

SIGNATOPE

BMEL Förderprogramm: Zweckvermögen des Bundes bei der Landwirtschaftlichen Rentenbank

## Schlussbericht zum Vorhaben: Teil I

### **Allergen Pro: Etablierung und Validierung von durchsatzfähigen Methoden zur detaillierten Analyse von Allergenprofilen in Lebensmitteln und zur individuellen Charakterisierung deren allergener Wirkung in Patienten**

Zuwendungsempfänger	SIGNATOPE GmbH
Förderkennzeichen	281A304B18
Projektleiter	Dr. Oliver Pötz
Laufzeit des Vorhabens	01.09.2020 - 29.02.2024
Berichtsdatum	10.09.2024

## I. Kurze Darstellung der Aufgaben und der durchgeführten Arbeiten der SIGNATOPE

### 1. Ursprüngliche Aufgabenstellung sowie der wissenschaftliche und technische Stand an den angeknüpft wurde

Ausgelöst durch bestimmte Lebensmittel leidet ein bestimmter Anteil der Bevölkerung (1-3% der Erwachsenen und 4-6% der Kinder) an allergischen Symptomen, die bis hin zu einer lebensbedrohlichen allergischen Reaktion (Anaphylaxie) führen können. Zu den häufigsten Nahrungsmittelallergenen gehören Hühnerei und Erdnuss. Durch die Einführung von alternativen Novel Food Proteinquellen, wie Insekten, entstehen potentiell neue Risiken für Allergiker. Im Mai 2021 wurden Mehlwürmer von der EU-Kommission SCOPAFF (Standing Committee on Plants, Animals, Food and Feed) als Novel Food autorisiert und eine entsprechende Risikobewertung durch die EFSA (European Food Safety Authority) vorgenommen (Turck et al. 2021). Im November 2021 wurde die Regulierung auf die Wanderheuschrecke (*Locusta migratoria*) ausgeweitet, seit Februar 2022 wurde das Heimchen (*Acheta domesticus*) und im Januar 2023 der Büffelwurm (Larven von *Alphitobius diaperinus*) für Lebensmittel zugelassen. Zusätzlich sind für Futtermittel noch die Hausfliege (*Musca domestica*), sowie eine Grillenart (*Gryllus assimilis*) zugelassen (Commission Regulation (EU) 2017/893). Das Risiko für eine unbeabsichtigte Verunreinigung von Lebensmitteln mit Insektenproteinen steigt dadurch und damit das Risiko für Allergiker, die auf solche Proteine reagieren. Deshalb sollten hochempfindliche Nachweisverfahren auf Nukleinsäureebene (PCR) und auf Proteinebene (Immunoaffinity-LC-MS/MS) etabliert werden, die solche Verunreinigungen sicher detektieren können. Außerdem sollte die allergene Wirkung der neuen Proteinquellen mit verlässliche Labormethoden über die Aktivität Allergen-spezifischer T-Zellen im Blut und über allergenspezifische IgE/IgG Antikörper sicher nachgewiesen werden.

Die SIGNATOPE GmbH entwickelt innovative Methoden zur Proteinquantifizierung, die eine Immunoaffinitätsanreicherung mit Massenspektrometrie kombinieren. Diese Technologie wurde bereits erfolgreich in früheren Forschungsprojekten eingesetzt, um Tests zur Herkunftsbestimmung von Blutmehlen auf Basis von alpha-2-Makroglobulin zu entwickeln. Dadurch konnten verbotene und erlaubte Blutprodukte zuverlässig unterschieden werden.

Im Rahmen des Konsortialprojekts Allergen Pro verfolgte SIGNATOPE folgende Hauptziele:

- **Identifizierung von Proteinsequenzen**, die sich für den eindeutigen Nachweis von zum Verzehr zugelassenen Insekten eignen.
- **Entwicklung von massenspektrometriebasierten Immunoassays**, um diese zugelassenen Insekten in Lebensmitteln präzise nachzuweisen.
- **Unterstützung der Projektpartner** bei der Identifizierung allergener Insektenproteine, um deren potenzielle Auswirkungen auf allergische Reaktionen zu untersuchen.

## 2. Ablauf des Vorhabens

Das Projekt wurde in enger Zusammenarbeit mit den Partnern entsprechend der Projektbeschreibung im Antrag durchgeführt. Aufgrund der Pandemie waren persönliche Treffen während eines Großteils des Projekts stark eingeschränkt. Dennoch ermöglichten monatliche digitale Meetings eine effektive Koordination der Arbeiten zwischen den Partnern. In einigen Fällen wurden Arbeitspakete und Meilensteine basierend auf den erzielten Ergebnissen angepasst.

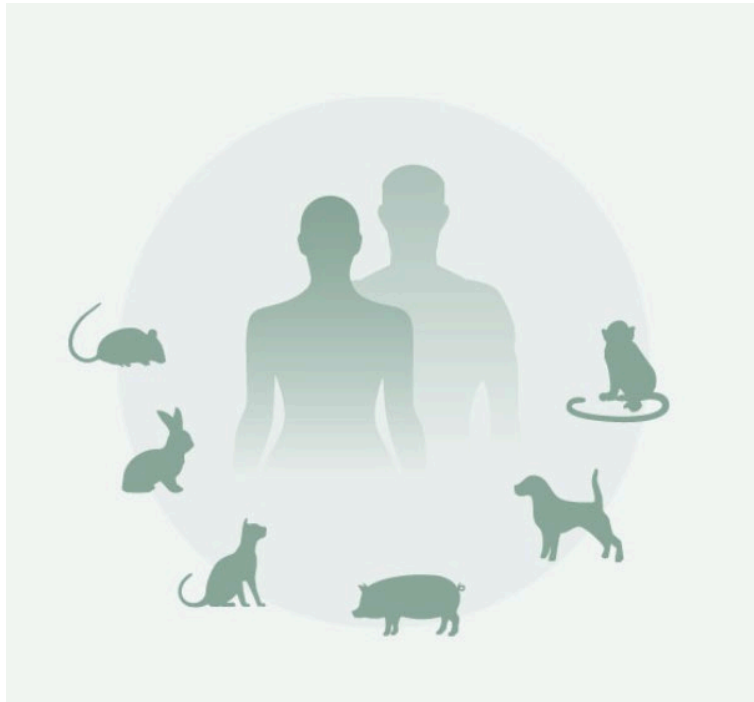
## 3. Wesentliche Ergebnisse sowie ggf. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

In öffentlich zugänglichen Datenbanken sind die Proteome der Spezies *Tenebrio molitor*, *Locusta migratoria*, *Gryllobius sigillatus*, *Alphitobius diaperinus*, *Acheta domesticus*, und *Hermetia illucens* nur sehr unvollständig publiziert, mit Abdeckungen im Bereich von lediglich 0,2 bis 7 %, abgesehen vom Proteom der *Hermetia illucens*. Daher reichte eine rein bioinformatische Analyse nicht aus, um einzigartige Sequenzen für jede Spezies zu identifizieren.

Um dieses Problem zu lösen, wurde eine Strategie entwickelt, die auf eigens durchgeführten Proteomanalysen basiert. Hierfür wurde Material verwendet, das von den Projektpartnern BFR und HSAS bereitgestellt wurde. So konnten sowohl speziesspezifische Sequenzen als auch ein panspezifisches Peptid identifiziert werden, die im Anschluss zur Generierung von Antikörpern eingesetzt wurden. Während der Entwicklung von massenspektrometrie-basierten Immunoassays wurden diese zum quantitativen Nachweis der entsprechenden Spezies eingesetzt. Insgesamt konnten für fünf von sechs Insektenarten ein Test entwickelt werden.

Der Versuch einen Lateral-Flow Assay für einen panspezifischen Nachweis von Insekten zu etablieren, konnte nicht verwirklicht werden, da mit den generierten Antikörpern kein funktionelles Paar identifizieren konnte.

Des Weiteren wurden die Projektpartner Projektpartnern HSAS, NMI und Charite bei der Identifizierung von Allergenen unterstützt. Hierbei wurden vom NMI und der HSAS die Reaktionen mit IgEs in Seren von Shrimps-, Krabben- und Hausstaubmilben-Allergikern in Western Blots und DIGI-West untersucht. Die SIGNATOPE konnte massenspektrometrisch Tropomyosin als das Protein identifizieren, das aus allen Insekten und Crustaceen bei den meisten Allergiker kreuzreaktive Reaktionen von IgEs zeigte. Nur im Falle von Hausstaubmilbenallergikern zeigten sich stattdessen oft mehrere andere kreuzreaktiven Proteine.



SIGNATOPE

Im Rahmen zur Innovationsförderung des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft  
(BMEL)

## Schlussbericht zum Vorhaben: Teil II

### **Allergen Pro: Etablierung und Validierung von durchsatzfähigen Methoden zur detaillierten Analyse von Allergenprofilen in Lebensmitteln und zur individuellen Charakterisierung deren allergener Wirkung in Patienten**

Zuwendungsempfänger	SIGNATOPE GmbH
Förderkennzeichen	281A304B18
Projektleiter	Dr. Oliver Pötz
Laufzeit des Vorhabens	01.09.2020 - 29.02.2024
Berichtsdatum	10.09.2024

## I. Eingehende Darstellung der Aufgaben und der durchgeführten Arbeiten der SIGNATOPE.

### 1. Durchgeführte Arbeiten im Vergleich zur Vorhabensbeschreibung

#### **Folgende Innovationsziele wurden im AllergenPro-Projekt adressiert:**

**Innovationsziel A:** Verbesserte analytische Methoden für einen sicheren Nachweis allergener Bestandteile auf Nukleinsäure- und Proteinebene in unterschiedlichen Lebensmittelmatrixen wurden etabliert.

**Innovationsziel B:** Verbesserte Sicherheit für Allergiker und Lebensmittelhersteller durch ein neuartiges, durchsatzfähiges in-vitro-Nachweissystem für Patienten IgE/IgG gegen allergene Epitope auf Arthropoden- (Hausstaubmilben, Krustentiere) und Insektenproteinen, zur schnellen und individuellen Risikoanalyse des allergenen Potentials dieser Proteine in Novel Food konnte als Proof of Concept etabliert werden. Ein Workflow für Immunoblots wurde etabliert, der eine sehr detaillierte Charakterisierung neuer Allergene in Novel Food ermöglicht.

**Innovationsziel C:** Verbesserte Sicherheit für Allergiker durch ein neuartiges In-vitro-Diagnostiksystem antigen-spezifischer Reaktionen von Immunzellen von Allergikern auf bestimmte Allergene (nativ, prozessiert) konnte nicht etabliert werden. Pandemiebedingt konnten keine Blutspender rekrutiert werden. Nur Grundlagen für entsprechende Vollblutassays wurden entwickelt.

Im Rahmen des Konsortialprojekts Allergen Pro verfolgte SIGNATOPE folgende Hauptziele:

- **Identifizierung von Proteinsequenzen**, die sich für den eindeutigen Nachweis von zum Verzehr zugelassenen Insekten eignen (AP2, federführend).
- **Entwicklung von massenspektrometriebasierten Immunoassays**, um diese zugelassenen Insekten in Lebensmitteln präzise nachzuweisen (AP2, federführend).
- **Unterstützung der Projektpartner** bei der Identifizierung allergener Insektenproteine, um deren potenzielle Auswirkungen auf allergische Reaktionen zu untersuchen (AP4, beteiligt).

Die Ergebnisse werden im Folgenden für die einzelnen Arbeitspakete dargestellt.

## Arbeitspaket 2: Entwicklung von Massenspektrometrie-basierten Immunoassays und eines peptid-zentrischen Lateral Flow Assays

### AP 2.1 Identifizierung von Spezies-Markerpeptiden bei nicht sequenzierten Arten

Wir haben für fünf zugelassenen Insektenarten geeignete Peptide für einen Speziesnachweis identifiziert und experimentell bestätigt, dass die Peptide einzigartig für die fünf untersuchten Spezies sind. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 aufgeführt. Hierzu wurden aktuelle Informationen aus den öffentlichen Genom- und Proteomdatenbanken für die Analysen vorgesehenen lebensmittelrelevanten Insektenarten entnommen (siehe Tabelle 1) und bioinformatisch analysiert. Da sehr wenige Informationen über die Proteome der Insekten zur Verfügung standen, wurde zunächst die aktuelle Datenlage recherchiert und eine Übersicht erstellt. Relevante Publikationen und verfügbare genomische Sequenzdatenbanken wurden heruntergeladen und gesichtet. Bei einigen Spezies wie z. B. *Locusta migratoria* und *Tenebrio molitor* standen Sequenzdatenbanken in den üblichen öffentlichen Datenbanken (NCBI) zur Verfügung, bei anderen Spezies wie *Grylloides sigillatus* waren Daten zu verwandten Spezies (*Grylloides bimaculatus*) auf eigens von Arbeitsgruppen eingerichteten Repositorien öffentlich zugänglich. Im Fall der Spezies *Alphitobius diaperinus* standen zum Zeitpunkt der Recherche keine vollständigen Sequenzdaten zur Verfügung.

Tabelle 1: Öffentlich zugängliche Genom- und Proteominformationen bezüglich der sieben Insektenarten, die in AllergenPro untersucht werden sollen.

Insekt	UniprotKB # Einträge (NOV-2020)	Proteom / % *	Genom sequenziert	Referenz	Genomdaten
<i>Tenebrio molitor</i>	614	2,79%	Ja	Eriksson, T., et al. "The yellow mealworm ( <i>Tenebrio molitor</i> ) genome: a resource for the emerging insects as food and feed industry." <i>Journal of Insects as Food and Feed</i> 6.5 (2020): 445-455. <a href="https://doi.org/10.3920/JIFF2019.0057">https://doi.org/10.3920/JIFF2019.0057</a>	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/term/?term=txid7067[Organism:noexp]">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/term/?term=txid7067[Organism:noexp]</a>
<i>Locusta migratoria</i>	1.249	5,67%	Ja	Wang, Xianhui, et al. "The locust genome provides insight into swarm formation and long-distance flight." <i>Nature communications</i> 5 (2014): 2957. <a href="https://doi.org/10.1038/ncomms3957">https://doi.org/10.1038/ncomms3957</a>	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/term/?term=Locusta%20migratoria%20">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/term/?term=Locusta%20migratoria%20</a>
<i>Grylloides sigillatus</i> (african house cricket)	24	0,11%	Ja, im Fall von, <i>Grylloides bimaculatus</i> (indische Hausgrille)	Cricket genomes: the genomes of future food Guillem Ylla, Taro Nakamura, Takehiko Itoh, Rei Kajitani, Atsushi Toyoda, Sayuri Tomonari, Tetsuya Bando, Yoshiyasu Ishimaru, Takahito Watanabe, Masao Fuketa, Yuji Matsuoka, Sumihare Noji, Taro Mito, Cassandra G. Extavour <a href="https://doi.org/10.1101/2020.07.07.191841">https://doi.org/10.1101/2020.07.07.191841</a>	<a href="http://gbimaculatusgenome.rc.fas.harvard.edu">http://gbimaculatusgenome.rc.fas.harvard.edu</a>
<i>Alphitobius diaperinus</i>	46	0,21%	Nein		
<i>Acheta domestica</i>	147	0,67%	Ja (no publication?)	Registration date: <b>7-Oct-2020</b> Naresuan University Female <i>A. domestica</i> specimens were collected from a farm located at Nakhon Ratchasima, Thailand. Hind legs were dissected from adult cricket bodies to extract DNA. Extracted DNA was sent for whole-genome sequencing, which was performed by Macrogen, Korea using Illumina based HiSeq x sequencing system	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/term/?term=txid6997[Organism:noexp]">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/term/?term=txid6997[Organism:noexp]</a>
<i>Hermetia illucens</i>	89	0,40%	Ja	Zhan, Shuai, et al. "Genomic landscape and genetic manipulation of the black soldier fly <i>Hermetia illucens</i> , a natural waste recycler." <i>Cell Research</i> 30.1 (2020): 50-60. <a href="https://doi.org/10.1038/s41422-019-0252-6">https://doi.org/10.1038/s41422-019-0252-6</a>	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/term/?term=txid6997[Organism:assembly_id=754268]">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/term/?term=txid6997[Organism:assembly_id=754268]</a>

\* Schätzung auf Basis des Genoms *Drosophila melanogaster*

Projekt Allergen Pro FKZ: 281A304B18

Für die verfügbaren Genome der untersuchten Spezies bzw. der nahen Artverwandten wie bei *Gryllodes sigillatus* wurden im nächsten Schritt Referenzproteome (reference proteome) von taxonomisch möglichst nahen verwandten Spezies gesucht.

- *Tenebrio molitor* => *Triboleum castaneum*
- *Locusta migratoria* => *Blatella germanica*
- *Acheta domesticus* => *Blatella germanica*
- *Hermetia illucens* => *Drosophila melanogaster*

Diese, auf der Plattform Uniprot verfügbaren, von Experten kuriierten Proteindatenbanken haben den Anspruch das Proteom einer Spezies möglichst vollständig darzustellen. Diese gut annotierten Sequenzen wurden mit den genomischen Daten der proteomisch schlecht aufgeklärten Spezies verglichen. Dadurch wurde entsprechend konservierte Bereiche identifiziert, die zur Identifizierung der Insektenproteine mit Hilfe der Massenspektrometrie verwendet wurden.

Die Proteinsequenzen dieser Proteine wurden *in silico* tryptisch fragmentiert und die theoretischen Peptide auf Einzigartigkeit (Proteotypizität) und Größe (8-25 Aminosäuren) gefiltert. Alle Peptide wurden anschließend mit tblastn in den Genomen der Insekten gesucht. Jede Suche dauert auf lokalen Servern mehrere Stunden, da es sich um hunderttausende abzugleichende Peptide und Genomdatenbanken von mehreren Gigabyte handelt. Die Ergebnisse der Suchen für jede Spezies wurden in einer Mastertabelle zusammengefasst und mit den Epitopen der bei Signatope verfügbaren Antikörper abgeglichen. Der Abgleich ergab bisher etwa 3900 verfügbaren Peptid-Kandidaten (*Tenebrio molitor*, *Locusta migratoria*, *Acheta domesticus*, *Hermetia illucens*). *Gryllodes bimaculatus* wurde hier als Surrogat für *Gryllodes sigillatus* verwendet.

Neben der bioinformatischen Aufbereitung und Filterung der Sequenzen wurden die zusammengestellten Daten in Experimenten genutzt, um die Peptide zu verifizieren. In einem ersten Schritt wurde ein bioinformatischen Arbeitsablauf entwickelt, der auf einer datenabhängigen Bottom-up-Proteomik (DDA) basiert, um artspezifische Peptide zu identifizieren (siehe Abbildung 1). Der Arbeitsablauf umfasst einen direkten tryptischen Verdau von Insektenmehlproben in Suspension, eine LC-MS/MS-basierte Analyse, gefolgt von einer Peptidsequenz-Identifizierung mittels MASCOT-Suche gegen *in silico* übersetzte genomische Insektendatenbanken und öffentlich verfügbare proteomische Arthropoda-Datenbanken. Die identifizierten Peptide wurden mit Hilfe eines Homologieansatzes unter Verwendung von BLAST annotiert und anschließend nach ihrer Einzigartigkeit sortiert. Das Vorhandensein dieser Peptidkandidaten in den Proben der jeweiligen Insektenart wurde durch gezielte LC-MS/MS-basierte Analysen bestätigt. In drei von fünf Insektenspezies konnte die Proteindatenlage verbessert werden und unsere Analysestrategie hat zu weit mehr Proteinidentifikationen geführt als bisher publiziert (Stand 12-Sep-2024, siehe Abbildung 2).

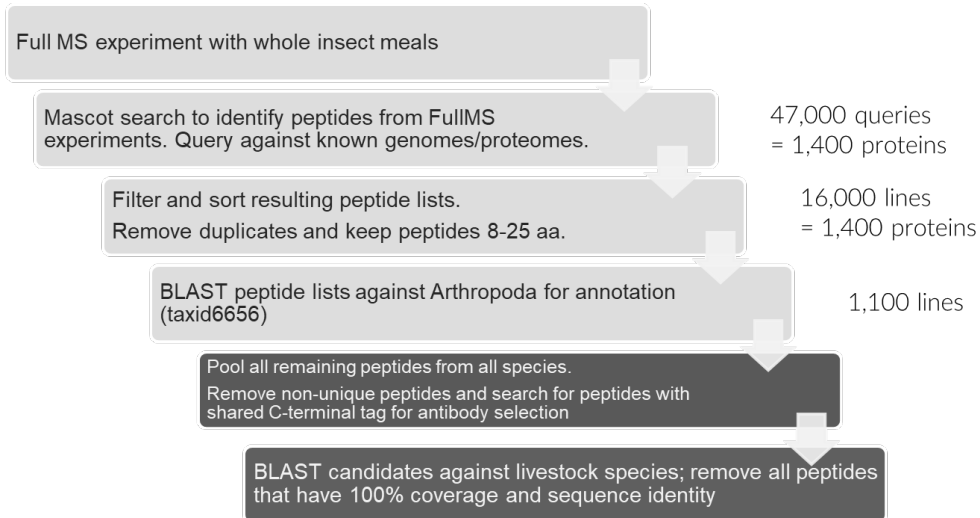


Abbildung 1: Vorgehen zur Selektion geeigneter Peptide zum spezifischen Nachweis von Insekten. Hier beispielhaft anhand von *Tenebrio molitor* gezeigt.

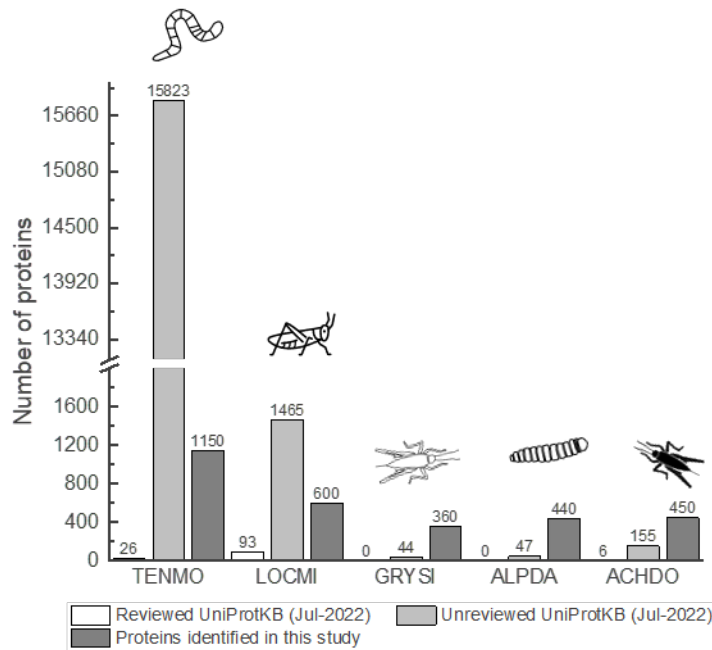


Abbildung 2: Ergebnisse der Proteom-Analysen von fünf der sechs Insektenarten, die als Futtermittelmehle zugelassen sind. Die Proteine wurden mit Trypsin fragmentiert und mit LC-MS/MS analysiert. Als Datenbank für die Identifizierung der Proteine wurde die Gesamtheit der Arthropodenproteine in der UniProt Datenbank verwendet.

Dieses Arbeitspaket wurde abgeschlossen. Für fünf von sechs Insektenarten wurde eine einzigartige Peptidsequenz identifiziert, die geeignet sein sollte entsprechende Insekten in Lebensmitteln zu authentifizieren und möglichst zu quantifizieren. Ein panspezifisches Peptid, das in allen sechs Spezies vorkommt wurde ebenfalls identifiziert. *Acheta Domesticus* und *Gryllos sigillatus* sind nah verwandt und daher sind spezifische Sequenzen schwer zu identifizieren. Des Weiteren sind die Genome dieser beiden Spezies nur unzureichend sequenziert. Die Suche nach einem geeigneten Peptid zum spezifischen Nachweis von *Acheta Domesticus* war daher nicht erfolgreich.

Auf diese Weise wurden für fünf der sechs zugelassenen Insektenarten geeignete Peptide zum Nachweis identifiziert und experimentell bestätigt, dass die Peptide einzigartig für die sechs untersuchten Spezies sind (siehe AP2.3, Tabelle 4).

Tabelle 2: Antigen/ Peptide zum speziesspezifischen massenspektrometrischen Nachweis von *Alphitobius diaperinus* (Alpda), *Tenebrio molitor* /Tenmo), *Locusta migratoria* (Locmi), *Hermetia illucens* (Heril) und *Grylodes sigillatus* (Grysi).

#	Species	Sequenz	Protein
1	ALPDA	ISIPFGEILELER	Hemocyanin C
2	ALPDA	DGDVVHGSYSLTDPDGTR	Larval cuticle protein A3A
3	TENMO	SLYGGYGSGLGIAR	Larval cuticle protein F1
4	HERIL	GSYSYNDGFFK	Cuticle protein
5	HERIL	IISLQGANNIIGR	Superoxide dismutase Cu-Zn
6	LOCFI	DVSPTELEYFEK	Vitellogenin A
7	GRYSI	VSSTLSGLSAELK	Arginine kinase
8	GRYSI	ASDVADTVLGATGSK	Spermatophylax protein 1C
9	INSECTA	LAFVEDELEVAEDR	Tropomyosin

Ein Manuskript der Ergebnisse ist aktuell in Arbeit. Die neuen Proteomdaten werden über die Publikation der wissenschaftlichen Gemeinschaft zur Verfügung gestellt.

## AP 2.2 Massenspektrometrische Charakterisierung von Allergenen

In diesem Arbeitspaket wurden wässrige Extrakte aus *Tenebrio molitor* (Mehlwurm) analysiert, die von den Projektpartnern Charité und HSAS nach vier verschiedenen Protokollen hergestellt wurden. Nach der Fragmentierung der Proben mit Trypsin erfolgte eine detaillierte Untersuchung mittels LC-MS/MS. Zum Vergleich untersuchte SIGNATOPE nicht filtrierte Homogenate von *Tenebrio molitor*. Die von der Charité gewonnenen Extrakte wurden zudem in Pricktests verwendet, um festzustellen, ob Personen mit Schalentierallergien auf Mehlwurmpoteine reagieren. Die Ergebnisse der Analysen wurden qualitativ miteinander verglichen. Insgesamt konnten etwa 800 Proteine in den Extrakten identifiziert werden, von denen 158 in allen Präparationen vorkamen – diese Proteine zählen zu den besonders häufig vertretenen Abbildung 3. Im nächsten Schritt wurden die Ergebnisse gezielt auf Proteine gefiltert, die von der WHO als Allergene klassifiziert sind (siehe hierzu Abbildung 4 und Tabelle 3).

Die Ergebnisse der Proteinidentifikationen sind Bestandteil eines Manuskripts, dass von dem Projektpartner Charité bearbeitet und eingereicht wird.

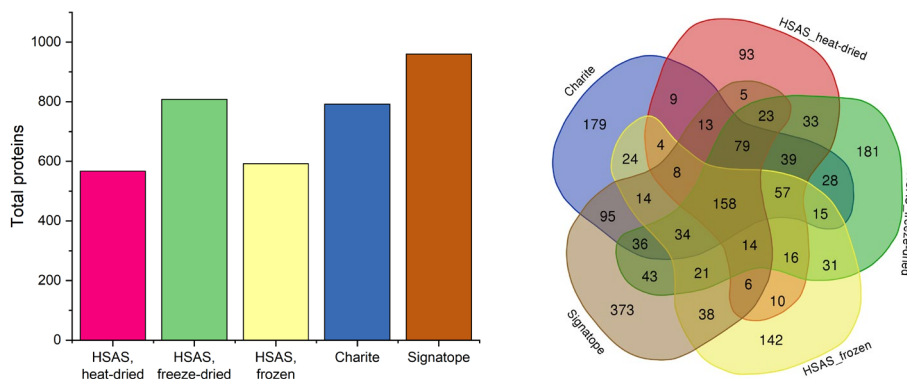


Abbildung 3 Verschiedene Proteinextraktionprotokolle wurden verwendet, um Proteine aus *Tenebrio molitor* (Mehlwurm) zu extrahieren. Die Proteine wurden mit Trypsin fragmentiert und mit LC-MS/MS analysiert. Als Datenbank für die Identifizierung der Proteine wurde die Gesamtheit der Arthropodenproteine in der UniProt Datenbank verwendet. Im linken Diagramm ist die Gesamtzahl der Proteinidentifikationen für die jeweiligen Methoden gezeigt. Im rechten Teil der Abbildung ist ein Venn Diagramm abgebildet, dass die Überlappung die Identifikation für die einzelnen Methoden aufzeigt.

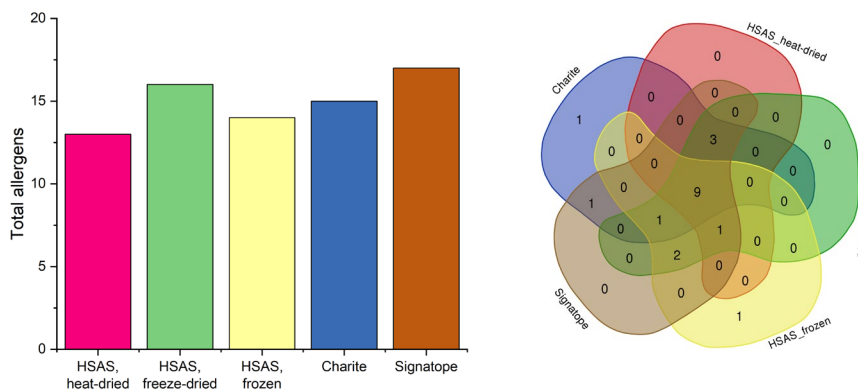


Abbildung 4: Die Ergebnisse der LC-MS/MS Analysen wurden auf in der WHO/IUIS Allergendatenbank hinterlegte Arthropodenallergene gefiltert ([WHO/IUIS Allergen Nomenclature Home Page](#)).

Tabelle 3: Mit LC-MS/MS nachgewiesene Proteinallergene in wässrigen Extrakten von *Tenebrio molitor* (Tenmo).

	HSAS, dried	heat-dried	HSAS, dried	freeze-dried	HSAS, frozen	Charite, dried	heat	Signatope
Alpha-amylase	x		x		x	x		x
Arginine kinase	x		x		x	x		x
Chitinase	x		x		x	x		x
Cytochrome C						x		x
Ferritin			x		x	x		x
Glutathione S-transferase	x		x		x	x		x
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase								
Heat Shock Protein			x		x			x
Heat Shock Protein 70			x		x			x
Lysosomal aspartic protease					x			
Odorant binding protein	x		x		x			x
Paramyosin	x		x		x	x		x
Phospholipase A2						x		
Profilin			x			x		x
Thioredoxin	x		x		x	x		x
Triosephosphate isomerase	x		x			x		x
Tropomyosin	x		x		x	x		x
Troponin C	x		x		x	x		x
Troponin I	x		x		x	x		x

### AP 2.3 Methodenentwicklung für einen Immunaффinitäts-LC-MS/MS-Assay

SIGNATOPE hat in diesem Arbeitspaket spezifische und quantitative Nachweismethoden für Insektenproteine auf Basis seiner proprietären Immunpräzipitations-MS Plattform entwickelt. Auf Basis der Ergebnisse von AP 2.1. wurden Antikörper für die Immunpräzipitation neu generiert. Mit diesen Antikörpern wurden proteotypische und speziesspezifische Peptide angereichert und im MS nachgewiesen. Leider konnte hier die Möglichkeit nicht ausgenutzt werden, mit gruppenspezifischen Antikörpern, die gemeinsame Epitope in den Peptiden erkennen, gleichzeitig Peptide anzureichern, die beispielsweise dem gleichen Protein aus verschiedenen Insektenarten entstammten. Die Assays wurden hinsichtlich ihrer analytischen Parameter Linearität, LOD und LLOQ untersucht.

Aus den in AP2.1 experimentell generierten Daten wurden Peptide hinsichtlich ihrer Spezieseinzigartigkeit ausgewählt und mit gezielten massenpektrometrischen Methoden (Parallel Reaction Monitoring Mass Spectrometry) in Proteinextrakten der jeweiligen Spezies verifiziert (siehe Abbildung 5). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die ausgewählten Peptide speziesspezifisch sind und in den jeweiligen anderen Insektenproben nicht vorhanden sind. Somit wurde sowohl experimentell als auch bioinformatisch die Einzigartigkeit der Peptide geprüft. Exemplarisch sind die Ergebnisse für Hemocyanin C in *Alphitobius diaperinus* Abbildung 6 anhand der Analyse des Peptides ISIPPFGEILELER gezeigt.

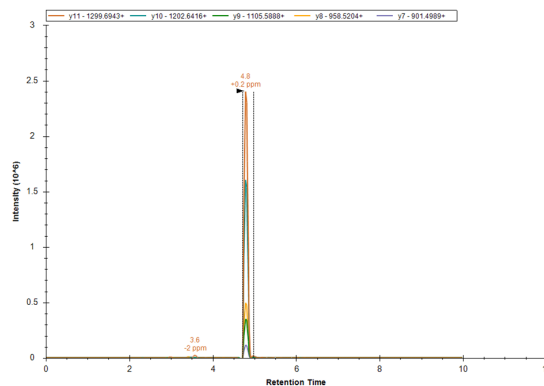


Abbildung 5: Gezielter Nachweis von Hemocyanin C in *Alphitobius diaperinus* anhand des Peptides ISIPPFGEILELER mittels Parallel Reaction Monitoring Mass Spectrometry. Gezeigt sind die Signale der Sekundärfragmente y7, y8, y9, y10 und y 11.

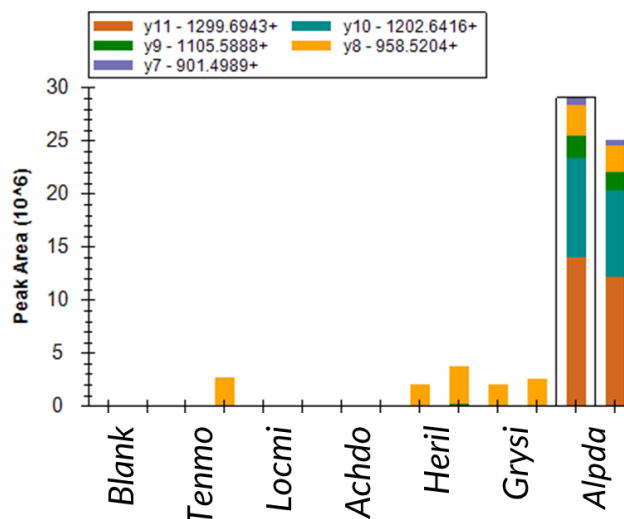


Abbildung 6: Nachweis der Spezieseinzigartigkeit des Hemocyanin C ISIPPFGEILELER für das Insekt *Alphitobius diaperinus* (Alpda) mittels Parallel Reaction Monitoring Mass Spectrometry im Vergleich zu *Tenebrio molitor* /Tenmo), *Locusta migratoria* (Locmi), *Acheta domesticus* (Achdo), *Hermetia illucens* (Heril) und *Gryllos sigillatus* (Grysi). Gezeigt sind die integrierten Signale der Sekundärfragmente  $\gamma 7$ ,  $\gamma 8$ ,  $\gamma 9$ ,  $\gamma 10$  und  $\gamma 11$ .

Es wurden insgesamt acht Peptide ausgewählt, die zum spezifischen Nachweis der Insekten *Alphitobius diaperinus* (Alpda), *Tenebrio molitor* (Tenmo), *Locusta migratoria* (Locmi), *Hermetia illucens* (Heril) und *Gryllos sigillatus* (Grysi) in Immunoaffinitäts-LC MS/MS Tests eingesetzt werden sollten. Die Peptide sind in Tabelle 4 aufgeführt. Die Peptide wurden des Weiteren zur Generierung neuer polyklonaler Antikörper synthetisiert und mit einem Trägerprotein konjugiert. Die Konjugate wurden von einem externen Dienstleister zur Immunisierung von Kaninchen verwendet. Für die Spezies *Acheta domesticus* konnte kein speziespezifischer Peptidkandidat identifiziert werden.

Neben den speziespezifischen Sequenzen wurde ein weiteres Peptid aus dem Protein Tropomyosin identifiziert, dass generisch für den Nachweis von Insekten (*Insecta*) verwendet wurde. Mit einer Bioinformatische Analyse wurde geprüft, dass auch in anderen Klassen, die zum Stamm der Arthropoden gehören wie z. B. Spinnen (*Arachnidae*) oder Schalentieren (*Crustaceae*), diese Sequenz nicht homolog ist.

Tabelle 4: Antigen/ Peptide zum speziespezifischen von *Alphitobius diaperinus* (Alpda), *Tenebrio molitor* /Tenmo), *Locusta migratoria* (Locmi), *Hermetia illucens* (Heril) und *Gryllos sigillatus* (Grysi) mittels Parallel Reaction Monitoring MS.

#	Species	Sequenz	Protein
1	ALPDA	ISIPPFGEILELER	Hemocyanin C
2	ALPDA	DGDVVHGSYSLTDPDGTR	Larval cuticle protein A3A
3	TENMO	SLYGGYGSGGLGIAR	Larval cuticle protein F1
4	HERIL	GSYSYNDGFFK	Cuticle protein
5	HERIL	IISLQGANNIIGR	Superoxide dismutase Cu-Zn
6	LOCFI	DVSPTELEYFEK	Vitellogenin A
7	GRYSI	VSSTLSGLSAELK	Arginine kinase
8	GRYSI	ASDVADTVLGATGSK	Spermatophylax protein 1C
9	INSECTA	LAFVEDELEVAEDR	Tropomyosin

Die Peptidantigene wurden zur Immunisierung auf Trägerproteinen immobilisiert und bei einem Unterauftragnehmer (David's Biotech, Regensburg) für die Immunisierung von je zwei Kaninchen eingesetzt. Die Seren der Tiere wurden nach 35 Tagen und 65 Tagen auf den Gehalt von antigenspezifischen Antikörpern unter der Verwendung von Peptidarrays untersucht. Exemplarisch ist das Ergebnis für den Antikörper gegen Argininkinase aus der Hausgrille (*Gryllus sigillatus*) in der Abbildung 7 gezeigt. Die Antikörper zeigen eine sehr gute Bindung an ihr Antigen und keine Kreuzreaktivität zu den anderen immunisierten Antigenen. Die Ergebnisse für die anderen acht Immunisierungen sind ähnlich und es wurde mindestens ein funktioneller Antikörper generiert.

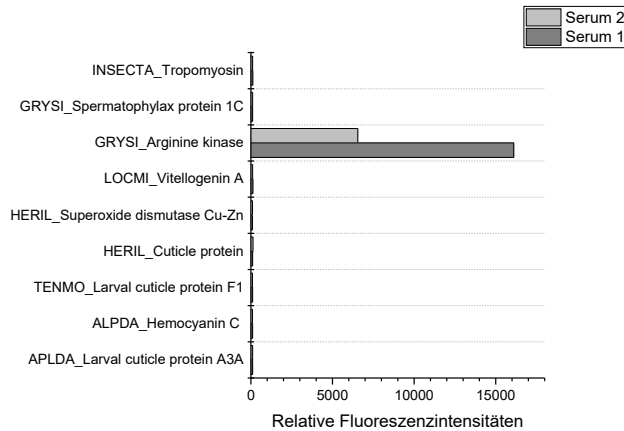


Abbildung 7 Peptidbindungsassay. Seren von zwei Tieren (1:10.000 verdünnt), die mit einem Antigen spezifisch für Argininkinase (*Grylodes sigillatus*, VSSTLSGLSAELK) immunisiert wurden, wurden mit einem Mikrosphärenpeptidarray (Luminex, TX) inkubiert. Der Peptidarray deckte alle zur Immunisierung verwendeten Antigen ab, inklusiver einer panspezifischen Sequenz für Tropomyosin. Für das Auslesen der Bindung der Antikörper an das Antigen wurde der Array mit einem anti-Kaninchen IgG-Phycoerythrin Konjugat in einem zweiten Inkubationsschritt inkubiert.

Nach der Antikörpergenerierung wurden die Antikörper affinitätsgereinigt und mit der Assayentwicklung begonnen. Hierzu wurde zunächst die Nachweisbedingungen im Massenspektrometer optimiert. Hierzu wurden die Kollisionsenergien, die für eine optimale Fragmentierung der Peptide notwendig sind, untersucht. Exemplarisch ist dies für das Peptid GSYSNDGFFK (*H. illucens*) in Abbildung 8 dargestellt.

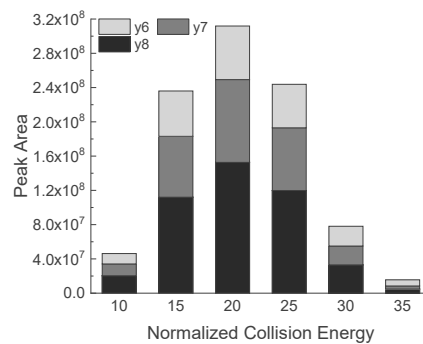


Abbildung 8 Optimierung der Kollisionsenergie (Normalized collision energy, NCE) zur Fragmentierung von GSYSNDGFFK.

Anschließend wurden die Antikörper zunächst auf ihre Funktionalität hin geprüft, ob diese ihr Antigen anreichern können. In Abbildung 9 ist das Ergebnis für den Antikörper gegen Argininkinase aus der Hausgrille (*Gryllus sigillatus*) dargestellt. Das Peptid lässt sich mit Hilfe der Immunanreicherung und der massenspektrometrischen Detektion bis zu einer Menge von 460 attomol quantifizieren. Alle Antikörper wurden mit diesem Verfahren untersucht. In den nächsten Schritten werden diese verwendet, um die endogene der Insekten in verschiedenen Spezies nachzuweisen.

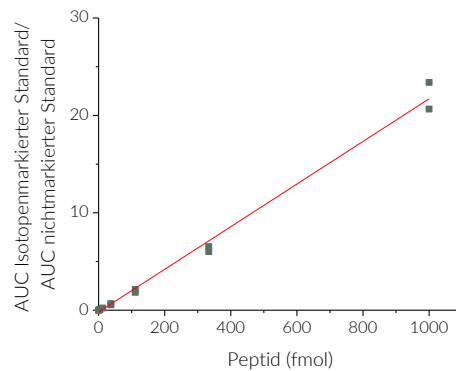


Abbildung 9 Immunoaffinitäts-LC-MS/MS assay. Eine Standardkurve des Peptids VSSTLSGLSÆELK wurde durch Verdünnung des synthetischen Peptids mit einer konstanten isotonen-markierten Peptidkonzentration (Verhältnis der Fläche unter der Kurve (AUC)) im Bereich von 0,46-1000 fmol erstellt. Die Peptide wurden mit dem entsprechenden Antikörper inkubiert. Der Antikörper-Peptid-Komplex wurde mit Hilfe von magnetischen Protein-G-Mikrosphären präzipitiert und gewaschen. Die Peptide wurden eluiert und anschließend mittels Massenspektrometrie detektiert und quantifiziert. Das Peptid war bis 460 amol nachweisbar.

Nach der Verifikation der Antikörperfunktionalität wurden 10 Chromatographiegradienten getestet, um die optimale Bedingung für eine Trennung der sieben Peptide zu identifizieren. In Abbildung 10 sind die Ergebnisse der Testungen dargestellt. Der final ausgewählte Gradient erlaubt die Analyse einer Probe innerhalb von 6 min. In Abbildung 11 ist das Messergebnis einer Kalibriergeraden für das Peptid ASDVADTVLGATGSK dargestellt. Anhand der Kalibriergerade ist eine Messung des Peptids im Bereich von 0.69 fmol – 1500 fmol und einer Richtigkeit von 80-120 % möglich.

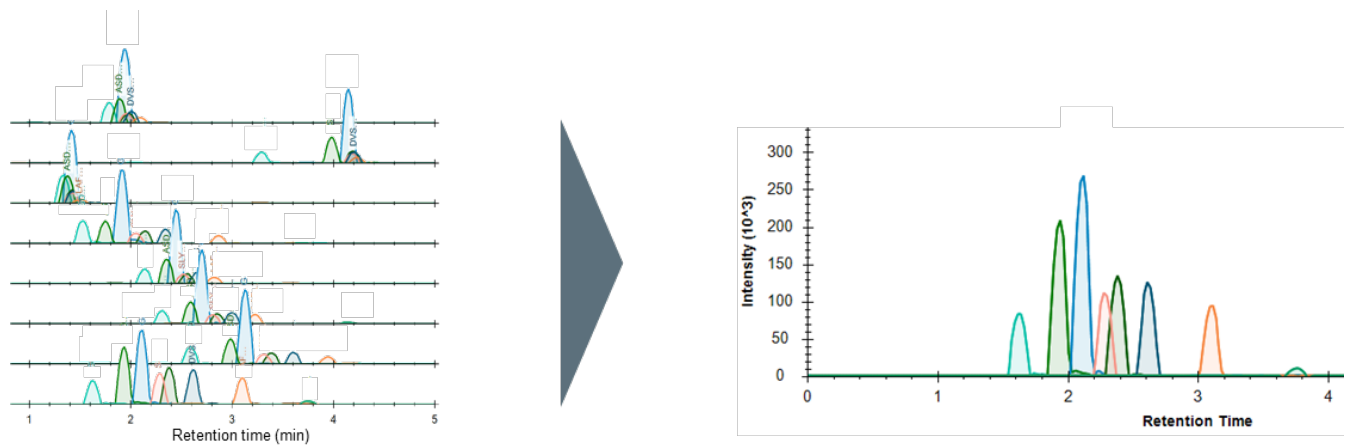


Abbildung 10 Optimierung des Chromatographiegradienten.

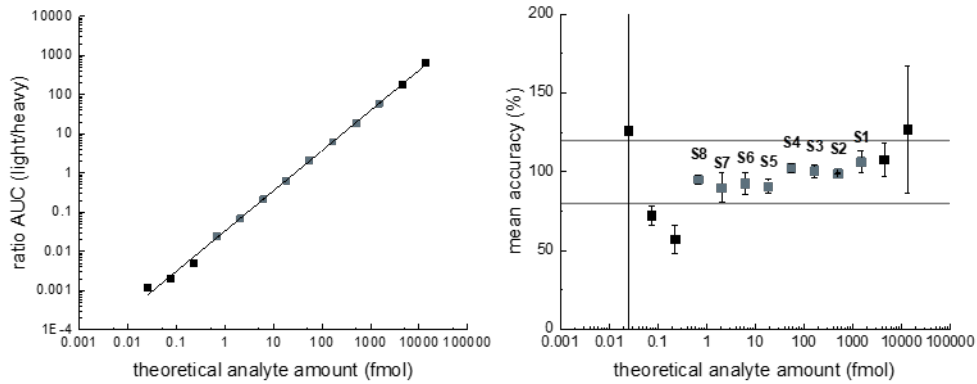


Abbildung 11 Kalibriergerade für das Peptid ASDVADTVLGATGSK zum Nachweis von Spermatophylax protein 1C, dem Speziesmarker für *Gryllodes sigillatus* (Grysi)

Es wurde ein Multiplexassay etabliert mit dem insgesamt sieben Peptide quantifiziert werden können. Anhand dieser Peptide lassen sich Fünf der sechs zugelassen Insekten eindeutig nachweisen. Ausserdem ist es möglich anhand des Tropomyosinpeptids generisch Insekten zu detektieren.

#### AP 2.4 Methodenentwicklung für einen Lateral-Flow-Assay

Mit den in AP2.3 generierten Antikörpern für das Tropomyosin Peptid LAFVEDELEVAEDR sollte ein erster Prototyp eines Lateral Flow Assays aufgebaut werden, der es Privatpersonen erlaubt, selbst Insektenproteine in Lebensmitteln nachzuweisen. In einer ersten Stufe wurde versucht ein Sandwich Immunoassay zu etablieren. Leider haben diese Experimente zu keinem Erfolg geführt, da mit den generierten Antikörpern kein funktionelles Paar identifiziert werden konnte. Daher konnte die Entwicklung eines Lateral-Flow Assays für einen panspezifischen Nachweis von Insekten nicht realisiert werden.

#### AP 2.5 Testung von verarbeiteten Proben

Der Test wurde exploratorisch eingesetzt, um verschiedene Lebensmittel wie Kekse, Cracker, Pasta, Energieriegel und Fleischersatz zu analysieren, die eine definierte Menge an Insektenmehlen enthielten. Die Lebensmittel wurden entweder von einem kommerziellen Hersteller bezogen oder vom Projektpartner BFR zur Verfügung gestellt. Hierbei wurden die reinen Insekten parallel untersucht, um die Richtigkeit zu berechnen. Die Ergebnisse für den generischen Insektenmarker Tropomyosin sind in Abbildung 12 dargestellt. Der Anteil an Tropomyosin am Gesamtprotein schwankt zwischen 1 und 8 mg Tropomyosin pro g Insektenprotein.

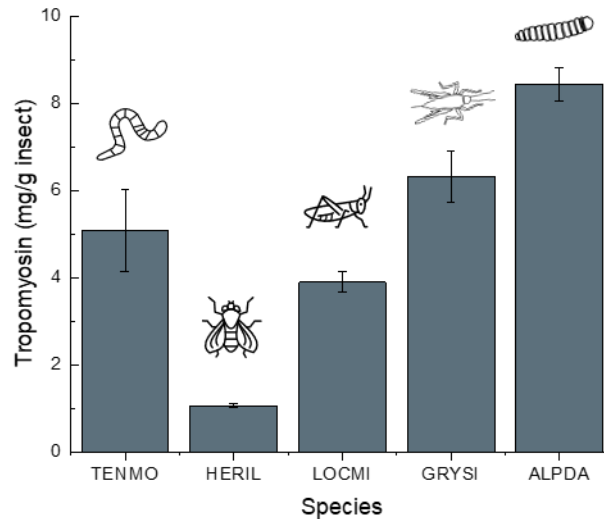


Abbildung 12 Quantifizierung von Tropomyosin in Insekten anhand des Peptids LAFVEDELEVAEDR.

Tabelle 5: Analyseergebnisse von zwei kommerziellen Lebensmittelprodukten die erlaubte Insektenmehle enthalten. Das Protein LCPA3A wurde indirekt über ein Peptid quantifiziert, um *Alphitobius diaperinus* nachzuweisen. BQL; Below limit of quantification

LCPA3A	Mittelwert (fmol)	mg/g Protein	ppm	Verdünnungs-faktor	Erwartungswert Insektengehalt /%	Messwert Insektengehalt /%	Richtigkeit/%
ALPDA	195137.78	2.26	2255.81	1000	100	100	100
Nudeln	6909.37	0.08	79.87	100	10	3.54	35
Energieriegel	6425.55	0.07	74.28	100	10	3.29	33
Fleischersatz	BQL						
Cracker	BQL						

Tabelle 6: Analyseergebnisse von zwei kommerziellen Lebensmittelprodukten die erlaubte Insektenmehle enthalten. Das Protein HCC wurde indirekt über ein Peptid quantifiziert, um *Alphitobius diaperinus* nachzuweisen. BQL; Below limit of quantification

HCC	Mittelwert (fmol)	mg/g Protein	ppm	Verdünnungs-faktor	Erwartungswert Insektengehalt /%	Messwert Insektengehalt /%	Richtigkeit/%
ALPDA	20146.63	1.20	1198.20	1000	100	100	100
Nudeln	1565.89	0.09	93.13	100	10	7.77	78
Energieriegel	897.18	0.05	53.36	100	10	4.45	45
Fleischersatz	BQL						
Cracker	BQL						

Tabelle 7: Analyseergebnisse von einem kommerziellen Lebensmittelprodukt das erlaubte Insektenmehle enthält. Das Protein LCPF1 wurde indirekt über ein Peptid quantifiziert, um *Tenebrio molitor* nachzuweisen. BQL; Below limit of quantification

LCPF1	Mittelwert (fmol)	mg/g Protein	ppm	Verdünnungs-faktor	Erwartungswert Insektengehalt /%	Messwert Insektengehalt /%	Richtigkeit/%
TENMO	76.41	0.00	0.86	10	10	100	100.00
Nudeln	BQL						
Energieriegel	BQL						
Fleischersatz	BQL						
Cracker	4.16	0.00	0.05	1	5.0	5.45	109

Tabelle 8: Analyseergebnisse von vier kommerziellen Lebensmittelprodukten die erlaubte Insektenmehle enthalten. Das Protein TPM wurde indirekt über ein Peptid quantifiziert, um *Alphitobius diaperinus*, *Tenebrio molitor* und *Gryllos sigillatus* generisch nachzuweisen.

TPM	Mittelwert (fmol)	mg/g Protein	ppm	Verdünnungs-faktor	Erwartungswert Insektengehalt /%	Messwert Insektengehalt /%	Richtigkeit/%
TenMO	116840.38	3.55	3551.41	10	10	100	100
GRYSI	53819.66	1.64	1635.87	1000	1000	100	100
ALPDA	75315.67	2.29	2289.25	1000	1000	100	100
Nudeln	1047.84	0.03	31.85	100	10	1.4	13
Energieriegel	4507.67	0.14	137.01	100	10	6.0	62
Fleischersatz	15847.47	0.48	481.69	100	20	29.4	148
Cracker	2528.59	0.08	76.86	100	5	2.2	38

Im Allgemeinen wurden die Insekten in den jeweiligen Lebensmitteln spezifisch nachgewiesen. Die Ergebnisse bezüglich der Richtigkeit schwanken zwischen 33 und 148%, wenn man reine Insektenpräparationen zugrunde legt.

Anhand des neuentwickelten Tests konnte ein speziesspezifischer selektiver Nachweis in den vier Lebensmitteln im Falle von *Tenebrio molitor* (Cracker) und *Alphitobius diaperinus* (Nudeln und Energieriegel) geführt werden und hat die Herstellerangaben bestätigt. Im Falle des Fleischersatzes konnte Insektenmehl nur durch den Nachweis des generischen Insektenmarkers nachgewiesen werden, da für den selektiven Nachweis von *Acheta domestica* kein spezifischer Test entwickelt werden konnte. Aufgrund der Homologien im Genom zu anderen Grillenspezies wurde kein selektives geeignetes Peptid identifiziert.

Hinsichtlich der Ergebnisse bezüglich der Richtigkeit ist anzumerken, dass uns keine Informationen über die Herstellung und Prozessierung der Insektenmehle vorlagen. Es ist möglich, dass eine zu niedrige Richtigkeit dadurch zu Stande kommt, dass unterschiedlich Insektenanteile für die Herstellung verwendet wurden oder die Prozessierung eine größere Rolle spielt. Hier besteht in jedem Fall noch Entwicklungsbedarf.

Projekt Allergen Pro FKZ: 281A304B18

## AP 2.6 Methodentransfer

Wir haben gemeinsam mit dem Projektpartner Nestle die technologischen Voraussetzungen hinsichtlich Massenspektrometer- und Chromatographieausstattung diskutiert, um einen Transfer durchzuführen. Der Transfer konnte aus Zeitgründen nicht mehr durchgeführt werden.

## Arbeitspaket 4: In-vitro Diagnostik – IgE/IgG Bindeprofile

### AP4.3 ESI-LCMSMS Analyse allergener DIGIWest und Western-blot Fraktionen

Die Projektpartner Projektpartnern HSAS, NMI und Charite wurden bei der Identifizierung von Allergenen unterstützt. Hierbei wurden vom NMI und der HSAS die Reaktionen mit IgEs in Seren von Shrimps-, Krabben- und Hausstaubmilben-Allergikern untersucht. Die Projektpartner HSAS und NMI haben Proteinisolate aus SDS-Polyacrylamidgelen isoliert, die mit Hilfe der Methoden Western-blot (HSAS) und DIGI West (NMI) als Proteine mit hoher Antigenizität identifiziert wurden. Die Isolate werden von Signatope mit LC-MS/MS analysiert, um die allergenen Proteine zu identifizieren. Die SIGNATOPE konnte massenspektrometrisch Tropomyosin als das Protein verifizieren, das aus allen Insekten und Crustaceen bei den meisten Allergiker kreuzreaktive Reaktionen von IgEs zeigte. Nur im Falle von Hausstaubmilbenallergikern zeigten sich stattdessen oft mehrere andere kreuzreaktiven Proteine. Details zu den Arbeiten sind im Bericht der HSAS aufgeführt.

## 3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Das AllergenPro Projekt basiert auf dem Bedarf nach innovativen Testsystemen für eine Risikobewertung potentieller neuer Allergene bzw. kreuzreaktiver allergener Proteine aus Novel Food Produkten. 1-3% der Erwachsenen und 4-6% der Kinder leiden in der EU an allergischen Symptomen, die bis hin zu einer lebensbedrohlichen allergischen Reaktion (Anaphylaxie) führen können. Deshalb hat der Gesetzgeber in die Lebensmittel-Informationsverordnung (LMIV; Verordnung (EU) Nr. 1169/2011) Deklarationsvorschriften für Allergene (Anhang II) geregelt. Da für Insekten aufgrund der Homologie zahlreicher Proteine wie z.B. Tropomyosin und Argininkinase ein hohes Risiko der Kreuzreaktion, vor allem mit Arthropoden (u.a. Krebstiere, Hausstaubmilben) zu erwarten ist (Reese et al 1999, Binder et al 2001) empfahl die EFSA 2018 eine Allergenkennzeichnungspflicht für Insekten. Für die Lebensmittelkontrolle und in Betrieben werden deshalb robuste quantitative und hochempfindliche Nachweisverfahren für die entsprechenden Insektenarten benötigt. (Garino et al, 2019).

Der gelbe Mehlwurm, die europäische Wanderheuschrecke und die Hausgrille haben in den letzten Jahren die Zulassung als Lebensmittel im europaweit harmonisierten Antragsverfahren erhalten. Seit Anfang 2023 trifft das auch auf den Buffalowurm zu. Für die tropische Hausgrille und die Larve der schwarzen Soldatenfliege gilt weiterhin eine Übergangsregelung. Zusätzlich sind für Futtermittel noch die Hausfliege (*Musca domestica*), sowie eine Grillenart (*Gryllus assimilis*) zugelassen (Commission Regulation (EU) 2017/893). Da eine unbeabsichtigte Vermischung v.a. von Pulvern gemahlener Insekten nicht auszuschließen ist, aber unbedingt vermieden werden muss, gilt es neben dem sensitiven Nachweis potentieller Allergene in Insekten auch generelle, idealerweise quantitative Nachweismethoden für diese Insektenarten basierend auf Nukleinsäure- und auf Proteinnachweisen zu entwickeln.

Im AllergenPro Projekt konnte ein Protein-basiertes Nachweissystem für fünf der sechs zugelassenen Insektenpezies bei der SIGNATOPE etabliert werden. SIGNATOPE entwickelte auf Basis der Immunpräzipitations-Massenspektrometrie (IPMS) ein schnelles MS-basiertes Nachweisverfahren. Wir Projekt Allergen Pro FKZ: 281A304B18

sind in der Diskussion mit den Projektpartnern Nestle und BfR ob und wie diese Nachweisverfahren transferiert werden können. Außerdem konnte SIGNATOPE dem Projektpartner Charité Informationen über die Proteinkomposition der Prick-Testlösungen zur Verfügung stellen. Solche Qualitätskontrollen können die Prick Diagnostik und die Charité unterstützen. Ohne eine entsprechende Zuwendung aus öffentlichen Mitteln wären die Forschungsarbeiten bei SIGNATOPE nicht finanzierbar gewesen. Die oben beschriebenen Arbeiten und Ziele konnten trotz der doch bemerkbaren Auswirkungen der Pandemie durchgeführt und erreicht werden.

#### 4. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Projektergebnisse

Der auf Immunpräzipitations-Massenspektrometrie (IPMS) basierende Nachweis von Insektenproteinen bei SIGNATOPE hat das Potenzial, als alternative analytische Methode zur PCR für den direkten Nachweis von Allergenen weiterentwickelt und kommerzialisiert zu werden. Da die Allergene in diesem Verfahren nach einem tryptischen Verdau über die entstehenden Peptide detektiert werden, weist der IPMS-Assay eine erhöhte Robustheit gegenüber äußeren Einflüssen wie Hitze, pH-Schwankungen oder Lichteinwirkung auf. Diese Faktoren können bei immunologischen oder PCR-basierten Verfahren die Analyte so stark verändern oder abbauen, dass eine Detektion nicht mehr möglich ist. Mit einer ausreichenden Nachweisempfindlichkeit der IPMS-Assays könnte dies einen bedeutenden Fortschritt und einen erheblichen Vorteil in der Lebensmittelprüfung auf Allergene darstellen.

#### 5. Des während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Uns sind keine Arbeiten bezüglich der von SIGNATOPE entwickelten Tests bekannt.

#### 6. Der erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 5 der NABF

Die Beschränkungen der Covid 19 Pandemie erlaubten keine Live-Präsentationen auf Konferenzen bis Mitte 2022. Das BfR präsentierte das Konzept und die Ergebnisse des Projektes auf der ONE 2022 Conference der EFSA in Brüssel (21.-24.06.2022) mit einem Poster (Broll, H., Garino, C., Schmolz, M., Pötz, O., Robert, M.-C., Stoll, D., Beyer, K., Joos, T.O.; 2022, Poster: ALLERGEN-PRO - Establishment and validation of methods to identify insect allergens in food and for the individual characterization of their allergenic effects in patients.). SIGNATOPE präsentierte Teilergebnisse des Projektes im Rahmen der 14. Europäischen Sommerschule für fortgeschrittene Proteomik in Brixen (31.07.2022-06.08-2022) mit einem Poster (Meisinger, T., Steinhilber, A., Planatscher, H., Joos, T.O., Pötz, O.; 2022, Poster: Determination of food authenticity of insect-based novel foods by mass spectrometry-based immunoassays). Zwei weitere Poster wurden auf der IMSC 2022 Konferenz in Maastricht (27.08.2022-02.09.2022, Meisinger, T., Steinhilber, A., Planatscher, H., Joos, T.O., Pötz, O.; 2022, Poster: Determination of food authenticity of insect-based novel foods by mass spectrometry-based immunoassays; LS-PA-062) und während dem 63. Jährlichen Treffen der Society of Toxicology (SOT) 2024 in Salt Lake City (10.03.2024 – 14.03.2024) präsentiert (Meisinger, T., Planatscher, H., Garino, C., Broll, H., Joos, T.O., Rothbauer, U., Braeuning, A., Pötz, O.; Poster: Development of protein-based assay methods for authentication of insects in food and feed; P349).

Beim BfR Workshop – Authentifizierung von allergenen Bestandteilen, Tierarten und Geweben in Lebens- und Futtermitteln am 23.11.2023 in Berlin wurden Ergebnisse des Allergen-Pro Projekts dem Fachpublikum in Session 3 vorgestellt. Die SIGNATOPE war mit einem Vortrag an dieser Präsentation

Projekt Allergen Pro FKZ: 281A304B18

beteiligt (Meisinger, T., 2023, Vortrag: Entwicklung eines massenspektrometriebasierten Immunoassays zur Authentifizierung und Quantifizierung erlaubter Insektenproteine in Lebensmitteln, BfR Workshop 23-Nov-2023, Berlin).

Zwei Peer Review Veröffentlichung der Ergebnisse sind bis Q2 2025 geplant. Zum einen die Analyse der Proteome der Spezies Spezies *Tenebrio molitor*, *Locusta migratoria*, *Grylloides sigillatus*, *Alphitobius diaperinus*, *Acheta domesticus*, und *Hermetia illucens* und die Entwicklung von Proteinbasierten Methoden zum selektiven Nachweis von *Tenebrio molitor*, *Locusta migratoria*, *Grylloides sigillatus*, *Alphitobius diaperinus*.