Gefördert durch

Bundesministerium
für Ernährung
und Landwirtschaft

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Projektträger

Bundesanstalt für
Landwirtschaft und Ernährung

Schlussbericht

Entwicklung eines Aptamer-basierten Biosensors zur Detektion und Untersuchung von Allergenen und ihrem allergenen Potential in Lebensmitteln (AptaSens)

Juni 2024

Schlussbericht

Entwicklung eines Aptamer-basierten Biosensors zur Detektion und Untersuchung von Allergenen und ihrem allergenen Potential in Lebensmitteln (AptaSens) – Verbundprojekt

Datum: 30.06.2024

Drittmittelprojekt AptaSens

Laufzeit des Vorhabens 01.04.2020 – 31.12.2023

Förderkennzeichen 281A302A18

Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Abteilung Lebensmitteltechnologie und
Forschungszentrum Borstel

Prof. Dr. Karin Schwarz, Prof. Dr. Uta Jappe & Dr. Julia Keppler

Inhaltsverzeichnis

1 Ursprüngliche Aufgabenstellung ..... - 1 -

2 Wesentliche Ergebnisse sowie Zusammenarbeit mit anderen Stellen ..... - 2 -

2.1 Behandlung von BLG und Milchprodukten mit chemisch-thermischen und physikalischen Verfahren ..... - 3 -

2.2 Einfluss der chemisch-thermischen und physikalischen Verfahren auf die funktionellen Eigenschaften von BLG und seine Verdaulichkeit ..... - 4 -

2.3 Allergenitätsprüfung mittels ELISA und BAT ..... - 4 -

3 Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse ..... - 5 -

4 Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen ..... - 5 -

5 Originalartikel (Fachzeitschriften) ..... - 5 -

6 Anhang ..... - 5 -

1 Ursprüngliche Aufgabenstellung

Das Thema Lebensmittelallergie erfährt in den letzten Jahren immer mehr Aufmerksamkeit. Zwar ist es aufgrund fehlender Diagnostik, die eine Allergie zweifelsfrei feststellen kann, schwierig, den Verlauf der Prävalenzen anzugeben, allerdings gibt es deutliche Hinweise, dass Lebensmittelallergien zunehmend auftreten (1–3). Derzeit wird geschätzt, dass **3-4% der Erwachsenen und Kinder von einer Lebensmittelallergie betroffen** sind (4). Da die damit verbundene Symptomatik vielfältig ist und von atopischen Ekzemen oder Konjunktivitis bis zu lebensbedrohlichen Zuständen wie Asthma oder einen anaphylaktischen Schock reichen kann, ist das Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen unerlässlich, um die betroffenen Verbraucher effizient zu schützen. Eine wirksame kausale Therapie gegen eine manifestierte Nahrungsmittel-Allergie existiert – mit Ausnahme der Erdnussallergie - bisher nicht, daher besteht die Behandlung in einer weitest gehenden Meidung der entsprechenden Lebensmittel (5). Dies wird durch fehlende Festlegung von Schwellenwerten und damit verbundene unzureichende Kennzeichnung der Nahrungsmittel erschwert (4). Ein weiterer Ansatz zur Minderung der Symptomatik kann die **Reduktion** der Allergene bzw. ihres **allergenen Potentials durch bestimmte Verfahrensschritte bei der Lebensmittelherstellung** sein (6–8). Allergene sind meist Proteine, deren physikalisch-chemische Eigenschaften durch die Verarbeitung der Lebensmittelrohstoffe verändert werden können. So gibt es Hinweise, dass Lebensmittelverfahrenstechniken wie thermische Behandlung, Fermentation oder auch Extrusion einen Einfluss auf das allergene Potential von Lebensmitteln haben können (7). Erste Arbeiten aus der Literatur zeigen, dass eine kovalente Modifikation mit pflanzlichen Inhaltsstoffen ebenfalls das allergene Potential diverser Proteine reduzieren kann, jedoch ist ein Anstieg der Immunreaktion gleichermaßen nicht auszuschließen (9–11). Die Beurteilung dieser Prozesse gestaltet sich jedoch als kompliziert, da es keine direkte Methode gibt, das allergene Potential von Lebensmitteln zu messen. So wird meist die Bindungskapazität der Allergene mit Hilfe von antikörperbasierten Nachweisverfahren, sogenannten Enzyme-linked Immunosorbent Assays, kurz ELISA, bestimmt und darüber Rückschlüsse auf die Allergenität gezogen (12). Die meisten Lebensmittelallergien werden durch eine Immunantwort hervorgerufen, die durch den Antikörper Immunglobulin E (IgE) vermittelt wird (5). Die Bindungseigenschaften an spezifische IgEs korrelieren aber nicht direkt mit der Allergenität eines Produkts, so zeigen bis zu 40% der Patienten mit nachweislichen allergenspezifischen IgEs keinerlei Symptomatik („stumme“ Sensibilisierung) (5). Damit erlauben ELISA Tests zwar Rückschlüsse auf das allergene Potential eines Stoffes, die Allergenität kann jedoch nicht direkt bestimmt bzw.

die Allergie der Patienten damit bewiesen werden. Weiterhin unterliegt die Methode Limitationen bezüglich der Qualität der eingesetzten Antikörper und damit der Reproduzierbarkeit sowie einer gewissen Empfindlichkeit gegenüber Matrixeinflüssen.
Ziel des vorgestellten Projektes ist die Entwicklung eines **Biosensors**, der durch **genaue Analyse der Bindungseigenschaften von Allergenen** an speziell synthetisierte Identifikationselemente einen Rückschluss auf deren allergenes Potential erlaubt. Auf Basis dieses Biosensors soll der Einfluss verschiedener Lebensmittelverfahrenstechniken und chemischer Modifikationen mit pflanzlichen Lebensmittelinhaltsstoffen auf die Stabilität von zwei allergenen Proteinen untersucht und bewertet werden. Als Beispielallergen dient zum einen das Milcheiweiß β-Lactoglobulin, eines der Hauptallergene bei Kuhmilchallergien, sowie das aus den Larven des Mehlkäfers isolierte Muskelprotein Tropomyosin, das mit hoher Wahrscheinlichkeit Kreuzallergien zu Krustentieren sowie Hausstaubmilben beim Verzehr von Insekten auslösen kann. Die Proteine werden in verschiedenen Matrices mit unterschiedlichen Verfahrenstechniken (Extrusion, Hochdruck, thermische Verfahren) behandelt sowie chemischen Modifikationen unterworfen, wie sie bei der Verarbeitung von Lebensmitteln in Gegenwart von pflanzlichen Inhaltstoffen vorkommen (Interaktion mit Polyphenolen aus Obst/Gemüse oder mit Schwefelverbindungen aus Knoblauch, Kresse oder Zwiebeln). Das Bindungsverhalten der behandelten Allergene an den Biosensor soll Hinweise auf die Mechanismen einer möglicherweise veränderten Allergenität liefern. Als Identifikations-elemente dienen hierfür speziell synthetisierte Aptamere, die hoch spezifisch an die Allergene binden. Die mit dem entwickelten Biosensor erhaltenen Ergebnisse werden einerseits mit etablierten ELISA-basierten Methoden verglichen. Ergänzend wird ein optimiertes zelluläres Verfahren, welches humane basophile Zellen nutzt, um die Allergenität für sensibilisierte Patienten darzustellen, zur Überprüfung herangezogen (der Basophilen-Aktivierungstest, BAT). Dieses Projekt dient dazu, den Wissensstand über die Mechanismen der Reduktion des allergenen Potentials von Lebensmitteln durch Verarbeitungsschritte zu erweitern, so dass diese gezielter eingesetzt werden können. Weiterhin sollen die erarbeiteten Erkenntnisse als Grundlage für die Übertragbarkeit der Methode auf andere Lebensmittelmatrices dienen. Damit wäre ein System geschaffen, das sich auf weitere Nahrungsmittel und deren Analyse hinsichtlich ihres allergenen Potentials, insbesondere nach Verarbeitung, anwenden ließe.

2 Wesentliche Ergebnisse sowie Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Das Projekt wurde in Zusammenarbeit der Verbundprojektpartner bearbeitet. Diese bestanden aus den Forschungseinrichtungen Max Rubner-Institut (MRI), Christian Albrechts-Universität zu Kiel (CAU), Universitätsklinikum Tübingen (UKT), Forschungszentrum Borstel (FZB) sowie dem KMU 3T analytik GmbH & CO. KG. Weiterhin wurde das Projekt von der Wageningen University & Research (WUR) sowie den Unternehmen FrieslandCampina, Thermo Fisher Scientific, Uhde High Pressure Technologies GmbH und Ella Biotech GmbH unterstützt.

Die wesentlichen Ergebnisse von Seiten der CAU, FZB & WUR waren die erfolgreiche Modifikation von Molkenproteinisolat und beta-Lactoglobulin mit phenolischen Verbindungen und anderen sekundären Inhaltstoffen von Pflanzen. Wir konnten zeigen, dass unterschiedliche Verbindungen unterschiedlich stark die Proteinstruktur beeinflussen. Insbesondere Allylisothiocyanat und Rosmarinsäure, Rutin und Gallussäure führten zu einer starken Konformationsänderung der Molkenproteine, die eine Blockierung von Epitopen wahrscheinlich machen. Auch die physikochemischen Eigenschaften wie Hydrophobizität waren verändert. Erste Versuche mit Antikörper-basierten Allergenitätstest mit Seren fortlaufend rekrutierter Patienten (FZB in Kooperation mit den Elbekliniken Buxtehude) zeigten jedoch keine signifikant verringerte Immunogenität, weshalb mit dem zellulären Assay, dem BAT, begonnen wurde.

2.1 Behandlung von BLG und Milchprodukten mit chemisch-thermischen und physikalischen Verfahren

Nicht kovalente Wechselwirkungen von Phenolen mit Proteinen lassen sich nicht immer ohne Weiteres feststellen, was häufig zu widersprüchlichen Ergebnissen in der Literatur führt. Dies führt zu Unsicherheiten darüber, inwieweit Phenole zu Proteinlösungen z. B. für Bioaktivitätsstudien hinzugefügt werden können, ohne die Proteinstruktur zu beeinträchtigen. Wir haben also zunächst untersucht, welche Teephenole (Epigallocatechingallat (EGCG), Epicatechin und Gallussäure) mit dem Molkenprotein β-Lactoglobulin interagieren, indem wir verschiedene State-of-the-Art-Methoden kombinierten. STD-NMR ergab, dass alle phenolischen Ringe von EGCG mit nativem β-Lactoglobulin interagieren können, was auf eine starke Bindung hindeutet, wie durch die Kleinwinkel-Röntgenstreuungsexperimente bestätigt wurde. Die Interaktion führte auch zur Proteinaggregation, also einer starken Veränderung der Quartärstruktur. Für Epicatechin wurden unspezifische Wechselwirkungen nur bei höheren Protein:Epicatechin-Molverhältnissen und nur mittels ^{1}H-NMR und FTIR gefunden. Für Gallussäure wurde mit keiner der durchgeführten Methoden Hinweise auf Wechselwirkungen mit β-Lactoglobulin gefunden. Wir konnten daraus schlussfolgern, dass Gallussäure und Epicatechin zu nativem BLG zugesetzt werden können, zum Beispiel als Antioxidantien, ohne dass es in weiten Konzentrationsbereichen zu Veränderungen des Allergens kommt. EGCG hingegen verändert die Proteinstruktur signifikant, wodurch dies vielversprechend für die Aptamerstudien ist. Die Ergebnisse wurden publiziert unter:

Schild, K., Sönnichsen, F.D., Martin, D., Garamus, V.M., van der Goot, A.J., Schwarz, K & Keppler J.K (2023): Unraveling the effects of low protein-phenol binding affinity on the structural properties of beta-lactoglobulin. Food Chemistry, DOI: 10.1016/j.foodchem.2023.136496

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden dann kovalente-Wechselwirkungen auf die Proteinstruktur analysiert. Hierfür wurden 12 verschiedene Pflanzenstoffe (Allylisothiocyanat (AITC), Zimtaldehyd, Gallussäure, Kaffeesäure, Rosmarinsäure, Chlorgensäure, Rutin, Epicatechin, p-Cumarinsäure, Sinapinsäure, Vanillinsäure und Ferulasäure) herangezogen und für 24 h bei alkalischem pH-Wert (8,5) und Raumtemperatur (ca. 20 °C) zusammen mit BLG inkubiert. Das molare Verhältnis von Protein zu Pflanzenstoff betrug 1:5. Anschließend wurde der Anteil an nicht gebundenen Pflanzenstoffen mittels Rührzelle und das restliche Wasser durch Gefriertrocknung entfernt. Insbesondere AITC, Rosmarinsäure, Rutin und Gallussäure bewirkten eine signifikante Konformationsänderung. Dies bestätigte die Hypothese, dass die Proteinkonformation durch sekundäre Pflanzenstoffe moduliert werden kann.

2.2 Einfluss der chemisch-thermischen und physikalischen Verfahren auf die funktionellen Eigenschaften von BLG und seine Verdaulichkeit

Da die kovalente Modifikation von Molkenproteinen mit sekundären Pflanzenstoffen die Proteinstruktur signifikant veränderte, ist zu erwarten, dass sich auch technologische Funktionalität und Allergenität ändern. Aus diesem Grund wurden mit den modifizierten Proteinen Emulsionen hergestellt.
Die modifizierten Emulsionen zeigten generell größere Standardabweichungen, und die Modifikation mit Gallussäure führte zu größeren Öltropfengrößen, was sich bei Emulsionen als nachteilig auf die Lagerstabilität auswirkt. Andere Modifikation wie Allylisothiocyanat oder Rutin zeigten hingegen insbesondere im niedrigen Druckbereich von 200 bar bereits gute Emulgierfähigkeit, die sich auch bei höherem Drücken fortsetzte. Diese Pflanzenstoffe könnten also in Lebensmittelanwendungen zur Proteinmodifikation eingesetzt werden, ohne die technische Funktionalität zu beeinträchtigen.

2.3 Allergenitätsprüfung mittels ELISA und BAT

Um zu testen, ob die BLG Proben, bei denen unter eine kovalente Modifikation mit Hilfe von Pflanzenstoffen zu verzeichnen war, auch eine veränderte IgE Bindungskapazität haben, wurde ein Dot-Test mit Humanseren von Milchallergikern und Kontrollen durchgeführt. Hierbei basierte die Detektion des allergenen Signals auf Chemilumineszenz. Um falsch positive Signale ausschließen zu können, wurden Kontrollen mit Puffer, Negativserum (Patienten ohne Milchallergie) und Seren von Milchallergikern, die jedoch negativ auf BLG reagieren, mit den Proteinproben inkubiert. Des Weiteren wurden 17 Patientenseren mit einer nachweislichen allergischen Reaktion gegen BLG verwendet. Jedoch war nur für 5 Patientenseren eine allergische Reaktion auf das unmodifizierte BLG zu erkennen. Untersuchungen von Milch-Allergikern mit Einzelallergenen im Basophilen Aktivierungstest (BAT) sind im nächsten Schritt geplant (13, 14)

3 Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die in dem Projekt gewonnen Erkenntnisse über die Modifikation von Milchproteinen beinhalten wichtige Informationen über die Sicherheit und Qualität dieser Grundnahrungsquelle. Die Ergebnisse könnten in Zukunft auf die Modifikation von Insektenproteinen angewendet werden. Weiterhin wurden für die verarbeitende Industrie kritische Schritte im Ablauf identifiziert und Lösungen erarbeitet. Die Projektergebnisse wurden und werden in wissenschaftlichen Fachzeitschriften veröffentlicht und stehen so der Lebensmittelwirtschaft zur freien Verfügung.

4 Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Mittlerweile gibt es zahlreiche Publikationen zur Modifikation von Milchproteinen mittels sekundären Pflanzenstoffen, aber unter diesen Studien gibt es kaum neue Untersuchungen dazu, ob die Modifikation das allergene Potential von Milchproteinen reduziert. Insofern bleibt dies eine sehr interessante Forschungsfrage, zu der wir hoffentlich mit den noch mit den ausstehenden letzten Messungen einige neue Antworten geben können.

5 Originalartikel (Fachzeitschriften)

Schild, K., Sönnichsen, F.D., Martin, D., Garamus, V.M., van der Goot, A.J., Schwarz, K & Keppler J.K (2023): Unraveling the effects of low protein-phenol binding affinity on the structural properties of beta-lactoglobulin. Food Chemistry, DOI: 10.1016/j.foodchem.2023.136496

6 Anhang

1. *Matthias Höpfner*: Untersuchungen zur Anwendbarkeit der Quarzmikrowaage für pharmazeutisch analytische Fragestellungen, Halle (Saale), 2005
2. *Speight RE, Cooper MA*: A survey of the 2010 quartz crystal microbalance literature. Journal of Molecular Recognition 25 (9), 451-473, 2012, doi: 10.1002/jmr.2209
3. *Vashist SK, Vashist P*: Recent Advances in Quartz Crystal Microbalance-Based Sensors. Journal of Sensors 2011, 1-13, 2011, doi: 10.1155/2011/571405
4. *Song S-H, Gao Z-F, Guo X, Chen G-H*: Aptamer-Based Detection Methodology Studies in Food Safety. Food Anal. Methods 12 (4), 966-990, 2019, doi: 10.1007/s12161-019-01437-3

5. *Pan W, Craven RC, Qiu Q, Wilson CB, Wills JW, Golovine S, Wang JF*: Isolation of virus-neutralizing RNAs from a large pool of random sequences. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92 (25), 11509-11513, 1995, doi: 10.1073/pnas.92.25.11509

6. *Hamula CLA, Zhang H, Le Guan L, Li X-F, Le XC*: Selection of aptamers against live bacterial cells. Analytical chemistry 80 (20), 7812-7819, 2008, doi: 10.1021/ac801272s

7. *Guo K-T, SchAfer R, Paul A, Gerber A, Ziemer G, Wendel HP*: A new technique for the isolation and surface immobilization of mesenchymal stem cells from whole bone marrow using high-specific DNA aptamers. Stem cells (Dayton, Ohio) 24 (10), 2220-2231, 2006, doi: 10.1634/stemcells.2006-0015

8. *Ruckman J, Green LS, Beeson J, Waugh S, Gillette WL, Henninger DD, Claesson-Welsh L, Janjić N*: 2'-Fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF165). Inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain. The Journal of biological chemistry 273 (32), 20556-20567, 1998, doi: 10.1074/jbc.273.32.20556

9. *Kuitio C, Choowongkomon K, Lieberzeit PA*: Aptamer-Based QCM-Sensor for Rapid Detection of PRRS Virus. Eurosensors, doi: 10.3390/proceedings2131038

10. *Shan W, Pan Y, Fang H, Guo M, Nie Z, Huang Y, Yao S*: An aptamer-based quartz crystal microbalance biosensor for sensitive and selective detection of leukemia cells using silver-enhanced gold nanoparticle label. Talanta 126, 130-135, 2014, doi: 10.1016/j.talanta.2014.03.056

11. *Yao C, Qi Y, Zhao Y, Xiang Y, Chen Q, Fu W*: Aptamer-based piezoelectric quartz crystal microbalance biosensor array for the quantification of IgE. Biosensors & bioelectronics 24 (8), 2499-2503, 2009, doi: 10.1016/j.bios.2008.12.036

12. *Jimenez-Monroy K.L PM*: Real-Time Monitoring of Aptamer Functionalization and Detection of Ara H1 by Electrochemical Impedance Spectroscopy and Dissipation-Mode Quartz Crystal Microbalance. J Biosens Bioelectron 05 (03), 2014, doi: 10.4172/2155-6210.1000155

13. Schocker F, Recke A, Kull S, Worm M, Jappe U. Persistent cow's milk anaphylaxis as a consequence of sensitization to human breast milk? Molecular characterization and

monitoring of immune modulation by omalizumab and OIT by basophil activation test. Pediatric Allergy Immunol 2018; 29:210-214. doi: 10.1111/pai.12843.

14. Schocker F, Kull S, Schwager C, Behrends J, Jappe U. Individual Sensitization Pattern Recognition to Cow's Milk and Human Milk Differs for Various Clinical Manifestations of Milk Allergy. Nutrients 2019; 14;11(6). doi: 10.3390/nu11061331