsprodukt konnte erst zu einem deutlich späteren Zeitpunkt (etwa nach 7 Tagen) und auch nur in einer geringeren Menge detektiert werden. Nach etwa 20 Tagen Inkubationsdauer waren weitere neue Peaks detektierbar, welche im Rückflussansatz nicht zu finden waren. Diese erscheinen im Spülschritt des Chromatogramms bei Retentionszeiten von rund 25 min. Auch sie weisen das für die Hippurylgruppe charakteristische UV-Spektrum mit dem Absorptionsmaximum bei 230 nm auf, was dafür spricht, dass es sich hierbei auch um Derivate von Hip-His-Leu handelt.

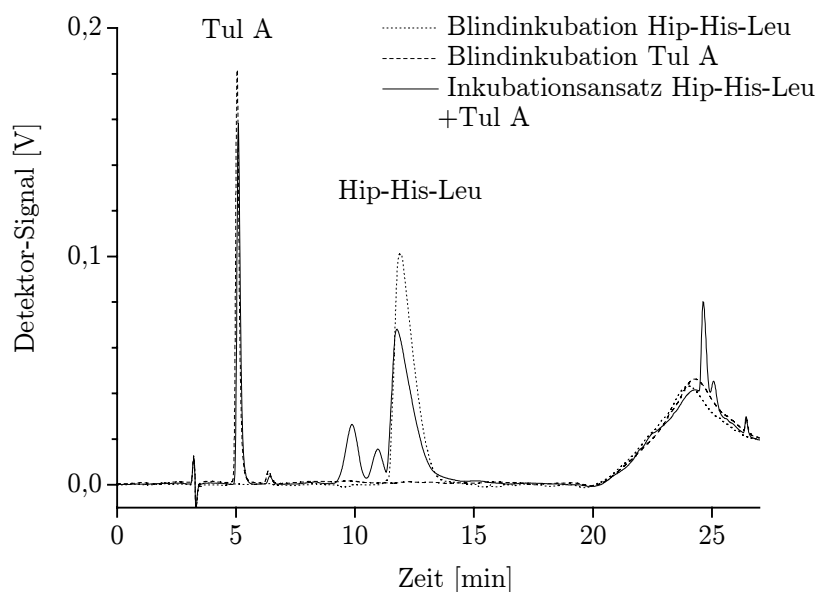


Abb. 4.4-7 RP-HPLC-Chromatogramm (UV-Detektion: $\lambda = 230 \text{ nm}$) der Inkubation von Hip-His-Leu mit einfachem Überschuss an Tul A im Vergleich mit den Blindinkubationen der Ausgangsstoffe Hip-His-Leu und Tul A nach 6 Wochen Inkubation bei 37° C

Der zeitliche Verlauf der Reaktion wird in Abb. 4.4-8 an Hand der Abnahme des Gehaltes an Hip-His-Leu verdeutlicht. Im Vergleich zu den Reaktionen mit Hip-Lys zeigt sich hier ein etwas anderer Verlauf. Während in den Inkubationsansätzen mit Hip-Lys spätestens nach drei Wochen keine signifikante Verringerung der Hip-Lys-

Konzentration mehr feststellbar war, ist bei der Inkubation von Hip-His-Leu mit Tul A auch nach 6 Wochen noch eine Abnahme der Peptidkonzentration in den Ansätzen zu verzeichnen. Die Umsatzraten von Hip-His-Leu unterscheiden sich in den Ansätzen mit äquimolaren Haptenzusatz und einfachen Haptenüberschuss während der gesamten Reaktionsdauer kaum voneinander. Nach 6 Wochen Inkubationsdauer konnten im Ansatz mit äquimolaren Zusatz von Tulipalin A noch 49 % und in dem Ansatz mit einfachem Haptenüberschuss 44 % Hip-Lys wiedergefunden werden.

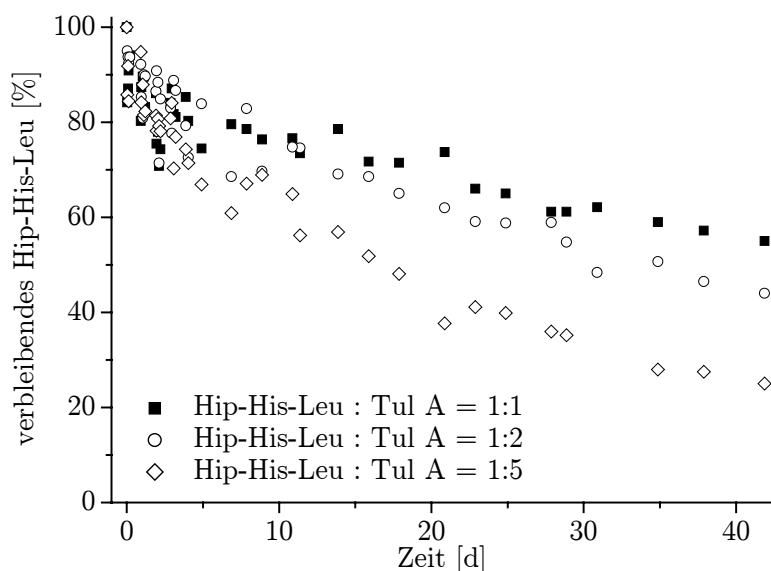


Abb. 4.4-8 Abnahme des Gehaltes an Hip-His-Leu während der Inkubation in methanolischer Lösung bei 37 °C mit Tul A in verschiedenen molaren Verhältnissen

Im Ansatz mit vierfachem Haptenüberschuss liegt die Abnahme der Peptidkonzentration wesentlich höher. So sind nach 6 Wochen Inkubation nur noch 23 % des ursprünglich eingesetzten Hip-His-Leu detektierbar.

4.4.5 Zusammenfassung der Inkubationsansätze

Die qualitative Zusammensetzung der Inkubationsansätze von Tul A mit den Hippuryl-Peptiden entspricht jener der Rückflussansätze. Lediglich im Ansatz mit Hip-His-Leu konnten im HPLC-Chromatogramm nach 20 Tagen mehrere zusätzlich Peaks detektiert werden. Eine Untersuchung des Inkubationsansatzes nach 6 Wochen Inkubationsdauer mit Hilfe der Aminosäureanalyse nach Säurehydrolyse zeigte jedoch keine Veränderung im Peakspektrum gegenüber dem Rückflussansatz. Hinsichtlich des Zimtaldehyds und des 7-Hydroxycitronellals lässt sich eine qualitative Aussage auf Grund der Vielzahl neuer Peaks nicht mit Sicherheit treffen. Bezüglich der erreichbaren Umsatzraten zeigen sich beim Vergleich mit den Rückflussansätzen deutliche Unterschiede (siehe Abb. 4.4-9). Betrachtet man exemplarisch die Ansätze mit einfachem Haptenüberschuss, so fällt auf, dass sich unter physiologischen Temperaturbedingungen

die Reaktivität bzw. die erreichbare Umsatzrate gegenüber peptidgebundenem Lysin im Vergleich zu den Rückflussbedingungen im Falle des 7-Hydroxycitronellals und des Zimtaldehyds erhöht und im Falle des Tul A dagegen erniedrigt. Interessant ist, dass die erreichbare Umsatzrate des Inkubationsansatzes von Tul A mit Hip-His-Leu ebenfalls größer ist als die des Rückflussansatzes. Somit ist die unter 4.3.5 erwähnte Korrelation zwischen dem kontaktallergenem Potential der Haptene und der Reaktivität gegenüber der nukleophilen Aminosäureseitenkette Lysin unter diesen milderen, physiologisch angenäherten Bedingungen nicht gegeben. Betrachtet man jedoch zusätzlich die Reaktion gegenüber Histidin, welches von den untersuchten Substanzen lediglich mit Tul A reagiert, ist Tul A wiederum als das reaktivste Hapten zu betrachten. Gleichzeitig lässt sich schlussfolgern, dass unter physiologischen Temperaturbedingungen die Reaktion von Tul A mit Histidin gegenüber der mit Lysin begünstigt ist.

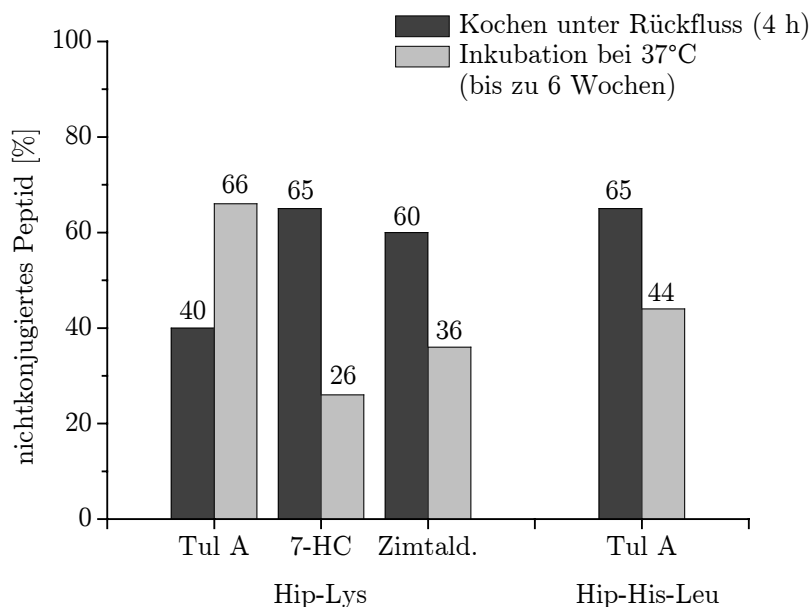


Abb. 4.4-9 Vergleich der Menge unkonjugierten Peptids in Inkubations- und Rückflussansätzen bei einfachem Haptenüberschuss (7-HC = 7-Hydroxycitronellal)

Ein Versuch mit einem Peptid, welches beide Aminosäuren enthält könnte, diese Vermutung verifizieren, leider stand ein solches nicht zur Verfügung. Eine weitere Erkenntnis, welche aus den Inkubationsansätzen gewonnen werden kann, ist, dass in jedem Falle eine Erhöhung der Haptenkonzentration auch zu einer Erhöhung der Umsatzrate des jeweiligen Hippuryl-Peptides führt (siehe Abb. 4.4-10). Dabei werden teilweise recht hohe Konjugationsraten erreicht.

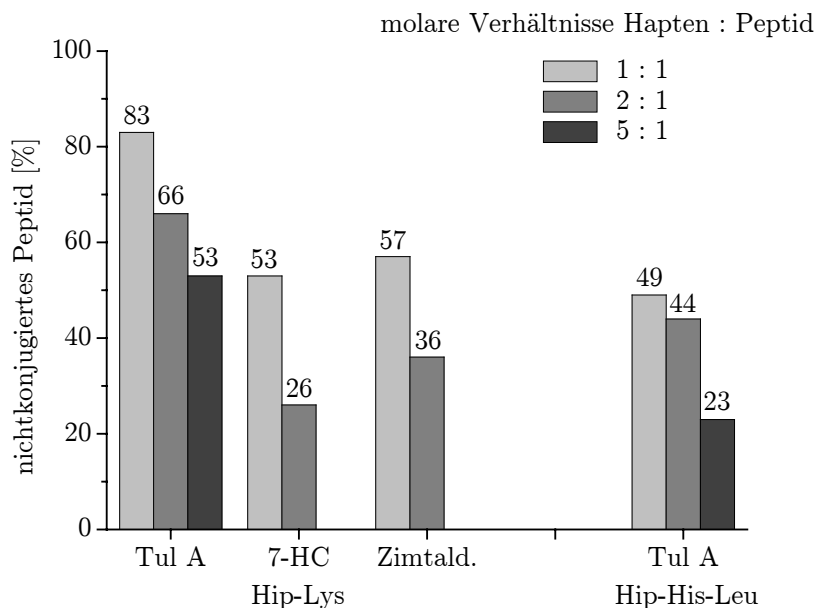


Abb. 4.4-10 Vergleich der verbleibenden unkonjugierten Peptide nach vierwöchiger Inkubation mit Tul A, 7-Hydroxycitronellal (7-HC) bzw. Zimtaldehyd in verschiedenen molaren Verhältnissen bei einer Temperatur von 37 °C

Die aufgeführten Zahlenwerte sind jedoch unter Vorbehalt zu betrachten, da die eingesetzten Konzentrationsverhältnisse in vivo normalerweise nicht erreicht werden. Man muss im Gegenteil davon ausgehen, dass die nukleophilen Aminosäureseitenketten im Überschuss vorliegen.

4.5 Vergleich der analytischen Methoden

Die Umsatzraten der Reaktionen von Tul A mit den Hippuryl-Derivaten von Lysin und Histidin wurden in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen mit verschiedenen analytischen Methoden bestimmt. Im Falle der Reaktionen unter Rückfluss geschah dies mit Hilfe der Aminosäureanalyse und in den Inkubationsansätzen mittels analytischer RP-HPLC. Um die erhaltenen Werte miteinander vergleichen zu können, bedarf es zuvor eines Vergleiches der beiden verwendeten Methoden. Beispielhaft sind in Tab. 4.5-1 die Messwerte von RP-HPLC und Aminosäureanalyse nach Säurehydrolyse der Inkubationsansätze von Hip-Lys und Tul A aufgeführt. Hier zeigt sich, dass beide Methoden annähernd gleiche Werte ergeben. Somit ist erwiesen, dass bei dieser Reaktion beide Methoden hinsichtlich der Bestimmung der Peptidkonzentration als gleichwertig anzusehen sind. Dabei ist die Aminosäureanalyse nach Säurehydrolyse, durch die Möglichkeit auf Glycin als internen Standard zurückgreifen zu können, als die genauere Methode anzusehen. Allgemein gilt dies jedoch nur, wenn bei der Konjugation kontaktallergener Substanzen an nukleophile Aminosäureseitenketten säurestabile Produkte entstehen.

Tab. 4.5-1: Vergleich der mittels Aminosäureanalyse nach Säurehydrolyse bzw. analytischer RP-HPLC bestimmten Umsatzraten von Hip-Lys - Tul A - Inkubationsansätzen nach 335 h Inkubationsdauer

	Aminosäureanalyse Lys/Gly [rel. Fläche *100 %]	HPLC [% Hip-Lys]
Hip-Lys-Referenz	100	100
Hip-Lys : Tul A		
1:2	67	67
1:5	53	56

Deutlich wird dies bei der Reaktion von Zimtaldehyd mit Hip-Lys. Mittels analytischer RP-HPLC konnte eine deutliche Abnahme der Konzentration an Hip-Lys sowie eine Vielzahl neuer Peaks detektiert werden. Bei der Aminosäureanalyse nach Säurehydrolyse wurde jedoch keine Veränderung zum Blindwert festgestellt. Die RP-HPLC ist als Methode zur Analyse der Zusammensetzung der Reaktionsgemische daher zu bevorzugen. Ein weiterer Nachteil der Aminosäureanalyse gegenüber der HPLC-Methode ist der erheblich höhere Zeit- und Arbeitsaufwand.

4.6 Reaktionen mit Acetyl-Derivaten als Screening

Die bisher im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Peptidmodelle reagierten nur vereinzelt mit den Substanzen mit kontaktallergenem Potential. Besonders die in der Literatur beispielsweise von *Doorn und Petersen (2002)* bzw. *Ahlfors et al. (2003)* beschriebenen Reaktionen an der Thiol-Gruppe des Cysteins konnten mit Hilfe des Glutathions als Peptidmodell lediglich am Beispiel des Tulipalin A bestätigt werden. Aus diesem Grunde wurden Aminosäurederivate verwendet, bei denen die α -Aminofunktion durch eine Acetylgruppe geschützt ist. Diese Acetylaminosäuren sollten die Reaktivität der entsprechenden proteingebundenen Aminosäuren gegenüber den elektrophilen kontaktallergen Substanzen widerspiegeln, ohne jedoch eine sterische Hinderung zu erfahren.

4.6.1 Rückflussansätze

Die Rückflussansätze mit den Acetyl-Derivaten der Aminosäuren orientierten sich methodisch an den bisher durchgeführten Rückflussansätzen zur generellen Feststellung der Reaktivität der untersuchten Haptene gegenüber den nukleophilen Aminosäureseitenketten (vgl. auch 4.3). Die Konzentration der hier als Carrierpeptid fungierenden Acetyl-Derivate konnte jedoch im Vergleich auf Grund der geringfügig besseren Löslichkeit etwas höher gewählt werden.

N^α-Acetyl-lysin

Die Rückflussansätze mit N^α-Acetyl-lysin (Ac-Lys) bestätigen die Untersuchungen mit Hip-Lys. Auch hier sind ausschließlich in den Ansätzen mit Tul A, 7-Hydroxycitronellal und Zimtaldehyd Veränderungen zu den Blindansätzen festzustellen. Anhand der Peakflächenverhältnisse von Blindansatz zu Reaktionsansatz lassen sich auch die Umsatzraten grob abschätzen. Sie sind in Abb. 4.6-1 grafisch dargestellt. Im Vergleich zu Hip-Lys ist die mittels RP-HPLC bestimmbare Abnahme an Modellcarrier deutlich höher (vgl. Abb. 4.4-9). Dies belegt die vermutete geringere sterische Behinderung der Reaktion durch den Einsatz eines kleineren Carriermoleküls. Die bei den Rückflussansätzen mit Hip-Lys festgestellte Reaktivitätsabstufung der Haptene untereinander bleibt unter diesen Bedingungen erhalten. Auch hier reagiert Tul A am stärksten, gefolgt von Zimtaldehyd und 7-Hydroxycitronellal.

N^α-Acetyl-histidin

Von den untersuchten Haptenen ist lediglich Tul A in der Lage, mit N^α-Acetyl-histidin (Ac-His) unter Rückflussbedingungen zu reagieren. Dies deckt sich mit den Beobachtungen bei den Rückflussansätzen mit Hip-His-Leu.

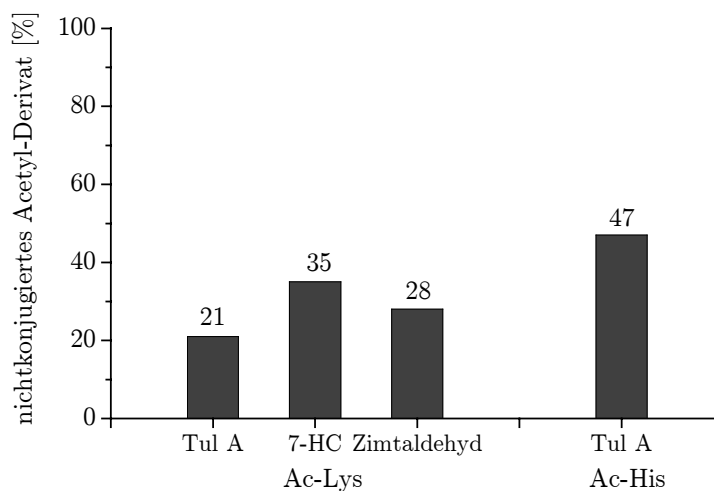


Abb. 4.6-1 Vergleich der nichtkonjugierten Acetyl-Derivate in Rückflussansätzen (4 h) mit einfachem Haptenüberschuss (7-HC = 7-Hydroxycitronellal)

Jedoch liegt auch hier im Vergleich zu Hip-His-Leu (vgl. Abb. 4.4-9) nach Beendigung der Reaktion prozentual weniger Ac-His unverändert im Ansatz vor (siehe Abb. 4.6-1). Das heißt, dass auch hier, im Vergleich zum Hippuryl-Derivat, eine höhere Reaktivität von Tul A gegenüber der Acetyl-geschützten Aminosäureseitenkette zu verzeichnen ist.

N^α-Acetyl-Arginin

Bei den Rückflussansätzen mit N^α-Acetyl-Arginin konnte generell keine Veränderung zu den gleichbehandelten Blindansätzen festgestellt werden. Dadurch wird die Vermutung

bestätigt, dass die Seitenkette des Arginins bei der Konjugation der untersuchten Haptene an nukleophile Aminosäureseitenketten keine Rolle spielt.

N^α-Acetyl-cystein

Im Falle des Reaktionsansatzes von *N^α-Acetyl-cystein* (Ac-Cys) mit Tul A (siehe Abb. 4.6-2) sprechen zwei Beobachtungen für eine Reaktion mit der Cystein-Seitenkette. Zum einen ist die ermittelte Peakfläche des Tul A im Vergleich zu einem gleichbehandelten Blindansatz etwa um zwei Drittel verringert. Zum anderen weist die stark verminderte Peakhöhe und veränderte Form des Ac-Cys-Peaks auf eine Reaktion hin. Es ist wahrscheinlich, dass eventuelle Reaktionsprodukte mit Ac-Cys koeluiieren und somit eine Auswertung erschweren. Somit ist es nicht sinnvoll, an dieser Stelle eine Abschätzung des Umsatzes über die Peakflächen des Ac-Cys durchzuführen.

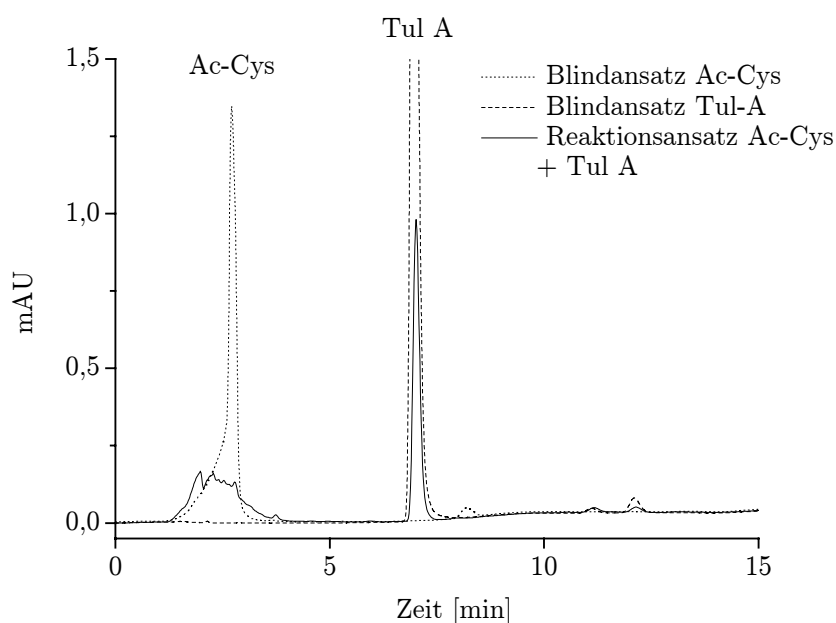


Abb. 4.6-2 RP-HPLC-Chromatogramm (Ausschnitt; UV-Detektion: $\lambda = 205$ nm) des Rückflussansatzes von Ac-Cys mit einfachem Überschuss an Tul A im Vergleich zu den Blindansätzen der Ausgangsstoffe

Es ist wahrscheinlich, dass auch hier eine Reaktion nach dem Mechanismus einer Michael-Addition an der Thiol-Gruppe des Cysteins stattfindet, wie es bereits bei der Reaktion mit Glutathion gezeigt werden konnte (vgl. auch 4.3.4). Im Gegensatz zu den Rückflussansätzen der untersuchten Haptene mit Glutathion war nicht nur bei der Reaktion von Ac-Cys mit Tul A eine Veränderung im HPLC-Chromatogramm im Vergleich zum Blindansatz festzustellen. Auch im Falle des Rückflussansatzes von Ac-Cys mit Zimtaldehyd (siehe Abb. 4.6-3) war eine deutliche Abnahme der Peakfläche des Zimtaldehyds gegenüber einem gleichbehandelten Blindwert festzustellen. Zusätzlich dazu war die Peakfläche des Ac-Cys im Reaktionsansatz deutlich geringer.

Außerdem konnten neue bisher unbekannte Peaks detektiert werden. Dies spricht auch hier dafür, dass Zimtaldehyd in der Lage ist, mit der Aminosäureseitenkette des Cysteins zu reagieren. Hierdurch wird die in der Literatur vielfach beschriebene hohe Reaktivität der Cystein-Seitenkette gegenüber elektrophilen Substanzen (*Ahlfors et al., 2003*) bestätigt.

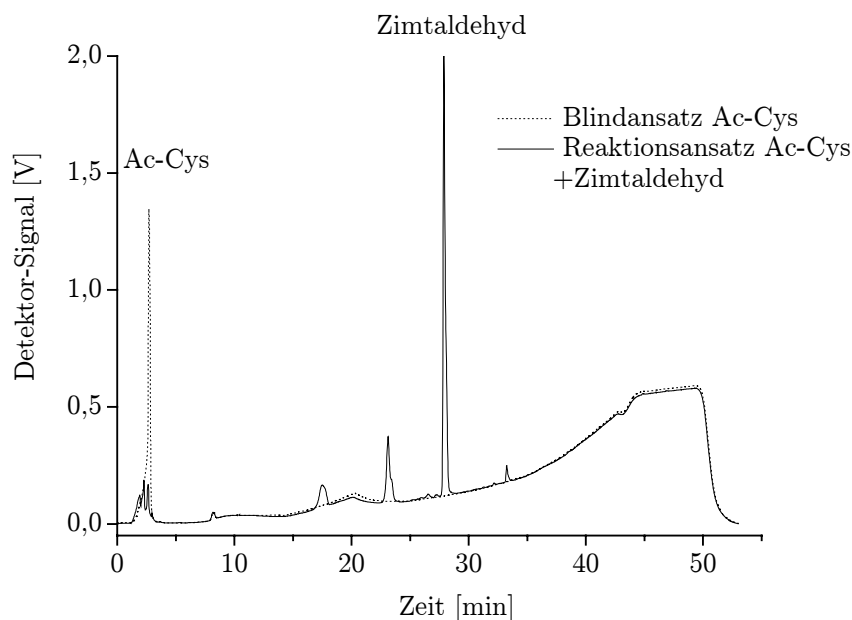


Abb. 4.6-3 RP-HPLC-Chromatogramm (UV-Detektion: $\lambda = 205 \text{ nm}$) des Rückflussansatzes von Ac-Cys mit einfachem Überschuss an Zimtaldehyd im Vergleich mit dem des Blindansatzes des Ausgangsstoffes Ac-Cys

4.6.2 Inkubationsansätze

Die Inkubationsansätze mit den Acetyl-Derivaten dienten an dieser Stelle lediglich als Screening bzw. Momentaufnahmen einer eventuellen Umsetzung nach einer bzw. vier Wochen Inkubation bei einer Temperatur von 37°C . Sie wurden daher als Ergänzung zu den entsprechenden Rückflussansätzen durchgeführt. So ist es nicht verwunderlich, dass die Ergebnisse qualitativ denen der Rückflussansätze mit den Acetylaminosäuren entsprechen. Das heißt, Haptene, welche unter Rückflussbedingungen mit den Acetylaminosäuren reagierten, zeigten diese Reaktionen auch unter physiologischen Temperaturbedingungen. Auch die ermittelten Umsatzraten für die Reaktionen mit den Aminosäureseitenketten von Lysin und Histidin unterschieden sich nach vier Wochen Inkubationszeit nicht signifikant von denen der Rückflussansätze (vgl. Abb. 4.6-1). Für die Cystein-Derivate wurde dieser Vergleich nicht durchgeführt, da durch die Peakform des Acetyl-Cysteins Koelutionen mit Produkten zu vermuten waren und daher nicht sinnvoll erschien. Die Chromatogramme der Inkubationsansätze entsprachen aber qualitativ denen der Rückflussansätze.

4.6.3 Zusammenfassung

Durch die hier durchgeführten Untersuchungen mit den Acetyl-Derivaten wurden die Ergebnisse der Experimente mit den Hippuryl-Peptiden qualitativ bestätigt (vgl. auch 4.3 und 4.4). Ein Nachteil der Acetylaminosäuren gegenüber den Hippuryl-Peptiden zeigt sich jedoch in der sich schwierig gestaltenden Auswertung der HPLC-Chromatogramme. Da die Acetylaminosäuren kein spezifisches Absorptionsmaximum im UV-Bereich besitzen, muss bei der Detektion auf den Wellenlängenbereich von 200 bis 210 nm zurückgegriffen werden. In diesem Bereich besitzt auch Methanol, welches hier als Lösungs- und Elutionsmittel Verwendung findet, eine hohe Eigenabsorption. Dies führt u.a. zu einer unruhigen Grundlinie im Chromatogramm. Auch eventuelle Verunreinigungen stören bei diesen Detektionswellenlängen empfindlich. Weiterhin eluieren die Acetylaminosäuren, bedingt durch den gegenüber den Hippuryl-Peptiden polarerer Charakter, bei deutlich geringen Retentionszeiten. Dies bewirkt auch eine wesentlich schlechtere Auftrennung eventueller Reaktionsprodukte. Auf Grund der Tatsache, dass die in den Reaktionsgemischen enthaltenen Haptene größtenteils wasserunlöslich sind, lässt sich auch der Methanolanteil des Gradienten nicht weiter verringern, da dies sonst zu Verunreinigungen der HPLC-Säule führt. Fazit ist, dass die Hippuryl-Peptide als Modellpeptide für die Untersuchung des kontaktallergen Potentials insgesamt besser geeignet sind. Im Nachhinein ist jedoch auch festzustellen, dass Glutathion als Modellpeptid für Reaktionen an der Aminosäureseitenkette des Cysteins ungeeignet erscheint. So konnte an Hand der Reaktion mit Ac-Cys gezeigt werden, dass neben Tul A auch Zimtaldehyd in der Lage ist, mit der Cysteinseitenkette zu reagieren, die Reaktionen mit Glutathion dagegen lieferten hierauf keinen Hinweis. Ideal für den direkten Vergleich der Reaktivität wäre an dieser Stelle ein Hippuryl-Peptid, welches Cystein enthält. Leider ist ein solches nicht käuflich erhältlich und eine Synthese war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Die Bedeutung der Konjugation von kontaktallergen Substanzen an die Thiolgruppe des Cysteins *in vivo* ist stark abhängig von der Verfügbarkeit freier Cysteinseitenketten in den Hautproteinen. In der Mehrzahl der Proteine liegt Cystein jedoch disulfidisch gebunden in Form von Cystin vor.

4.7 Einfluss des pH-Wertes am Beispiel der Reaktion von Tulipalin A

4.7.1 Qualitativer Einfluss des pH-Wertes

Nachdem sich auch die Acetyl-Derivate der nukleophilen Aminosäureseitenketten von Lysin und Histidin als sehr reaktiv gegenüber Tul A erwiesen hatten, war zu klären, welchen Einfluss der pH-Wert auf die Reaktion ausübt. Die Frage ist aus dem Grunde bedeutsam, da auch kosmetische Mittel mit kontaktallergenen Duftstoffen oder Pflanzeninhaltsstoffen, je nach Anwendung und Formulierung unterschiedliche pH-Werte aufweisen. Zu diesem Zweck wurden nun den Inkubationsansätzen von Ac-Lys bzw. Ac-His mit Tul A definierte geringe Mengen an Salzsäure bzw. Natriumhydroxid zugesetzt und der Einfluss des pH-Wertes durch Vergleich mit parallel durchgeführten undotierten Inkubationsansätzen abgeschätzt. Da bei der Aminosäureanalyse nach Säurehydrolyse der Acetyl-Derivate keine weitere Aminosäure als interner Standard zur Verfügung steht, geschieht die Reaktivitätsabschätzung durch das Peakflächenverhältnis der Aminosäure zu dem(n) Additionsprodukt(en). Unter der Annahme, dass die Aminosäuren und die jeweiligen Addukte ein gleiches Extinktionsverhalten zeigen, wurde für die Berechnung die Summe der Peakflächen von Aminosäure und Produkt(en) 100 % gesetzt und der jeweilige Anteil berechnet. In Abb. 4.7-1 sind die Ergebnisse dieser Versuche grafisch dargestellt.

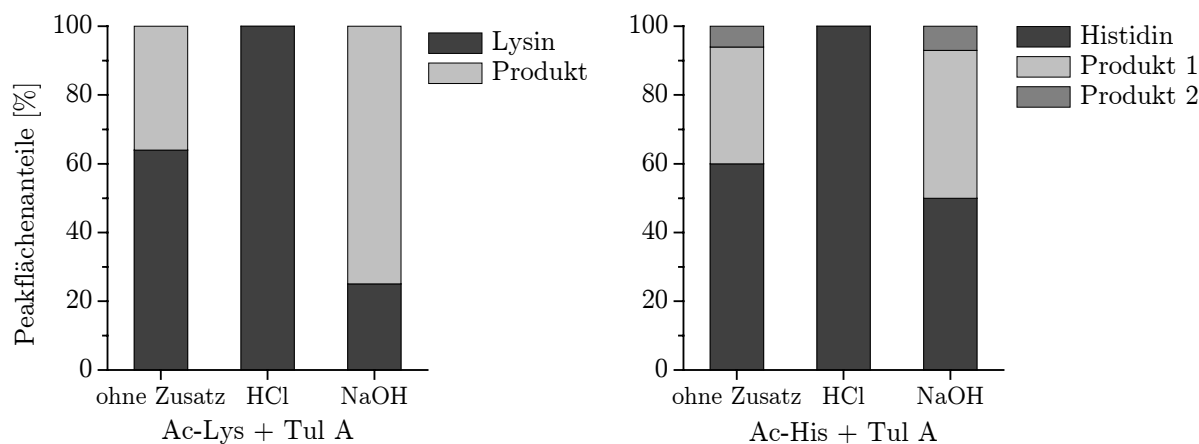


Abb. 4.7-1 Peakflächenanteile der Aminosäuren und Konjugationsprodukte in den Inkubationsansätzen von Tul A und Ac-Lys bzw. Ac-His mit verschiedenen Zusätzen (bestimmt mit Aminosäureanalyse nach Säurehydrolyse)

Hier zeigt sich, dass geringe Zusätze sowohl an Salzsäure als auch an Natriumhydroxid einen Einfluss auf die Reaktion der nukleophilen Aminosäureseitenketten Lysin und Histidin mit Tul A haben. Ein Zusatz an Salzsäure scheint eine Reaktion vollständig zu hemmen, denn hier waren nach 14 Tagen Inkubation weder im Ansatz mit Ac-Lys noch im Ansatz mit Ac-His entsprechende Reaktionsprodukte detektierbar. Vermutlich protoniert die Säure die funktionelle Gruppe und behindert so einen nukleophilen

Angriff. Ein Zusatz von Natriumhydroxid dagegen wirkt sich positiv auf die Reaktivität aus. Sehr deutlich wird das am Beispiel des Ansatzes mit Ac-Lys. Während ohne Natriumhydroxidzusatz nur ca. ein Viertel des Ac-Lys umgesetzt wird, sind es mit Natriumhydroxidzusatz drei Viertel. Der Grund dafür liegt im hohen pK_s -Wert der ϵ -Aminogruppe des Lysins von 10,5. Ein Zusatz von Alkali in Form von Natriumhydroxid begünstigt die Deprotonierung dieser Aminogruppe und erleichtert damit eine nukleophile Reaktion. Beim Inkubationsansatz mit Ac-His war durch den Zusatz von Natriumhydroxid ebenfalls ein signifikanter Anstieg in der Bildung von Reaktionsprodukten gegenüber dem Vergleichsansatz ohne Zusatz festzustellen. Jedoch war hier der Einfluss geringer als bei Ac-Lys, da die Konjugation des Histidins nur um etwa 10 % erhöht wurde. Dieser Unterschied gegenüber Lysin lässt sich an dieser Stelle ebenfalls über den pK_s -Wert erklären. Dieser beträgt beim Histidin für den Imidazolring nur 6,0. Die Summe der beiden Reaktionsprodukte liegt ohne Natriumhydroxid leicht über der Umsetzung mit Ac-Lys. Auf Grund des niedrigeren pK_B -Wertes des Imidazolringes im Histidin ist dieser unter milden Bedingungen gegenüber Tulipalin A leichter zur Konjugation befähigt als die ϵ -Aminogruppe des Lysins. Ein Basenzusatz wirkt sich dementsprechend geringer aus. In den nachfolgenden Untersuchungen sollte nun dieser Einfluss des Natriumhydroxids und damit des pH-Wertes genauer quantifiziert werden.

4.7.2 Quantitativer Einfluss des Natriumhydroxidzusatzes

Bisher konnte gezeigt werden, dass die Reaktion von Tul A an die nukleophilen Aminosäureseitenketten von Lysin und Histidin durch den pH-Wert im Reaktionsgemisch stark beeinflusst wird. Dabei wirkte sich eine durch Zugabe von Natriumhydroxid erreichte Verlagerung des pH-Wertes in den basischen Bereich positiv auf die Produktbildung aus. Zu klären ist nun, ob es ein pH-Optimum für die jeweilige Reaktion mit Lysin bzw. Histidin gibt. Durch Zugabe definierter Mengen Natriumhydroxidlösung unterschiedlicher Konzentration zu den Inkubationsansätzen konnten pH-Werte von 7 bis 12 erzielt werden (siehe Tab. 3.7-1). Nach zwei Wochen Inkubation bei 37 °C wurden die Ansätze miteinander verglichen. Die Auswertung erfolgte dabei, wie unter 4.7.1 beschrieben, über das Verhältnis der Peakflächen von Ausgangsstoffen zu Reaktionsprodukten. In Abb. 4.7-2 und Abb. 4.7-3 ist das Ergebnis grafisch dargestellt. An Hand dieser Diagramme wird deutlich, dass sich Zusätze an Natriumhydroxid bei den Reaktionen von Tul A mit Ac-Lys bzw. Ac-His sehr unterschiedlich auswirken. Bei der Reaktion mit Ac-Lys ist durch Natriumhydroxidzusatz bis zu einer Konzentration von 0,07 mol/l im Inkubationsansatz (entspricht etwa einem pH-Wert zwischen 8 und 9) ein positiver Einfluss feststellbar. Eine weitere Erhöhung des pH-Wertes führt zu einer scheinbaren Verringerung des Umsatzes. Möglich ist hier, dass ein hoher pH-Wert eine Spaltung des

Konjugationsproduktes bewirkt. Je höher der pH-Wert im Ansatz ist, desto weiter liegt das Gleichgewicht der Reaktion auf der Seite der Ausgangsstoffe. Das Optimum liegt hier im Bereich von 0,03 bis 0,04 mol/l Natriumhydroxid im Inkubationsansatz.

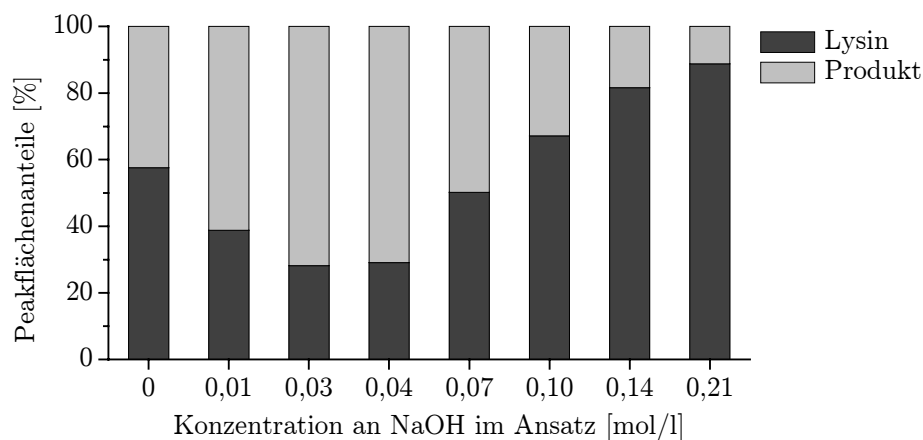


Abb. 4.7-2 Peakflächenanteile von Lysin und Konjugationsprodukt in den Inkubationsansätzen von Tul A und Ac-Lys mit unterschiedlichen Zusätzen an Natriumhydroxid (bestimmt mit Aminosäureanalyse nach Säurehydrolyse)

Bei der Reaktion mit Ac-His dagegen führt eine Natriumhydroxidkonzentration von 0,04 mol/l bereits zu einer signifikanten Verringerung der Produktbildung gegenüber dem Inkubationsansatz ohne Natriumhydroxidzusatz. Ab einer Konzentration von 0,1 mol/l ist dann keine Reaktion mehr feststellbar.

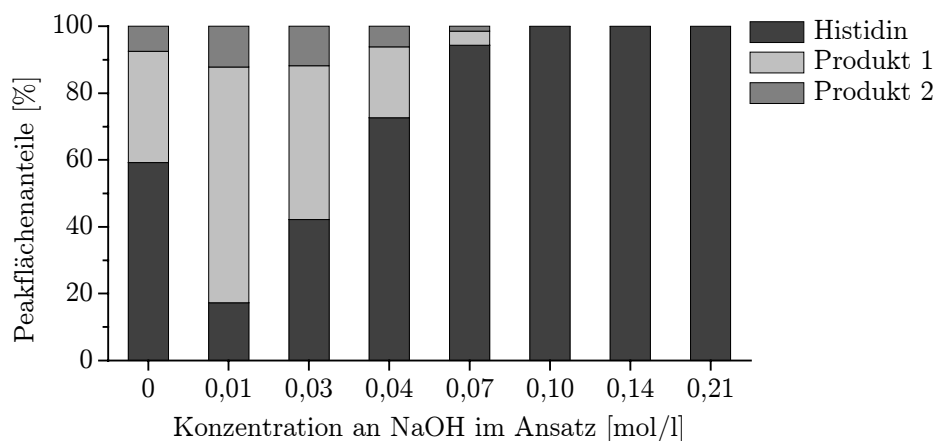


Abb. 4.7-3 Peakflächenanteile von Histidin und Konjugationsprodukten in den Inkubationsansätzen von Tul A und Ac-His mit unterschiedlichen Zusätzen an Natriumhydroxid (bestimmt mit Aminosäureanalyse nach Säurehydrolyse)

Hier ist, analog zur Reaktion mit der Lysinseitenkette, bei hohen pH-Werten das Gleichgewicht vollständig auf der Seite der Ausgangsstoffe. Das Optimum liegt bei der Reaktion mit Ac-His in ganz geringen Zusätzen, welche eine Konzentration an Natriumhydroxid von ca. 0,01 mol/l im Inkubationsansatz ergeben. Dadurch ließ sich die Umsatzrate nahezu verdoppeln.

4.8 Isolierung und Strukturaufklärung von Reaktionsprodukten

4.8.1 N^α-Hippuryl-lysin und Tulipalin A

In den bisher untersuchten Reaktionsansätzen von N^α-Hippuryl-lysin und Tulipalin A konnten mit Hilfe der Aminosäureanalyse nach Säurehydrolyse ein neuer Peak und durch die analytische RP-HPLC zwei neue Peaks detektiert werden. Da bei der Reaktion unter Rückfluss der größere Stoffumsatz zu verzeichnen war, bieten sich diese Reaktionsbedingungen auch als Syntheseparameter an. Der Ansatz wurde lediglich bezüglich der Stoffmenge vergrößert. Zur Vereinfachung der sich anschließenden Auftrennung des Reaktionsgemisches mit Hilfe der semipräparativen HPLC wurde nach einer Möglichkeit gesucht, überschüssiges Tul A aus dem Ansatz zu entfernen. Eine einfache Lösung ist hier eine Flüssig-Flüssig-Extraktion. Dazu wurden verschiedene organische Lösungsmittel, wie beispielweise n-Heptan, tert.-Butylmethylether und Essigsäureethylester, hinsichtlich ihres Einflusses auf das Produktspektrum, ihrer Extraktionswirkung und ihren Phasentrennungseigenschaften getestet. Essigsäureethylester erwies sich in diesen Versuchen als gut geeignet. Es war möglich das freie Tul A vollständig aus dem Reaktionsansatz zu entfernen, ohne die anderen Bestandteile zu beeinflussen. Mit Hilfe der semipräparativen HPLC konnten zwei unbekannte Fraktionen isoliert werden (F1 und F2; siehe Abb. 4.8-1), zusätzlich wurde das im Ansatz enthaltene nicht umgesetzte Hip-Lys für eine Wiederverwertung zurückgewonnen.

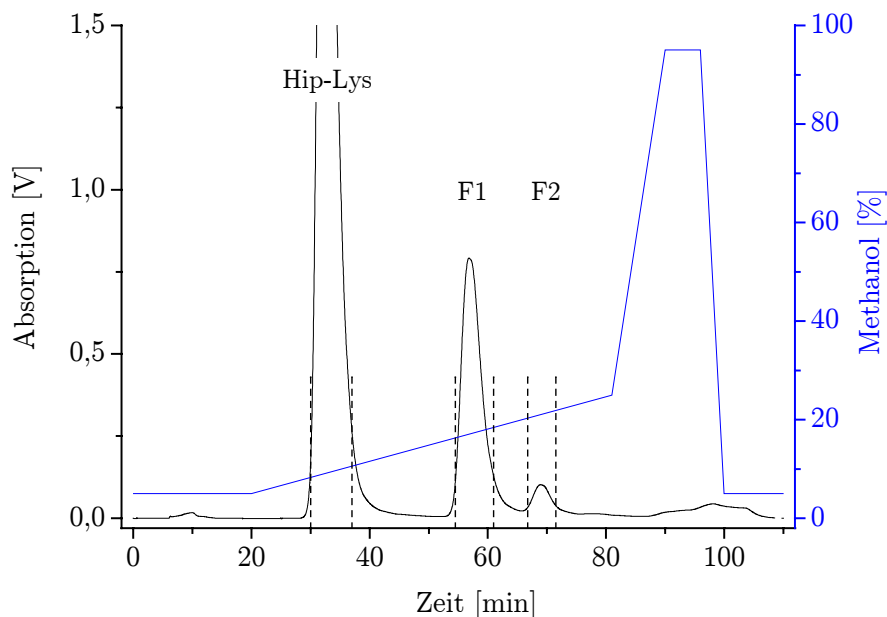


Abb. 4.8-1 Chromatogramm der semipräparativen RP-HPLC (UV-Detektion: $\lambda = 230$ nm) des Syntheseansatzes von Hip-Lys und Tul A (4 h unter Rückfluss) nach Extraktion mit Essigsäureethylester

Die Analyse der eingegangenen Fraktion des Hauptreaktionsproduktes (F1, Abb. 4.8-1) mittels analytischer HPLC bestätigte, dass die Fraktion praktisch frei von anderen im Reaktionsansatz enthaltenen Stoffen war. Beim Rechromatographieren der Fraktion des isolierten zweiten Reaktionsproduktes (F2) wurde festgestellt, dass dessen Retentionszeit mit der des Hauptreaktionsproduktes (F1) identisch ist. Dies konnte auch durch Addition des ersten Reaktionsproduktes bestätigt werden. Ein weiterer Grund für die stärkere Retardierung dieses Produktes in der semipräparativen HPLC könnte eine auf intermolekularen Wechselwirkungen basierende Zusammenlagerung des Hauptreaktionsproduktes sein. Somit konnte nur das Hauptprodukt, welches durch Einengung und Trocknung von Fraktion F1 gewonnen wurde, einer Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie zugeführt werden. Die chemische Struktur des isolierten Reaktionsproduktes wurde durch Aufnahme von ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren vollständig aufgeklärt. Hierbei waren insbesondere die zweidimensionalen NMR-Spektren (COSY, HSQC) und ein Vergleich der Daten des Reaktionsproduktes mit denen der Ausgangsstoffe hilfreich bei der Zuordnung der Peaks in den Spektren zu den jeweiligen Kohlenstoff- bzw. Wasserstoffatomen (siehe 3.7.1). Beim Vergleich der ^1H -NMR-Spektren von Reaktionsprodukt und Hip-Lys ist festzustellen, dass die Struktur des Peptids vollständig erhalten geblieben ist. Auffallend im ^1H -NMR-Spektrum des Produktes ist die Verschiebung der Peaks der Wasserstoffatome des C-Atoms der exocyclischen Methylengruppe im Vergleich zum Spektrum von Tul A. Außerdem ist nun im ^1H -NMR-Spektrum ein Signal zu finden, welches dem α -Kohlenstoff im Lactonring zugeordnet werden kann. Dass dieses Kohlenstoffatom jetzt ein Proton trägt lässt erkennen, dass eine Reaktion an der exocyclischen Methylengruppe unter Reduktion der Doppelbindung stattgefunden hat. Ein Vergleich des ^{13}C -NMR-Spektrums von Hip-Lys mit dem des Reaktionsproduktes F1 zeigt im Produkt fünf neue Peaks, bei zweien davon entspricht die chemische Verschiebung denen eines Lactonringes. Weiterhin ist eine Verschiebung des Signals des ε -Kohlenstoffatoms des Lysins festzustellen, die auf eine Reaktion an der ε -Aminogruppe hinweist. Auf Grund dieser Daten lässt sich für die unbekannte Substanz in Fraktion F1 die in Abb. 4.8-2 Nr. **26** dargestellte Struktur angeben. Ihr IUPAC-Name ist 2-(2-Benzoylaminoacetyl-amino)-6-[(2-oxo-tetrahydro-furan-3-ylmethyl)-amino]-hexansäure, im weiteren Verlauf der Arbeit wird die Substanz vereinfacht als "Hip-LysTu" bezeichnet. Die Bildung von Hip-LysTu erfolgt dabei mit hoher Wahrscheinlichkeit über eine nukleophile Addition der ε -Aminogruppe der Lysinseitenkette an das partiell positiviertete Kohlenstoffatom der exocyclischen Methylengruppe der α,β -ungesättigten Carbonylstruktur im Tulipalin A (siehe Abb. 4.8-2).

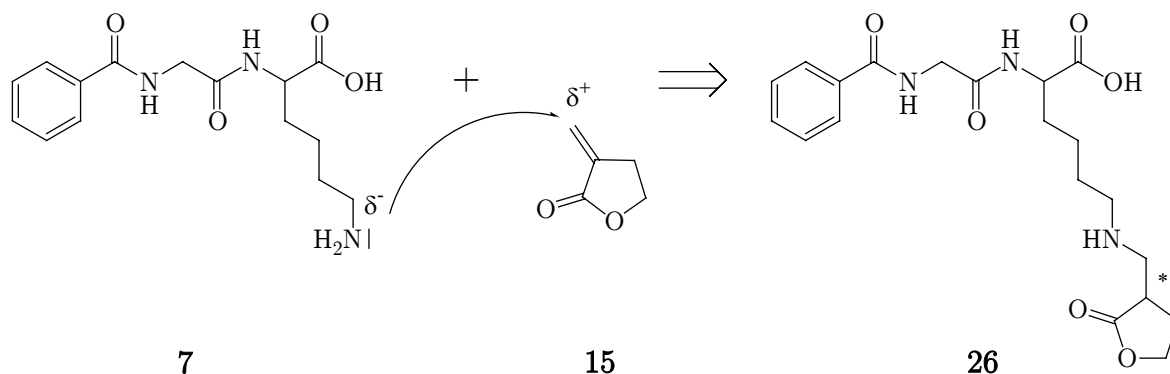


Abb. 4.8-2 Nukleophile Addition der ε-Aminogruppe des peptidgebundenen Lysins an die exocyclische Methylengruppe der α,β-ungesättigten Carbonylstruktur des Tul A (Reaktion nach dem Mechanismus einer Michael-Addition)

Dabei entsteht ein neues asymmetrisches Kohlenstoffatom am Butyrolactonring, dessen Konfiguration noch nicht aufgeklärt ist. Diese Reaktion bestätigt die bisher in der Literatur beschriebenen Umsetzungsreaktionen von Tulipalin A mit Modellnucleophilen. So beschrieben beispielsweise *Franot et al. (1993)* ein "Michael-Addukt" von Tul A und Aminobutan und im Rahmen einer Diplomarbeit gelang *Helling (1996)* die Umsetzung von Tul A mit 1-Aminohexan bzw. 6-Aminohexansäure. Additionsprodukte von Tul A an Aminosäureseitenketten von Peptiden sind jedoch bisher in der Literatur unbekannt.

4.8.2 N^α-Hippuryl-histidin-leucin und Tulipalin A

Synthese durch Kochen unter Rückfluss

Obwohl die bisherigen Versuche aufzeigten, dass sich bei der Reaktion von N^α-Hippuryl-histidin-leucin mit Tulipalin A in methanolischer Lösung durch Inkubation bei 37 °C ein größerer Umsatz erzielen lässt als beim Kochen des Ansatzes unter Rückfluss, wurde zunächst auf Grund der Zeitersparnis auf diese drastischeren Reaktionsbedingungen zurückgegriffen. Nachteil hierbei ist, dass ein mögliches Reaktionsprodukt, welches bisher nur im HPLC-Chromatogramm des Inkubationsansatzes detektiert wurde (siehe 4.4.4), wahrscheinlich nicht isolierbar ist. Im Vorfeld wurden auch für dieses Reaktionsgemisch verschiedene Extraktionsmittel getestet, um eine Vereinfachung der Auftrennung mittels semipräparativer HPLC zu erreichen. Jedoch brachte keines der untersuchten Lösungsmittel befriedigende Ergebnisse in Bezug auf Phasentrennung, Extraktionskraft und Stabilität der Bestandteile. Nach Herstellung eines Syntheseansatzes unter Rückflussbedingungen wurde dieser direkt zur Fraktionierung mittels semipräparativer HPLC eingesetzt.

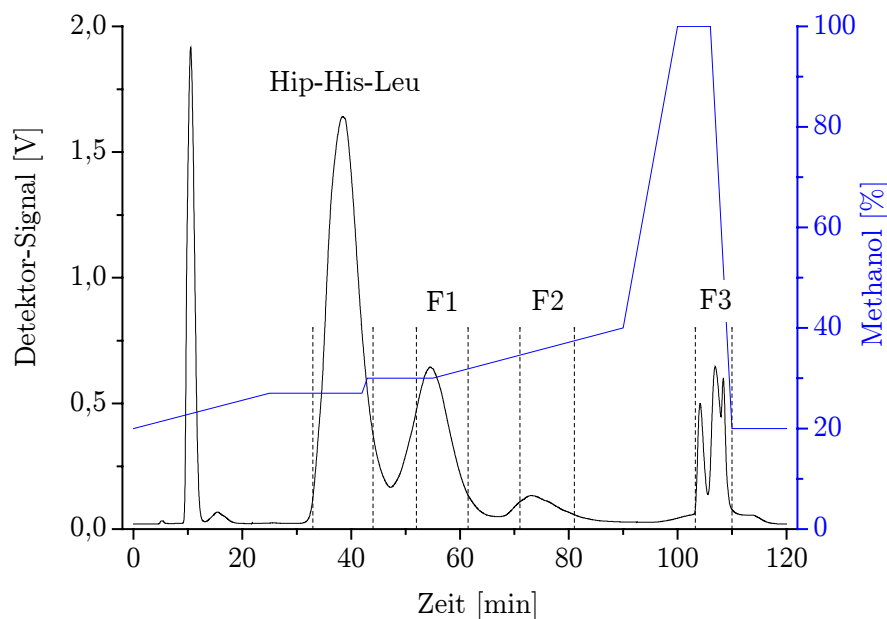


Abb. 4.8-3 Chromatogramm der semipräparativen RP-HPLC (UV-Detektion: $\lambda = 230 \text{ nm}$) des Rückfluss-Syntheseansatzes von Hip-His-Leu und Tul A

Die präparative Trennung des Rückflussansatzes aus Hip-His-Leu und Tul A erwies sich als schwierig. So konnte keine Basislinientrennung zwischen dem Peak des Hip-His-Leu und dem ersten Produktpeak (F1) erreicht werden (Abb. 4.8-3). Um eine Verunreinigung der Produktfraktion mit dem Ausgangsstoff zu vermeiden, wurde eine Zwischenfraktion aufgefangen, die jedoch verworfen wurde. Die Rechromatographie der ersten Produktfraktion (F1) mittels analytischer HPLC ergab, dass in dieser Fraktion zwei Verbindungen enthalten waren. Eine Standardaddition von Hip-His-Leu zeigte allerdings, dass der Ausgangsstoff nicht oder nur in vernachlässigbar geringer Menge in der Fraktion enthalten war. Bei der Rechromatographie des zweiten Produktpeaks (F2) konnte ein Peak im Anstieg des Spülschrittes des Gradienten wiedergefunden werden. Ein solcher Peak konnte vorher lediglich im HPLC-Chromatogramm des Inkubationsansatzes detektiert werden (vgl. 4.4.4). Es kann davon ausgegangen werden, dass dieses Produkt in den bisher gemessenen Rückflussansätzen in so geringer Konzentrationen enthalten war, dass dieser Peak durch die Eigenabsorption des Methanol als Eluent überdeckt und damit eine Detektion verhindert wurde. Die Verbindungen, die in der letzten Fraktion (F3) enthalten waren, konnten durch Rechromatographie an der analytischen HPLC den Peaks zugeordnet werden, die dort im Spülschritt bei einer Eluentzusammensetzung von 100% Methanol erfasst wurden. Auch in dieser Fraktion waren mehrere Reaktionsprodukte enthalten. Da keiner der Peaks in reiner Form isoliert werden konnte, war eine Strukturaufklärung durch Aufnahme der NMR-Spektren nicht möglich, so dass die Produktidentifizierung mittels

ESI-TOF-Massenspektrometrie durchgeführt wurde. Dabei wurden für die einzelnen Fraktionen die in Tab. 4.8-1 angegebenen Molekülion-Massenzahlen ermittelt.

Tab. 4.8-1 Molekülion-Massenzahlen der Fraktionen des Rückfluss-Syntheseansatzes von Hip-His-Leu und Tul A

	Hip-His-Leu	Fraktion F1	Fraktion F2	Fraktion F3
Molekülion($[M+H]^+$)- Massenzahl	430,21	528,29	528,28	444,23 542,26

Die Massenzahl 528,3, welche in den Fraktionen F1 und F2 bestimmt wurde, entspricht genau einem Molekülion der addierten Massen von Hip-His-Leu und Tul A. Dies ist ein Hinweis auf eine möglicherweise stattgefundene Additionsreaktion. Möglich ist hier ebenso, wie bei der Bildung von Hip-LysTu, eine Reaktion nach dem Mechanismus einer Michael-Addition. Als nukleophile Partner sind die Stickstoffatome im Imidazolring des Histidins prädestiniert. Hier sind prinzipiell zwei Produkte möglich, einmal durch Addition am τ -Stickstoffatom und weiterhin durch Addition am π -Stickstoffatom. Dies würde auch die zwei Fraktionen mit gleichen Molekülion-Massenzahlen erklären. Die im Spülschritt des Gradienten aufgefangene Fraktion F3 weist im Massenspektrum zwei Peaks auf, welche als Molekülion-Massen in Frage kommen. Auffällig ist, dass diese Massenzahlen jeweils um 14 größer sind, als die Molekülion-Massen von Hip-His-Leu und denen in den Fraktionen F1 und F2.

Synthese durch Inkubation bei 37 °C

Durch die Untersuchung der bei der Auftrennung des Rückflussansatzes gewonnenen Fraktionen konnten zwar mehrere mögliche Produkte isoliert und Hinweise auf ihre Struktur erlangt werden, jedoch ist eine eindeutige Zuordnung bislang nicht möglich gewesen. Daher wurde ein weiterer Syntheseansatz aus Hip-His-Leu und Tul A hergestellt und für 40 Tage bei 37 °C inkubiert. Eine anschließende Untersuchung mittels analytischer HPLC zeigte, dass im Syntheseansatz nahezu kein Hip-His-Leu mehr vorhanden war. Eine Auftrennung des Gemisches wurde, wie beim Rückflussansatz mittels semipräparativer HPLC durchgeführt. Leider konnte das relativ saubere Trennbild der Auftrennung des Rückflussansatzes nicht erreicht werden. Der Gradient wurde daher neu angepasst und insgesamt wurden 4 Fraktionen aufgefangen (siehe Abb. 4.8-4). Fraktion 1 (F1) enthielt zwei Peaks bei denen eine Basislinientrennung mit den zur Verfügung stehenden apparativen Mitteln nicht zu erreichen war. Die anderen Fraktionen F2 bis F4 zeigten bei Rechromatographie mittels analytischer HPLC jeweils lediglich einen Peak.

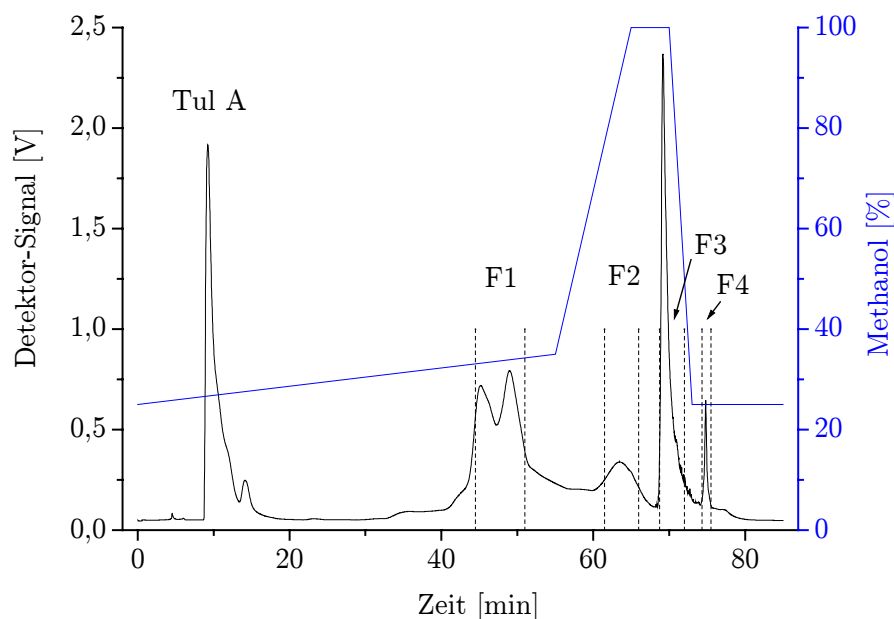


Abb. 4.8-4 Chromatogramm der semipräparativen RP-HPLC (UV-Detektion: $\lambda = 230$ nm) des Inkubations-Syntheseansatzes von Hip-His-Leu und Tul A

Anschließend wurden die Molmassen, der in den Fraktionen enthaltenen Verbindungen mittels ESI-TOF-Massenspektrometrie bestimmt. Dabei wurden die in Tab. 4.8-2 angegebenen Molekülion-Massenzahlen bestimmt.

Tab. 4.8-2 Molekülion-Massenzahlen der Fraktionen des Inkubations-Syntheseansatzes von Hip-His-Leu und Tul A

	Fraktion F1	Fraktion F2	Fraktion F3	Fraktion F4
Molekülion($[M+H]^+$)- Massenzahl	528,27	528,28	542,28	444,22

Ein Vergleich mit den beim Rückfluss-Syntheseansatz gewonnenen Fraktionen zeigt, dass die gleichen Molekülion-Massenzahlen bestimmt wurden. Dies bestätigt die bisherigen Beobachtungen, dass die Reaktionsbedingungen lediglich einen Einfluss auf Umsatzrate und Geschwindigkeit haben, nicht aber auf die Art der Reaktionsprodukte. Von den aufgetrennten Fraktionen konnte lediglich die Fraktion F3 in ausreichender Menge und Reinheit für eine Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie gewonnen werden. Es gelang, die chemische Struktur des in Fraktion F3 isolierten Reaktionsproduktes durch Aufnahme von ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren mit Hilfe der zugehörigen zweidimensionalen Spektren (COSY, HSQC, HMBC) vollständig aufzuklären. Ein Vergleich der NMR-Spektren von Hip-His-Leu und Fraktion F3 zeigt dabei, dass das Peptid in seiner Struktur unverändert blieb. Das ^{13}C -NMR-Spektrum des Produktes weist gegenüber dem Ausgangstoff Hip-His-Leu 6 neue Signale auf. Fünf

dieser Signale können, wie schon im Falle von Hip-LysTu (siehe 3.9.1) einem addierten α -Methylen- γ -butyrolactonring zugeordnet werden. Weiterhin ist eine Verschiebung der Signale der Kohlenstoffatome des Imidazolringes der Histidinseitenkette festzustellen, die auf eine Reaktion an dieser Stelle hinweist. Das 6. neue Signal, ein Quadruplett bei einer Verschiebung von 52,7 ppm, weist auf eine neu entstandene Methoxy-Gruppe hin. Auffallend im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Produktes ist die Verschiebung der Peaks der Wasserstoffatome des C-Atoms der exocyclischen Methylengruppe im Vergleich zum Spektrum von Tul A. Außerdem ist nun im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ein Signal zu finden, welches dem α -Kohlenstoff im Lactonring zugeordnet werden kann. Das dieses Kohlenstoffatom jetzt ein Proton trägt, lässt erkennen, dass eine Reaktion an der exocyclischen Methylengruppe unter Reduktion der Doppelbindung stattgefunden hat. Von den zwei möglichen Reaktionsorten an Histidinseitenkette konnte mittels der zweidimensionalen Spektren COSY bzw. HMBC das τ -Stickstoffatom als Bindungsort identifiziert werden. So lassen sich Kopplungen des C-Atoms bzw. der H-Atome der exocyclischen Methylengruppe mit zwei verschiedenen H-Atomen des Imidazolringes feststellen (Abb. 4.8-5). Bei einer Bindung am π -Stickstoffatom der Histidinseitenkette wäre nur eine Kopplung mit einem H-Atom möglich. Auf Grund dieser Daten lässt sich für die unbekannte Substanz in Fraktion F3 die in Abb. 4.8-5 Nr. **27** dargestellte Struktur angeben. Ihr IUPAC-Name lautet 2-[2-(2-Benzoylamino-acetylamino)-3-[1-(2-oxo-tetrahydro-furan-3-ylmethyl)-1H-imidazol-4-yl]-propionylamino]-4-methyl-pentansäuremethylester; im weiteren Verlauf der Arbeit wird die Substanz vereinfacht als "Hip-His(1H-Tu)-Leu-OMe" bezeichnet.

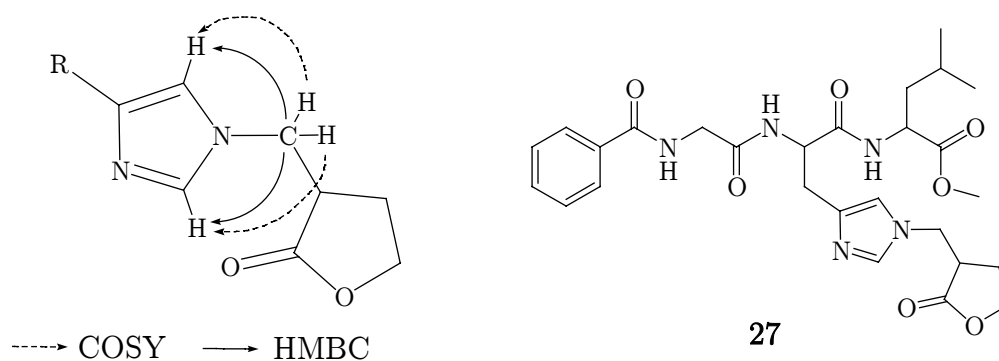


Abb. 4.8-5 COSY bzw. HMBC-Kopplungen und Struktur des aus Fraktion F3 isolierten Reaktionsproduktes der Inkubation von Hip-His-Leu mit Tul A - "Hip-His(1H-Tu)-Leu-OMe" (**27**)

Wie bei der Bildung von Hip-LysTu (siehe 4.8.1) ist auch hier eine Reaktion nach dem Mechanismus der Michael-Addition wahrscheinlich. Das τ -Stickstoffatom im Imidazolring der Aminosäureseitenkette des Histidins ist hierbei der nukleophile Partner in der Reaktion, welcher an das partiell positiviertete Kohlenstoffatom der exocyclischen Methylengruppe der α,β -ungesättigten Carbonylstruktur im Tulipalin A

addiert. Wiederum entsteht dabei ein neues asymmetrisches Kohlenstoffatom am Butyrolactonring, dessen Konfiguration jedoch nicht aufgeklärt ist. Bemerkenswert ist weiterhin die Bildung eines Methylesters am C-Terminus des Peptides. Dies hat seine Ursache im verwendeten Lösungsmittel Methanol, welches im Verlauf der Inkubation mit der Carbonsäurefunktion des Leucins reagiert hat. *Tava et al. (2003)* beobachteten eine ähnliche Veresterung freier Carbonsäuregruppen bei der Lagerung von Saponinen in alkoholischen Lösungen. Durch diese Reaktion lässt sich auch die Massendifferenz von 14 erklären, die sich dann rein rechnerisch durch die Addition von Methanol und die anschließende Wasserabspaltung ergibt. Somit ist es wahrscheinlich, dass die in Fraktion F3 des Rückfluss-Syntheseansatzes und in Fraktion F4 des Inkubations-Syntheseansatzes gefundene Molekülion-Massenzahl von 444,2 dem Methylester des Ausgangsstoffes Hip-His-Leu zuzuordnen ist. Ebenso weisen die in anderen Fraktionen gefundenen Molekülion-Massenzahlen von 528,3 auf nicht veresterte Additionsprodukte von Hip-His-Leu und Tul A hin. Da sowohl bei der analytischen HPLC als auch bei der Aminosäureanalyse nach Säurehydrolyse zwei unbekannte Peaks detektierbar waren, kann man davon ausgehen, dass auch mindestens zwei verschiedene Additionsprodukte an der Aminosäureseitenkette des Histidins entstehen. Denkbar wäre neben der Addition am τ -Stickstoffatom auch eine Reaktion am π -Stickstoffatom des Imidazolringes. Durch den relativ geringen Strukturunterschied dieser beiden Derivate ließe sich auch die schlechte Auftrennung im HPLC-Chromatogramm erklären. Ein Vergleich der Chromatogramme der Aminosäureanalyse nach Säurehydrolyse von dem in Fraktion F3 enthaltenen Additionsprodukt mit dem Inkubations-Syntheseansatz (siehe Abb. 4.8-6) erlaubt eine Zuordnung der aufgeklärten Struktur in das Produktspektrum im Chromatogramm. Im ASA-Chromatogramm des Syntheseansatzes sind neben den im Ausgangsstoff Hip-His-Leu enthaltenen Aminosäuren Glycin, Leucin und Histidin zwei weitere Peaks bei Retentionszeiten von 49,1 und 50,6 min detektierbar. Im ASA-Chromatogramm von Fraktion F3 ist neben den Aminosäuren Glycin und Leucin lediglich der Peak mit der Retentionszeit von 49,1 min vorhanden. Diesem Peak kann nun auf Grund der Strukturaufklärung das "Michael-Addukt" vom τ -Stickstoffatom des Imidazolringes von Histidin an die exocyclische Methylengruppe des Tul A zugeordnet werden. In Abb. 4.8-6 **28** ist die Struktur dieser modifizierten Aminosäure angegeben. Ihr Name nach IUPAC-Nomenklatur ist 2-Amino-3-[1-(2-oxotetrahydro-furan-3-ylmethyl)-1H-imidazol-4-yl]-propansäure. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird diese Verbindung vereinfacht als His(1H-Tu) bezeichnet. Der Vergleich der Peakhöhen im ASA-Chromatogramm des Syntheseansatzes lässt weiterhin den Schluss zu, dass His(1H-Tu) das Hauptkonjugationsprodukt von Tul A an die Aminosäureseitenkette des Histidins ist. Ein Nachweis für das weiterhin vermutete Addukt am π -Stickstoffatom des Imidazolringes von Histidin steht aber noch aus.

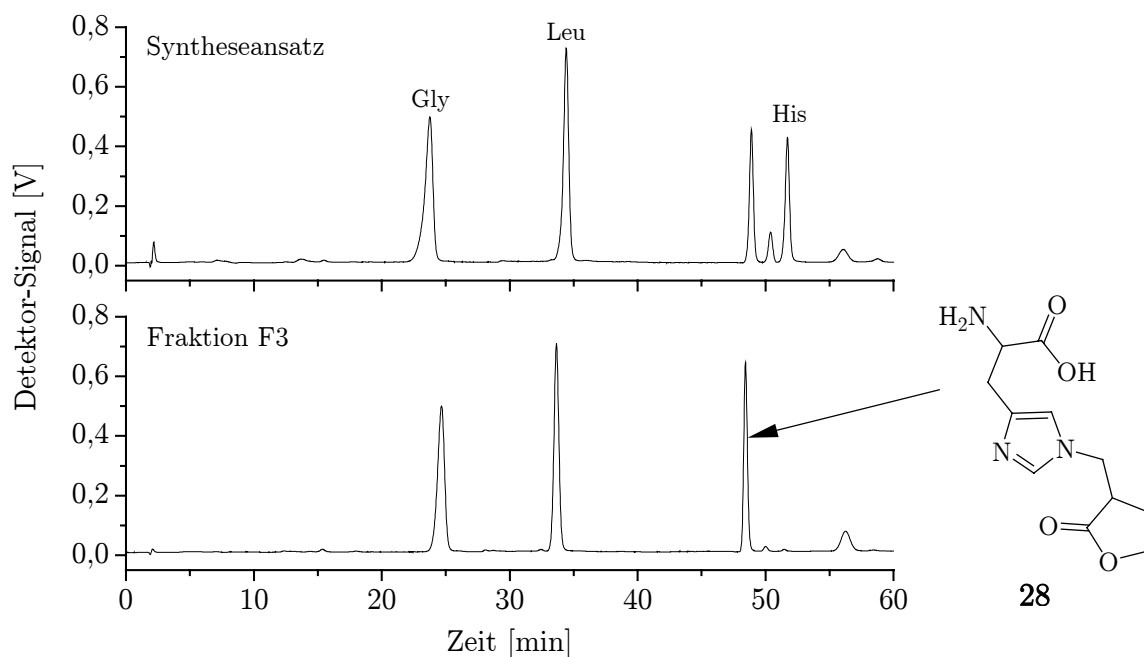


Abb. 4.8-6 Vergleich der ASA-Chromatogramme (Detektion: $\lambda = 570 \text{ nm}$) von Inkubations-Syntheseansatz und Fraktion F3 und Struktur der zugeordneten modifizierten Aminosäure His(1H-Tu) (**28**)

4.8.3 N^α-Acetyl-histidin und Tulipalin A

Auf Grund der schlechten Auftrennung der Reaktionsgemische von Hip-His-Leu und Tul A mittels semipräparativer HPLC wurde zur Aufklärung der Modifizierung der Aminosäureseitenkette Histidin N^α-Acetyl-histidin (Ac-His) verwendet. Hierbei ist die in α -Stellung befindliche Aminogruppe des Histidins lediglich durch eine Acetylgruppe geschützt. Der Syntheseansatz wurde analog den Inkubationsansätzen mit Acetyl-Derivaten durchgeführt und für vier Wochen bei 37 °C inkubiert. Durch eine Untersuchung des Ansatzes mittels analytischer HPLC konnten neben den Ausgangsstoffen Ac-His und Tul A zwei neue Peaks detektiert werden. Aufgetrennt wurde das Reaktionsgemisch durch semipräparative HPLC. Detektiert wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 205 \text{ nm}$, da weder Ac-His noch Tul A ein spezifisches Absorptionsmaximum im UV-Bereich besitzen. Eine Vielzahl organischer Verbindungen bis hin zum Lösungsmittel Methanol absorbieren das UV-Licht in diesem Bereich sehr stark, dies zeigt sich auch im Spülschritt des HPLC-Chromatogramms (siehe Abb. 4.8-7). Eine Basislinientrennung der beiden Produktpeaks konnte mit den zur Verfügung stehenden Mitteln nicht erreicht werden, aus diesem Grund wurde eine Zwischenfraktion eingefügt. Die zwei unbekanntenen Reaktionsprodukte in den Fraktionen F1 und F2 konnten auf diese Weise in ausreichender Reinheit isoliert werden.

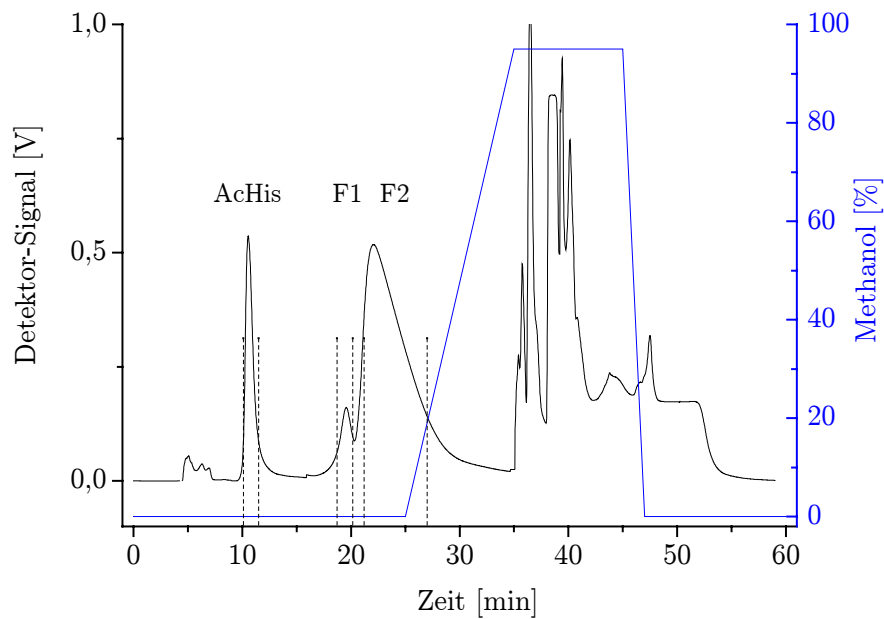


Abb. 4.8-7 Chromatogramm der semipräparativen HPLC (UV-Detektion: $\lambda = 205 \text{ nm}$) des Syntheseansatzes von Ac-His und Tul A

Ein Vergleich der Chromatogramme der Aminosäureanalyse nach Säurehydrolyse von Syntheseansatz und den isolierten Fraktionen zeigt dies deutlich (siehe Abb. 4.8-8).

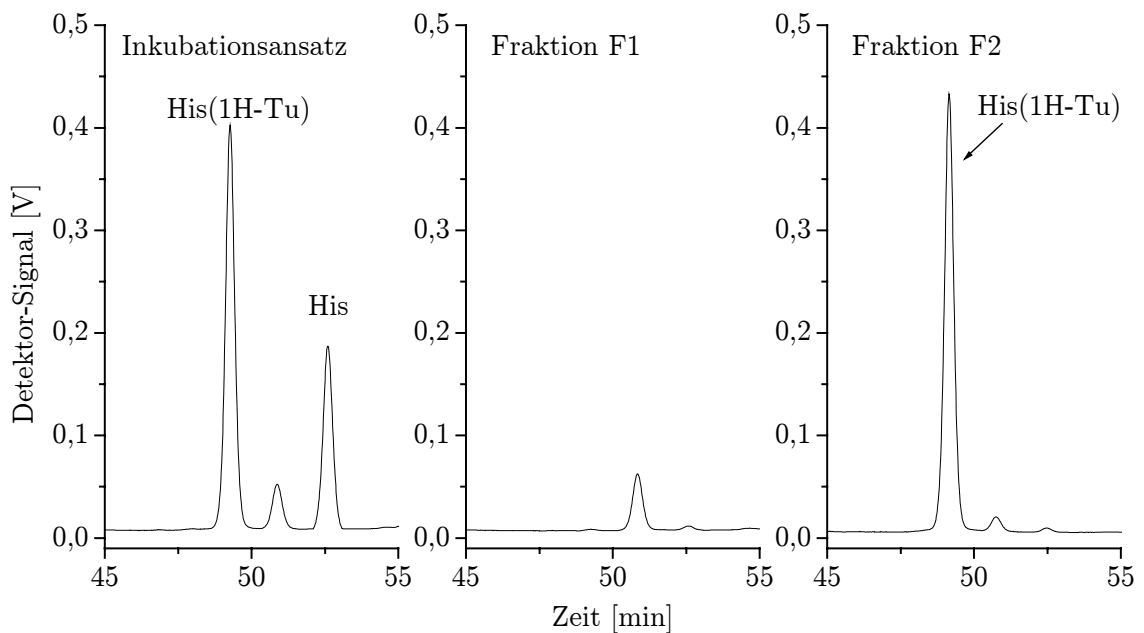


Abb. 4.8-8 ASA-Chromatogramme (Ausschnitte; Detektion: $\lambda = 570 \text{ nm}$) der isolierten Fraktionen im Vergleich mit dem des Inkubations-Syntheseansatzes von Ac-His und Tul A

Im ASA-Chromatogramm des Syntheseansatzes sind neben dem Histidin-Peak zwei weitere Peaks bei Retentionszeiten von 49,2 und 50,8 min detektierbar. Der Peak bei 49,2 min kann dabei eindeutig der Fraktion F2 und der mit der Retentionszeit von 50,8 min der Fraktion F1 zugeordnet werden. Ein Vergleich mit dem ASA-Chromatogramm des Inkubations-Syntheseansatzes von Hip-His-Leu und Tul A (siehe Abb. 4.8-6) zeigt eine qualitative Übereinstimmung bezüglich der Retentionszeiten der beiden neuen Peaks, was dafür spricht, dass bei der Inkubation von Ac-His mit Tul A die Seitenkette des Histidins in gleicher Weise modifiziert wird wie bei der Inkubation des größeren Peptids Hip-His-Leu mit Tul A. Dem Peak bei 49,2 min lässt sich hier ebenfalls das "Michael-Addukt" His(1H-Tu) zuordnen. Somit wäre das in Fraktion F2 isolierte Reaktionsprodukt das Acetyl-Derivat dieser modifizierten Aminosäure. Um diese Annahme zu bestätigen und auch um Hinweise auf die Struktur von Fraktion F1 zu erhalten, wurden die Fraktionen mittels ESI-TOF-MS massenspektrometrisch untersucht. Die Massenspektren der beiden Fraktionen sind in Abb. 4.8-9 abgebildet.

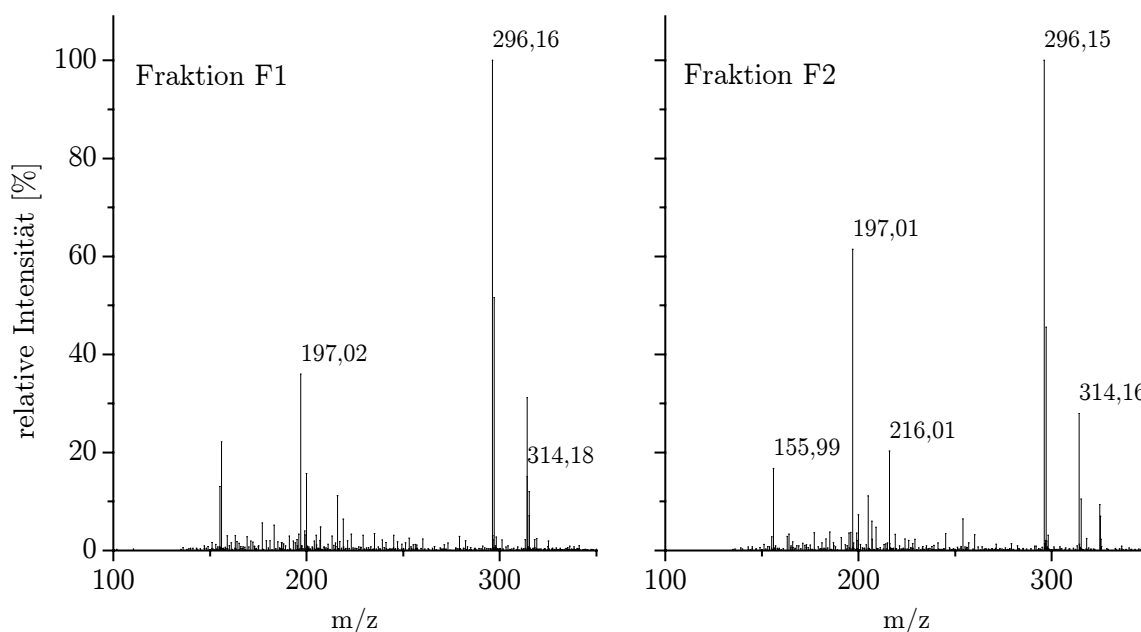


Abb. 4.8-9 Massenspektren der Fraktionen des Syntheseansatzes von Ac-His und Tul A
Die Massenspektren der beiden isolierten Fraktionen F1 und F2 des Syntheseansatzes von Ac-His und Tul A unterscheiden sich praktisch nicht voneinander. Beide enthalten die Molekülion-Massenzahl von 296,2. Für Fraktion F2 war dies zu erwarten, da diese Masse dem Molekülion MH^+ von Ac-His(1H-Tu) (Abb. 4.8-10 **29**) entspricht. Die gleiche Masse besitzt auch das Molekülion MH^+ des "Michael-Adduktes" von Tul A am π -Stickstoffatom des Imidazolringes (Abb. 4.8-10 **30**). Somit kann diese Verbindung der Fraktion F1 zugeordnet werden. Nach IUPAC-Nomenklatur lautet ihr Name 2-Amino-

3-[3-(2-oxo-tetrahydro-furan-3-ylmethyl)-3H-imidazol-4-yl]-propansäure. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit, wird sie vereinfacht als Ac-His(3H-Tu) bezeichnet.

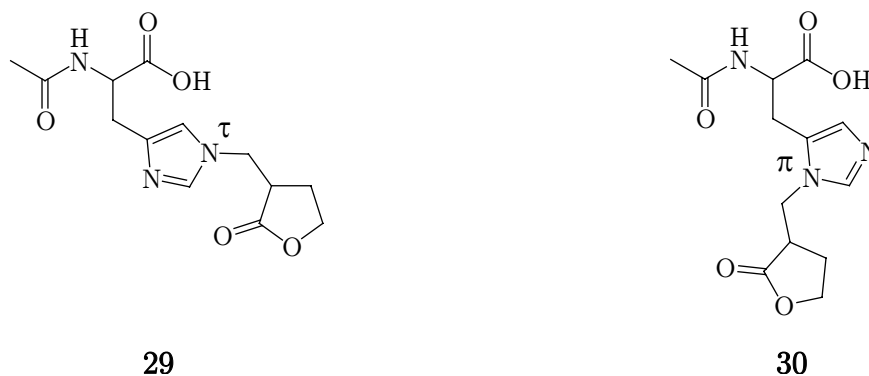


Abb. 4.8-10 Strukturen der isolierten Produkte Ac-His(1H-Tu) (**29**) und Ac-His(3H-Tu) (**30**) des Syntheseansatzes aus Ac-His und Tul A

Zusätzlich ist in beiden Fraktionen jeweils die Molekülion-Massenzahl 314,2 detektierbar. Die Massendifferenz von 18 zu den Molekülionen der Ac-His-Derivate deutet auf eine Addition von Wasser hin. Dies lässt sich durch die Isolation und Lagerung der Fraktionen in Reinstwasser erklären. Unter diesen Bedingungen kann sich der Lactonring des addierten Tul A unter Anlagerung von Wasser aufspalten (Abb. 4.8-11).

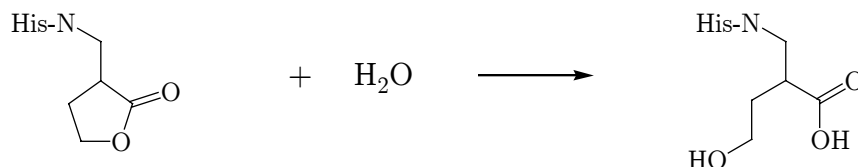


Abb. 4.8-11 Aufspaltung des Lactonringes unter Wasseranlagerung

Zusammenfassend lässt sich damit die Aussage treffen, dass die jeweils zwei unbekannt Peaks, welche mittels Aminosäureanalyse nach Säurehydrolyse bzw. analytischer RP-HPLC detektiert wurden, als Produkte einer Reaktion nach dem Mechanismus der Michael-Addition an der Aminosäureseitenkette des Histidins identifiziert wurden. Als nukleophile Zentren fungieren hier die Stickstoffatome im Imidazolring. Das τ -Stickstoffatom ist aber, wenn man die Peakflächen der Chromatogramme als Berechnungsgrundlage heranzieht, etwa zehnmal reaktiver gegenüber Tulipalin A als das π -Stickstoffatom. Diese Erkenntnisse bestätigen u.a. die Arbeiten von *Uchida und Stadtman (1992)*. Sie beschrieben ebenfalls Michael-Additionsprodukte der Aminosäureseitenkette Histidin mit einer α,β -ungesättigten Carbonylverbindung. Im Rahmen von Untersuchungen zu Reaktionen von Produkten der Lipidperoxidation mit Proteinen stellten sie fest, dass die Inkubation von N ^{α} -Acetyl-histidin mit 4-Hydroxynonenal zu einer Derivatisierung an Histidinseitenketten

führt und zwei neue Produkte detektierbar waren. Als wahrscheinliche Struktur für die Produkte gaben sie die Acetyl-Derivate von $N^\tau(N^\pi)$ -4-Dihydroxynonan-1-allyl-histidin an. Diese Vorhersage wurde von *Tsai und Sokoloski (1995)* mittels NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie bestätigt.

4.8.4 N^α -Hippuryl-lysin und 7-Hydroxycitronellal

Im Rahmen der bisher durchgeführten Experimente zur Reaktivität von 7-Hydroxycitronellal gegenüber Hip-Lys konnten mehrere neue Peaks im HPLC-Chromatogramm detektiert werden. Ziel war es nun, diesen Peaks eventuelle Reaktionsprodukte zuzuordnen zu können. Zu diesem Zweck wurde ein Syntheseansatz von Hip-Lys und 7-Hydroxycitronellal hergestellt. Gewählt wurden hier aus Zeitgründen die Bedingungen des Rückflussansatzes. Da mindestens ein Peak auf Grund seines UV-Spektrums nicht als Konjugationsprodukt von Hip-Lys in Frage kam, bot es sich auch hier an, die anstehende chromatographische Auftrennung des Reaktionsgemisches im Vorfeld durch eine Flüssig-Flüssig-Extraktion zu vereinfachen. Ein geeignetes Lösungsmittel wurde in tert.-Butylmethylether gefunden. Mit Hilfe der anschließenden semipräparativen HPLC konnten neben Hip-Lys fünf weitere Fraktionen (F1 - F5, siehe Abb. 4.8-12) isoliert werden.

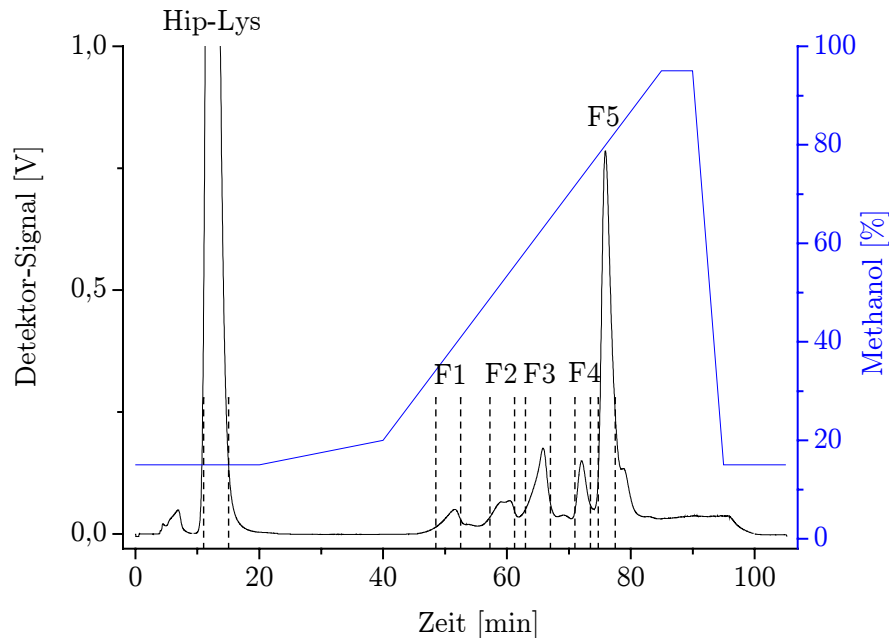


Abb. 4.8-12 Chromatogramm der semipräparativen HPLC (UV-Detektion: $\lambda = 230$ nm) des Syntheseansatzes von Hip-Lys und 7-Hydroxycitronellal

Nach Rechromatographie und Trocknung wurden die isolierten Fraktionen massenspektroskopisch untersucht. Die ermittelten Molekülion-Massenzahlen sind in Tab. 4.8-3 zusammengefasst.

Tab. 4.8-3 Molekülion-Massenzahlen der isolierten Fraktionen des Syntheseansatzes von Hip-Lys und 7-Hydroxycitronellal

Fraktion	F1	F2	F3	F4	F5
Molekülion-Massenzahl	626,48	461,33	902,61	478,47	768,62

Überraschend sind hier die teilweise recht hohen Molekülmassen, die dafür sprechen, dass das Verhältnis der Ausgangsstoffe im Produkt nicht in jedem Falle 1:1 ist wie bei den Reaktionen von Tul A mit den nukleophilen Aminosäureseitenketten. Die Fraktionen F2 und F4 sind rein rechnerisch die einzigen, auf welche dies zuträfe. Ein Produkt einer Schiff-Base-Reaktion ergäbe eine Molekülion-Massenzahl $[M+H]^+$ von 462,29 und ein einfaches Additionsprodukt 480,30. Die Differenz zur ermittelten Molekülion-Massenzahl ist jedoch zu deutlich, um diese Zuordnung eindeutig treffen zu können. Es waren daher weitere Methoden zur Strukturaufklärung notwendig. Leider wies lediglich Fraktion F5 eine ausreichende Reinheit und Substanzmenge auf, welche für eine Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie notwendig ist. Es gelang, die chemische Struktur des in Fraktion F5 isolierten Reaktionsproduktes durch Aufnahme von ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren mit Hilfe der zugehörigen zweidimensionalen Spektren (COSY, HSQC, HMBC) vollständig aufzuklären. Hilfreich war auch hier wieder der Vergleich mit den NMR-Spektren der Ausgangsstoffe. Es zeigte sich, dass sowohl die Struktur des Peptids als auch der Großteil der aliphatischen Kette des 7-Hydroxycitronellals erhalten geblieben sind. Wenn man jedoch die Signalintensitäten vergleicht, kann man feststellen, dass im Produkt das Verhältnis von Peptidgerüst zur aliphatischen Kette des 7-Hydroxycitronellal etwa 1 zu 3 ist. Weiterhin ist im ^1H -NMR-Spektrum des Produktes kein Signal mehr für ein Aldehyd-Wasserstoffatom detektierbar. Ebenso ist die chemische Verschiebung der in α -Position zur Aldehydgruppe befindlichen Wasserstoffatome verändert. Dies spricht einerseits für eine Reaktion an der Aldehydfunktion und andererseits zusätzlich für einen Verlust des Sauerstoffatoms an diesem Kohlenstoffatom. Möglich wäre das durch eine Schiff-Base-Reaktion. Hierbei schließt sich an die Additionsreaktion eine Abspaltung von Wasser an. Bestätigt wird dies durch eine Untersuchung von Fraktion F5 mittels Massenspektrometrie. Hier wurde für das Reaktionsprodukt eine Molekülion-Massenzahl von 768,62 ermittelt. Rein rechnerisch ergibt die Summe von einem Molekül Hip-Lys und 3 Molekülen 7-Hydroxycitronellal abzüglich 3 Molekülen Wasser eine Molekülion-Massenzahl $[M+H]^+$ von 770,56. Die Massendifferenz zur gefundenen Masse lässt sich durch die Bildung eines Pyridinium-Ions erklären. Den Hinweis auf ein Pyridinium-Ion liefert ein UV-Spektrum (siehe Abb. 4.8-13) des in Fraktion F5 enthaltenen Reaktionsproduktes. Hier ist ein für Pyridinium-Ionen charakteristisches Absorptionsmaximum von 280 nm detektierbar. Durch den Ringschluss verliert die Struktur ein Wasserstoffatom und durch die daraus resultierende positive Ladung am

Stickstoffatom bedarf es nicht mehr der Anlagerung eines Protons zur Erfassung im Massenspektrometer.

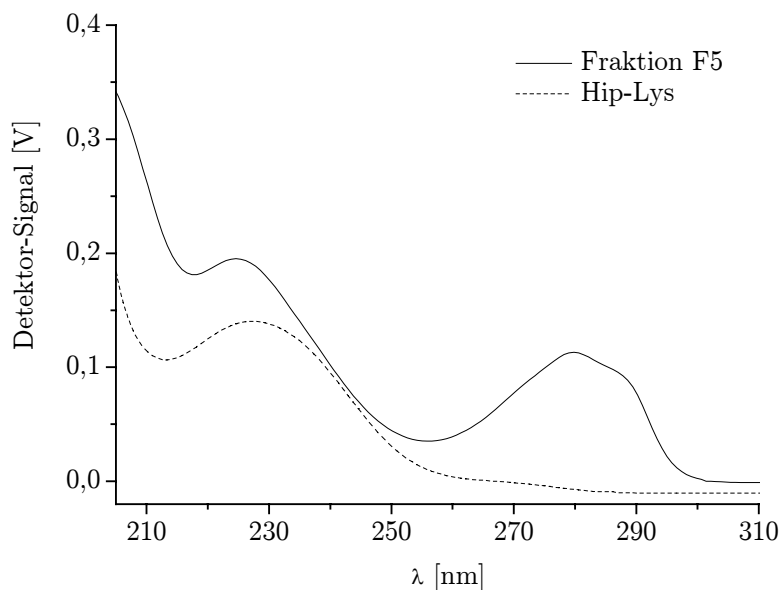
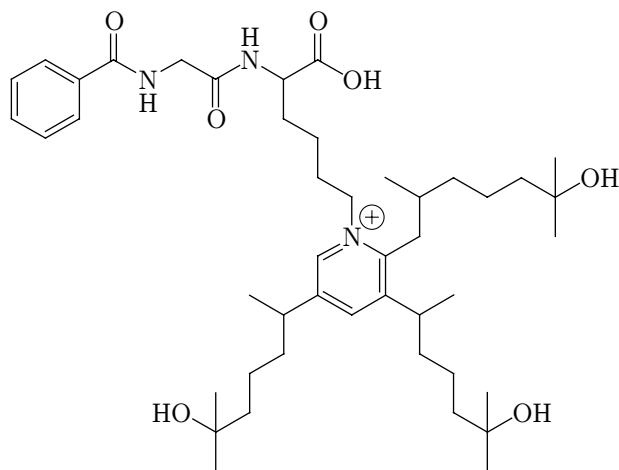


Abb. 4.8-13 Vergleich der UV-Spektren von dem in Fraktion F5 isolierten Produkt und dem Ausgangsstoff Hip-Lys

Dies ergäbe dann rechnerisch die Molekülion-Massenzahl von 768,56. Auf Grund dieser Daten lässt sich für die unbekannte Substanz in Fraktion F5 die in Abb. 4.8-14 (31) dargestellte Struktur angeben.



31

Abb. 4.8-14 Isoliertes Reaktionsprodukt der Reaktion von Hip-Lys und 7-Hydroxycitronellal

Ihr IUPAC-Name lautet 1-[5-(2-Benzoylamino-acetylamino)-5-carboxy-pentyl]-2-(6-hydroxy-2,6-dimethyl-heptyl)-3,5-bis-(5-hydroxy-1,5-dimethyl-hexyl)-pyridinium. Etwas Vergleichbares wurde unter anderem von *Baker et al. (1998)* beschrieben. Im Rahmen

von Untersuchungen zu Reaktionen von Produkten der Lipidperoxidation mit Proteinen setzten sie N-Acetylglycyllysin mit 2-Alkenalen um. Dabei konnten sie die entstehenden Produkte mittels NMR- und Massenspektroskopie aufklären. Es zeigte sich, dass nach initiiender Schiff-Base-Reaktion verschiedene Folgereaktionen stattfanden, welche u.a. auch zu Pyridinium-Ionen führten. Pyridinium-Ionen als Reaktionsprodukte an der Lysinseitenkette konnten ebenfalls bei der Reaktion von Carbobenzoxylysin mit Glycolaldehyd (*Nagai et al., 2002*) und bei der Reaktion von Acetyllysin mit Acrolein (*Furuhata et al., 2003*) sowie mit Glyceraldehyd (*Usui und Hayase, 2003*) detektiert werden. Über die Bildung der Substanz in Fraktion F5 lässt sich an dieser Stelle nur spekulieren. Es ist aber denkbar, dass auch in diesem Falle der erste Schritt eine Schiff-Base-Reaktion der ϵ -Aminogruppe der Lysinseitenkette mit der Aldehydfunktion des 7-Hydroxycitronellals ist, wie dies von *Patlewicz et al. (2002)* für die Reaktion von 7-Hydroxycitronellal mit Proteinen vorhergesagt wurde.

4.8.5 N^α-Hippuryl-lysin und Zimtaldehyd

Zimtaldehyd zeigte in den bisher durchgeführten Experimenten eine hohe Reaktivität gegenüber Hip-Lys. Dabei war mit Hilfe der analytischen HPLC eine Vielzahl an in Blindansätzen nicht auftretenden Produkten zu detektieren. Um diesen Peaks eventuelle Reaktionsprodukte zuordnen zu können, wurde ein Syntheseansatz von Hip-Lys und Zimtaldehyd unter Rückflussbedingungen hergestellt. Auf Grund der Menge der detektierten Produkte war es vor der chromatographischen Auftrennung des Reaktionsgemisches notwendig, Stoffe, die auf Grund ihres UV-Spektrums als Konjugationsprodukte von Hip-Lys ausgeschlossen werden konnten, aus dem Gemisch zu entfernen. Mittel der Wahl war auch in diesem Falle eine Flüssig-Flüssig-Extraktion. Als Extraktionsmittel erwies sich Essigsäureethylester als geeignet. Mit Hilfe der sich an die Extraktion anschließenden semipräparativen HPLC wurden neben Hip-Lys acht weitere Fraktionen (F1 - F8, siehe Abb. 4.8-15) isoliert. Diese wiesen teilweise eine ölige bis harzartige Konsistenz auf. Nach Beschreibungen von *Sprung (1940)* führen Reaktionen von Zimtaldehyd mit aliphatischen Aminen auch zu harzartigen Verbindungen, welche als Produkte von Reaktionen ähnlich der Aldolreaktion entstehen können. Nach Rechromatographie und Trocknung im Stickstoffstrom wurden die isolierten Fraktionen massenspektroskopisch untersucht. Die ermittelten Molekülion-Massenzahlen sind in Tab. 4.8-4 zusammengefasst.

Tab. 4.8-4 Molekülion-Massenzahlen der isolierten Fraktionen des Syntheseansatzes von Hip-Lys und Zimtaldehyd

Fraktion	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
Molekülion-Massenzahl	446,1	536,1	424,2	566,1	1103,4	959,3	700,3	682,2

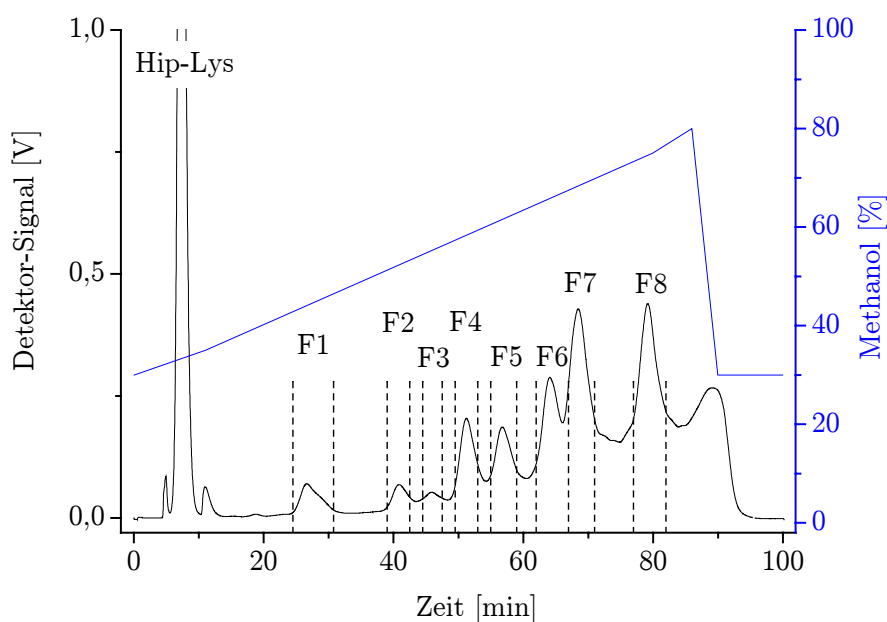


Abb. 4.8-15 Chromatogramm der semipräparativen HPLC (UV-Detektion: $\lambda = 230 \text{ nm}$) des Syntheseansatzes von Hip-Lys und Zimtaldehyd

Die gefundenen Massenzahlen belegen ebenso wie die Anzahl an detektierbaren Reaktionsprodukten, dass bei der Reaktion von Zimtaldehyd mit Hip-Lys komplexe Reaktionsmechanismen stattfinden. Wie im Falle des 7-Hydroxycitronellal sind auch hier keine Molekülion-Massenzahlen für einfache Additionsprodukte zu detektieren. *Patlewicz et al. (2002)* sagten für die Reaktion von Zimtaldehyd mit Proteinen eine Additionsreaktion nach Art der Michael-Addition voraus. Dies ergäbe im Falle des Hip-Lys ein "Michael-Addukt" mit einer Molekülion-Massenzahl $[M+H]^+$ von 440,19. Ein Produkt einer Schiff-Base-Reaktion würde ein Imin mit der Molekülion-Massenzahl $[M+H]^+$ von 422,18 ergeben. Die gefundenen Massen sprechen aber eher dafür, dass an ein Hip-Lys-Molekül mehr als ein Zimtaldehyd-Molekül addiert werden. Auch Quervernetzungsreaktionen zwischen zwei Hip-Lys-Molekülen wären bei Massenzahlen um die 1000 denkbar. Leider wiesen die isolierten Fraktionen nicht die für eine Untersuchung mittels NMR-Spektroskopie notwendige Reinheit und Substanzmenge auf, sodass diese Methode nicht zur Strukturaufklärung herangezogen werden kann.

4.8.6 LC-MS-Experimente mit verschiedenen Lysin-Derivaten

Die Isolation und Strukturaufklärung von Konjugationsprodukten an die nukleophile Aminosäureseitenkette des Lysins brachte im Falle des Zimtaldehyds keine eindeutige Zuordnung von Reaktionsprodukten. Bei der Reaktion von 7-Hydroxycitronellal mit Hip-Lys konnte lediglich ein Reaktionsprodukt eindeutig identifiziert werden. In beiden Reaktionsansätzen entsteht eine Vielzahl unbekannter Verbindungen. Bisher ist es leider nicht möglich gewesen, echte Konjugationsprodukte von eventuell auftretenden

Nebenreaktionsprodukten zu unterscheiden. Eine Möglichkeit hierzu bietet sich mit dem Einsatz der Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS). Hierfür wurden die Haptene 7-Hydroxycitronellal und Zimtaldehyd mit verschiedenen Lysin-Derivaten unter Rückfluss umgesetzt. Neben den bisher eingesetzten Derivaten Hip-Lys und Ac-Lys fand zusätzlich Boc-Lys Verwendung (siehe Abb. 4.8-16). Auf die prinzipielle Reaktivität der Haptene gegenüber der ϵ -Aminogruppe des Lysins sollte die verwendete Schutzgruppe keinen Einfluss haben.

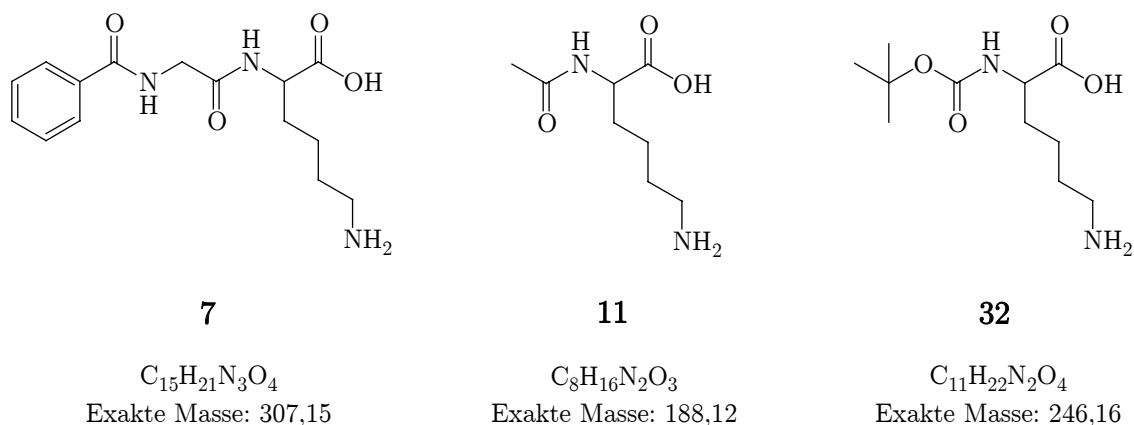


Abb. 4.8-16 Für LC-MS-Experimente verwendete Lysin-Derivate Hip-Lys (**7**), Ac-Lys (**11**) und Boc-Lys (**32**) mit Angabe der exakten Molekülmasse

Im Anschluss an die Reaktion wurden die Ansätze mit Hilfe der LC-MS untersucht. Durch die unterschiedlichen Massen der verwendeten Lysin-Derivate ergibt sich hier die Möglichkeit, beim Vergleich der in den jeweiligen Ansätzen detektierten Massenzahlen die wirklichen Konjugationsprodukte der Lysin-Derivate von anderen Bestandteilen der Ansätze zu unterscheiden. Unter anderen Bestandteilen sind hier Produkte zu verstehen, welche die Haptenmoleküle untereinander bilden. Durch die Anwesenheit der Lysin-Derivate mit den enthaltenen funktionellen Gruppen, welche durch ihren sauren oder basischen Charakter auch als Katalysator dienen können, reagieren die Haptene im Reaktionsansatz untereinander möglicherweise anders als im Blindansatz.

7-Hydroxycitronellal

In Abb. 4.8-17 sind die LC-MS-Chromatogramme der Reaktionsansätze der verschiedenen Lysin-Derivate mit 7-Hydroxycitronellal unter Zuordnung der Molekülion-Massenzahlen gegenübergestellt. Gut erkennbar sind hier die Lysin-Derivate im vorderen Bereich der Chromatogramme, denen sich leicht die Molekülion-Massenzahlen $[M+H]^+$ zuordnen lassen. Im Chromatogramm des Hip-Lys-Ansatzes ist dem größten Peak die Molekülion-Massenzahl von 768,52 zuzuordnen. Dies entspricht dem bereits isolierten Reaktionsprodukt **31** (siehe Abb. 4.8-14), bei welchem sich drei Moleküle 7-Hydroxycitronellal an die ϵ -Aminogruppe des Lysins unter Bildung eines Pyridinium-Ions anlagern.

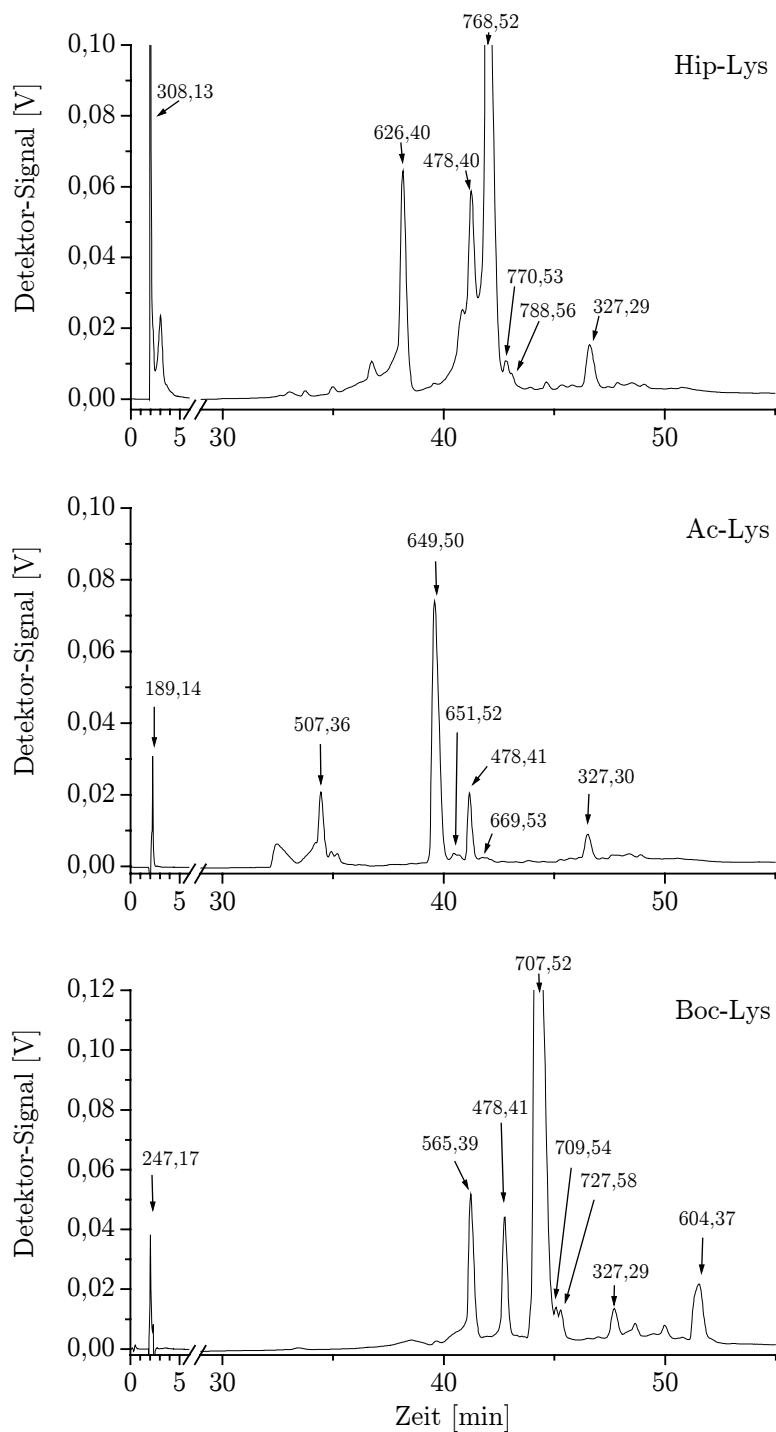


Abb. 4.8-17 LC-Chromatogramme der LC-MS (UV-Detektion: $\lambda = 230 \text{ nm}$) der Rückflussansätze verschiedener Lysin-Derivate mit 7-Hydroxycitronellal (Den Peaks sind dabei die jeweiligen Molekülion-Massenzahlen zugeordnet.)

Berücksichtigt man die Masse des jeweils eingesetzten Lysin-Derivates, lässt sich auch in den Ansätzen mit Ac-Lys und Boc-Lys dem Hauptreaktionsprodukt die Massenzahl des jeweiligen Pyridinium-Ions zuordnen: 649,50 im Falle des Ac-Lys-Ansatzes und 707,52 beim Boc-Lys-Ansatz. Das Ergebnis des Ansatzes mit Hip-Lys wird damit bestätigt. Mit dem Ziel einen möglichen Bildungsweg dieses Konjugationsproduktes

vorzuschlagen und um eventuell weitere Produkte zu identifizieren, wurden die Massenzahlen der Ansätze miteinander verglichen. Neben dem Hauptreaktionsprodukt sind weitere Peaks detektierbar, deren Massenzahl vom eingesetzten Lysin-Derivat abhängig ist. Gleiche Additionsprodukte ergeben dabei stets auch die gleiche Differenz aus gefundener Massenzahl und Massenzahl des Lysin-Derivates. Weiterhin sind Peaks detektierbar, welche in allen Ansätzen gleichermaßen zu finden sind und somit keine Additionsprodukte an die Lysinseitenkette darstellen. In Tab. 4.8-5 sind die in den Ansätzen detektierten Massenzahlen gegenübergestellt.

Tab. 4.8-5 Detektierte Massenzahlen in den Ansätzen verschiedener Lysin-Derivate mit 7-Hydroxycitronellal

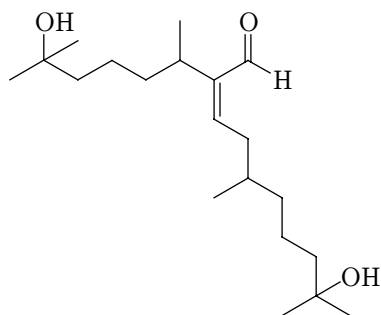
Ansatz mit		Bemerkungen		
Hip-Lys [M+H] ⁺ : 308,13	Ac-Lys [M+H] ⁺ : 189,14			
	Boc-Lys [M+H] ⁺ : 247,17			
Lysin-Derivat-abhängige Massenzahlen		Δ^*		
768,52	649,50	707,52	460,4	Pyridinium-Ion
770,53	651,52	709,54	462,4	Schiff-Base 35
788,56	669,53	727,58	480,4	”Michael-Addukt” 36 oder Halbaminal
626,40	507,36	565,39	318,2	
Lysin-Derivat-unabhängige Massenzahlen		t_R [min]**		
327,29	327,30	327,29	46,8	Aldoladditionsprodukt zweier 7-HC-Moleküle 33
478,40	478,41	478,41	41,2	

*: Δ gibt an dieser Stelle die Differenz zwischen der gefundenen Massenzahl und dem jeweiligen Lysin-Derivat an.

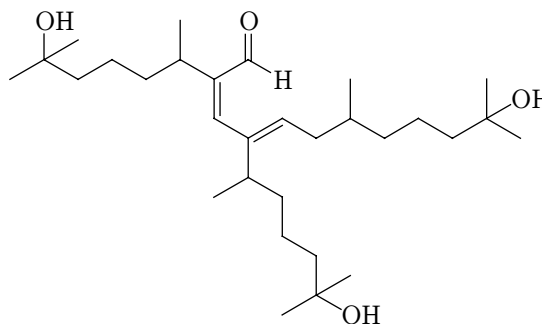
** t_R ist die Retentionszeit, bei welcher die jeweilige Massenzahl in allen drei Ansätzen detektierbar war.

Nach Vorhersagen von *Patlewicz et al. (2002)* sollte 7-Hydroxycitronellal mit der Lysinseitenkette nach Art einer Schiff-Base-Reaktion reagieren. Ein Hinweis darauf konnte jedoch nicht gefunden werden. Das dabei entstehende Imin würde eine Massendifferenz Δ von 154,1 ergeben, jedoch ist in keinem der Ansätze eine Massenzahl zu finden, die für eine Addition von einem Molekül 7-Hydroxycitronellal an die Lysinseitenkette spricht. Das würde bedeuten, dass 7-Hydroxycitronellal selbst nicht in der Lage ist, mit der ϵ -Aminogruppe des Lysins zu reagieren. Es ist vielmehr anzunehmen, dass 7-Hydroxycitronellal durch eine vorgelagerte Reaktion in eine reaktivere Verbindung umgewandelt wird. Einen Hinweis darauf gibt die in allen Ansätzen gleichermaßen detektierte Massenzahl von 327,3. Diese entspricht genau dem

Molekülion $[M+H]^+$ eines Reaktionsproduktes der Aldoladdition und Aldolkondensation von zwei Molekülen 7-Hydroxycitronellal. Möglich ist diese Reaktion durch das Vorhandensein der ϵ -Aminogruppe des Lysins, welche hier als Katalysatorbase fungieren kann, und die im Rückflussansatz herrschende hohe Reaktionstemperatur. Dabei entsteht eine α,β -ungesättigte Carbonylverbindung (siehe Abb. 4.8-18 **33**).



33
 $C_{20}H_{38}O_3$
 Exakte Masse: 326,28



34
 $C_{30}H_{56}O_4$
 Exakte Masse: 480,42

Abb. 4.8-18 Mögliche Produkte von Aldoladditions-Aldolkondensations-Reaktionen von zwischen 7-Hydroxycitronellal-Molekülen mit Angabe der exakten Molekülmassen

Bei dieser vinylogenen Carbonylverbindung werden die Eigenschaften des Carbonylkohlenstoffatoms praktisch ungeschwächt auf das β -Kohlenstoffatom übertragen. Die Verbindung könnte nun einerseits nach Schiff-Base-Reaktion und andererseits auch nach dem Mechanismus einer Michael-Addition mit der ϵ -Aminogruppe des Lysins reagieren. Hinweise auf die dabei entstehenden Reaktionsprodukte konnten jedoch in den Ansätzen nicht gefunden werden. Weiterhin wäre denkbar, dass sich eine weitere Aldoladdition-Aldolkondensation anschließt, welche zu der Verbindung **34** (siehe Abb. 4.8-18) führen würde. Die Verbindung selbst konnte nicht detektiert werden, was möglicherweise an ihrer schlechten Ionisierbarkeit liegt. Es wurden jedoch Molekülion-Massenzahlen möglicher Reaktionsprodukte der Verbindung **34** mit der Lysinseitenkette in allen Ansätzen detektiert. So konnten Massenzahlen sowohl für die entsprechenden Schiff-Basen (**35**), als auch für "Michael-Addukte" (**36**) gefunden werden (siehe Abb. 4.8-19). Die dem "Michael-Addukt" zugeordnete Massenzahl könnte jedoch auch auf das entsprechende Halbaminale, welches das Zwischenprodukt bei der Bildung der Schiff-Basen **35** darstellt, zurückgeführt werden. Die Methode der Massenspektrometrie erlaubt an dieser Stelle keine eindeutige Unterscheidung. Beide Massenzahlen kommen jedoch jeweils nur in geringen Mengen in den Ansätzen vor. Ob sie Zwischenprodukte bei der Bildung des als Hauptprodukt identifizierten Pyridinium-Ions **31** darstellen oder ob sie lediglich aus Nebenreaktionen hervorgegangen sind, lässt sich nicht mit Bestimmtheit sagen. In der Literatur sind

zwar Pyridinium-Ionen als Produkte der Reaktion der Lysinseitenkette mit α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen (*Baker et al., 1998; Furuhashi et al., 2003*) oder Hydroxyaldehyden (*Nagai et al., 2002; Usui und Hayase, 2003*) bekannt, über deren Bildungsmechanismus wird jedoch lediglich spekuliert.

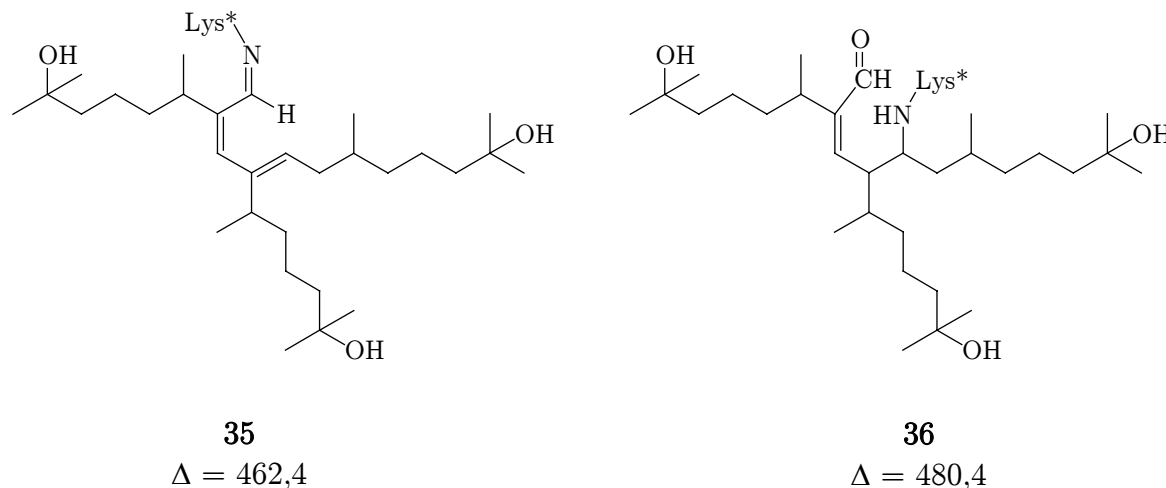


Abb. 4.8-19 mögliche Additionsprodukte von 34 an die ϵ -Aminogruppe des Lysins (Lys* steht hier für die jeweiligen Lysin-Derivate) unter Angabe der Massendifferenz zum Lysin-Derivat (vgl. auch Tab. 4.8-5)

Trotz der in diesem Experiment gewonnenen neuen Erkenntnisse lässt sich der Reaktionsmechanismus an dieser Stelle nicht vollständig erklären. Ein entscheidender Schritt bei der Reaktion von 7-Hydroxycitronellal mit der ϵ -Aminogruppe des Lysins scheint die vorherige Umwandlung des Aldehyds in eine α,β -ungesättigte Carbonylverbindung zu sein.

Zimtaldehyd

In Abb. 4.8-20 sind die LC-MS-Chromatogramme der Reaktionsansätze der verschiedenen Lysin-Derivate mit Zimtaldehyd unter Zuordnung der Molekülion-Massenzahlen gegenübergestellt. Im Vergleich zu den Ansätzen mit 7-Hydroxycitronellal (vgl. Abb. 4.8-17) ist hier die Anzahl der während der Reaktion entstehenden neuen Peaks deutlich höher. Im vorderen Bereich der Chromatogramme, bei Retentionszeiten von 2 bis 3 min, sind die Lysin-Derivate leicht an Hand ihrer Molekülion-Massenzahlen $[M+H]^+$ identifizierbar. Zimtaldehyd ist im verwendeten Positiv-Modus quasi nicht ionisierbar. Aus diesem Grund lässt sich der Zimtaldehydpeak lediglich an Hand seines UV-Spektrums identifizieren. Neben Zimtaldehyd sind in den LC-MS-Chromatogrammen der Ansätze noch weitere Peaks detektierbar, denen keine Massenzahl zugeordnet werden kann. Diese eluieren bei 10,5 bzw. zwischen 31 und 33 min. Bei dem Peak, welcher bei 33 min eluiert, handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um Zimtsäure. Diese konnte bereits in den Rückfluss- und Inkubationsansätzen mit Hip-Lys detektiert werden (siehe auch 4.3.1 und 4.4.3).

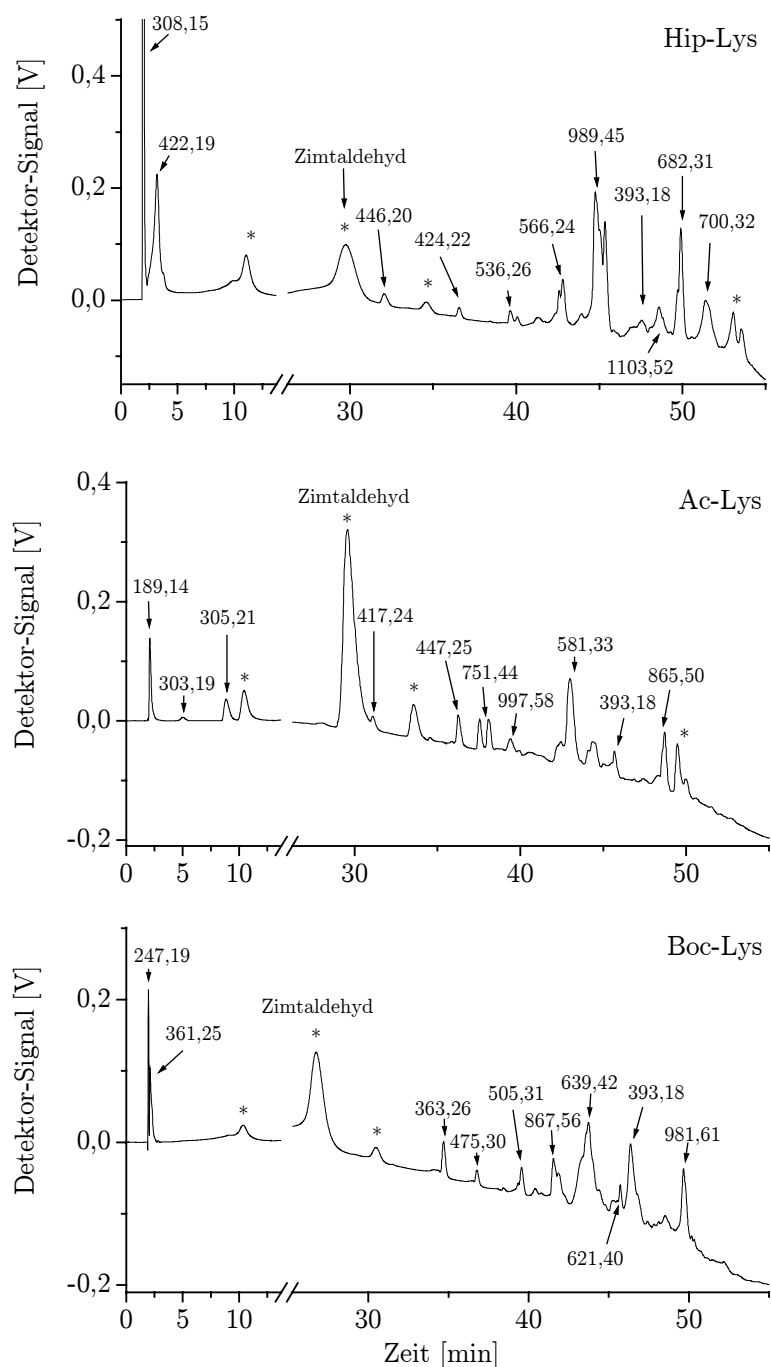


Abb. 4.8-20 LC-Chromatogramme der LC-MS (UV-Detektion: $\lambda = 230 \text{ nm}$) der Rückflussansätze verschiedener Lysin-Derivate mit Zimtaldehyd (Den Peaks sind dabei die jeweiligen Molekülion-Massenzahlen zugeordnet. Ausnahme: die mit (*) gekennzeichneten Peaks, die zwar UV-aktiv sind, jedoch keine im verwendeten Modus ionisierbaren Moleküle enthalten.)

Wie bei den Ansätzen mit 7-Hydroxycitronellal wurden auch hier die detektierten Massenzahlen miteinander verglichen, um eventuelle Produkte identifizieren zu können. Diese besitzen Massenzahlen, welche vom jeweils verwendeten Lysin-Derivat abhängig sind. Gleiche Additionsprodukte ergeben dabei stets die gleiche Differenz aus

bestimmter Massenzahl und Massenzahl des Lysin-Derivates. In Tab. 4.8-6 sind die in den jeweiligen Ansätzen gefundenen Massenzahlen gegenübergestellt.

Tab. 4.8-6 Detektierte Massenzahlen in den Ansätzen verschiedener Lysin-Derivate mit Zimtaldehyd

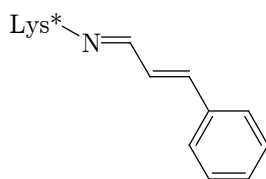
Hip-Lys [M+H] ⁺ : 308,13	Ansatz mit			Bemerkungen
	Ac-Lys [M+H] ⁺ : 189,14	Boc-Lys [M+H] ⁺ : 247,17		
Lysin-Derivat-abhängige Massenzahlen			Δ^*	
422,19	303,19	361,25	114,0	Schiff-Base 37
424,22	305,21	363,26	116,1	
536,26	417,24	475,30	228,1	Pyridinium-Ion 38
566,24	447,25	505,31	258,1	
682,31	-	621,40	374,2	Produkt 40
700,32	581,33	639,42	392,2	Produkt 41
989,45	751,44	867,57	374,2 ^{**}	Quervernetzungsprodukt 42
1103,52	865,50	981,61	488,2 ^{**}	
Lysin-Derivat-unabhängige Massenzahlen			$t_R[\text{min}]^{***}$	
393,18	393,18	393,18	47	evtl. Konjugationsprodukt 39 dreier Zimtaldehydmoleküle

*: Δ gibt an dieser Stelle die Differenz zwischen der detektierten Massenzahl und dem jeweiligen Lysin-Derivat an.

** : Hier scheinen zwei Moleküle Lysin-Derivat involviert zu sein. Der Wert ergibt sich aus der Differenz von detektierter Massenzahl und 2 mal Lysin-Derivat ($[\text{M}+\text{H}]^+$ und M).

***: t_R ist die Retentionszeit, bei welcher die Massenzahl in allen drei Ansätzen detektierbar war.

Prinzipiell kann Zimtaldehyd unter den vorliegenden Bedingungen nach zwei verschiedenen Mechanismen direkt mit der ϵ -Aminogruppe des Lysins reagieren (*Elahi et al., 2004*). Einmal nach einer Schiff-Base-Reaktion am Carbonylkohlenstoff und weiterhin nach dem Mechanismus einer Michael-Addition am β -Kohlenstoffatom. *Patlewicz et al. (2002)* favorisieren dabei die Reaktion nach dem Mechanismus der Michael-Addition. Durchsucht man die Chromatogramme nach den jeweiligen Massenzahlen, so stellt man fest, dass die entsprechenden Michael-Addukte in den Ansätzen nicht detektierbar sind. Man findet jedoch bei Retentionszeiten zwischen 3 und 6 min Massenzahlen, welche Iminen, also Produkten einer Schiff-Base Reaktion zwischen Zimtaldehyd und der Lysinseitenkette, zugeordnet werden können (siehe Abb. 4.8-21 **37**).



37

Abb. 4.8-21 Produkt der Schiff-Base-Reaktion von Lysin-Derivaten mit Zimtaldehyd (Lys* repräsentiert die jeweiligen Lysin-Derivate)

Insgesamt konnten in den Ansätzen mindestens 8 mögliche Konjugationsprodukte an der Lysinseitenkette festgestellt werden. Die Massendifferenzen zu den jeweiligen Lysin-Derivaten lassen auf Mehrfachadditionen schließen, bei denen sich ähnlich wie bei 7-Hydroxycitronellal bis zu drei Zimtaldehydmoleküle an ein Molekül Lysin-Derivat anlagern können. Zwei der detektierten Massendifferenzen deuten auf eine Beteiligung von zwei Molekülen Lysin-Derivat im Konjugationsprodukt hin. Somit scheint durch Zimtaldehyd eine Quervernetzung von Proteinen über die Lysinseitenkette möglich zu sein. Dabei waren bis zu vier Moleküle Zimtaldehyd beteiligt. Eine ähnliche Quervernetzung von Lysinseitenketten wurde von *Baker et al. (1998)* bei der Reaktion von N-Acetylglycyllysin mit *trans*-2-Hexenal beschrieben.

Ausgehend von der Schiff-Base **37** lässt sich auch ein möglicher Reaktionsmechanismus für die Produkte mit der Massendifferenz 228,1 angeben. Analog zu den Beobachtungen von *Furuhata et al. (2003)*, die bei der Reaktion von Acrolein mit Acetyl-lysin die Bildung eines Pyridinium-Ions beobachteten, könnte sich auch bei der Reaktion von Zimtaldehyd mit der Lysinseitenkette an die Schiff-Base-Reaktion eine Art Michael-Addition mit einem zweiten Molekül Zimtaldehyd anschließen. Dieses Zwischenprodukt kondensiert unter Wasserabspaltung zu einem Pyridinium-Ion (Abb. 4.8-22).

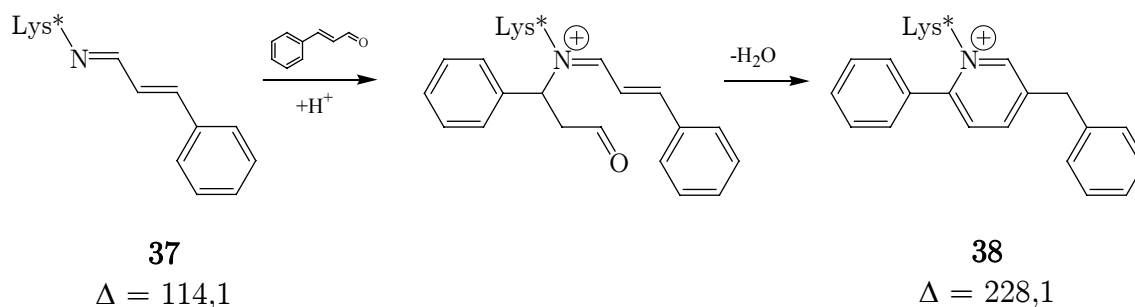


Abb. 4.8-22 Mögliche Folgereaktion zur Bildung eines Pyridinium-Ions (Lys* steht für die jeweiligen Lysin-Derivate)

Ob die höherkonjugierten Produkte ebenfalls durch Folgereaktionen aus der Schiff-Base (**37**) entstehen, oder ob, wie in Falle des 7-Hydroxycitronellal, Zimtaldehydmoleküle in Anwesenheit der Peptide untereinander reagieren, lässt sich nicht mit Sicherheit

aussagen. Neben den oben erwähnten Peaks, welchen auf Grund ihrer schlechten Ionisierbarkeit keine Massenzahl zugeordnet werden konnte, wird diese Vermutung nur dadurch gestützt, dass in allen drei Ansätzen bei einer Retentionszeit von 47 min eine Verbindung mit der Molekülon-Massenzahl $[M+H]^+$ von 393,18 detektierbar war. Rein rechnerisch ergibt sich diese Molekülon-Massenzahl, wenn drei Moleküle Zimtaldehyd unter Abspaltung von vier Wasserstoffatomen miteinander reagieren. Die Angabe von Struktur und möglichem Bildungsmechanismus dieser Verbindung wäre jedoch an dieser Stelle pure Spekulation. Diese Verbindung **39** scheint jedoch eine wichtige Rolle bei der Bildung weiterer Konjugationsprodukte zu spielen (siehe Abb. 4.8-23).

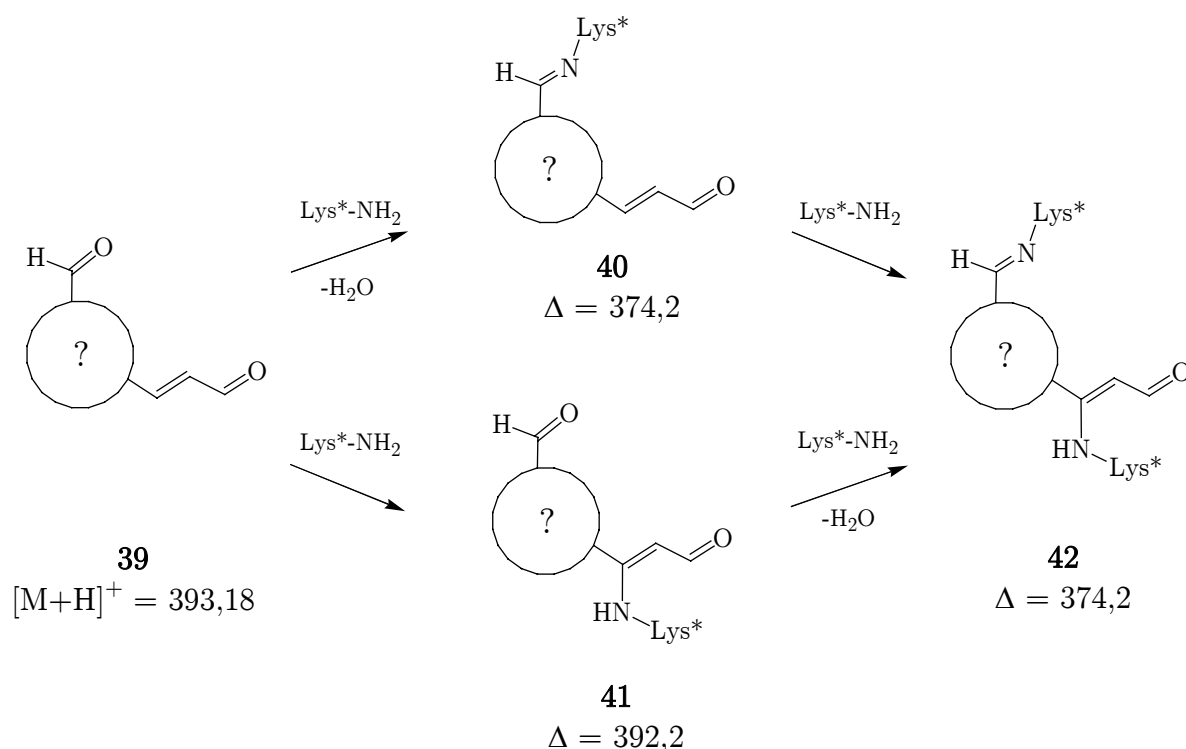


Abb. 4.8-23 Möglicher Reaktionsweg zu einem Quervernetzungsprodukt

Die Verbindung **39** scheint in der Lage zu sein, nach zwei verschiedenen Mechanismen mit der ϵ -Aminogruppe des Lysins reagieren zu können. Am wahrscheinlichsten sind hier einmal eine Schiff-Base-Reaktion, welche zu Produkt **40** führt und andererseits eine "Michael-Addition", welche Produkt **41** ergeben würde. Weiterhin lässt sich vermuten, dass beide mit einem weiteren Molekül Lysin-Derivat zu einem Quervernetzungsprodukt **42** reagieren können. Ein eindeutiger Mechanismus der Reaktion von Zimtaldehyd mit der Lysinseitenkette lässt sich jedoch mit den vorliegenden Daten der LC-MS-Untersuchungen nicht angeben. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die bisher in der Literatur diskutierten Reaktionsmechanismen der Michael-Addition bzw. Schiff-Base-Reaktion von einem Molekül Zimtaldehyd an die ϵ -Aminogruppe des Lysins (Elahi et al., 2004) nicht ausreichen, die Reaktion der Lysinseitenkette mit Zimtaldehyd zu beschreiben.

4.9 Reaktion von Tulipalin A mit Proteinen

4.9.1 Nachweis einer Konjugation am Beispiel Rinderserumalbumin

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass bei der Reaktion der kontaktallergenen Verbindung Tulipalin A mit Modellpeptiden die Aminosäureseitenketten von Lysin und Histidin modifiziert werden. Die dabei entstehenden "Michael-Additionsprodukte" sind säurestabil und können mittels Aminosäureanalyse nach Säurehydrolyse detektiert und bestimmt werden. Diese Analysenmethode bietet die Möglichkeit die Modifikationen nicht nur an den Aminosäureseitenketten von einfachen Modellpeptiden nachzuweisen, sondern auch an den Aminosäureseitenketten nativer Proteine. Rinderserumalbumin (BSA) ist als Protein für diesen Versuch eine gute Wahl, da es sehr reich an Lysin ist und auch Histidin in ausreichender Menge vorhanden ist. Auf Grund der in den Vorversuchen gewonnenen Erkenntnisse wurden für die Reaktion von Tul A mit BSA Rückflussbedingungen und Methanol als Lösungsmittel gewählt. Das in Methanol unlösliche BSA lag dabei im Reaktionsansatz suspendiert vor. Ein Vergleich der Aminosäureanalyse nach Säurehydrolyse des Reaktionsansatzes mit der eines Blindansatzes von BSA zeigt eine deutliche Verringerung des Histidingehaltes im Reaktionsansatz gegenüber dem Blindansatz (siehe Abb. 4.9-1). Eine ähnliche qualitative Aussage ist beim Lysin nicht möglich, da es sich, bedingt durch den hohen Gehalt in BSA, außerhalb des Kalibrierbereiches der Methode befand.

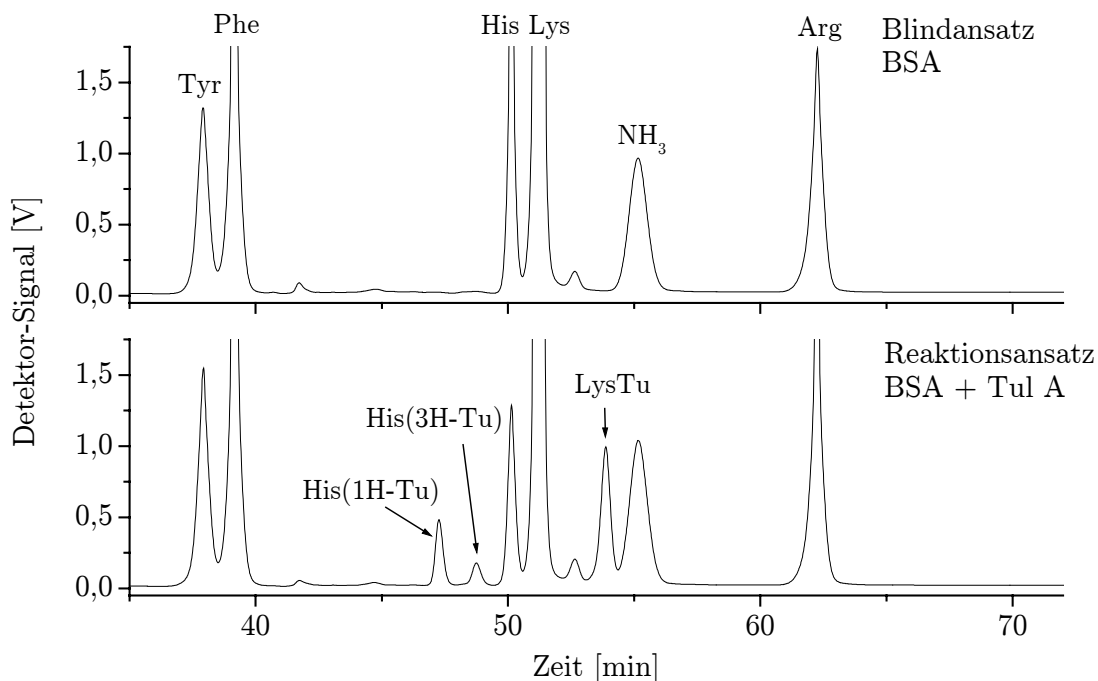


Abb. 4.9-1 ASA-Chromatogramme (Ausschnitte; Detektion: $\lambda = 570$ nm) von BSA und dem Reaktionsansatz aus BSA und Tul A im Vergleich

Zusätzlich konnten im Chromatogramm des Reaktionsansatzes drei neue Peaks im Aminosäurespektrum detektiert werden. Auf Grund der oben beschriebenen Strukturaufklärungsexperimente (vgl. 4.8.2 und 4.8.3) und dem Vergleich der Retentionszeiten lassen sich diesen Peaks die "Michael-Additionsprodukte" LysTu, His(1H-Tu) und His(3H-Tu) der Aminosäuren Lysin und Histidin zuordnen. Dies zeigt, dass die in den Versuchen mit Modellpeptiden isolierten Konjugationsprodukte von Tulipalin A an nukleophile Aminosäureseitenketten auch in nativen Proteinen entstehen können. Eine Michael-Addition einer α,β -ungesättigten Carbonylverbindung an die Histidinseitenketten in BSA wurde auch von *Alaiz und Giron (1994)* beschrieben. Im Rahmen von Studien zur Lipidperoxidation konnten sie nach Inkubation von Rinderserumalbumin (BSA) mit 2-Octenal in Phosphatpuffer einen Verlust an Lysin und Histidin feststellen. Mit Hilfe der Aminosäureanalyse konnten aber lediglich zwei unbekannte Peaks detektiert werden, welche als modifizierte Histidinseitenketten identifiziert wurden. Im Rahmen von Untersuchungen zu Bindungsmechanismen von kontaktallergenen Substanzen an Proteine ist in der Literatur jedoch noch nichts beschrieben.

4.9.2 Inkubationsversuche mit ausgewählten Proteinen

Nachdem nachgewiesen wurde, dass bei einer Reaktion von Tulipalin A mit BSA unter Rückflussbedingungen ebenfalls die bereits in den Versuchen mit den Modellpeptiden identifizierten "Michael-Additionsprodukte" LysTu, His(1H-Tu) und His(3H-Tu) detektierbar sind, stellt sich die Frage, ob auch weniger drastische Reaktionsbedingungen zu diesem Ergebnis führen. Weiterhin ist auch der Zeitverlauf der Reaktion und ein Vergleich der Reaktivität von Tul A gegenüber verschiedenen Proteinen von Interesse. Zu diesem Zweck wurden ausgewählte Proteine mit Tul A in methanolischer Lösung bis zu 4 Wochen bei einer Temperatur von 37 ° C inkubiert und nach definierten Zeitabständen auf ihre Aminosäurezusammensetzung hin untersucht. Verwendung fanden neben BSA die in verschiedenen Bereichen der Haut vorkommenden Proteine Keratin, Collagen und Elastin sowie die als Vergleich dienenden Proteine Rinderinsulin und β -Lactoglobulin. Bedingt durch ihre Unlöslichkeit in Methanol lagen die Proteine im Reaktionsansatz lediglich in suspensierter Form vor. Da es unmöglich ist, aus einer Suspension ein definiertes Aliquot abzunehmen, konnte zur Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Reaktion ein Ansatz nicht über mehrere Wochen verfolgt werden. Stattdessen wurden gleichartige Reaktionsansätze hergestellt und diese über definierte Zeiträume inkubiert. Bereits nach einer Inkubationszeit von einer Woche konnten in den Aminosäurechromatogrammen der Proteine BSA, Rinderinsulin und β -Lactoglobulin neue Peaks detektiert werden, welche in den Blindinkubationen nicht auftraten (siehe Abb. 4.9-2).

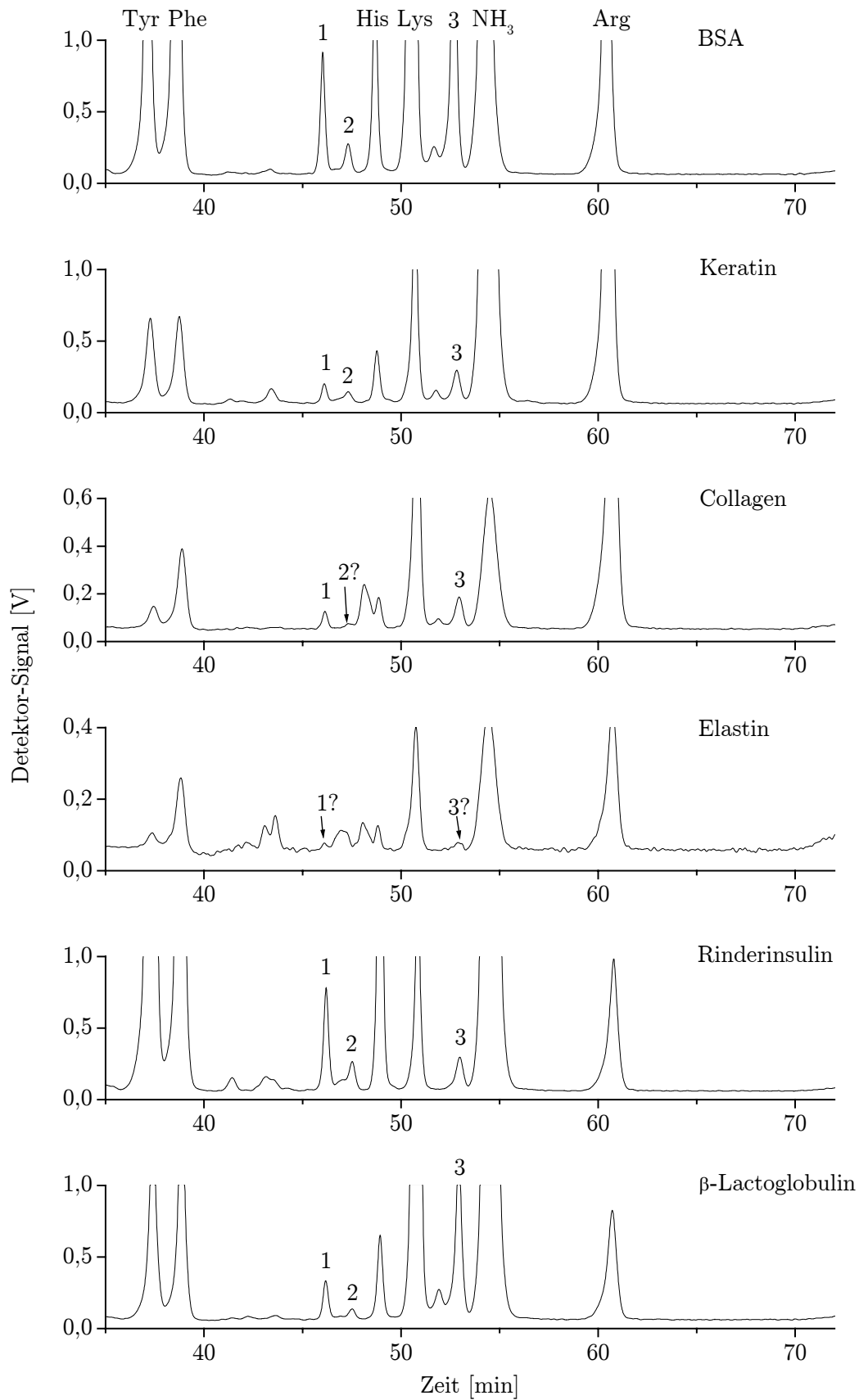


Abb. 4.9-2 ASA-Chromatogramme (Ausschnitte; Detektion: $\lambda = 570 \text{ nm}$) der Inkubationsansätze ausgewählter Proteine mit Tul A nach 4 Wochen Inkubation bei 37° C (1: His(1H-Tu); 2: His(3H-Tu); 3: LysTu)

Ihre Retentionszeiten und das Peakmuster entsprechen den identifizierten "Michael-Additionsprodukten" LysTu, His(1H-Tu) und His(3H-Tu). Nach einer Inkubationsdauer von 4 Wochen waren sie in den Inkubationsansätzen aller untersuchten Proteine nachweisbar. Dabei ist eine Abhängigkeit der Peakhöhen vom Lysin- bzw. Histidingehalt des jeweiligen Proteins (vgl. Tab. 4.9-1) festzustellen.

Tab. 4.9-1 Lysin- und Histidingehalte in ausgewählten Proteinen in g Aminosäure/ 100 g Protein (abgeschätzt nach Daten in Tab. 2.5-1)

Aminosäure	BSA	Keratin	Collagen	Elastin	Rinderinsulin	β -Lactoglobulin
Lys	11,3	3,5	4,0	0,4	2,5	11,3
His	3,5	1,5	0,7	0,1	4,9	1,6

Proteine mit relativ hohen Gehalten an Lysin und Histidin, wie BSA, Rinderinsulin und β -Lactoglobulin, zeigen nach Inkubation mit Tul A auch deutliche Peaks an den modifizierten Aminosäuren LysTu, His(1H-Tu) und His(3H-Tu). Das Collagen hat dagegen nur einen sehr geringen Histidingehalt, weswegen sich neben LysTu lediglich das His(1H-Tu) eindeutig detektieren lässt. Das in seiner Bildung weniger bevorzugte His(3H-Tu) ist nur zu erahnen. Sehr schwach sind diese Peaks auch beim Elastin. Erklärbar ist dies durch den geringsten Gehalt an Lysin und Histidin unter den untersuchten Proteinen. Neben dieser rein qualitativen Aussage stellt sich auch die Frage, in welchem Maße die vorhandenen nukleophilen Aminosäureseitenketten mit Tul A reagiert haben. Als interner Standard diente hierfür die Aminosäure Valin, welche in allen untersuchten Proteinen enthalten ist und im Aminosäurechromatogramm basisliniengetrennt von anderen Aminosäuren eluiert. Zur Berechnung wurden die Peakflächen von Lysin und Histidin der Peakfläche von Valin gegenübergestellt. So entstanden Valinäquivalente, die beim Proteinblindwert 100 % gesetzt wurden. Die Valinäquivalente der Inkubationen wurden nun ins Verhältnis zu denen der jeweiligen Blindwerte gesetzt. Elastin wurde hierbei nicht in die Berechnung einbezogen, da durch die geringen Gehalte an Lysin und Histidin eine qualitative Auswertung durch die zu erwartenden Fehler wenig sinnvoll erscheint. In Abb. 4.9-3 ist die Abnahme der Gehalte an den nukleophilen Aminosäuren Lysin und Histidin während der Inkubation grafisch dargestellt. Qualitativ bestätigen die hier erhaltenen Kurvenverläufe die bei den Inkubationen der Hippuryl-Derivate von Lysin und Histidin mit Tul A festgestellten Ergebnisse. Die Reaktion von Tul A mit der Aminofunktion der Lysinseitenkette erreicht auch hier den Gleichgewichtszustand eher. Deutlich wird dies dadurch, dass der Lysingehalt im Protein nach drei Wochen Inkubation nur geringfügig kleiner ist als nach zwei Wochen. Nach vier Wochen Inkubation ist keine signifikante Verringerung des Lysingehaltes mehr feststellbar. Im Gegensatz dazu

verringert sich der Histidingehalt in den Proteinen auch nach vier Wochen Inkubation noch signifikant im Vergleich zur Vorwoche.

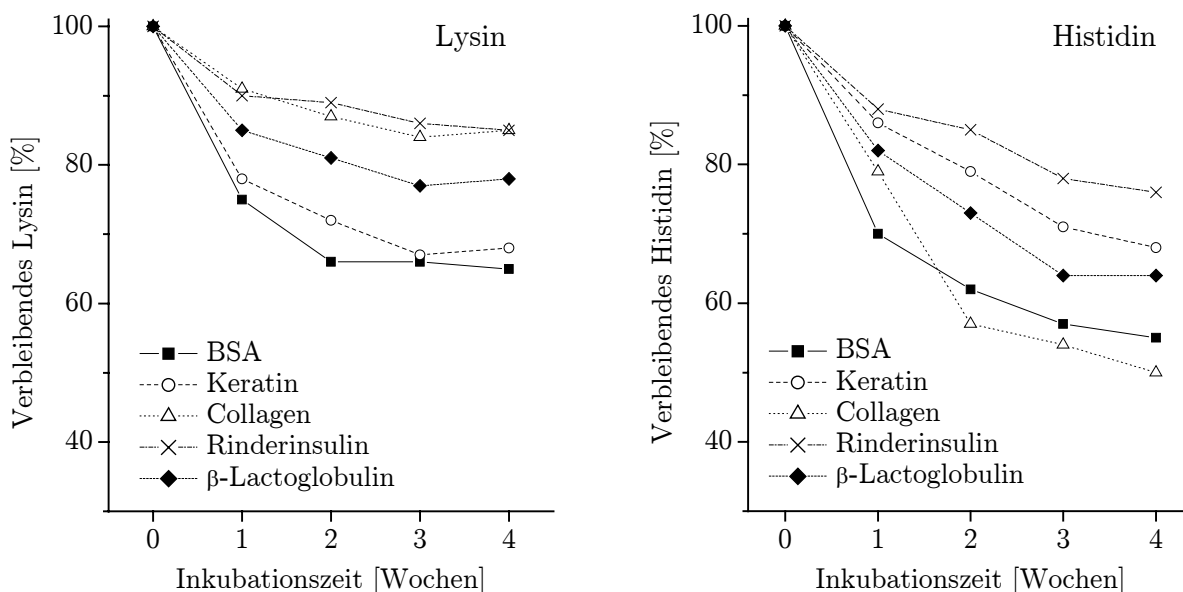


Abb. 4.9-3 Vergleich der Abnahme der Gehalte an den nukleophilen Aminosäuren Lysin und Histidin bei der Inkubation ausgewählter Proteine mit Tulipalin A bei einer Temperatur von 37 °C

In Abb. 4.9-4 sind die in den inkubierten Proteinen verbleibenden unkonjugierten nukleophilen Aminosäuren Lysin und Histidin für einen Vergleich direkt gegenübergestellt. Nach vierwöchiger Inkubation sind je nach Protein zwischen 15 und 35 % der Lysinseitenketten und 24 bis 50 % der Histidinseitenketten durch eine Reaktion mit Tul A nicht mehr als solche bestimmbar. Wie auch schon in den Inkubationsexperimenten mit den Hippuryl-Derivaten sind auch hier die Modifikationsraten der Histidinseitenketten in der Regel deutlich höher als die der Lysinseitenketten. Eine Ausnahme bildet lediglich das Keratin, bei welchem sich die Modifikationsraten zwischen Lysin und Histidin nicht signifikant unterscheiden. Trotz des deutlichen molaren Überschusses an Tul A (beispielsweise 1000-fach beim BSA) werden die bei den Hippuryl-Derivaten erreichten Umsatzraten nicht erreicht. Begründbar ist dies einerseits durch den teilweise geringen Gehalt an Lysin und Histidin. Bedeutsamer ist jedoch die räumliche Verfügbarkeit dieser Aminosäuren in der Proteinstruktur. Durch die Sekundär- und Tertiärstruktur erfahren die nukleophilen Aminosäureseitenketten eine teilweise sterische Abschirmung, welche sie für eine Reaktion mit Tulipalin A unzugänglich macht. So findet eine Reaktion nur an räumlich günstig angeordneten funktionellen Gruppen statt. Im Rahmen dieser Arbeit war es leider nicht möglich, diesen Einfluss abzuschätzen oder zu quantifizieren.

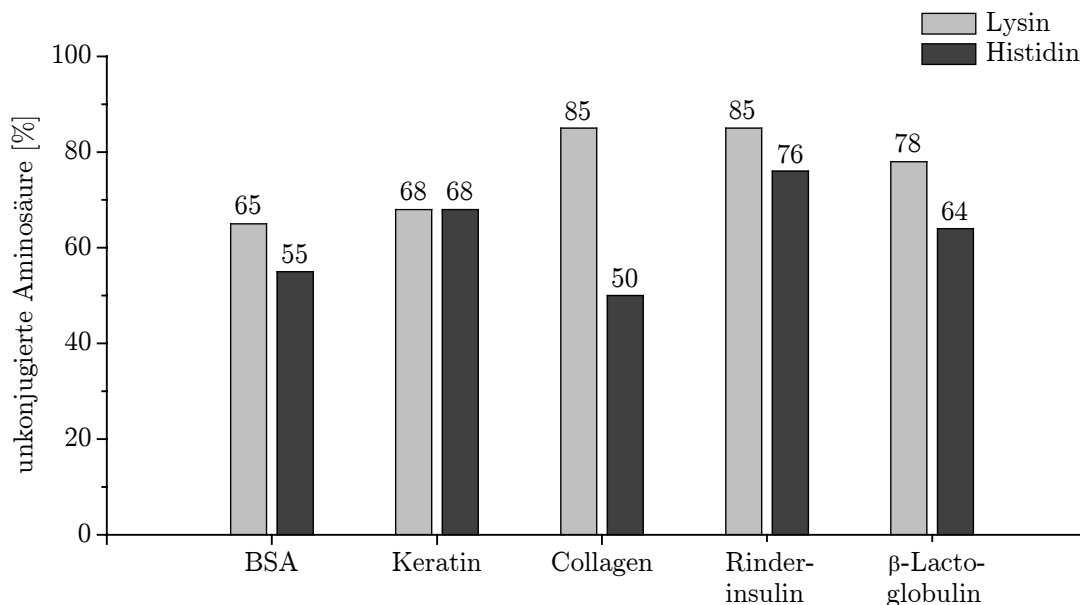


Abb. 4.9-4 Vergleich der in ausgewählten Proteinen verbleibenden unkonjugierten nukleophilen Aminosäuren Lysin und Histidin nach vierwöchiger Inkubation mit Tul A bei einer Temperatur von 37 ° C

Der Versuch macht aber deutlich, dass Tulipalin A sehr wohl in der Lage ist, auch in nativen Proteinen mit den nukleophilen Aminosäureseitenketten Lysin und Histidin zu reagieren. Konjugationsprodukte konnten dabei nicht nur in lysin- bzw. histidinreichen Proteinen, wie beispielsweise BSA, detektiert werden. Auch Proteine, die wenig Lysin bzw. Histidin enthalten, wie Keratin, Collagen und Elastin, welche aber als Hautproteine für die Ausbildung einer Kontaktallergie bedeutsam sein können, sind in der Lage mit Tulipalin A zu reagieren. Bei einer Inkubationstemperatur von 37 ° C, also unter physiologischen Temperaturbedingungen, findet eine Reaktion an Lysin und Histidin gleichermaßen statt. Über einen längeren Zeitraum betrachtet führt jedoch die Reaktion am Histidin zu signifikant höheren Umsatzraten. Eine Wichtung der Bedeutung dieser Additionsreaktionen bei der Ausbildung einer Kontaktallergie lässt sich mit diesen Daten jedoch leider nicht mit Sicherheit treffen. Die Modifizierung des im Proteinverband vorhandenen Lysins zu LysTu und des Histidins zu His(1H-Tu) bzw. His(3H-Tu) bewirkt jeweils eine Veränderung der Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins. Im Körper wird das modifizierte Protein, welches jetzt einen sogenannten Hapten-Carrier-Komplex bildet, durch diese Kopplung (Haptenisierung) zu einem Antigen, welches vom Körper als fremd erkannt wird und somit von den in der Epidermis lokalisierten Langerhans-Zellen aufgenommen werden kann. Damit ist die Induktionsphase der Kontaktallergie eingeleitet (vgl. auch 2.2.2). Speziell im Falle des Tulipalin A sind dabei Carrierproteine notwendig, die Lysin- oder Histidinseitenketten enthalten, welche sterisch zugänglich sind. Neben den bereits diskutierten Hautproteinen Keratin, Collagen und Elastin, sind auch andere Bestandteile der

Epidermis als Reaktionspartner denkbar. Beispielhaft seien hier Proteine der cornified cell envelopes (15 nm dicke unlösliche Proteinschicht auf der Innenseite der Zellmembran von Epidermalzellen) erwähnt: Filaggrin, Loricrin und Elafin (*Steinert und Marekov, 1995; Hogen-Esch et al., 1999*). Dabei enthält Filaggrin zwar kein Lysin, ist dafür aber sehr reich an Histidin (*Steven und Steinert, 1994*). Auch Cystein als möglicher Bindungsort darf nicht außer Acht gelassen werden. Mit den verwendeten Mitteln konnte zwar keine Bindung von Tulipalin A im Protein nachgewiesen werden, jedoch konnte gezeigt werden, dass es sehr wohl in der Lage ist, mit der Cysteinseitenkette zu reagieren (vgl. 4.3.4 und 4.6). In analoger Weise wie das Tulipalin A sollten auch viele Sesquiterpenlactone mit den Seitenketten von Lysin, Histidin bzw. Cystein reagieren können. Bedingung hierfür ist, wie am Beispiel Helenalin, Alantolacton oder Costunolid (siehe Abb. 2.2-2), eine exocyclische Methylengruppe am Lactonring. Sie ist die Voraussetzung für die Reaktion nach dem Mechanismus der Michael-Addition. Dies konnten u.a. *Wagner et al. (2004)* in ihren Untersuchungen zum Verhalten von Sesquiterpenlactonen gegenüber Humanserumalbumin in vitro zeigen. Sie stellten eine Bindung der Sesquiterpenlactone an der Thiol-Gruppe des Cysteins fest. Weiterhin vermuteten sie eine Bindung an der ϵ -Aminogruppe des Lysins. In der Regel haben Sesquiterpenlactone jedoch ein geringeres kontaktallergenes Potential als Tulipalin A (*Mitchell und Dupuis, 1971; Mitchell et al., 1972*). Erklärbar wäre dies durch eine strukturbedingte sterische Hinderung der Reaktion.

5 Zusammenfassung

Die allergische Kontaktdermatitis zählt zu den häufigsten Hauterkrankungen. Etwa 7 % der Bevölkerung sind jährlich von ihr betroffen, 20 % sind gegen allergene Stoffe sensibilisiert. Sie stellt darüber hinaus ein zentrales Problem in der Berufsdermatologie dar, welches in der Bundesrepublik Deutschland jährlich Kosten in Höhe von ca. 3 Mrd. Euro verursacht (*Diepgen, zitiert in: Merk, 2002*). Als Auslöser sind dabei die Inhaltsstoffe kosmetischer Mittel und hier besonders die Duftstoffe von großer Bedeutung. Die allergische Kontaktdermatitis ist eine zellvermittelte Reaktion vom verzögerten Typ, die eine spezifische Sensibilisierung auf einen Stoff (Kontaktallergen) voraussetzt. Ein entscheidender Schritt, sowohl bei der Sensibilisierung als auch bei der Auslösung der kontaktallergischen Reaktion ist die Bildung eines Hapten-Carrier-Komplexes aus dem niedermolekularen Kontaktallergen (Hapten) und Hautproteinen (Carrier). Neben ihrem Hautpenetrationsvermögen ist also die Reaktivität einer Substanz bzw. ihrer Metaboliten gegenüber Proteinen ein mögliches Maß für die Abschätzung ihrer Sensibilisierungsfähigkeit. Bedingt durch ihre Struktur besitzt der überwiegende Teil der bekannten Kontaktallergene einen elektrophilen Charakter und ist somit prädestiniert, mit nukleophilen Aminosäureseitenketten zu reagieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben dem bedeutenden Phytoekzematogen Tulipalin A die bislang wenig erforschten Duftstoffe Geraniol, 7-Hydroxycitronellal, Benzaldehyd, Salicylaldehyd, Vanillin, Zimtaldehyd, α -Amyl-zimtaldehyd und Benzylcinnamat auf ihre Reaktivität gegenüber peptidgebundenen nukleophilen Aminosäuren untersucht. Ausgewählt wurden für diese Modellversuche Hippuryl-Derivate und Acetyl-Derivate der Aminosäuren Lysin, Histidin, Arginin bzw. Cystein und zusätzlich Glutathion. Dabei wurden Reaktionsbedingungen gewählt, welche eine Adaption an physiologische Gegebenheiten erlauben. Ziel war es, zu klären, ob die mit diesen Modellversuchen zu gewinnenden Ergebnisse mit dem bekannten kontaktallergenen Potential der eingesetzten Haptene korrelieren und damit geeignet sind, das kontaktallergene Potential einer Substanz vorherzusagen. In der Literatur sind Konjugationsprodukte von Kontaktallergenen mit Peptiden oder Proteinen bislang wenig beschrieben. Daher war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, individuelle Produkte von Reaktionen kontaktallergener Substanzen mit nukleophilen Aminosäureseitenketten zu isolieren und zu charakterisieren, um so definierte Hapten-Carrier-Konjugate, welche unter physiologisch relevanten Bedingungen entstehen können, zu beschreiben. Aufbauend auf den gefundenen Strukturen waren Reaktionsmechanismen vorzuschlagen.

1 Zunächst wurde eine Methode gesucht, mit der es möglich ist, sowohl die Ausgangsstoffe als auch mögliche Reaktionsprodukte in den Modellansätzen parallel zu

erfassen. Die RP-HPLC mit Dioden-Array-Detektion erwies sich dabei als geeignete Methode. Eine Aminosäureanalyse nach Säurehydrolyse ist ebenfalls möglich unter der Bedingung, dass bei der Reaktion säurestabile Produkte entstehen. In Anlehnung an Arbeiten von *Helling (1996)* wurde anfangs als Reaktionsmedium eine wässrig-alkoholische Lösung gewählt. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass Wasser als Bestandteil des Lösungsmittels bei der Reaktion von kontaktallergenen Substanzen mit nukleophilen Aminosäureseitenketten ungeeignet ist. Lediglich bei dem sehr potenten Kontaktallergen Tulipalin A ließen sich bei Anwesenheit von Wasser Reaktionsprodukte nachweisen. Ein Wechsel auf reines Methanol als Lösungsmittel und eine Verschärfung der Reaktionsbedingungen bewirkte eine wesentliche Erhöhung des Umsatzes. Qualitativ waren aber gleiche Reaktionsprodukte detektierbar.

2 Da über die Reaktivität der ausgewählten Kontaktallergene gegenüber peptidgebundenen nukleophilen Aminosäureseitenketten in der Literatur bisher nichts beschrieben ist, wurden Screening-Versuche mit Hippuryl-Peptiden (Hip-Lys, Hip-His-Leu, Hip-Arg) bzw. Glutathion durchgeführt. Diese wurden in methanolischer Lösung unter Rückflussbedingungen sowie bei physiologischen Temperaturbedingungen durchgeführt. Insgesamt konnten nur bei drei der untersuchten Kontaktallergene Hinweise auf eine Reaktion mit den Modellpeptiden gefunden werden. Es sind dies mit Tulipalin A, Zimtaldehyd und 7-Hydroxycitronellal auch die nach Literaturdaten potentesten Kontaktallergene unter den untersuchten Stoffen. Während Zimtaldehyd und 7-Hydroxycitronellal lediglich mit peptidgebundenem Lysin reagieren, ist beim Tulipalin A auch eine Reaktion mit peptidgebundenem Histidin und Cystein möglich. Die Aminosäure Arginin spielt bei den hier untersuchten Stoffen keine Rolle bei Konjugationsreaktionen an Proteine. Unter Rückflussbedingungen reagiert Tulipalin A gegenüber Lysin deutlich stärker als Zimtaldehyd und dieses geringfügig stärker als 7-Hydroxycitronellal. Damit korreliert die Reaktivität unter Rückflussbedingungen mit dem bekannten kontaktallergenen Potential der Stoffe. Die Ergebnisse sind qualitativ auch auf physiologische Temperaturbedingungen übertragbar. Bezüglich der erreichbaren Umsatzraten zeigen sich jedoch deutliche Unterschiede. Im Falle des 7-Hydroxycitronellals und des Zimtaldehyds erhöht sich die erreichbare Umsatzrate gegenüber peptidgebundenem Lysin im Vergleich zu den Rückflussbedingungen, im Falle des Tulipalin A wird sie dagegen erniedrigt.

Analog zu den Screening-Versuchen mit Hippuryl-Peptiden bzw. Glutathion durchgeführte Ansätze mit Acetyl-Derivaten der nukleophilen Aminosäuren Lysin, Histidin, Arginin und Cystein bestätigen zum Großteil die erhaltenen Ergebnisse. Es ist lediglich festzustellen, dass Glutathion als Modellpeptid für Reaktionen an der Aminosäureseitenkette des Cysteins nicht uneingeschränkt geeignet ist. So konnte an Hand der Reaktion mit Ac-Cys gezeigt werden, dass auch Zimtaldehyd in der Lage ist, mit der Seitenkette des Cysteins zu reagieren. Die Reaktionen mit Glutathion lieferten

hierfür keinen Hinweis. Ein Nachteil der Acetyl-Derivate gegenüber den Hippuryl-Peptiden zeigt sich jedoch in der schwierigen Auswertung der HPLC-Chromatogramme. Die Hippuryl-Peptide sind somit als Modellpeptide für die Untersuchung des kontaktallergen Potentials insgesamt besser geeignet. Es ist jedoch nicht möglich, mit diesen Screening-Versuchen eine generell gültige Aussage über die Sensibilisierungsfähigkeit einer Substanz zu treffen, da Stoffe mit bekanntem, aber geringem kontaktallergen Potential, wie Geraniol oder Vanillin, keine Reaktion zeigen.

3 Durch Zusätze von Säure bzw. Base zu Inkubationsansätzen von Ac-Lys bzw. Ac-His mit Tulipalin A wurde der Einfluss des pH-Wertes auf die Konjugationsreaktionen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Konjugation von Tulipalin A an die nukleophilen Aminosäureseitenketten von Lysin und Histidin sehr stark vom pH-Wert abhängig ist. Bereits geringe Zusätze an Salzsäure sind in der Lage, die Reaktion zu unterbinden. Eine Zugabe von Natriumhydroxid führt in Abhängigkeit von der Konzentration zunächst zu einer Erhöhung der Umsatzrate. Nach Durchlaufen eines pH-Optimums, welches im Bereich des pK_s -Wertes der jeweiligen Aminosäure liegt, kommt es auch hier zu einer Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts in Richtung der Ausgangsstoffe.

4 Mit Hilfe der semipräparativen RP-HPLC gelang es, Produkte der Reaktionen kontaktallergener Substanzen mit peptidgebundenen Aminosäuren zu isolieren sowie mittels NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie zu identifizieren. Nach Reaktion von Tulipalin A mit N^α -Hippuryl-lysin konnte das Hippuryl-Derivat des Konjugationsproduktes 2-(2-Benzoylamino-acetylamino)-6-[(2-oxo-tetrahydro-furan-3-ylmethyl)-amino]-hexansäure isoliert werden. Die Hip-LysTu genannte Verbindung ist dabei das Produkt einer nukleophilen Addition der ϵ -Aminogruppe der Lysinseitenkette an das partiell positiviert Kohlenstoffatom der exocyclischen Methylengruppe der α,β -ungesättigten Carbonylstruktur im Tulipalin A. Nach Umsetzung von Tulipalin A mit N^α -Hippuryl-histidin-leucin bzw. N^α -Acetyl-histidin konnten zwei Reaktionsprodukte an der Histidinseitenkette aufgeklärt werden. Sie lassen, wie bei der Lysinseitenkette, auf einen analogen Reaktionsmechanismus nach Art einer Michael-Addition schließen. Nukleophile Zentren sind hier die beiden Stickstoffatome im Imidazolring der Histidinseitenkette. Aus dem Syntheseansatz mit Hip-His-Leu konnte der Methylester des Additionsproduktes am τ -Stickstoffatom des Imidazolringes isoliert und mittels NMR-Spektroskopie strukturell aufgeklärt werden. Einen Hinweis auf die Reaktion am π -Stickstoffatom brachte die Isolierung von zwei Produkten der Reaktion von Tulipalin A mit Ac-His und ihre Untersuchung mittels ASA und Massenspektrometrie. Die durch die Reaktion mit Tulipalin A entstehenden modifizierten Histidinreste 2-Amino-3-[1-(2-oxo-tetrahydro-furan-3-ylmethyl)-1H-

imidazol-4-yl]-propansäure und 2-Amino-3-[1-(2-oxo-tetrahydro-furan-3-ylmethyl)-3H-imidazol-4-yl]-propansäure wurden mit His(1H-Tu) und His(3H-Tu) bezeichnet.

Bei den Reaktionen von 7-Hydroxycitronellal bzw. Zimtaldehyd mit peptidgebundenem Lysin ist eine Vielzahl neuer Verbindungen in den Reaktionsansätzen detektierbar. Durch semipräparative HPLC konnte lediglich das Hauptprodukt der Reaktion von 7-Hydroxycitronellal mit Hip-Lys isoliert und mittels NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie strukturell aufgeklärt werden. Dabei zeigte sich, dass drei Moleküle 7-Hydroxycitronellal unter Bildung eines Pyridinium-Ions an die ϵ -Aminogruppe der Lysinseitenkette konjugieren. Dieses Ergebnis wurde in LC-MS-Experimenten mit verschiedenen Lysin-Derivaten bestätigt. Hier konnte gezeigt werden, dass ein entscheidender Schritt bei der Reaktion von 7-Hydroxycitronellal mit der ϵ -Aminogruppe des Lysins die vorherige Umwandlung des Aldehyds in eine α,β -ungesättigte Carbonylverbindung zu sein scheint. Bei der Reaktion von Zimtaldehyd mit der Lysinseitenkette konnte ein Produkt einer Schiff-Base-Reaktion als erstes Additionsprodukt identifiziert werden. Eindeutige Reaktionsmechanismen können an Hand der erhaltenen Daten nicht vorgeschlagen werden. Es wurden jedoch wichtige Hinweise auf Mehrfachaddukte gewonnen. Beim Zimtaldehyd wurden zusätzlich Quervernetzungsprodukte zwischen zwei Lysinseitenketten detektiert.

5 Auf Grund der Säurestabilität der Additionsprodukte von Tulipalin A an die nukleophilen Aminosäureseitenketten von Lysin und Histidin sind die Konjugationsprodukte LysTu, His(1H-Tu) und His(3H-Tu) auch mittels Aminosäureanalyse nach Säurehydrolyse bestimmbar. Dadurch eröffnete sich die Möglichkeit, die Bildung dieser Aminosäurederivate auch in Proteinen nachzuweisen. Zu diesem Zweck wurden die in der Haut vorkommenden Proteine Keratin, Collagen und Elastin, sowie die lysin- und histidinreichen Proteine Rinderserumalbumin, Rinderinsulin und β -Lactoglobulin vier Wochen mit Tulipalin A unter physiologischen Temperaturbedingungen inkubiert. Die Konjugationsprodukte waren mit Ausnahme des Elastins in allen untersuchten Proteinen nachweisbar. Anhand der Berechnung von Valinequivalenten konnte die zeitabhängige Abnahme der Gehalte an Lysin und Histidin, sowie die Bildung der individuellen Konjugationsprodukte für die einzelnen Proteine bestimmt werden. So gelang erstmals der Nachweis von Konjugationsprodukten einer kontaktallergenischen Substanz an nukleophile Aminosäureseitenketten in nativen Proteinen. Diese Reaktion von Tulipalin A mit den Seitenketten von Lysin und Histidin ist wahrscheinlich der entscheidende erste Schritt bei der Induktion einer Kontaktallergie gegen Tulipalin A. Sie bewirkt, dass das so modifizierte Protein vom Körper als fremd erkannt werden kann und somit eine zellvermittelte allergische Reaktion auslöst.

6 Literaturverzeichnis

- Aberer, W., Komericki, P., Uter, W., Hausen, B.M., Lessmann, H., Kränke, B., Geier, J., Schnuch, A. (2003). Epidemiologische Überwachung von Kontaktallergenen. *Hautarzt* **54**, 741-749
- Ahlfors, S.R., Sterner, O., Hansson, C. (2003). Reactivity of contact allergenic haptens to amino acid residues on a model carrier peptide, and characterization of formed peptide-hapten adducts. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* **16**, 59-68
- Alaiz, M., Giron, J. (1994). Modification of histidine residues in bovine serum albumin by reaction with (E)-2-octenal. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 2094-2098
- Alvarez-Sanchez, R., Basketter, D.A., Pease, C., Lepoittevin, J.-P. (2003). Studies of chemical selectivity of hapten, reactivity, and skin sensitization potency. 3. Synthesis and studies on the reactivity toward model nucleophiles of the ¹³C-labeled skin sensitizers, 5-chloro-2-methylisothiazol-3-one (MCI) and 2-Methylisothiazol-3-one (MI). *Chem. Res. Toxicol.* **16**, 627-636
- Aplin, C.G., Lovell, C.R. (2001). Contact dermatitis due to hardy primula species and their cultivars. *Contact Dermatitis* **44**, 23-29
- Asherson, G.L., Ptak, W. (1968). Contact and delayed hypersensitivity in the mouse. I. Active sensitisation and passive transfer. *Immunology* **15**, 405-416. Zitiert in: Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I.R., Willis, C. (1999). Toxicology of contact dermatitis. Allergy, irritancy and urticaria. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England
- BAA (Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin) Leitfaden für Meldungen neuer Stoffe nach dem Chemikaliengesetz. 5. überarb. Auflage. Stand: 17.12.2003
- Baker, A., Zidek, L., Wiesler, D., Chmelik, J., Pagel, M., Nowotny, M.V. (1998). Reaction of N-acetylglycyllysine methyl ester with 2-alkenals: An alternative model for covalent modifications of proteins. *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 730-740
- Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I.R., Willis, C. (1999a). Toxicology of contact dermatitis. Allergy, irritancy and urticaria. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England
- Basketter, D.A., Lea, L.J., Dickens, A., Briggs, D., Pate, I., Dearman, R.J., Kimber, I. (1999b). A comparison of statistical approaches to the derivation of EC3 values from local lymph node assay dose responses. *J. Appl. Toxicol.* **19**, 261-266
- Basketter, D.A., Blaikie, L., Dearman, R.J., Kimber, I., Ryan, C.A., Gerberick, G.F., Harvey, P., Evans, P., White, I.R., Rycroft, R.J.G. (2000). Use of the local lymph

- node assay for the estimation of relative contact allergenic potency. *Contact Dermatitis* **42**, 344-348
- Basketter, D.A., Kimber, I.R. (2001a). Predictive testing in contact allergy: facts and future. *Allergy* **56**, 937-943
- Basketter, D.A., Kimber, I.R. (2001b). Predictive tests for irritants and allergens and their use in quantitative risk assessment. In: Rycroft, R.J.G., Menne, T., Frosch, P.J., Lepoittevin, J.-P. (Hrsg.): Textbook of Contact Dermatitis. 3rd edition. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 227-236
- Basketter, D.A., Wright, Z.M, Warbrick, E.V., Dearman, R.J., Kimber, I., Ryan, C.A., Gerberick, G.F., White, I.R. (2001). Human potency predictions for aldehydes using the local lymph node assay. *Contact Dermatitis* **45**, 89-94
- Bear, R.S. (1952). The structure of collagen fibrils. *Adv. Prot. Chem.* **7**, 69-160
- Belitz, H.-D., Grosch, W. (1992). Lehrbuch der Lebensmittelchemie. 4. überarb. Auflage. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York
- Benezra, C., Ducombs, G. (1987). Molecular aspects of allergic contact dermatitis to plants. Recent progress in phytodermatochemistry. *Dermatosen.* **35**, 4-11
- Bertwistle, A.P. (1935). Tulip Fingers. *Br. J. Dermatol.* **2**, 255
- BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung) Datenbank Chemikalien und Kontaktallergene. Online unter: <http://www.bfr.bund.de> (Stand 2001)
- Bowers, W. (2003). Major histocompatibility complex (MHC) and T-cell receptors. Course: Medical Microbiology (PSMB 650/720) USC School of Medicine. Online unter: <http://www.med.sc.edu:85/2003-immpdf/Lecture%2011.pdf>
- Brown, J.H., Jardetzky, T.S., Gorga, J.C., Stern, L.J., Urban, R.G., Strominger, J.L., Wiley, D.C. (1993). Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* **364**, 33-39
- Bruze, M., Johansen, J.D., Andersen, K.E., Frosch, P., Lepoittevin, J.-P., Rastogi, S., Wakelin, S., White, I., Menne, T. (2003). Deodorants: An experimental provocation study with cinnamic aldehyde. *J. Am. Acad. Dermatol.* **48**, 194-200
- Büchner, S.A. (2001). Kontaktdermatitis. *Schweiz. Med. Forum.* **18**, 458-463
- Bundschuh, G. (1986). Repetitorium immunologicum. Gustav Fischer Verlag, Jena
- Carter, D.C., Ho, J.X. (1994). Structure of serum albumin. *Adv. Prot. Chem.* **45**, 153-203
- Cheung, C., Hotchkiss, S.A.M., Smith Pease, C.K. (2003). Cinnamic compound metabolism in human skin and the role metabolism may play in determining relative sensitisation potency. *J. Dermatol. Sci.* **31**, 9-19
- Christensen, L.P., Kristiansen, K. (1999). Isolation and quantification of tuliposides and tulipalins in tulips (*Tulipa*) by high-performance liquid chromatography. *Contact Dermatitis* **40**, 300-309

- Christensen, L.P. (1999). Direct release of the allergen tulipalin A from *Alstroemeria* cut flowers: a possible source of airborne contact dermatitis? *Contact Dermatitis* **41**, 320-324
- Cronin, E. (1972). Sensitivity to Tulip and *Alstroemeria*. *Contact Derm. Newsletter* **11**, 286
- De Benito, V., Alzaga, R. (1999). Occupational allergic contact dermatitis from cassia (Chinese cinnamon) as a flavouring agent in coffee. *Contact Dermatitis* **40**, 165
- DeGroot, A.C., Frosch, P.J. (2001). Patch test concentrations and vehicles for testing contact allergens. In: Rycroft, R.J.G., Menne, T., Frosch, P.J., Lepoittevin, J.-P. (Hrsg.): Textbook of Contact Dermatitis. 3rd edition. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1037-1072
- DKG (Deutsche Kontaktallergie-Gruppe e.V.) Empfehlungen für Epikutantestereien. Online unter: <http://www.ivdk.gwdg.de/dkg/> (Stand: 20.02.2003)
- Doorn, J.A., Petersen, D.R. (2002). Covalent modification of amino acid nucleophiles by the lipid peroxidation products 4-hydroxy-2-nonenal and 4-oxo-2-nonenal. *Chem. Res. Toxicol.* **15**, 1445-1450
- Ducombs, G., Schmidt, R.J. (2001). Plants and plant products. In: Rycroft, R.J.G., Menne, T., Frosch, P.J., Lepoittevin, J.-P. (Hrsg.): Textbook of Contact Dermatitis. 3rd edition. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 893-931
- Dupuis, G., Benezra, C. (1982). Allergic contact dermatitis to simple chemicals. A molecular approach. Marcel Dekker Inc., New York, USA
- Elahi, E.N., Wright, Z., Hinselwood, D., Hotchkiss, S.A.M., Basketter, D.A., Smith Pease, C.K. (2004). Protein binding and metabolism influence the relative skin sensitization potential of cinnamic compounds. *Chem. Res. Toxicol.* **17**, 301-310
- Estrada, E., Patlewicz, G., Chamberlain, M., Basketter, D.A., Larbey, S. (2003). Computer-aided knowledge generation for understanding skin sensitization mechanisms: The TOPS-MODE approach. *Chem. Res. Toxicol.* **16**, 1226-1235
- Estrada, E., Patlewicz, G., Gutierrez, Y. (2004). From knowledge generation to knowledge archive. A general strategy using TOPS-MODE with DEREK to formulate new alerts for skin sensitization. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **44**, 688-698
- Felter, S.P., Robinson, M.K., Basketter, D.A., Gerberick, G.F. (2002). A review of the scientific basis for uncertainty factors for use in quantitative risk assessment for the induction of allergic contact dermatitis. *Contact Dermatitis* **47**, 257-266
- Ferguson, J. E., Beck, M.H. (1995). Contact sensitivity to vanilla in a lip salve. *Contact Dermatitis* **33**, 352
- Fey, H. Otte, I. (1991). Wörterbuch der Kosmetik. 3. Aufl. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart

- Franot, C., Benezra, C., Lepoittevin, J-P. (1993). Synthesis and interaction studies of ^{13}C labelled lactone derivatives with a model protein using ^{13}C NMR. *Bioorg. Med. Chem.* **1**, 389-397
- Franot, C., Roberts, D.W., Smith, R.G., Basketter, D.A., Benezra, C., Lepoittevin, J-P. (1994a): Structure-activity relationships for contact allergenic potential of γ,γ -Dimethyl- γ -butyrolactone derivatives. 1. Synthesis and electrophilic reactivity studies of α -(ω -substituted-alkyl)- γ,γ -dimethyl- γ -butyrolactones and correlation of skin sensitization potential and cross-sensitization patterns with structure. *Chem. Res. Toxicol.* **7**, 297-306
- Franot, C., Roberts, D.W., Smith, R.G., Basketter, D.A., Benezra, C., Lepoittevin, J-P. (1994b): Structure-activity relationships for contact allergenic potential of γ,γ -Dimethyl- γ -butyrolactone derivatives. Quantitative structure-skin sensitization relationships for α -substituted- α -methyl- γ,γ -dimethyl- γ -butyrolactones. *Chem. Res. Toxicol.* **7**, 307-312
- Friedli, G.L. (1996). Interaction of deamidated soluble wheat protein (swp) with other food proteins and metals. *Dissertation*. University of Surrey
- Fujita, N., Kobayashi, H., Tsuruta, D., Sakaguchi, I., Yamanaka, K., Kutsuna, H., Teramae, H., Mizuno, N., Ikeda, N., Kato, Y., Minamino, M., Kaneda, K., Ishii, M. (2003). Induction of cutaneous delayed hypersensitivity reactions in mice sensitised with intragastrically administered hapten: activation of Langerhans cells in the sensitization and elicitation phase. *Br. J. Dermatol.* **149**, 475-483
- Furuhata, A., Ishii, T., Kumazawa, S., Yamada, T., Nakayama, T., Uchida, K. (2003). N^ϵ -(3-Methylpyridinium)lysine, a major antigenic adduct generated in acrolein-modified protein. *J. Biol. Chem.* **278**, 48658-48665
- Frosch, P.J., Johansen, J.D., White, I.R. (Eds.) (1998). *Fragrances: Beneficial and Adverse Effects*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg
- Gad, S.C., Dunn, B.J., Dobbs, D.W., Reilly, C., Walsh, R.D. (1986). Development and validation of an alternative dermal sensitization test: the mouse ear swelling test (MEST). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **84**, 93-114
- Geier, J., Brasch, J., Schnuch, A., Lessmann, H., Pirker, C., Frosch, P.J. (2002). Lyril has been included in the patch test standard series in Germany. *Contact Dermatitis* **46**, 295-297
- Gell P.G.H., Coombs, R.R.A. (1975). Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and diseases. In: *Clinical aspects of immunology*. (Hrsg.: Gell P.G.H., Coombs R.R.A., Lachmann P.J.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, 761-781

- Goodwin, B.F.J., Roberts, D.W. (1986). Structure-activity relationships in allergic contact dermatitis. *Food Chem. Toxicol.* **24**, 795-798
- Gross, J., Schumacher, K. (2003). Der Duft der Larven: Wie *Phratora vitellinae* (Coleoptera: Chrysomelidae) die Keimung insektenpathogener Pilzsporen auf der Larvencuticula verhindert. Vortrag Entomologentagung Halle
- Hall, I.H., Lee, K.-H., Mar, E.C., Starnes, C.O. (1977). Antitumor Agents. 21. A proposed mechanism for inhibition of cancer growth by tenulin and helenalin and related cyclopentenones. *J. Med. Chem.* **20**, 333-337
- Hartert, C. (2002). Untersuchungen zur Bindung des hochpotenten Kontaktallergens Tulipalin A an peptidgebundene Aminosäuren. *Diplomarbeit*, Technische Universität Dresden
- Hausen, B.M., Prater, E., Schubert, H. (1983). The sensitizing capacity of alstroemeria cultivars in man and guinea pig. Remarks on the occurrence, quantity and irritant and sensitising potency of their constituents tuliposide A and tulipalin A (alpha-methylene-gamma-butyrolactone). *Contact Dermatitis* **9**, 46-54
- Hausen, B.M., Vieluf, I.K. (1997). Allergiepflanzen - Pflanzenallergene: Handbuch und Atlas der allergieinduzierenden Wild- und Kulturpflanzen. 2. Aufl. ecomed Verlags-Gesellschaft mbH, Landshut/München
- Helling, R. (1996). Untersuchungen zur Umsetzung kontaktallergener Strukturen mit Modellaminen. *Diplomarbeit*, Technische Universität Dresden
- Henle, T., Walter, H., Krause, I., Klostermeyer, H. (1991). Efficient determination of individual Maillard compounds in heat-treated milk products by amino acid analysis. *Int. Dairy J.* **1**, 125-135
- Hermann-Kunz, E. (2000). Allergische Krankheiten in Deutschland: Ergebnisse einer repräsentativen Studie. *Bundesgesundheitsbl.* **43**, 400-406
- Hogen-Esch, H., Boggess, D., Sundberg, J.P. (1999). Changes in keratin and filaggrin expression in the skin of chronic proliferative dermatitis (cpdm) mutant mice. *Pathobiology.* **67**, 45-50
- Höpner, A. (1996). Modelluntersuchungen zur allergieinduzierenden Hapten-Protein-Konjugation. *Diplomarbeit*, Technische Universität Dresden
- IFRA(International Fragrance Association) Usage standards for fragrance materials. Online unter: <http://www.ifraorg.org/GuideLines.asp> (Stand: 24. Oktober 2003)
- IGfBM (Internationale Gesellschaft für Biologische Medizin) Was hilft gegen Allergien? Online unter: <http://www.biogesellschaft.de> (Stand 2004)
- Jakubke, H.-D., Jeschkeit, H. (1969). Aminosäuren, Peptide, Proteine. 1. Auflage. Akademie Verlag, Berlin
- Jakubke, H.-D., Jeschkeit, H. (1975). Brockhaus Biochemie. 2. Auflage. VEB F.A. Brockhaus Verlag, Leipzig

- Katz, S.I. (1993). The skin as an immunological organ: Allergic contact dermatitis as a paradigm. *J. Dermatol.* **20**, 593-603
- Kaufman, J.F., Auffray, C., Korman, A.J., Shackelford, D.A., Strominger, J. (1984). The class II molecules of the human and murine major histocompatibility complex. *Cell* **36**, 1-13
- Kimber, I., Dearman, R.J., Basketter, D.A., Ryan, C.A., Gerberick, G.F. (2002). The local lymph node assay: past, present and future. *Contact Dermatitis* **47**, 315-328
- Kupchan, S.M., Giacobbe, T.J., Krull, I.S., Thoma, A.M., Eakin, M.A., Fessler, D.C. (1970). Reaction of endocyclic α,β -unsaturated γ -lactones with thiols. *J. Org. Chem.* **35**, 3539-3543
- Langer, A. (2003). Untersuchungen zur Bindung des hochpotenten Kontaktallergens Tulipalin A an peptidgebundene Aminosäuren. *Diplomarbeit*, Technische Universität Dresden
- Lappin, M.B., Kimber, I., Norval, M. (1996). The role of dendritic cells in cutaneous immunity. *Arch. Dermatol. Res.* **288**, 109-121
- Larsen, W., Nakayama, H., Lindberg, M., Fischer, T., Elsner, P., Burrows, D., Jordan, W., Shaw, S., Wilkinson, J., Marks, J. Jr., Sugawara, M., Nethercott, J. (2002). Fragrance contact dermatitis: a worldwide multicenter investigation (Part III). *Contact Dermatitis* **45**, 141-144
- Lepoittevin J.P. (1999). Development of structure-activity relationships (SARs) in allergic contact dermatitis. *Cell Biol. Toxicol.* **15**, 47-55
- Lepoittevin, J.-P. (2001). Molecular aspects of allergic contact dermatitis. In: Rycroft, R.J.G., Menne, T., Frosch, P.J., Lepoittevin, J.-P. (Hrsg.): Textbook of Contact Dermatitis. 3rd edition. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 59-89
- Magnusson, B., Kligman, A.M. (1969). The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. *J. Invest. Dermatol.* **52**, 268-276
- Mascarenhas, R., Robalo-Cordeiro, M., Fernandes, B., Oliveira, H.S., Goncalo, M., Figueiredo, A. (2001). Allergic and irritant contact dermatitis from *Alstroemeria*. *Contact Dermatitis* **44**, 169
- Menne, T., Holm, N.V. (1986). Genetic susceptibility in human allergic contact sensitization. *Sem. Dermatol.* **5**, 301-306
- Merk, H.F. (2002). Allergisches Kontaktekzem. *Z. Hautkr.* **77**, 466-472
- Mikheeva, L.M., Grinberg, N.V., Grinberg, V.Y., Tolstoguzov, V.B. (1998). Effect of thermal denaturation on vanillin binding to some food proteins. *Nahrung* **42**, 185-186
- Mitchell, J.C., Dupuis, G. (1971). Allergic contact dermatitis from sesquiterpenoids of the Compositae family of plants. *Br. J. Derm.* **84**, 139-150

- Mitchell, J.C., Dupuis, G., Geissman, T.A. (1972). Allergic contact dermatitis from sesquiterpenoids of plants. Additional allergenic sesquiterpene lactones and immunological specificity of Compositae, Liverworts and Lichens. *Br. J. Derm.* **87**, 235-240
- Murphy, L.-A., White, I.R. (2003). Contact dermatitis from geraniol in washing-up liquid. *Contact Dermatitis* **49**, 52
- Nagai, R., Hayashi, C.M., Xia, L., Takeya, M., Horiuchi, S. (2002). Identification in human atherosclerotic lesions of GA-pyridine, a novel structure derived glycolaldehyd-modified proteins. *J. Biol. Chem.* **277**, 48905-48912
- NIEHS (National Institute of Environmental Health Sciences) (1999). The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds. The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). *NIH Publication*. No. 99-4494
- Online unter: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/llna.htm>
- Nielsen, N.H., Linneberg, A., Menne, T., Madsen, F., Frølund, L., Dirksen, A., Jørgensen, T. (2001). Allergic contact sensitization in an adult Danish population: Two cross-sectional surveys eight years apart (The Copenhagen allergy study). *Acta Derm. Venereol.* **81**, 31-34
- Nilsson, A.-M., Gäfvert, E., Salvador, L., Luthman, K., Bruze, M., Gruvberger, B., Nilsson J.L.G., Karlberg A.-T. (2001). Mechanism of the antigen formation of carvone and related α - β -unsaturated ketones. *Contact Dermatitis*. **44**, 347-356
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) (2001). Guideline for the testing of chemicals 429: Skin sensitisation: Local Lymph Node Assay. Online unter: <http://www.oecd.org>
- Patlewicz, G.Y., Basketter, D.A., Smith, C.K., Hotchkiss, S.A.M., Roberts, D.W. (2001). Skin sensitisation structure activity relationships for aldehydes. *Contact Dermatitis* **44**, 331-336
- Patlewicz, G.Y., Wright, Z.M., Basketter, D.A., Pease, C.K., Lepoittevin, J.-P., Gimenez Arnau E. (2002). Structure-activity relationships for selected fragrance allergens. *Contact Dermatitis* **47**, 219-226
- Paulick, T. (1998). Untersuchungen zur Umsetzung ausgewählter kontaktallergener Verbindungen mit Proteinmodellen. *Diplomarbeit*, Technische Universität Dresden

- Payne, M.P., Walsh, P.T. (1994). Structure-activity relationships for skin sensitization potential: Development of structural alerts for use in knowledge-based toxicity prediction systems. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **34**, 154-161
- Pickert, J., Hartert, C., Raddatz, H., Henle, T. (2003). Studies on the mechanism of allergic contact dermatitis: The reaction of α -Methylene- γ -Butyrolactone with peptide-bound lysine. *Exog. Dermatol.* **2**, 210-215
- Picman, A.K., Rodriguez, E., Towers, G.H.N. (1979). Formation of adduct of parthenin and related sesquiterpene lactones with cysteine and glutathione. *Chem. Biol. Interact.* **28**, 83-89
- von Pirquet, C. (1906). Allergie. *Münch: med. Wochensch.* **30**, 1457
- Raddatz, H., Helling, R., Ludwig, E. (1996). Zur Reaktivität ausgewählter Kontaktallergene mit Aminogruppen. *Z. Lebensmittelchem.* **50**, 159-160
- Raddatz, H., Henle, T. (2000). Chemische Aspekte bei Kontaktallergien. *Kosmetische Medizin* **20**, 308-313
- Rastogi, S.C, Johansen, J.D., Frosch, P., Menne, T., Bruze, M., Lepoittevin, J.-P., Dreier, B., Andersen, K.E., White, I.R. (1998). Deodorants on the European market: quantitative chemical analysis of 21 fragrances. *Contact Dermatitis* **38**, 29-35
- Rastogi, S.C., Heydorn, S., Johansen, J.D., Basketter, D.A. (2001). Fragrance chemicals in domestic and occupational products. *Contact Dermatitis* **45**, 221-225
- Rastogi, S.C, Menne, T., Johansen, J.D. (2003). The composition of fine fragrances is changing. *Contact Dermatitis* **48**, 130-132
- RL 67/548/EWG (Richtlinie 67/548/EWG des Rates vom 27. Juni 1967 zur Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften für die Einstufung, Verpackung und Kennzeichnung gefährlicher Stoffe. zuletzt geändert am 21.08.2001.
- RL 2003/15/EG (Richtlinie 2003/15/EG des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 27. Februar 2003 zur Änderung der Richtlinie 76/768/EWG des Rates zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedsstaaten über kosmetische Mittel.
- Rustemeyer, T., van Hoogstraten, I.M.V., von Blomberg, B.M.E., Scheper, R.J. (2001). Mechanisms in allergic contact dermatitis. In: Rycroft, R.J.G., Menne, T., Frosch, P.J., Lepoittevin, J.-P. (Hrsg.): Textbook of Contact Dermatitis. 3rd edition. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 13-58
- Santucci, B., Picardo, M., Iavarone, C., Trogolo, C. (1985). Contact dermatitis to *Alstroemeria*. *Contact Dermatitis* **12**, 215-219
- SCCNFP (Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products). Fragrance allergy in consumers. A review of the problem. Analysis for the need

- for appropriate consumer information and identification of consumer allergens. SCCNFP/0017/98, Dezember 1999
- Schempp, C.M., Schöpf, E., Simon, J.C. (2002). Durch Pflanzen ausgelöste toxische und allergische Dermatitis (Phyto dermatitis). *Hautarzt* **53**, 93-97
- Schmalle, H.W., Jarchow, O.H. (1983). Kontaktallergene, Isolierung, Identifizierung und Struktur-Wirkungsbeziehungen am Beispiel ausgewählter Phytoekzematogene. *Funkt. Biol. Med.* **2**, 9-17
- Schnuch, A., Geier, J. (1995). Die häufigsten Kontaktallergene im Jahr 1994. Auswertung aus den Kliniken des IVDK in Zusammenarbeit mit der Deutschen Kontaktallergiegruppe. *Dermatosen* **6**, 275-278
- Schnuch, A., Uter, W., Geier, J., Gefeller, O. (2002). Epidemiology of contact allergy: an estimation of morbidity employing the clinical epidemiology and drug-utilization research (CE-DUR) approach. *Contact Dermatitis* **47**, 32-39
- Sieben, S., Hertl, M., Al Masaoudi, T., Merk, H.F., Blömeke, B. (2001). Characterization of T Cell Responses to Fragrances. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **172**, 172-178.
- Simon, J.C. (1994). Die Haut - ein Immunorgan. *Fortschr. Med.* **112**, 293-295
- Smith Pease, C.K., Basketter, D.A., Patlewicz, G.Y. (2003). Contact allergy: the role of skin chemistry and metabolism. *Clin. Exp. Dermatol.* **28**, 177-183
- Sprung, M.A. (1940). A summary of the reactions of aldehydes with amines. *Chem. Rev.* **26**; 297-338
- Steinert, P.M., Marekov, L.N. (1995). The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isodipeptide cross-linked components of the epidermal cornified cell envelope. *J. Biol. Chem.* **270**, 17702-17711
- Steven, A.C., Steinert, P.M. (1994). Protein composition of cornified cell envelopes of epidermal ceratinocytes. *J. Cell Sci.* **107**, 693-700
- Streit, M., Braathen, L.R. (2001). Contact dermatitis: clinics and pathology. *Acta Odontol. Scand.* **59**, 309-314
- Svedman, C., Bruze, M., Johansen, J.D., Andersen, K.E., Goosens, A., Frosch, P.J., Lepoittevin, J.-P., Rastogi, S., White, I.R., Menne, T. (2003). Deodorants: an experimental provocation study with hydroxycitronellal. *Contact Dermatitis.* **48**, 217-223.
- Tava, A., Mella, M., Bialy, Z., Jurzysta, M. (2003). Stability of saponins in alcoholic solutions: ester formation as artifacts. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 1797-1800
- Tristram, G.R. (1949). Amino acid composition of purified proteins. *Adv. Prot. Chem.* **5**, 83-153

- Tsai, L., Sokoloski, E.A. (1995). The reaction of 4-hydroxy-2-nonenal with N^α-acetyl-L-histidine. *Free Radic. Biol. Med.* **19**, 39-44
- Uchida, K., Stadtman, E.R. (1992). Modification of histidine residues in proteins by reaction with 4-hydroxynonenal. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 4544-4548
- Usui, T., Hayase, F. (2003). Isolation and identification of the 3-hydroxy-5-hydroxymethyl-pyridinium compound as a novel advanced glycation end product on glyceraldehydes-related Maillard reaction. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 930-932
- Verspyck Mijnsen, G. A. W. (1969). Pathogenesis and causative agent of "tulip finger". *Br. J. Derm.* **81**, 737-745
- Wagner, S., Kratz, F., Merfort, I. (2004). In vitro behaviour of sesquiterpene lactones and sesquiterpene lactone-containing plant preparations in human blood, plasma and human serum albumin solutions. *Planta Med.* **70**, 227-233
- Ward, W.H., Lundgren, H.P. (1954). Formation, composition and properties of keratins. *Adv. Prot. Chem.* **9**, 243-297
- Welker, H., Welker, P.D., Rappaport, M.D. (1932). Dermatitis due to Tulip bulbs. *J. Allergy* **3**, 317-320
- Westendorf, J. (1997). Naturstoffe. In: Marquardt, H., Schäfer, S.G.(Hrsg.): Lehrbuch der Toxikologie. Spektrum, Akad. Verl. Heidelberg, Berlin, 650-691
- Yamamoto, A., Morita, A., Tsuji, T., Suzuki, K., Matsunaga, K. (2002). Contact urticaria from geraniol. *Contact Dermatitis* **46**, 52
- Zaugg, R.H., Walder, J.A., Klotz, I.M. (1977). Schiff base adducts of hemoglobin. Modifications that inhibit erythrocyte sickling. *J. Biol. Chem.* **252**, 8542-8548

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die Dissertation wurde am Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität Dresden unter der wissenschaftlichen Betreuung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr.-Ing. habil. Thomas Henle angefertigt.

Erfolgreiche Promotionsverfahren haben durch mich bis jetzt nicht stattgefunden.

Die Promotionsordnung der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden in der aktuell gültigen Fassung erkenne ich in allen Teilen an.

Janko Pickert

Danksagung

Herrn Prof. Dr. T. Henle, Direktor am Institut für Lebensmittelchemie der TU Dresden, und Frau Dr. H. Raddatz danke ich für die interessante Themenstellung und für die stets freundliche und hilfsbereite Betreuung. Es hat mir große Freude bereitet, dieses Thema mit so einer hervorragenden wissenschaftlichen Unterstützung zu bearbeiten.

Herrn Prof. Dr. T.J. Simat vom Institut für Lebensmittelchemie der TU Dresden und Herrn Prof. Dr. H.F.Merk vom Universitätsklinikum der RWTH Aachen danke ich für die freundliche Übernahme der Korreferate.

Frau Dipl.Ing. (FH) K. Schlosser danke ich für die Durchführung der Aminosäureanalysen und Herrn Dr. U. Schwarzenbolz für seine Hilfe bei den LC-MS-Messungen. Außerdem danke ich Frau Dr. M. Gruner vom Institut für Organische Chemie der TU Dresden für die Aufnahme und die Hilfe bei der Auswertung der NMR-Spektren.

Frau DLC C. Hartert und Frau DLC A. Langer gilt mein Dank für ihre Mitarbeit bei der Durchführung von Untersuchungen im Rahmen ihrer Diplomarbeiten am Institut für Lebensmittelchemie.

Allen Doktoranden und Mitarbeitern des Instituts für Lebensmittelchemie an der TU Dresden danke ich für das freundliche und angenehme Umfeld, welches ein hervorragendes Arbeitsklima geschaffen hat.

Vor allem gilt mein Dank meiner Familie, hier besonders meinen Eltern, die mir durch ihre Unterstützung dies erst ermöglicht haben.