



UFOP-SCHRIFTEN | RAPSÖL & ERNÄHRUNG

ABSCHLUSSBERICHT

Einfluss Allergenes Potenzial des nicht kennzeichnungspflichtigen Lebensmittel-Zusatzes Raps unter besonderer Berücksichtigung der Kreuzreaktivität mit Senf

Vorgelegt von:

Dr. Elke Ueberham

Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Abteilung Therapievalidierung, AG Proteinbiomarker, Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie (IZI)

*Allergenes Potenzial des nicht kennzeichnungspflichtigen
Lebensmittel-Zusatzes Raps unter besonderer
Berücksichtigung der Kreuzreaktivität mit Senf*



*Abschlussbericht zum
UFOP-Projekt 528/171
Kurztitel "Allergenes Potenzial von Raps"*

Leipzig, 30.04.2018

Vorgelegt von:

Dr. Elke Ueberham, Wissenschaftliche Mitarbeiterin

Abteilung Therapievalidierung,

AG Proteinbiomarker

1. Hintergrund und Zielstellung

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.2 Instrumente und Zubehör

2.3. Methoden

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Rapspräparate

3.2 Reaktivität monoklonaler Senf-Antikörper gegenüber Raps

4. Zusammenfassung und Diskussion

5. Referenzen

1. Hintergrund und Zielstellung

Die Fragestellung nach der potentiellen Allergenität von Raps-Proteinen resultiert aus der botanischen Verwandtschaft der Brassica Arten, Brassica napus (Raps) mit Brassica nigra (schwarzer oder orientalischer Senf) und Brassica juncea (brauner Senf). Weitere Mitglieder dieser Gattung sind verschiedene Kohlsorten wie Brokkoli, Blumenkohl und Weißkohl, die in der Allergenitätsdebatte eher selten auftauchen. Obwohl Allergien gegen Kohlsorten bereits beschrieben wurden (Sánchez-Guerrero und Escudero 1998) wird über eine Kennzeichnungspflicht, die vorrangig Senf-Allergiker vor ungewollten Kontakt mit eventuell kreuzreagierenden Proteinen schützen soll, bezüglich verschiedener Kohlsorten wenig diskutiert. Die Tatsache, dass aufgrund verfeinerter Technologien Raps in neuerer Zeit als Proteinisolat in größeren Mengen einsetzbar wäre, hat die Diskussion um die Allergenität von Raps in den Fokus gerückt (Scientific Opinion on the safety of "rapeseed protein isolate" as a Novel Food ingredient 2013). Es fehlen jedoch bisher Studien über allergische Reaktionen von Senf-Allergikern auf Raps (Fiocchi et al. 2016), deshalb scheint eine Spurenkennzeichnung wie bei allergenen Bestandteilen eher fraglich. Auf molekularer Ebene fällt eine hohe Homologie zwischen dem 2 S Albumin des Raps (Napin) und dem 2 S Albumin des Senfes auf (Abbildung 1).

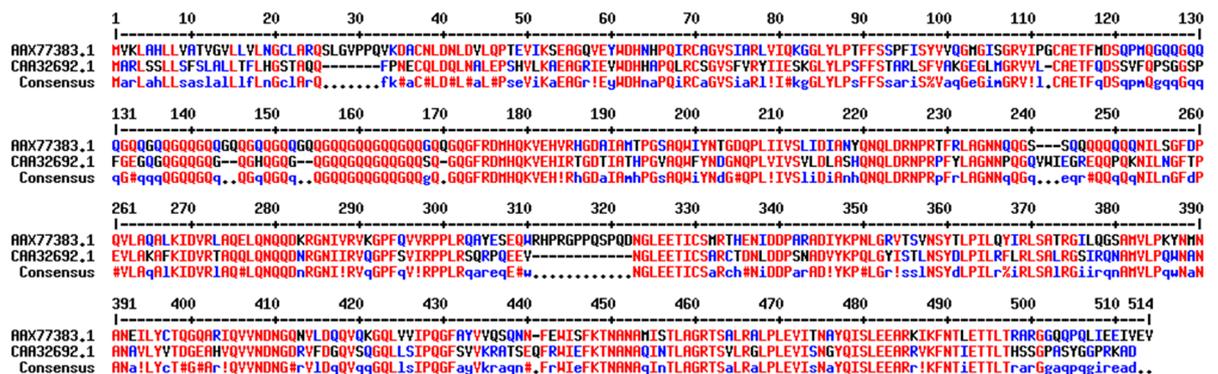


Abb. 1: Sequenzvergleich der 2S-Albumine von Raps (P17333, Napin(Brassica napus) mit den 2 S Albuminen von Senf (Q42413, Brassica juncea (brauner Senf); P15322, Sinapis alba (weißer/gelber Senf), CAA46784.1 Brassica nigra (orientalischer/schwarzer Senf). Alle Aminosäuren, die in beiden Proteinen gleich sind, sind in rot dargestellt.

Im Gegensatz zu den 2S-Albuminen gibt es jedoch weniger homologe Bereiche bei den Untereinheiten der 11 S Globuline in Raps und Senf (Abbildung 2).

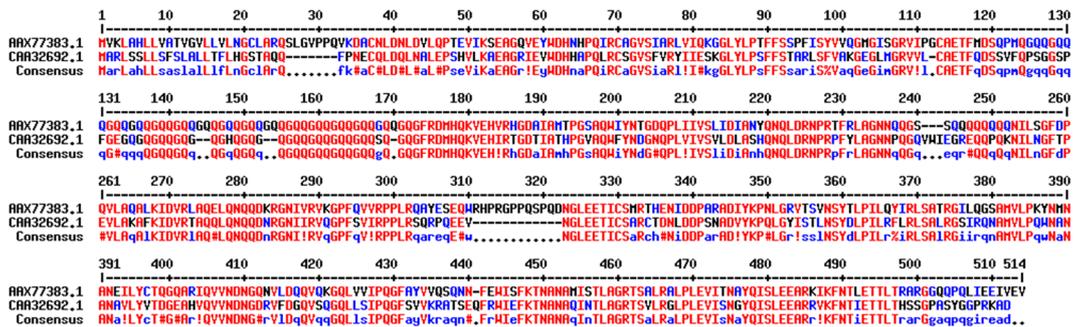


Abb. 2: Sequenzvergleich des Cruciferins aus Raps (CAA32692.1) und 11S Globulin aus gelben Senf (AAX77383.1).

Alle Aminosäuren, die in beiden Proteinen identisch sind, sind in rot dargestellt.

Eine Recherche der wissenschaftliche Literatur verweist auf wenige Publikationen, die die Bindung von spezifischem IgE an Rapsproteine beschreiben, die aber vorwiegend aus einem Arbeitskreis stammen (Poikonen et al. 2006; Puumalainen et al. 2006). Aufgrund der unzureichenden Datenlage wird für Raps auch stets vom allergenen Potenzial gesprochen und nicht von dessen Allergenität, da diese bisher nicht eindeutig nachgewiesen ist (Puumalainen et al. 2015). Eine Sensibilisierung, d.h. die Bildung von spezifischen IgE Antikörpern auf ein Lebensmittel, stellt den ersten Schritt bei der allergischen Reaktion dar, muss aber nicht unbedingt in einer allergischen Reaktion münden.

Wenn spezifische IgE Antikörper *in vitro* untersucht werden, spielen die verwendeten experimentellen Bedingungen eine große Rolle bei der Interpretation der Daten. So kann die Affinität eines Antikörpers nur unter genauer Beschreibung des biochemischen Milieus angegeben werden, was Temperatur, pH-Wert und Salzkonzentration einschließt. Aber auch das Umgebungsmilieu bezüglich des Vorhandenseins anderer Proteine beeinflusst aufgrund vielfältiger Wechselwirkungen die Bindung eines Antikörpers an das entsprechende Antigen. Die Bindung ist in hohem Masse von der Präsentation des Antigens (hier des potentiellen Allergens abhängig). Beispielsweise binden manche Antikörper an denaturiertes und natives Protein, andere sind nur in der Lage an natives Protein anzudocken. Von Bedeutung kann zusätzlich der verwendete Proteinextrakt sein, der vom Reinigungsgrad und Fraktionierung des Proteins abhängt.

Deshalb war es das Ziel unseres Projektes mit Seren von Senf-Allergikern, die hohe IgE Spiegel gegen Senf-Proteine aufweisen aber auch in sogenannten Doppelblind Placebo kontrollierten (DBPC) Studien, als Senf-Allergiker eingestuft worden waren, in eigenen Experimenten unter verschiedenen definierten Bedingungen die Bindung von Senf-spezifischen IgE-Antikörpern an verschiedene Raps-Protein-Isolate zu überprüfen. Daraus könnte dann auf das allergene Potenzial von Raps geschlossen werden. Eine tatsächliche Allergenität muss aber dennoch stets in einer DBPC-Studie bewiesen werden.

Zusätzlich sollte in diesem Projekt unter Verwendung monoklonaler Maus-Antikörper, die sehr ähnliche oder gleiche Epitope wie die Patienten-Antikörper erkennen, eine genauere molekulare Charakterisierung der Proteine erreicht werden. Das eröffnet die Möglichkeit einer sehr gezielten molekularen Diagnostik.

Unser ursprüngliches Vorhaben das allergene Potenzial des Raps mit gut charakterisierten Patientenseren von Senf-Allergikern zu untersuchen, konnte aufgrund der Nicht-Beschaffbarkeit der Allergiker-Seren nicht durchgeführt werden.

Deshalb wurden neben der Charakterisierung von Rapspräparaten unter verschiedenen Aufschlußbedingungen ausschließlich Experimente mit tierischen Antikörpern aus der Maus durchgeführt.

Dabei kann man davon ausgehen, dass sich unter den tierischen Antikörpern auch solche befinden werden, die in Ihrer Antigenbindungsstelle am Protein dem Patienten-Antikörper eines sensibilisierten Senf-Allergiker Ig E Typs sehr ähnlich sind. Dies lässt sich aus der Genese der spezifischen IgE Antikörper (ϵ -Kette im Fc Teil des Antikörpers, Abbildung 3) ableiten, die bei der sogenannten Typ I Allergie zur allergischen Reaktion führen.

Auch gesunde Menschen, die nicht von einer Nahrungsmittel-Allergie betroffen sind, verfügen über ein enormes Antikörperrepertoire gegen Nahrungsmittel. Diese Antikörper gehören nur einer anderen Klasse nämlich der IgG-Klasse (gamma Kette im Fc-Teils des Antikörpers) an (Abbildung 3).

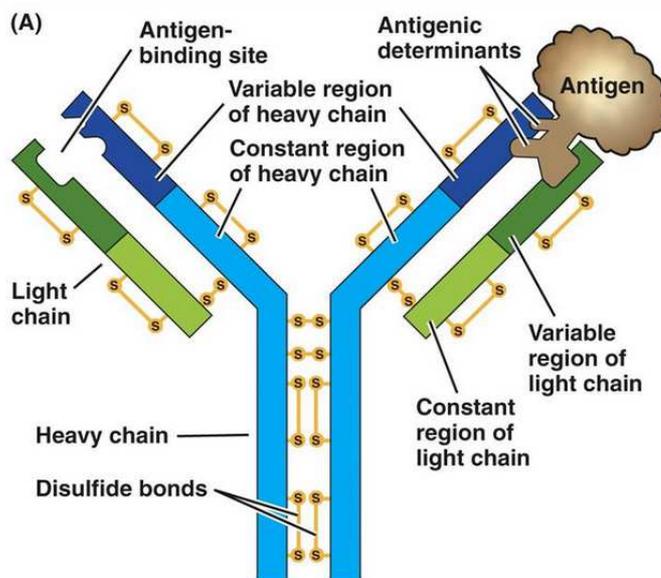
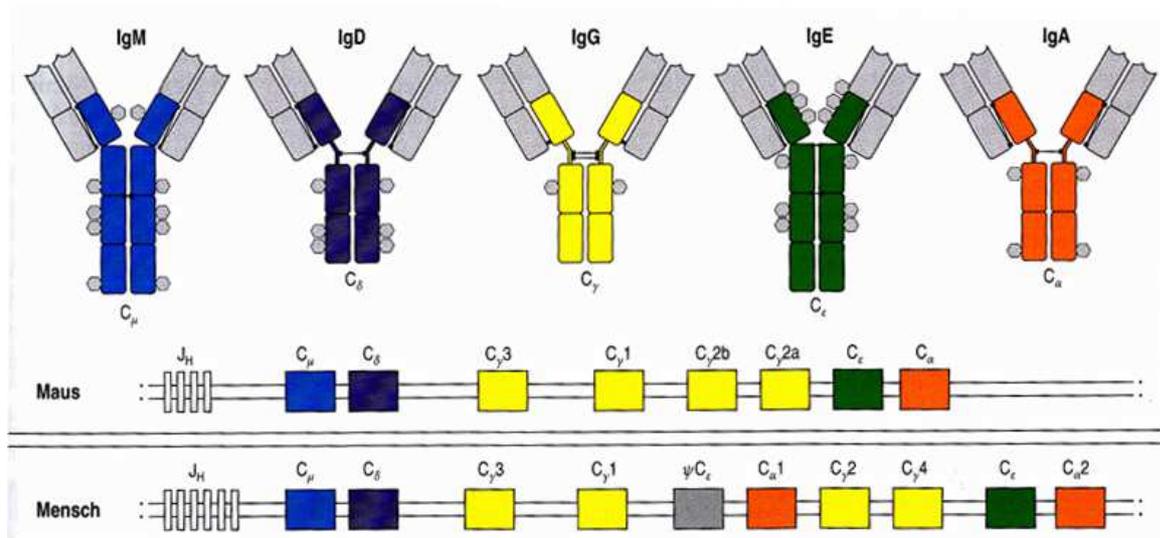


Abb.3: Klassen von Antikörpern und prinzipielle Darstellung der funktionellen und strukturellen Untereinheiten eines Antikörpermoleküls aus dem Lehrbuch Immunologie (Janeway, 7. Auflage 2009, S.205)

Die Antikörper der IgG Klasse binden nicht an den Fcε-Rezeptor an Mastzellen und führen somit nicht zu den Symptomen der allergischen Reaktion. Dennoch kann man IgG Antikörper für *in vitro* Untersuchungen von allergenen Bestandteilen von Nahrungsmitteln benutzen, wenn der Fokus auf der Antigen-Bindungsdomäne liegt.

Voraussetzung für die Bildung von zirkulierenden Antikörpern für Nahrungsmittel-Allergene ist das Durchbrechen der physiologischen Barriere an den Körper-Grenzflächen.

Dieses Durchbrechen kann man durch eine Impfung vortäuschen, bei der die entsprechenden Antigene aktiv an Stellen der immunologischen Reaktion überführt werden. Auf diese Art und Weise können monoklonale Antikörper in Tieren gegen allergene Proteine hergestellt werden mit denen man Kreuzreaktivitäten zwischen verschiedenen allergenen Proteinen *in vitro* untersuchen kann.

Die hier vorgestellten Untersuchungen beschäftigen sich mit den Kreuzreaktionen von Senf-spezifischen Antikörpern zu Raps mit dem Ziel Aussagen zum allergenen Potenzial des Rapses treffen zu können.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Es wurden monoklonale anti-Senf Antikörper aus der Maus (Eigenherstellung Fraunhofer IZI) verwendet. Rapsproben wurden freundlicherweise von der Van Hees GmbH (Herr Alexander Stephan) und dem Fraunhofer IVV (Andreas Fetzer) zur Verfügung gestellt. Die verwendeten Senfproben waren ein Geschenk der Develey Senf&Feinkost GmbH (Andreas Witsch).

Für SDS-Elektrophoresen wurden SDS-Probenpuffer, - Laufpuffer und Gele entsprechend laborüblicher Standardprozeduren verwendet. IPG Streifen (Dry strips) und IGP Puffer für die isoelektrische Fokussierung wurden von der Firma Biorad bezogen (Firma BioRad, München). Zur Detektion der Bindung der Antikörper wurden sekundäre anti-mouse POD Antikörper (Dianova GmbH, Hamburg) eingesetzt. Gebundene sekundäre POD markierte Antikörper wurden über eine Farbreaktion mit dem Substrat TMB-E (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) substrate (DUNN Labortechnik, Asbach) detektiert. Ein Abstoppen der Reaktion und der Farbumschlag zum Endprodukt, welches bei 450 nm spektrophotometrisch vermessen wurde (OD450 nm) wurde mit 0,5 M M Schwefelsäure erreicht.

Die Affinitätschromatographie zur Reinigung der Antikörper wurde mit Hitrap Protein G Säulen (5 ml) (Firma GE Healthcare, Freiburg) durchgeführt.

2.2 Instrumente

Es wurden ein ELISA Platten Wascher TECAN Columbus Pro, ein ELISA-Reader TECAN- Sunrise™ (Firma Tecan, Männedorf, Schweiz), ein Ettan IPGphor Gerät zur isoelektrischen Fokussierung, eine Chromatographie-Einheit Äkta Pure und Purifier (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg), eine Elektrophorese-Einheit Tetracell (Firma Biorad, München) und eine Vacuum-Rotationsverdampfer-Zentrifuge verwendet.

2.3 Methoden

1D_SDS und 2D SDS –Elektrophoresen wurden nach Standard Prozeduren der Gerätehersteller durchgeführt www.biorad.com/webroot/web/pdf/lsr/.../10007296D.pdf

Monoklonale Antikörper wurden über Affinitätschromatographie an Protein G-Säulen entsprechend der Arbeitsanleitung zu HiTrap-Protein G Säulen (Instructions 71-7001-00 AO, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) gereinigt. Für ELISA zur Überprüfung der Antikörper produzierenden Klone wurden 5-10 µg Proteinextrakt über Nacht bei 4°C an die Platte gebunden, anschließend dreimal mit Waschpuffer PBS-T gewaschen und alle verbliebenen Bindungsstellen 1h bei Raumtemperatur mit Caseinlösung gesättigt. Die Bindung der Antikörper aus dem Hybridomüberstand erfolgte 20 min bei Raumtemperatur. Nach einer erneuten dreimaligen Waschung mit Waschpuffer PBS-T wurde mit dem sekundären anti-Maus-POD Antikörper 20 min inkubiert, erneut gewaschen und es erfolgte die Farbentwicklung mit dem Substrat TMB. Durch Zugabe von Schwefelsäure wurde die Reaktion beendet und die Platten wurden im ELISA Reader vermessen.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von Rapspräparaten

Für die Beurteilung der Proteinverteilung wurden Raps-Gesamt-Extrakte und gereinigte Fraktionen aus dem Fraunhofer IVV (Fetzer et al. 2018) verwendet.

Dazu wurden Rapspräparate unter Verwendung verschiedener Extraktionspuffer aufgenommen und bezüglich ihres Proteinbandenmusters zunächst in der eindimensionalen SDS Elektrophorese verglichen. Im ersten Schritt wurde Rapssaat auf zwei unterschiedliche Art und Weisen entölt, um die effektivste Methode zur Darstellung eines Raps-Gesamt-Proteinextrakts zu ermitteln. Wie anhand des Bandenmusters in den einzelnen Spuren der elektrophoretischen Auftrennung in Abbildung 4 zu erkennen ist, wird durch eine Hexan-Entölung, gefolgt von einem Aufschluss in Denaturierungspuffer auf Harnstoffbasis bei 60°C, ein Gesamtproteinpräparat gewonnen, dass eine gleichmäßig effektive Präparation aller Molekulargewichtsgrößen erlaubt. Im Gegensatz dazu werden bei Hexan-Entölung mit anschließender Aufnahme des Proteins in PBS vorwiegend Proteine mit geringen Molekulargewicht (mutmaßliche Napin-Fraktion) und bei Verwendung von Aceton bei tiefer Temperatur vorwiegend Proteine mit hohem Molekulargewicht extrahiert.

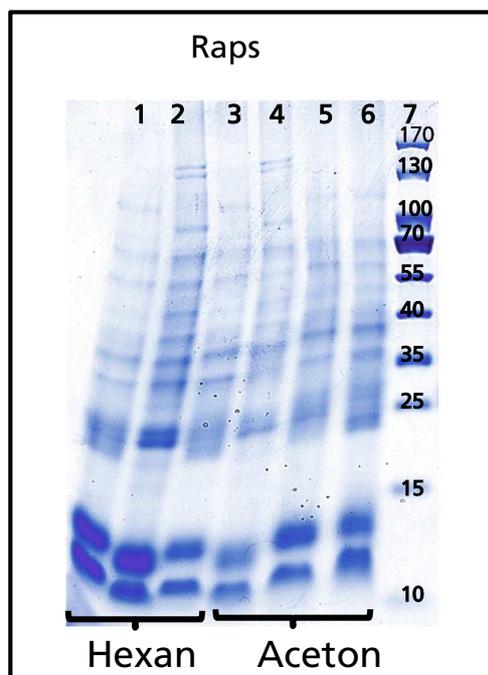


Abb. 4: Elektrophorese von Rapspräparaten nach verschiedenen Entölungsprozeduren.

Rapssaat wurde fein vermahlen und entweder bei Raumtemperatur mit Hexan entölt oder mit eiskaltem Aceton über Nacht bei - 80°C (Tiefemperaturmethode) entfettet. Danach wurde das Rapsmehl nach einer Vacuum-Trocknung mit PBS bei Raumtemperatur (Spur 1 und 4), mit Denaturierungspuffer auf Harnstoffbasis bei 60°C (Spur 2 und 5) oder mit Tris-Puffer (10mM, 400 mM NaCl) (Spur 3 und 6) bei Raumtemperatur aufgeschlossen. Proteine wurden mit dem Farbstoff Coomassie G250 sichtbar gemacht.

Aufgrund der hohen Sequenzhomologie zwischen Napin (2S Albumin) des Rapses und der 2S Albumine des Senfes wurde der Hypothese nachgegangen, dass gereinigte Protein-Präparate, deren Gehalt an Napin unter einen bestimmten Schwellenwert sinkt, keine Kreuzreaktionen mit Senf mehr aufweisen sollten und somit als unbedenklich einzustufen wären. Wie in Abbildung 5 zu erkennen, wiesen die vom Fraunhofer IVV zur Verfügung gestellten 11 S Globulin-Präparate, die eine bezüglich des Napins reduzierte Fraktion darstellen, einen hohen Reinheitsgrad auf, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass sich dieses Präparat zur Untersuchung der Kreuzreaktivität eignet. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Fetzer und Kollegen, die nach der Fertigstellung der praktischen Arbeiten zu diesem Projekt in der Zeitschrift *Industrial Crops & Products* erschienen sind (Fetzer et al. 2018).

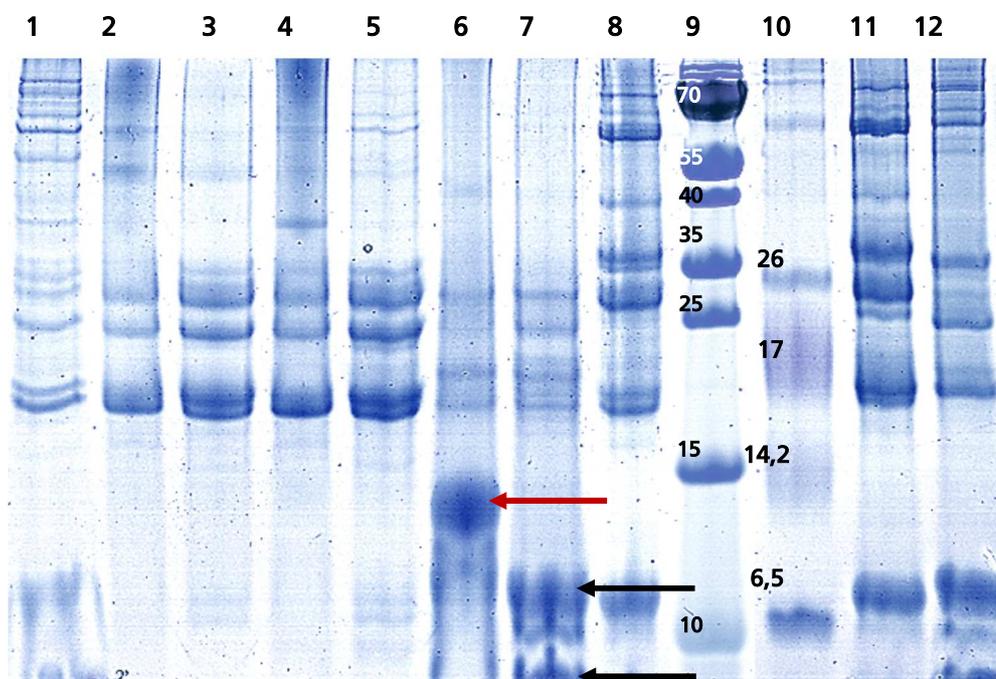


Abb. 5: Elektrophorese von aufgereinigte Raps- und Senf-Proteinisolaten

In Spur 1 wurde ein Raps-Gesamtproteinisolat unter reduzierenden Bedingungen aufgetragen. In Spur 2 bis 7 wurden Raps-Proteinfraktionen, 2 Cruciferinpräparate (Spur 2,3, 4,5) und ein Napin-

Präparat (Spur 6, 7) aufgetragen. Dabei ist das Proteinisolat in der Spur mit der geraden Zahl jeweils unter nicht-reduzierenden Bedingungen und in der Spur mit der ungeraden Nummer unter reduzierenden Bedingungen zu sehen. Spur 8 und 11 zeigen ein Gesamtproteinpräparat des gelben Senfes und in Spur 12 wurde ein Gesamtpräparat des braunen Senfes aufgetragen. Alle Senfpräparate sind unter reduzierenden Bedingungen dargestellt. Spur 9 und 10 enthalten Molekulargewichtsmarker (9 entspricht der Peqlab Protein IV-ladder (Peqlab, GmbH, Erlangen) und Spur 10 zeigt die Molekulargewichtsaufteilung im Ultra Low Range Molecular Weight Marker (Firma Sigma, Deisenhofen). Die jeweiligen Molekulargewichte sind in kDa angegeben. Die Proteine wurden mit dem Farbstoff Coomassie G250 angefärbt. Der rote Pfeil weist auf Napin in nicht-reduzierter Form. In den Cruciferin Spuren wird dieses Protein nicht detektiert. Die schwarzen Pfeile deuten auf die beiden Untereinheiten des Napins, die durch Reduktion der Disulfidbrücken entstehen.

Die Proteinisolate wurden, wie in Abbildung 4 für das Raps-Gesamt-Proteinisolat beschrieben, jeweils unter denaturierenden Bedingungen (Harnstofflösung), in PBS (pH 7,0) und in einer Tris-Lösung (10 mM, pH 9,0) mit hohem Salzgehalt (400 mM) aufgenommen. In Abbildung 5 sind die Molekulargewichtsverteilungen unter denaturierenden Bedingungen gezeigt.

Die resultierenden Proteinlösungen wurden zur Überprüfung der Bindung von monoklonalen Antikörpern eingesetzt.

3.2 Reaktivität monoklonaler Senf-Antikörper gegenüber Raps

Das im Abschnitt 1 (Hintergrund und Zielstellung) erläuterte Prinzip des Durchbrechens der physiologischen Barriere, die zur Bildung von Antikörpern gegenüber Nahrungsmitteln führt, wird bei der Immunisierung von Tieren für die Herstellung von Antikörpern benutzt. Entsprechend dieses Ansatzes wurden spezifische Senf-Antikörper-produzierende Hybridome, die im Arbeitskreis vorlagen, mit Rapspräparaten überprüft, um Aussagen über die Kreuzreaktivitäten treffen zu können. Bei sorgfältiger Separierung der einzelnen Klone ist davon auszugehen, dass jeweils ein Klon (Gesamtheit der Zellen, die von einer quasi unsterblichen Hybridomzelle abstammen und das gleiche genetische Material tragen) jeweils nur einen einzigartigen Antikörper produziert (monoklonal).

Aufgrund der beschriebenen Kreuzreaktionen, die infolge der niedrigeren Homologie weniger häufig in den 11 S Globulinen zu erwarten sind, wurden im Berichtszeitraum zum Screening neben Gesamtextrakten vorwiegend Cruciferin angereicherte Fraktionen des Rapses verwendet.

Es wurden 380 Antikörper produzierende Klone, die im weiteren als Klone oder Hybridomüberstände bezeichnet werden, bezüglich ihrer Reaktivität auf Raps unter überprüft (Abbildung 6).

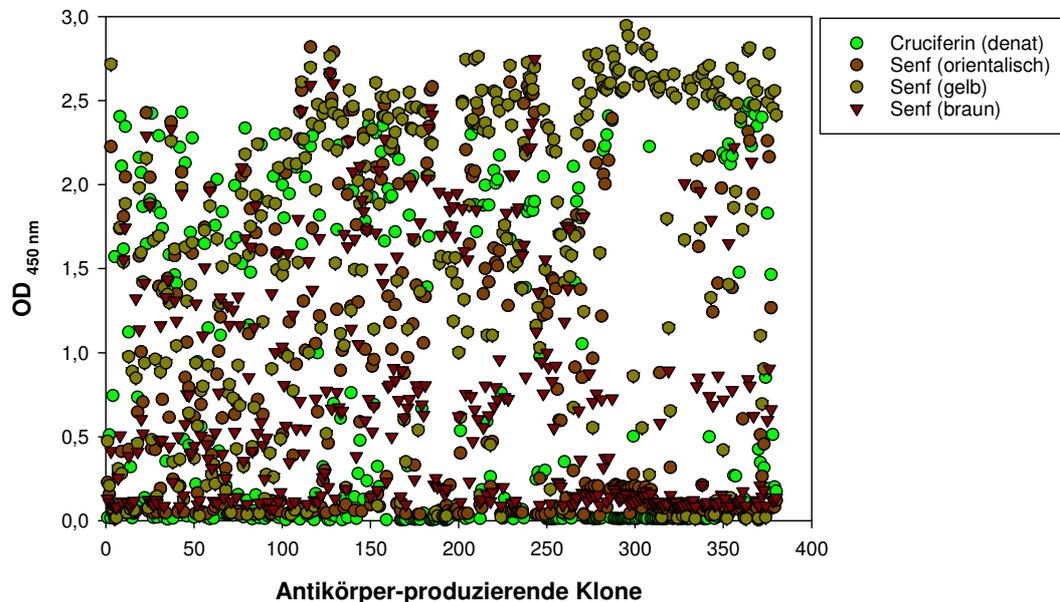


Abb. 6: Überprüfung der Senf-spezifischer Antikörper bezüglich ihrer Reaktivität auf Proteine einer 11 S Globulin angereicherten Fraktion (in der Legende zum Graph als Cruciferin bezeichnet) unter denaturierenden Bedingungen. Jeder Klon kommt im Bild 4-mal vor. Es wird die Reaktion auf die verschiedenen Extrakten, wie in der Legende angegeben, gezeigt. Je höher der Punkt im Diagramm liegt desto besser war die Bindung an das jeweilige Antigen.

Insgesamt wurde bei 145 der 380 Klone eine positive Reaktion auf Cruciferin (11S Rapsprotein beobachtet, was einem Anteil von 38 % entspricht, bei einem cut-off der OD bei 450 nm von 0,5. Im Gegensatz dazu binden bei einer Extraktion der Proben mit einem wässrigen Extraktionspuffer unter nicht-denaturierenden Bedingungen (PBS, phosphate buffered saline), von 97 Klonen die auf gelben Senf positiv sind, 88 Klone an Cruciferin und 7 Klone an Napin. Das wären 90 Prozent der Gelbsenf-reaktiven Klone, die mit einer angereicherten Fraktion von Cruciferin reagieren könnten.

Es wurde deshalb mit den spezifischeren denaturierenden Bedingungen weitergearbeitet, um den Unterschied in der Bindungsspezifität zwischen Senf-und Rapsklonen weiter heraus zu arbeiten.

38 Hybridom-Überstände aus diesen 145 Klonen, die auf Cruciferin positiv reagierten, wurden auf weiteren Proteinextrakten näher charakterisiert. Vergleicht man die Bindung

der Antikörper unter den drei beschriebenen Bedingungen auf Gesamtextrakten von Raps und Senf (gelb) können einzelne Klone identifiziert werden, die nur an Raps binden und somit für den Nachweis von Raps in einem Testverfahren geeignet wären (Abbildung 7).

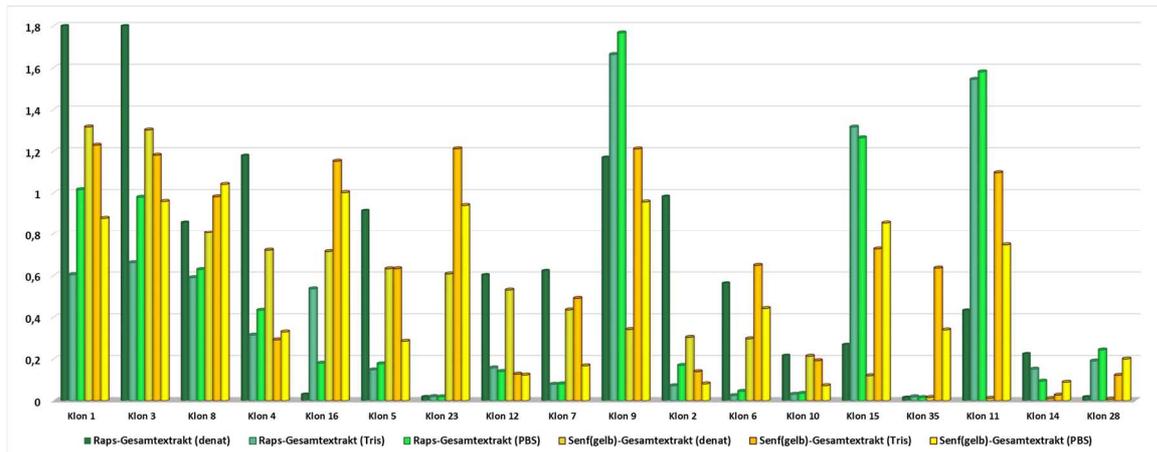


Abb. 7: Reaktion ausgewählter Klone auf die Gesamt-Raps-Fraktion (grüne Säulen) unter verschiedenen Extraktionsbedingungen für das Antigen Raps, wie in der Legende angegeben und auf Senf (gelbe Säulen). Die Klone 11 und 14 fallen durch ihre vernachlässigbar geringe Bindungsfähigkeit an Senf-Extrakt und denaturierenden Bedingungen auf, bei mittel-starker Bindung an denaturierten Raps-Gesamtextrakt.

Da Klon R11 auch gegen die anderen Senfarten (brauner und orientalischer) nur geringe Bindung aufweist (Abbildung 8) sollte sich dieser Klon für die Entwicklung eines Nachweistests für Raps eignen.

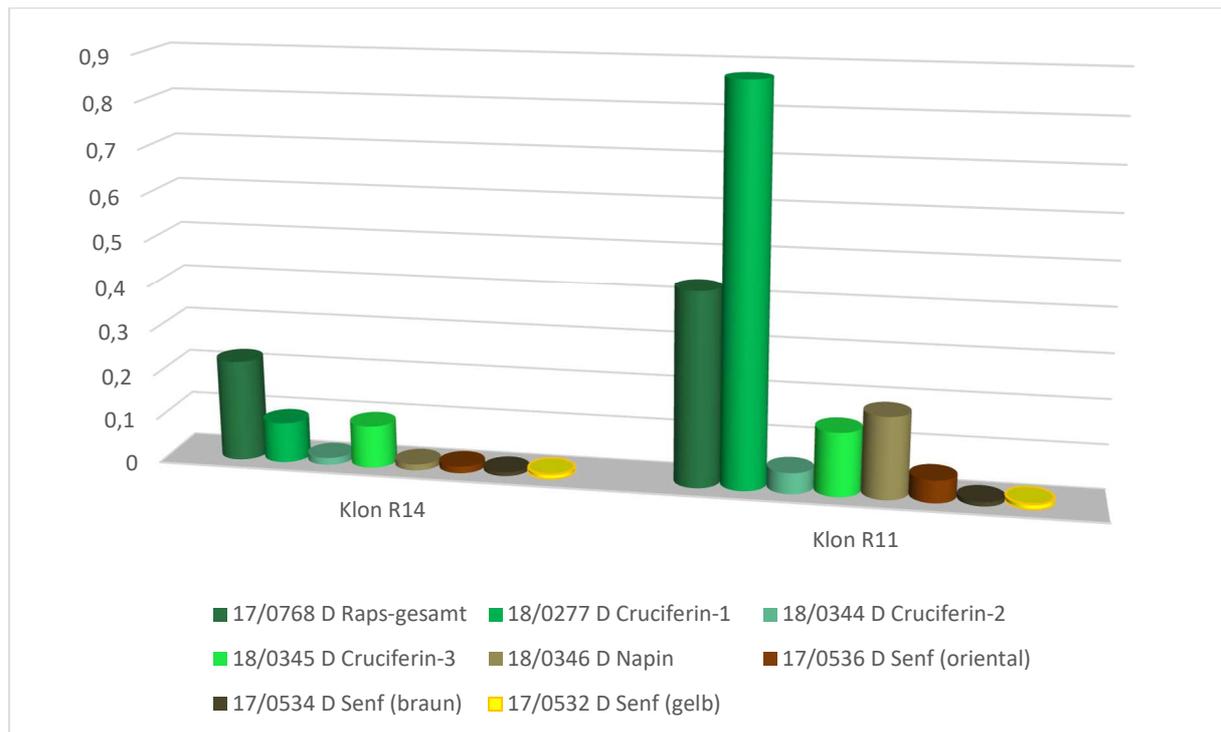


Abb. 8: Spezifität des Klons R11 im Vergleich zu Klon 14 auf die verschiedenen Rapspräparaten (Raps-Gesamt-Extrakt, Cruciferin, Napin, repräsentiert durch die grünen Säulen) und die Senfsorten brauner Senf (braune Säulen), orientalischer Senf (schwarze Säulen) und gelber Senf (gelb).

Untersucht man die Bindungsfähigkeit von Klon R11 unter denaturierenden Bedingungen eingehender, fällt auf, dass ein Unterschied zwischen den drei verschiedenen Cruciferin Fraktionen A, B und C besteht. Der Klon R11 bindet an die Cruciferin Fraktion A außergewöhnlich gut (Abbildung 9).

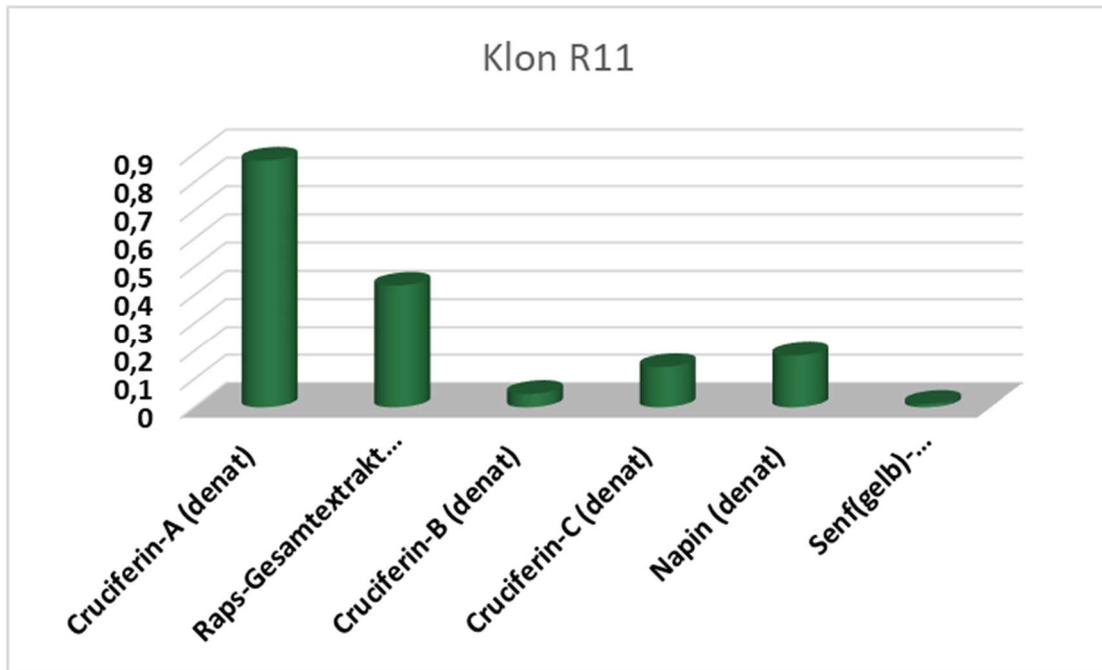


Abb. 9: Reaktivität des ausgewählten Klons R11 auf drei verschiedene Cruciferin Fraktionen und Napin im Vergleich zu Raps-Gesamt-Extrakt und gelbem Senf wie angezeigt.

Um auf molekularer Ebene endgültig zu klären, welches Protein bzw. welche Untereinheit eines Proteins der Klon R11 tatsächlich erkennt, bietet sich eine Immunoaffinitätschromatographie an. Mit dieser Methode kann das Antigen rein dargestellt werden. Dazu wird eine große Menge an Hybridomüberstand benötigt (Litermaßstab). Klon R11 wurde deshalb weiter kultiviert und expandiert und anschließend reines IgG über Affinitätschromatographie dargestellt (Abbildung 10).

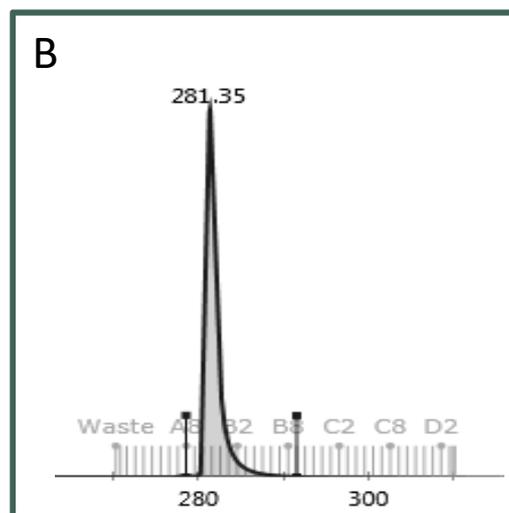
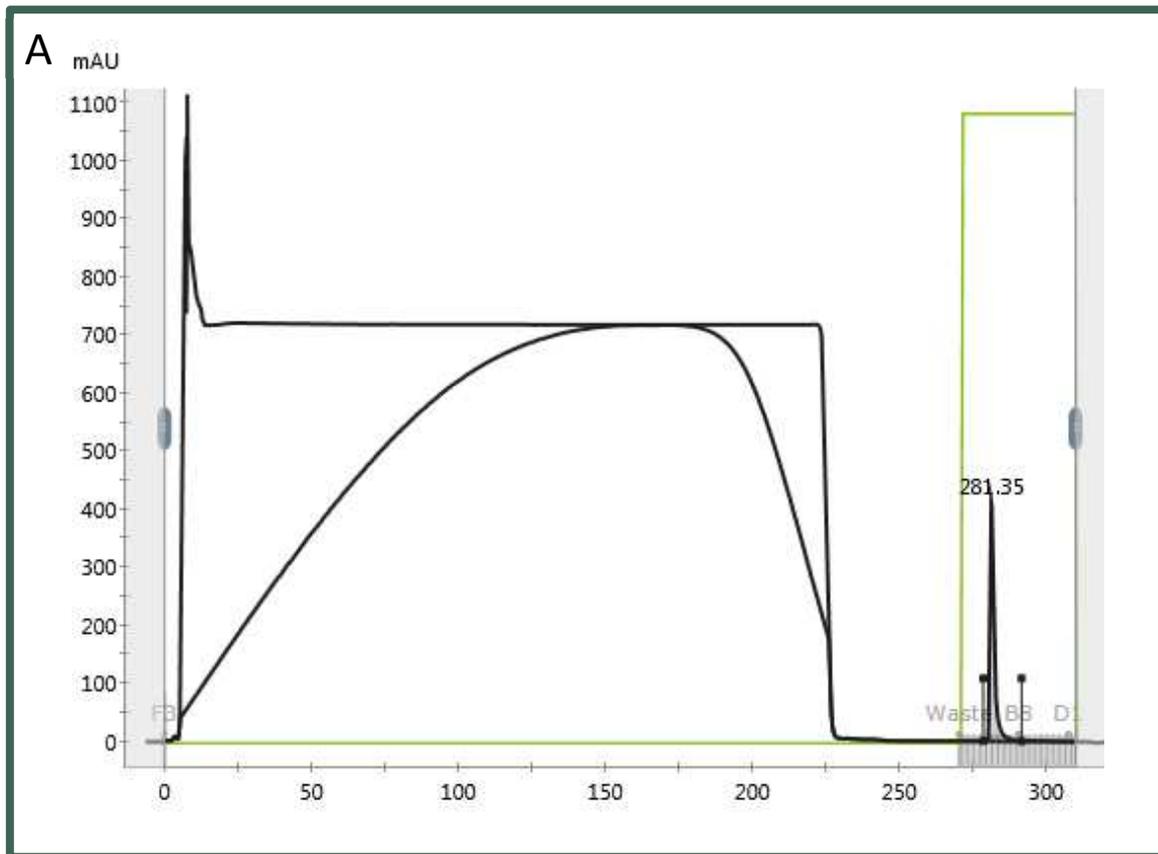


Abb.10: Affinitätschromatographie zur Reinigung des IgGs aus Hybridomüberstand R11

In Teil-Abbildung A ist das Chromatogramm, das den Verlauf der Reinigung anzeigt, dargestellt. Nach Bindung des IgGs an das kovalent gekoppelte Protein G der Säulenmatrix (Start 0 ml bis 225 ml), wird in einem Waschschrift alles ungebundene und nicht spezifisch gebundene Protein entfernt (225 bis 250 ml) und in einem nachfolgenden Elutionsschritt, über einen pH Shift nach pH 2,7 aus der Säule eluiert. Der eluierte IgG Peak, in Teilbild B Fraktion A9 bis B2, wird nachfolgend in PBS überführt und steht danach für die Immunoaffinitäts-Chromatographie sowie andere Anwendungen zur Verfügung.

4. Zusammenfassung und Diskussion

Entsprechend des Arbeitsplanes zum Projekt 528/171 wurde eine Charakterisierung von Rapspräparaten vorgenommen.

Das ursprünglich verfolgte Projektziel auf molekularer Ebene Aussagen zum allergenen Potenzial des nicht-kennzeichnungspflichtigen Lebensmittel-Zusatzes Raps treffen zu können, konnte innerhalb des Projektzeitraumes jedoch nicht erreicht werden, weil keine Senf-Allergiker-Seren zur Verfügung standen. Dies wurde im Oktober 2017 bei der Sitzung der UFOP-Fachkommission "Humanernährung" vorgetragen und am 15.12.2017 schriftlich mitgeteilt.

Es wurden deshalb Untersuchungen mit monoklonalen Mausantikörpern durchgeführt, die einen Beitrag zur molekularen Charakterisierung von Raps-Proteinen liefern und für weitere Untersuchungen zum Raps zur Verfügung stehen. Dabei konnte ein monoklonaler Antikörper identifiziert werden, der sich für eine Test-Entwicklung zum spezifischen Nachweis von Raps eignet, da er unter den gewählten Extraktionsbedingungen keine Kreuzreaktivität zu Senf aufweist. Die unterschiedlich starke Bindung dieses Klons an die drei unterschiedlichen Cruciferin-Präparate gibt in der vorliegenden Studie Anlass zur Suche nach dem spezifischen Antigen, um die Spezifität dieses Antikörpers in einem späteren Test definitiv angeben zu können, zeigt aber auch, dass bei unterschiedlicher Herstellung der Proteinpräparate differenzierte Bindungen von Antikörpern resultieren und somit *in vitro* Untersuchungen, die mit nur einer Präparationsmethode durchgeführt werden, bezüglich ihrer Übertragbarkeit auf die *in vivo* Situation sehr kritisch zu betrachten sind.

Darüber hinaus könnte die Vorbehandlung des Proteins wie Druckbehandlung oder Wärmebehandlung, die in der konventionellen Ölgewinnung aus Raps angewendet wird (Salazar-Villanea et al. 2016) eine Rolle für die Bindungsfähigkeit spezifischer Antikörper spielen.

Zusammenfassend wird festgestellt, dass trotz der großen Homologie in der Sequenz der 2S Albumine von Raps und Senf unter den gewählten Bedingungen nur sehr wenige der hier untersuchten Senf-Antikörper auch an die angereicherte 2S-Fraktion des Raps (Napin Fraktion) binden. Aber auch die Bindung der untersuchten Antikörper-Klone an die Cruciferin Fraktion, die 38 % der Gesamtheit untersuchten Antikörper betrug, lässt eher auf eine geringere Kreuzreaktivität schließen, zumal in der vorliegenden Studie bedingt

durch die Screening Methode nur stark bis mittel-affine Antikörper verwendet wurden. Es wurde insgesamt, wie zu erwarten war, eine starke Abhängigkeit der Bindung der Antikörper von der jeweiligen Extraktionsbedingung festgestellt.

Entsprechend dieser Ergebnisse sind Studien, die sich mit allergenen Bestandteilen und der Kreuzreaktivität unter ausgewählten spezifischen Bedingungen beschäftigen (Bueno C, Martin-Pedraza L, Cuesta-Herranz J, and Villalba M 2016), kritisch in Hinblick auf die tatsächlichen Reaktionen *in vivo* zu beurteilen.

In weitergehenden Untersuchungen sollten mit den hier vorgestellten Antikörpern noch mehr Raps Präparate untersucht werden, die vor allem dem für die Humanernährung vorgesehenen Canola Protein-Präparaten entsprechen, deren ernährungsphysiologische Vorteile bereits beschrieben wurden (Fleddermann et al. 2013). Da die für die Humanernährung vorgesehenen Produkte, wie die von Fetzer und Kollegen beschriebenen und hier verwendeten Proteinisolate von kalt gepresstem Rapskuchen abgeleitet sind, werden allerdings ähnliche Ergebnisse erwartet.

5. Referenzen

- Bueno C, Martin-Pedraza L, Cuesta-Herranz J, and Villalba M (2016): Is the Cross-Reactivity of Sin a 1, 2S Albumin from Mustard Seeds, Exclusively Restricted to Brassicaceae Members? In: *JSM Allergy and Asthma* 2016 (1), S. 1001.
- Fetzer, Andreas; Herfellner, Thomas; Stäbler, Andreas; Menner, Michael; Eisner, Peter (2018): Influence of process conditions during aqueous protein extraction upon yield from pre-pressed and cold-pressed rapeseed press cake. In: *Industrial Crops and Products* 112, S. 236–246. DOI: 10.1016/j.indcrop.2017.12.011.
- Fiocchi, Alessandro; Dahdah, Lamia; Riccardi, Carla; Mazzina, Oscar; Fierro, Vincenzo (2016): Precautionary labelling of cross-reactive foods. The case of rapeseed. In: *Asthma research and practice* 2, S. 13. DOI: 10.1186/s40733-016-0028-4.
- Fleddermann, Manja; Fechner, Anita; Rößler, Andrea; Bähr, Melanie; Pastor, Anja; Liebert, Frank; Jahreis, Gerhard (2013): Nutritional evaluation of rapeseed protein compared to soy protein for quality, plasma amino acids, and nitrogen balance--a randomized cross-over intervention study in humans. In: *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)* 32 (4), S. 519–526. DOI: 10.1016/j.clnu.2012.11.005.
- Poikonen, S.; Puumalainen, T. J.; Kautiainen, H.; Burri, P.; Palosuo, T.; Reunala, T.; Turjanmaa, K. (2006): Turnip rape and oilseed rape are new potential food allergens in children with atopic dermatitis. In: *Allergy* 61 (1), S. 124–127. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2005.00929.x.
- Puumalainen, T. J.; Puustinen, A.; Poikonen, S.; Turjanmaa, K.; Palosuo, T.; Vaali, K. (2015): Proteomic identification of allergenic seed proteins, napin and cruciferin, from cold-pressed rapeseed oils. In: *Food chemistry* 175, S. 381–385. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.11.084.
- Puumalainen, Tuija J.; Poikonen, Sanna; Kotovuori, Annika; Vaali, Kirsii; Kalkkinen, Nisse; Reunala, Timo et al. (2006): Napins, 2S albumins, are major allergens in oilseed rape and turnip rape. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 117 (2), S. 426–432. DOI: 10.1016/j.jaci.2005.10.004.
- Salazar-Villanea, Sergio; Bruininx, Erik M. A. M.; Gruppen, Harry; Hendriks, Wouter H.; Carré, Patrick; Quinsac, Alain; van der Poel, Antonius F. B. (2016): Physical and chemical changes of rapeseed meal proteins during toasting and their effects on in vitro digestibility. In: *Journal of animal science and biotechnology* 7, S. 62. DOI: 10.1186/s40104-016-0120-x.
- Sánchez-Guerrero, I. M.; Escudero, A. I. (1998): Occupational contact dermatitis to broccoli. In: *Allergy* 53 (6), S. 621–622. DOI: 10.1111/j.1398-9995.1998.tb03941.x.
- Scientific Opinion on the safety of “rapeseed protein isolate” as a Novel Food ingredient (2013). In: *EFSA* 11 (10), S. 13.

Leipzig, 30.04.2018

Dr. Elke Ueberham

