

Nahrungsmittelallergie: Identifizierung und Charakterisierung von Erdnußallergenen mit Patientenserien und monoklonalen Antikörpern

L. Uhlemann, W.-M. Becker und M. Schlaak

Forschungsinstitut Borstel, FRG

Food allergy: Identification and characterization of peanut allergens with patients' sera and monoclonal antibodies

Zusammenfassung: Zielsetzung dieser Arbeit ist eine verbesserte Diagnostik der Erdnußallergie. Um eine Standardisierung der Testsubstanzen für die in vivo- und in vitro-Diagnostik zu erreichen, wurden die Typ I Allergie assoziierten Einzelkomponenten der Erdnuß mit Hilfe von Patientenserien und monoklonalen Antikörpern identifiziert und charakterisiert. Zur Allergenidentifizierung wurden IEF-Immunoprint-, SDS-PAGE-Immunoblot- und 2-D-Elektrophoresetechniken eingesetzt.

Zu Beginn der Untersuchungen zeigte ein Vergleich mit Kontroll- und Patientenserum, daß beide Serumgruppen erdnusspezifische IgG-, IgA- und IgM-Antikörper enthielten. Dagegen wurden spezifische IgE-Antikörper nur mit dem Patientenserum nachgewiesen. Im IEF-Immunoprint waren die intensivsten IgE-Bindungen im pH-Bereich von pH 5,5 bis 7,5 festzustellen und im SDS-PAGE-Immunoblot sind Hauptallergene in den Molekulargewichtsbereichen von 17, 30, 48–66 und 116 kD identifiziert worden.

Es konnten 8 Hybridomzelllinien (PN-a bis PN-h), die monoklonale Antikörper gegen IgE-reaktive Einzelkomponenten aus dem Erdnußextrakt produzieren, etabliert werden. In ELISA-Inhibitionstests ließen sich identische Bindungsstellen der monoklonalen Antikörper und Patientenserien am Antigen nachweisen. Weiterhin wurde die Eignung der monoklonalen Antikörper zur Detektion versteckter Allergene in verarbeiteten Nahrungsmitteln geprüft.

Summary: The purpose of this study is to improve the diagnosis of peanut allergy. In order to standardize test substances for in vivo and in vitro diagnostic, the type I allergy-associated single components of peanuts have been identified and characterized with the aid of patients' sera and monoclonal antibodies. For allergen detection IEF-immunoprint-, SDS-PAGE-immunoblot- and 2-D electrophoresis-techniques have been used.

A comparison of control sera and patients' sera showed that both contained peanut specific IgG-, IgA- and IgM-antibodies. In contrast, peanut-specific IgE-antibodies were only detectable with patients' sera. In IEF-immunoprint the most intensive IgE-bindings showed up in pI-range from pH 5.5 to 7.5. In SDS-PAGE-immunoblot major allergens could be identified at molecular weight ranges of 17, 30, 48 to 66 and 116 kD.

Abkürzungen:

Ig	= Immunglobulin
IEF	= Isoelektrische Fokussierung
pI	= Isoelektrischer Punkt
SDS-PAGE	= Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
kD	= Kilo Dalton
ELISA	= Enzyme-linked-immunosorbent-assay
NC	= Nitrocellulose

Raising monoclonal antibodies against IgE-reactive components from peanut extract resulted in eight antibody-producing hybridoma cell lines, named PN-a to PN-h. ELISA-inhibition tests revealed common epitopes of monoclonal antibodies and patients' antibodies. Moreover, the monoclonal antibodies were tested to see whether they can be used for detection of hidden peanut allergens.

Schlüsselwörter: Erdnuß – Immunoblotting – IgE-Reaktivitäten – monoklonale Antikörper

Key words: peanut – immunoblotting – IgE-reactivities – monoclonal antibodies

Einleitung

Immer mehr Menschen leiden unter allergischen Erkrankungen, die Ausdruck einer veränderten Reaktionslage des Organismus gegenüber verschiedensten Stoffen, zu meist natürlichen Ursprungs, sind. Mit einer Nahrungsmittelallergie werden nur diejenigen Krankheitsbilder bezeichnet, die durch Nahrungsmittel als Allergene und deren Symptomatik durch immunologische Mechanismen ausgelöst werden. Nach Coombs und Gell gehört die häufigste Form der allergischen Reaktion auf Nahrungsmittel zum Typ I der pathogenen Immunreaktionen, die eine komplexe Reaktionskette darstellt. Hierbei wird an basophile Granulozyten und Mastzellen gebundenes spezifisches IgE über mindestens zwei Bindungsstellen (Epitope) eines Allergens vernetzt. Dies ist für die Zelle das Signal zur Ausschüttung von verschiedenen Mediatorstoffen, die wiederum die allergischen Symptome am Zielorgan auslösen. Zu den Symptomen einer Typ I-Reaktion auf Nahrungsmittel gehören Lippen- und Zungenödem, Entzündung der Rachenschleimhaut, Urtikaria, Quincke-Ödem, Rhinitis, Bronchialasthma und anaphylaktischer Schock. Bei gastrointestinaler Manifestation stehen Bauchschmerzen, Übelkeit, Erbrechen und Durchfälle im Vordergrund (15).

Die Differentialdiagnose einer Nahrungsmittelallergie gestaltet sich aufgrund der Symptomenvielfalt und der bisher unzureichenden Zuverlässigkeit der verschiedenen diagnostischen Verfahren oftmals schwierig. Dies ist nicht zuletzt auf den Einsatz unzureichend standardisierter Allergenextrakte zurückzuführen. Der Stellenwert diagnostischer Methoden lässt sich erst dann richtig beurteilen, wenn die Testsubstanzen eindeutig definiert sind (33).

Erdnüsse sind einer der häufigsten Auslöser von Nahrungsmittelallergien mit einer besonders hohen allergenen Potenz (8, 34). Nach dem Genuss von Erdnüssen sind anaphylaktische Reaktionen mit tödlichem Verlauf registriert worden (30). Sogar eine Sensibilisierung des Säuglings durch die Muttermilch wird für möglich gehalten (32). Die allergene Aktivität der Erdnuß ist an ihren Proteinanteil gebunden. Oral verabreichtes Erdnußöl wird von Erdnußallergikern vertragen (31).

Bereits in mehreren Arbeiten wurde gezeigt, daß Erdnüsse eine Vielzahl von Allergenen enthalten. In den letzten 5 Jahren wurden von einigen Arbeitsgruppen SDS-PAGE-Immunoblottechniken zur Allergenidentifizierung in Erdnüssen eingesetzt (9, 13, 14, 20, 22, 26, 34). Der Erdnußextrakt wird hierbei elektrophoretisch nach Molekulargewichten getrennt und vom Trenngel auf eine Trägermembran transferiert. Immunoblottechniken bieten durch die Kombination von hochauflösenden elektrophoretischen Trennmethoden und der Spezifität immunologischer Nachweistechniken den Vorteil, ohne vorhergehende Fraktionierung die humorale Immunantwort gegen einzelne Komponenten eines Extraks zu analysieren. Mit der SDS-PAGE-Immunoblottechnik wurden bis zu 25 IgE-reaktive Komponenten nachgewiesen. Bei der Durchsicht

dieser Daten ist es aber aufgrund der Methodenvielfalt kaum möglich, die Resultate zur Deckung zu bringen. Zur Lösung dieses Problems wurden monoklonale Antikörper hergestellt, die als standardisierte Reagenzien zur Allergenidentifizierung eingesetzt werden. Sie bieten gegenüber polyklonalen Antiseren den Vorteil, daß sie zur qualitativen und quantitativen Identifizierung von Einzelkomponenten geeignet sind, potentiell in unbegrenzter Menge und in definierbarer Spezifität zur Verfügung stehen (1). Weiterhin wurde mit den hergestellten monoklonalen Antikörpern ein Testsystem zur Detektion versteckter Erdnußallergene in verarbeiteten Nahrungsmitteln entwickelt, welches ein wichtiges Hilfsmittel in der Diagnostik und Karenz darstellen kann.

Material und Methoden

Extrakt: Geröstete Erdnüsse bzw. tiefgefrorene Schokolade wurden mit einem Schnitzelwerk zerkleinert und mit 0,1 M Ammoniumbicarbonat-Puffer pH 8,0 4 Stunden bei 4°C extrahiert. Anschließend wurde der Extrakt filtriert, zentrifugiert, gegen Aqua dest. dialysiert und lyophilisiert.

Seren: Es wurden Seren von 9 Patienten mit klinisch manifester Erdnußallergie und positivem Radio-Allergosorbent-Test (RAST-Stufe III oder IV) eingesetzt. Das Kontrollserum wurde aus 15 Seren nicht allergisch Erkrankter gepoolt.

IEF-Print-Technik: Die IEF wurde in 0,9 %igen Agarose-Dünnsschichtgelen durchgeführt. Das Gel enthielt an Ampholinen 7,5 % Servalyt 3–10 und 2,5 % Servalyt 4–6. Zur Stabilisierung der Gele wurde 12 % Sorbit zugesetzt (12). Die Gele wurden mittels Kapillartechnik in Gießkassetten auf Trägerfolie gegossen. 15 µg Protein pro cm Gel wurden mit Hilfe einer Applikationsmaske aus Silikongummi aufgetragen. Die Trennstrecke betrug 10 cm. Die getrennten Proteine wurden mittels Kapillarkraft auf NC-Membranen transferiert (25).

SDS-PAGE-Blot-Technik: In einer diskontinuierlichen SDS-PAGE wurden die Proteine nach ihren Molekulargewichten getrennt (24). Die Zusammensetzung des Sammelgels betrug 5 % T und 0,75 % C, das Trenngel bestand aus einem Gradienten von 10 bis 20 % T und 0,75 % C. 10 µg Protein wurden pro cm Gel eingesetzt und über eine Strecke von 7 cm getrennt. Der Transfer der Proteine auf die NC-Membran erfolgte elektrophoretisch durch Semi-dry-blotting (18).

Blottingmembranen: Es wurden Nitrocellulosemembranen mit den Porengrößen 0,1, 0,2 und 0,45 µm eingesetzt. Um die Proteimbindungskapazität der Nitrocellulose zu erhöhen, wurden die Membranen mit Bromcyan aktiviert (10).

2-D Elektrophorese: 1. Dimension: Auf Gel-Bond PAG wurde mit Immobilinen ein Gel (T = 4 % und C = 4 %) mit einem pH-Gradienten von pl 3,5 bis 9,3 gegossen (11). Pro Gelstreifen (3–5 mm) wurde 100 µg Protein in Aqua dest. auf der anodischen Seite aufgetragen und ca. 6–7 Stunden fokussiert. 2. Dimension: Das Gradientengel (T = 10 % – 15 %, C = 4 %) wurde ebenfalls durch Gel-Bond PAG gestützt in einer Gießkassette auf das Sammelgel (T = 5 %, C = 4 %) gegossen. Die Gelstreifen aus der 1. Dimension wurden in einer horizontalen Elektrophorese auf das Sammelgel aufgelegt.

Herstellung monoklonaler Antikörper: Weibliche, 3 bis 4 Monate alte Balb/c-Mäuse wurden mit jeweils 100 µg Erdnußextrakt 3mal intraperitoneal immunisiert. Um Hybride zu erhalten, die vorwiegend Immunglobuline der Klasse IgG produzieren, wurde

Freund'sches Adjuvans als Immunstimulans eingesetzt (27). Die B-Lymphozyten der Milzen wurden mit der Myelomzelllinie P3×63Ag8U1 fusioniert. Die antikörperproduzierenden Hybridome wurden mittels IEF-Print selektiert. Zur Bestimmung des Iso-typs der einzelnen monoklonalen Antikörper wurde die doppelte Immundiffusion nach Ouchterlony angewandt.

Immunenzymatischer Nachweis von Antikörperreaktivitäten: Die Blots wurden in Streifen geschnitten und in mit Tris-Tween pH 7,4 (6) in 1 : 20 verdünntem Patientenserum bzw. 1 : 2 verdünnten Kulturüberständen über Nacht inkubiert. Zum Nachweis der Immunglobulinklassenbindungen wurden alkalische Phosphatase konjugiertes Ziege-anti-Human und Ziege-anti-Maus isotyp-spezifisches Antiserum verwendet. Die gebundenen Antikörper wurden durch Inkubation mit 5-Brom-4-Chlorindoxylphosphat (BCIP) und Nitroblautetrazolium (NBT) visualisiert (19). Um unspezifische Bindungen der Nachweisantikörper bei den Immunoblotuntersuchungen auszuschließen, wurden entsprechende Kontrollen mitgeführt. Sie waren immer negativ, d. h. keiner der Nachweis-antikörper wurde unspezifisch durch den Erdnußextrakt gebunden.

ELISA-Inhibitionstest: Der Inhibitionstest wurde als direkter ELISA durchgeführt, d. h. der Erdnußextrakt ist an die feste Phase gekoppelt worden. Eine konstante Menge eines monoklonalen Antikörpers wurde zusammen mit dem seriell verdünnten Patientenpoolserum in die Näpfe der ELISA-Platte gegeben. Mit einem alkalische Phosphatase konjugierten Ziege-anti-Maus IgG/M Antiserum wurde die Bindung des monoklonalen Antikörpers an den Erdnußextrakt nachgewiesen. Je geringer dieser Wert war, umso stärker wurden die monoklonalen Antikörper durch das Patientenserum inhibiert.

Ergebnisse

Reaktivitäten der Patientenseren

Zu Beginn der Allergenidentifizierung wurde in Vergleichsuntersuchungen mit dem Kontroll- und dem Patientenserum geprüft, welche Immunglobulinklassen an der antigenspezifischen Immunantwort gegen Erdnüsse beteiligt sind. Die IEF-Immunprint- und SDS-PAGE-Immunoblotuntersuchungen zeigten, daß das Kontrollserum ebenso wie das Patientenserum spezifische IgG-, IgA- und IgM-Antikörper enthält. Vom Patientenserum wurde jedoch eine größere Anzahl von Banden detektiert, und die Bindungsintensitäten der Immunglobulinklassen IgG und IgA waren im Vergleich zum Kontrollserum insbesondere im IEF-Immunprint stärker. Erdnußspezifische IgE-Antikörper wurden nur mit Patientenserum nachgewiesen.

Im IEF-Immunprint detektierten die Patientenserien ca. 30 bis 40 IgE-reaktive Komponenten im gesamten pH-Bereich von pH 3,2 bis 7,5 (Abb. 1). Im SDS-PAGE-Immunoblot wurden von den Patientenserien bis zu 17 Komponenten im Molekulargewichtsbereich von 12 bis 116 kD identifiziert (Abb. 2). Hauptallergene sind bei 17, 30, 48 bis 66 und 116 kD ermittelt worden. Als Hauptallergene sind diejenigen Komponenten definiert, mit denen mehr als 50 % der Patientenserien IgE-Bindungen aufweisen (4).

Herstellung monoklonaler Antikörper

Es wurden 8 Hybridomzelllinien (PN-a bis PN-h), die monoklonale Antikörper gegen IgE-reaktive Einzelkomponenten aus dem Erdnußextrakt produzieren, etabliert. Der Isotyp des monoklonalen Antikörpers PN-h ist unbekannt; alle anderen gehören der

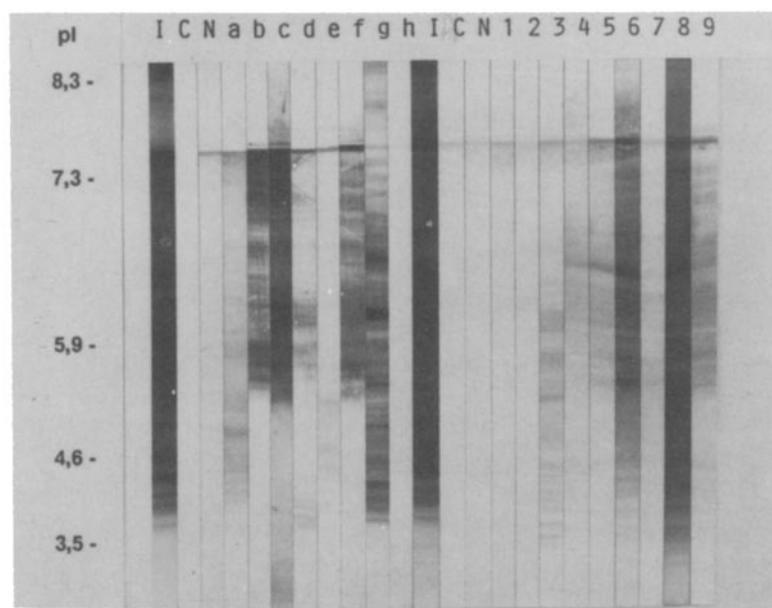


Abb. 1. Reaktivitäten der monoklonalen Antikörper und IgE-Bindungen der Patientenserien im Erdnuß IEF-Immunoprint: I = Tuschefärbung, C = Kontrolle, N = Kontrollserum, a-h = monoklonale Antikörper, 1-9 = Patientenserien

Immunglobulinklasse IgG₁ an. Die Hybridomüberstände zeigten im IEF-Immunoprint und SDS-PAGE-Immunoblot unterschiedliche Bandenmuster (Abb. 1 und 2). Monoklonale Antikörper sind monospezifisch, d. h. sie erkennen nur ein bestimmtes Epitop auf einem Protein, aber nicht das Protein als solches. Deshalb kann die Bindung monoklonaler Antikörper an mehrere Komponenten im IEF-Immunoprint und SDS-PAGE-Immunoblot entweder auf identische Epitope verschiedener Proteine oder auf Isoproteine zurückgeführt werden. Alle als Hauptallergene identifizierten Komponenten wurden von einem oder mehreren monoklonalen Antikörpern erkannt (Tab. 1).

Tab. 1. Monoklonale Antikörper, die mit den Hauptallergenen aus Erdnüssen reagieren

Hauptallergene	monoklonale Antikörper
116 kD	PN-b, PN-c und PN-f
66 kD	PN-b, PN-c und PN-f
63 kD	PN-b, PN-c und PN-f
60 kD	PN-b, PN-c und PN-f
55 kD	PN-a, PN-c, PN-d, PN-f und PN-g
48 kD	PN-e
30 kD	PN-a und PN-g
17 kD	PN-d

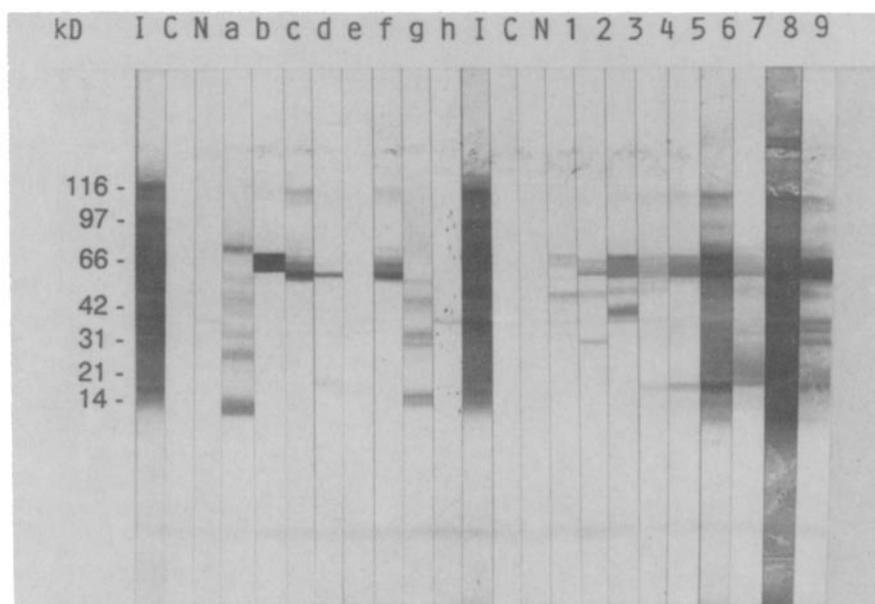


Abb. 2. Reaktivitäten der monoklonalen Antikörper und IgE-Bindungen der Patientenserien im Erdnuß SDS-PAGE-Immunoblot: I = Tuschefärbung, C = Kontrolle, N = Kontrollserum, a-h = monoklonale Antikörper, 1-9 = Patientenserien

Um einerseits die Spezifität der produzierten monoklonalen Antikörper zu testen und andererseits deren Einsatzmöglichkeiten zur Untersuchung von Erdnußallergenen in verarbeiteten Nahrungsmitteln zu prüfen, wurden die monoklonalen Antikörper im SDS-PAGE-Immunoblot gegen Sojabohnen, Erbsen, weiße Bohnen, Linsen, Haselnüsse, Mandeln, Walnüsse und Caschewkerne untersucht. Die monoklonalen Antikörper PN-a, PN-b, PN-c, PN-d, PN-e, PN-f und PN-h zeigten keine Reaktivitäten mit den untersuchten Hülsenfrüchten und Nüssen, d. h. sie reagieren im hohen Maße spezifisch mit Erdnüssen.

ELISA-Inhibitionstest

In einem ELISA-Inhibitionstest wurde untersucht, ob die monoklonalen Antikörper und die Patientenserien außer denselben Komponenten im Erdnußextrakt auch identische bzw. überlappende Epitope erkennen. In diesen Tests konkurrierte eine konstante Menge eines monoklonalen Antikörpers mit den Antikörpern eines seriell verdünnten Patientenpoolserums um die Bindungsstellen am Antigen. Diese Untersuchungen wurden zuerst mit dem unfractionierten Serum durchgeführt. In einem weiteren Arbeitsschritt wurde das IgG aus dem Serum an Protein G-Sepharose absorbiert, um möglichst die durch IgE inhibierten Bindungsstellen zu erfassen. In den Inhibitionstests (Abb. 3) wurden die Bindungen der monoklonalen Antikörper PN-b, PN-c, PN-d und PN-f eindeutig durch das unfractionierte Poolserum inhibiert. Nach Absorption des Poolserums an Protein-G-Sepharose zeigten die monoklonalen Antikörper PN-b, PN-c, PN-d und PN-f immer noch eine Inhibition, wobei die Inhibitonskurven des monoklonalen Antikörpers PN-d vor und nach der Absorption einen nahezu identischen Verlauf zeigten, so daß wahrscheinlich kein IgG an der Inhibition beteiligt war.

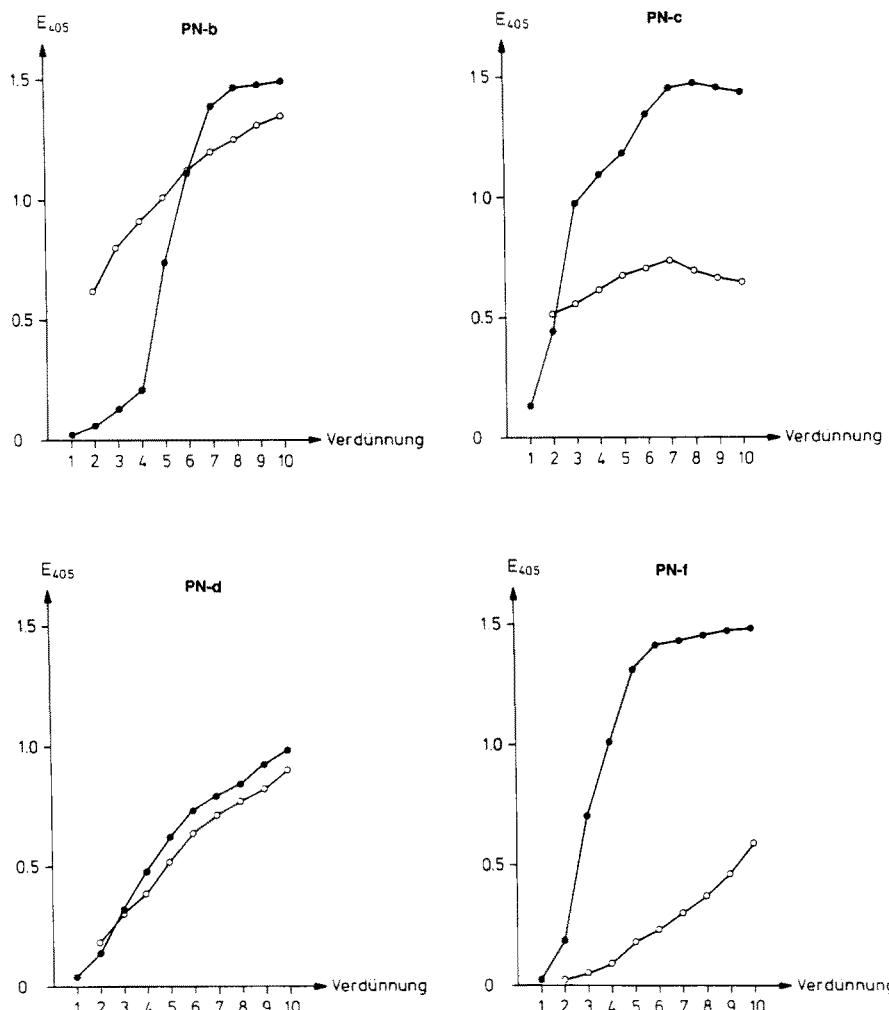


Abb. 3. ELISA-Inhibitionstests: Bindungsvermögen einer konstanten Menge Kulturüberstand in Konkurrenz zum seriell verdünnten Patientenpoolserum. ● = Serum vor Protein G-Absorption, ○ = Serum nach Protein G-Absorption

2-D Elektrophorese

In der 2-D Elektrophorese war festzustellen, daß sich Erdnußkomponenten, die zuvor nur nach Molekulargewicht getrennt wurden, bei der zweidimensionalen Trennung in bis zu 20 Spots differenzierten (Abb. 4). Im 2-D Immunoblot reagierten die monoklonalen Antikörper überwiegend mit den Komponenten, die auch vom IgE des Patientenserums identifiziert wurden. Die monoklonalen Antikörper PN-b, PN-c und PN-f, die in der SDS-PAGE eine 66 kD-Bande detektieren, reagierten im 2-D Blot nur zum Teil mit denselben Spots im Molekulargewichtsbereich von 66 kD, d. h. es wurden wahrscheinlich unterschiedliche Epitope des Proteins erkannt.

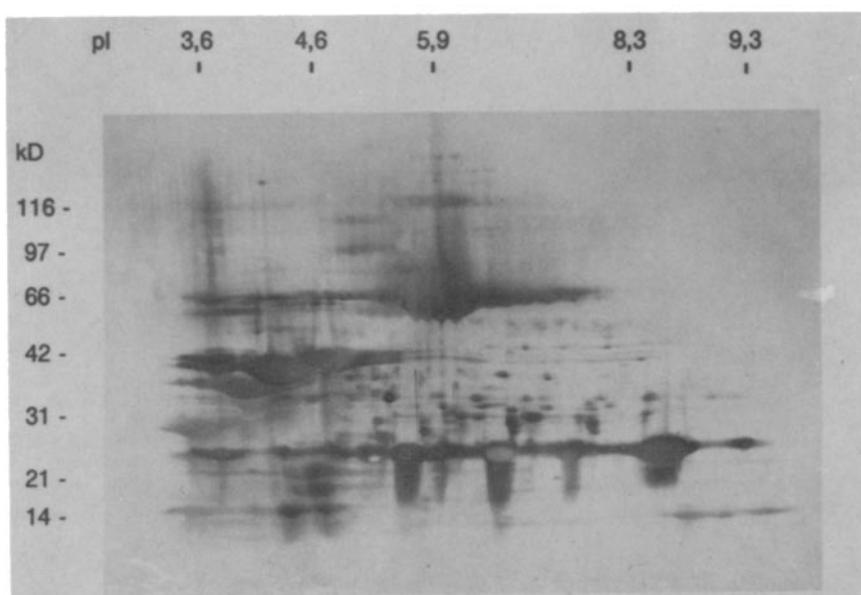


Abb. 4. Unspezifische Proteinfärbung eines Erdnußblots nach 2-D Elektrophorese mit Tusche

Nachweis von Erdnußproteinen in verarbeiteten Nahrungsmitteln

Für diese Untersuchung wurden eine Vollmilch- und eine Erdnußschokolade gleichen Herstellers eingesetzt. Die IgE-Reaktivitäten des Patientenserums zeigten im Immunoblot nur mit der Erdnußschokolade Bindungen im pH-Bereich von pH 3,8 bis 7,5 und im Molekulargewichtsbereich von 17 bis 116 kD, womit eindeutig die Hauptallergene der Erdnuß identifiziert wurden. Die monoklonalen Antikörper PN-a bis PN-h zeigten mit der Vollmilchschokolade weder im IEF-Immunoprint noch im SDS-PAGE-Immunoblot Reaktivitäten. Dagegen reagierten mit der Erdnußschokolade im IEF-Immunoprint drei (PN-a, PN-b, PN-g) und im SDS-PAGE-Immunoblot zwei (PN-a, PN-g) monoklonale Antikörper (Abb. 5). Mit diesen monoklonalen Antikörpern lassen sich Erdnußproteine in verarbeiteten Nahrungsmitteln nachweisen.

Diskussion

Bereits in früheren Arbeiten wurde mit der gekreuzten Radioimmunelektrophorese (CRIE) gezeigt, daß Erdnüsse eine Vielzahl von Allergenen enthalten (2). Die bei der Immunelektrophorese zur Präzipitation des Antigens verwendeten polyklonalen Antiseren lassen sich jedoch nur schwer in größerer Menge mit konstanter Qualität herstellen, so daß die Vergleichbarkeit dieser Methode unzureichend ist. Außerdem ist nicht sicher, ob alle Komponenten durch das Antiserum präzipitiert werden; oder das Antiserum könnte Epitope abdecken, die sich dadurch einem Nachweis entziehen. Diese Einschränkungen lassen sich durch die Anwendung von Immunoblottechniken, die außerdem im Gegensatz zu Präzipitationstests unabhängig von der Mengenrelation Antigen zu Antikörper sind, umgehen.

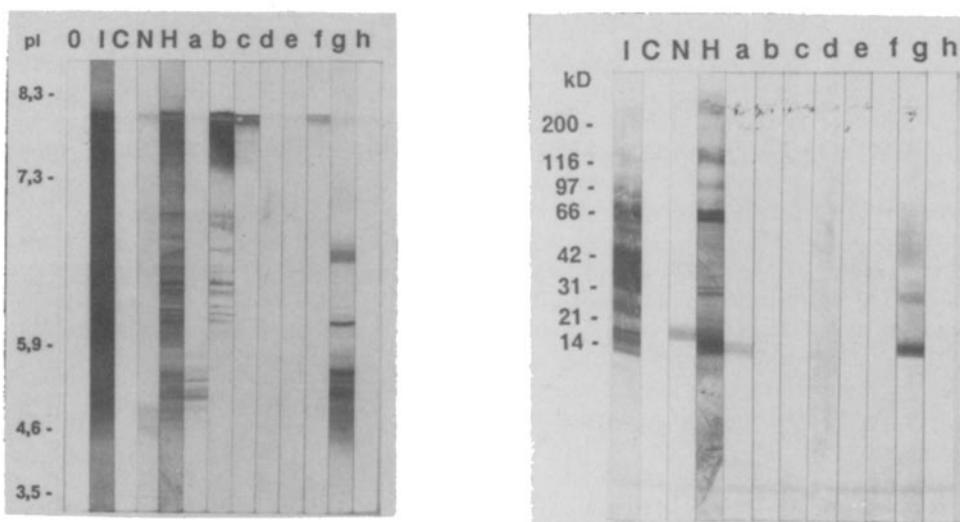


Abb. 5. Reaktivitäten der monoklonalen Antikörper im Erdnußschokoladen IEF-Immunoprint und SDS-PAGE-Immunoblot: 0 = Pufferkontrolle, I = Tuschefärbung, C = Kontrolle, N = Mausnormalserum, H = Maushyperimmunserum, a-h = monoklonale Antikörper

In den letzten 5 Jahren wurden von einigen Arbeitsgruppen SDS-PAGE-Immunoblottechniken zur Identifizierung von Erdnußallergenen eingesetzt, die sich ausschließlich auf den Nachweis von IgE-Reaktivitäten beschränken (9, 13, 14, 20, 22, 26, 34). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind nur schwer zur Deckung zu bringen (Tab. 2). Die Ursache dafür liegt wahrscheinlich in den verschiedenen Modifizierungen der SDS-PAGE-Immunoblottechnik (Probenaufbereitung, unterschiedliche Gel-, Puffer- und Blottingsysteme) und in der Auswahl des Patientenkollektivs.

Tab. 2. Im SDS-PAGE-Immunoblot identifizierte Hauptallergene

Arbeitsgruppen	Molekulargewichte der identifizierten Allergene
Meier-Davis et al., 1987	15, 20 und 66 kD
Häberle et al., 1988	10 bis 200 kD
Yunginger et al., 1989	10 bis 66 kD
Burk et al., 1990	55 kD
Lee et al., 1990	18, 22, 29 und 43 kD
Hefle et al., 1990	15-25, 26-58 und 66 kD
Perborn et al., 1990	13, 16, 40, und 50 kD
eigene Untersuchung	17, 30, 48-66 und 116 kD

In dieser Arbeit konnte mit Hilfe der SDS-PAGE-Immunoblottechnik erstmals gezeigt werden, daß sowohl das IgG des Kontroll- als auch das des Patientenserums mit Komponenten desselben Molekulargewichts reagieren. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß die Einzelkomponenten eines Erdnußextrakts in der Lage sind, bei Gesunden und Erdnußallergikern gleichermaßen eine IgG-Antwort zu induzieren. Daß auch gesunde Personen spezifische IgG-Antikörper gegen Nahrungsmittelantigene aufweisen, wurde bereits von mehreren Untersuchern gezeigt. Wahrscheinlich erfüllt die Produktion von IgG-Antikörpern gegen Antigene aus der Nahrung eine physiologische Aufgabe des Organismus in der Abwehr von Fremdproteinen. Warum Nahrungsmittelallergiker häufig erhöhte Mengen zirkulierendes spezifisches IgG aufweisen, ist unbekannt. Ob dies ein Hinweis auf eine blockierende Funktion der IgG-Antikörper und/oder die Folge einer erhöhten Allergenbelastung ist, konnte bisher nicht geklärt werden.

IgE-Antikörperbindungen sind im Immunoblot nur bei Erdnußallergikern festgestellt worden, wobei sich ein unterschiedliches Bandenmuster zeigte. Diese Beobachtung weist auf eine individuelle immunologische Auseinandersetzung der Erdnußallergiker mit Allergeneinzelkomponenten hin, wobei aber offensichtlich bestimmte Komponenten ein höheres Potential zur IgE-Induktion besitzen als andere. Für die Standardisierung von Allergenextrakten und den Vergleich verschiedener Extraktchargen ist deshalb nicht nur die Proteinkonzentration von Bedeutung, sondern man sollte auch die einzelnen patientenrelevanten Allergene qualitativ und quantitativ erfassen können. Hierbei haben monoklonale Antikörper eine zunehmende Bedeutung erlangt. Sie bieten als sekundäre Standards den enormen Vorteil, unbegrenzt in gleichbleibender Qualität zur Verfügung zu stehen. Monoklonale Antikörper können direkt zur Identifizierung und Quantifizierung von Allergeneinzelkomponenten eingesetzt werden.

In dieser Arbeit wurden erfolgreich monoklonale Antikörper gegen die IgE-reaktiven Einzelkomponenten aus dem Erdnußextrakt produziert. Die Bindungen der monoklonalen Antikörper PN-b, PN-c, PN-d und PN-f an das Antigen ließen sich in ELISA-Inhibitionstests mit Patientenserum, vor und nach Absorption des IgG's, hemmen. Das bedeutet, daß identische bzw. überlappende Epitope erkannt wurden. Mit Hilfe dieser monoklonalen Antikörper ist es möglich, in komplex zusammengesetzten Erdnußextrakten den Gehalt an IgE-reaktiven Einzelkomponenten zu bestimmen. Dies wird die Standardisierung und damit die Zuverlässigkeit diagnostischer Untersuchungsverfahren steigern können. Außerdem werden die monoklonalen Antikörper die Reinigung diagnostisch relevanter Einzelkomponenten ermöglichen. Gereinigte Erdnußallergene können die Basis für eine gezielte Desensibilisierung bilden.

Zur weiteren proteinchemischen Analyse der Epitope stellt die hochauflösende Trennung in der 2-D Elektrophorese eine hervorragende Grundlage dar, weil sie eine differenziertere Trennung der Proteine als in der eindimensionalen Trennung ermöglicht. So könnten z. B. die Proteine auf eine Polyvinyliden-Difluorid-Membran geblottet, ausgestanzt und sequenziert werden (21).

Erdnußallergene, über deren Vorkommen in verarbeiteten Nahrungsmitteln der Verbraucher keine Kenntnis hat, stellen ein großes Problem in der Diagnostik sowie in der Einhaltung der Karez dar (34). So ist es nach § 9 Absatz 3.3 der Kakaoverordnung untersagt, Lebensmittel, die in nicht unterscheidbarer Weise mitverarbeitet wurden und weniger als 5 % vom Gesamtgewicht des Fertigerzeugnisses betragen, zu deklarieren.

In einer erst kürzlich veröffentlichten Untersuchung (17) wurde ein Radioimmunoassay zur Detektion von Erdnußallergenen in Schokoladenprodukten vorgestellt. In diesem Testsystem wird eine definierte Menge Erdnußextrakt an die feste Phase einer

ELISA-Platte gekoppelt. Die zu prüfende Probe wird zusammen mit einem Poolserum aus 5 Erdnußallergikerseren in die Näpfe gegeben. Dabei inhibieren in der Probe vorhandene Erdnußproteine die Bindung des Serums an die Erdnußproteine der festen Phase. Je weniger Serum sich an die definierte Menge Erdnußextrakt bindet, desto höher ist der Gehalt an Erdnußproteinen in der Probe. Es muß allerdings bezweifelt werden, daß es sich in diesem Testsystem um den direkten Nachweis von Erdnußallergenen handelt, weil das Erdnußallergikerserum sicherlich außer den allergenspezifischen IgE-Antikörpern auch spezifische Immunglobuline anderer Klassen enthält. Deshalb kann in diesem Radioimmunoassay ein unfaktionsiertes Poolserum nur als hochtitriges Antiserum und nicht als Indikator für Allergene angesehen werden.

Auch in diesem Zusammenhang sind standardisierte Reagenzien, wie sie monoklonale Antikörper darstellen, gegenüber polyklonalen Antiseren vorzuziehen. Aus diesem Grund wurden die hergestellten monoklonalen Antikörper, die sich als hochgradig erdnusspezifisch erwiesen haben, zur Detektion von Erdnußproteinen in verarbeiteten Nahrungsmitteln, speziell Schokoladenprodukten, eingesetzt. Bei diesen Untersuchungen erwies sich die IEF-Immunoprinttechnik der SDS-PAGE-Immunoblottechnik überlegen. Für die Erstellung eines kommerziellen Testsystems zur Detektion versteckter Erdnußallergene wäre die Trennung eines Nahrungsmittelextrakts aber auch gar nicht notwendig. Ein Dotten, d. h. ein Auftröpfen der zu untersuchenden Probe auf eine CNBr-aktivierte NC-Membran ist sicherlich ausreichend. Die noch zu lösenden Probleme liegen eher auf Seiten der Probenaufbereitung und in der Nachweigrenze, die mit den monoklonalen Antikörpern erreicht wird. Untersuchungen und klinische Beobachtungen bei Erdnußallergikern haben gezeigt, daß die Stabilität der Erdnußallergene offenbar abhängig vom Verarbeitungsgrad ist (16), wobei die Erhitzungszeit und Temperatur den wesentlichsten Einfluß ausüben (23). Mit Hilfe der monoklonalen Antikörper wird es möglich sein, einen quantitativen Test zur Überwachung allergenreduzierender Verfahrenstechniken zu entwickeln.

Diese Arbeit ist ein vom Land Baden-Württemberg gefördertes Forschungsvorhaben im Rahmen des Projekts Umwelt und Gesundheit, Bereich Allergene und Umweltschadstoffe in Lebensmitteln.

Literatur

1. Baldo BA (1983) Standardization of allergens. *Allergy* 38:535
2. Barnett D, Baldo BA, Howden MEG (1983) Multiplicity of allergens in peanuts. *J Allergy Clin Immunol* 72:61-68
3. Barnett D, Howden MEH, Bonham B, Burley RW (1985) Aspects of legume research. Proc Seydney Allergen Group 4:104-118
4. Barnett D, Howden MEH (1986) Partial characterization of an allergenic glycoprotein from peanut. *Biochim Biophys Acta* 882:97-105
5. Barnett D, Bonham B, Howden MEH (1987a) Allergenic cross-reactions among legume foods - An in vitro study. *J Allergy Clin Immunol* 79:433-438
6. Batteiger B, Newhall WJ, Jones RB (1982) The use of Tween 20 as a blocking agent in the immunological detection of proteins transferred to nitrocellulose membranes. *J Immunol Meth* 55:297-307
7. Becker WM (1989) Reactivities of immunoglobulin E and immunoglobulin G subclasses identified by isoelectric focusing-immunoprint in allergic patients. *Electrophoresis* 10:633-639

8. Burks AW, Williams LW, Mallory SB, Shirrell MA, Williams C (1989) Peanut protein as a major cause of food adverse reactions in patients with atopic dermatitis. *Allergy Proc* 10:265–269
9. Burks AW, Williams LW, O'Brien T (1990) Identification of a major peanut allergen in patients with atopic dermatitis and peanut hypersensitivity. (abstract) *J Allergy Clin Immunol* 85:227
10. Demeulemeester CI, Peltre G, Laurent M, Panheleux D (1987) Cyanogen bromide-activated nitrocellulose membranes: A new tool for immunoprint techniques. *Electrophoresis* 8:71–73
11. Görg A, Postel W, Günther S (1988) 2-D Electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension: Critical parameters and remedies. *Electrophoresis* '88:57–72
12. Haas H, Becker WM, Maasch HJ, Schlaak M (1986) Analysis of allergen components in grass pollen extracts using immunoblotting. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 79:434–440
13. Häberle M, Baur X, Weiss W (1988) Erdnußpaste – ein okkultes Allergen in Schokolade. *Allergologie* 11:22–26
14. Hefle S, Folgert J, Chu FS, Bush RK (1990) Development of monoclonal antibodies to peanut proteins. *J Allergy Clin Immunol* 85:227
15. Hofer T, Wüthrich B (1985) Nahrungsmittelallergien II. Häufigkeit der Organmanifestationen und der allergieauslösenden Nahrungsmittel. *Schweiz med Wschr* 115:1437–1442
16. Kalliel JN, Klein DE, Settipane GA (1989) Anaphylaxis to peanuts: Clinical correlation to skin tests. *Allergy Proc* 10:259–260
17. Keating MU, Jones RT, Worley NJ, Shively CA, Yunginger JW (1990) Immunoassay of peanut allergens in food-processing materials and finished foods. *J Allergy Clin Immunol* 86:41–44
18. Kyhse-Andersen J (1984) Electroblotting of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Meth* 10:203–209
19. Leary JJ, Brigati DJ, Ward DC (1983) Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotinlabeled DNA-probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: Bio blots. *Proc Nat Acad USA* 80:4045–4049
20. Lee CE, Whisman BA, Goetz DW (1990) Identification of peanut and tru nut allergens by immunoblotting. (abstract) *J Allergy Clin Immunol* 85:227
21. Matsudaira P (1987) Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J Biol Chem* 282:10035–10038
22. Maier-Davis S, Taylor SL, Nordlee J, Bush R (1987) Identification of peanut allergens by immunoblotting. (abstract) *J Allergy Clin Immunol* 79:218
23. Neucere NJ, Ory RL, Carney WB (1969) Effect of roasting on the stability of peanut proteins. *J Agr Food Chem* 17:25–28
24. Neville DM, Glossmann H (1974) Molecular weight determination of membrane protein and glycoprotein subunits by discontinuous gel electrophoresis in dodecyl sulfate. *Meth Enzymol* 32: 92–102
25. Peltre G, Lapeyre J, David B (1982) Heterogeneity of grass pollen allergens (*Dactylis glomerata*) recognized by IgE antibodies in human patient sera by a new nitrocellulose immunoprint technique. *Imm Lett* 5:127–131
26. Perborn H, Elfvik K, Karlsson-Borga A (1990) Allergen composition studies of soy, peanut and wheat using SDS-PAGE and immunoblotting. (abstract) *Clin exp immunol* 20:70
27. Peters JH, Baumgarten H (1990) Monoklonale Antikörper. Herstellung und Charakterisierung. Springer Verlag, Berlin
28. Petersen A, Kahlert H, Jelke H, Becker WM, Schlaak M (1989) Produktion und Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern gegen allergene Komponenten. *Immun Infekt* 17:158–164
29. Sachs MI, Jones RT, Yunginger JW (1981) Isolation and partial characterisation of a major peanut allergen. *J Allergy Clin Immunol* 67:27–34
30. Settipane GA (1989) Anaphylactic deaths in asthmatic patients. *Allerg Proc* 10:271–274
31. Taylor SL, Busse WW, Sachs MI, Parker JL, Yunginger JW (1981) Peanut oil is not allergenic to peanut-sensitive individuals. *J Allergy Clin Immunol* 68:372–375
32. Van Asperen PP, Kemp AS, Mellis CM (1983) Immediate food hypersensitivity reactions on the first known exposure to the food. *Arch Dis Child* 58:253–256
33. Yunginger JW, Jones RT (1987) In: Brede HD (Hrsg) A review of peanut chemistry. Implications for the standardization of peanut extracts. *Arbeiten aus dem Paul-Ehrlich-Institut*, Band 80:251–264

34. Yunginger WJ, Squillace DL, Jones RT, Helm RM (1989) Fatal anaphylactic reactions induced by peanuts. *Allergy Proc* 10:249-253

Eingegangen 27. Juli 1992
akzeptiert 20. Januar 1993

Anschrift der Verfasser:

Dr. L. Uhlemann, Forschungsinstitut Borstel, Parkallee 22, W-2061 Borstel, FRG