

Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie  
Lehrstuhl für Hydrogeologie, Hydrochemie und Umweltanalytik  
der Technischen Universität München

# **Immunanalytische Methoden zur Detektion von Erdnuss- und Haselnuss-Spuren in Lebensmitteln**

**Martin Kiening**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen  
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. M. Schuster  
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. R. Nießner  
2. Univ.-Prof. Dr. P. Schieberle

Die Dissertation wurde am 20.02.2006 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 24.05.2006 angenommen.



# Danksagung

Diese Arbeit entstand in der Zeit von März 2002 bis November 2005 am Lehrstuhl für Hydrogeologie, Hydrochemie und Umweltanalytik der Technischen Universität München unter Leitung von Herrn o. Univ.-Prof. Dr. Reinhard Nießner.

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Nießner für die Möglichkeit danken, das sehr interessante Projekt am Institut für Wasserchemie bearbeiten zu können. Sein stetes Interesse an den Forschungsergebnissen, die gute Ausstattung der Laboratorien und die für die Bearbeitung gewährten Freiheiten waren für das Vorankommen der Arbeit sehr förderlich.

Bei Herrn PD Dr. Michael G. Weller möchte ich mich sehr herzlich für die große Unterstützung bedanken. Während der gesamten Zeit war er ständig offen für Fragen und Diskussionen. Mit seinen zahlreichen Ideen konnte er entscheidend zum Gelingen des Projektes beitragen.

Der Europäischen Kommission danke ich für die Finanzierung des Forschungsprojekts „AllergenTest“ (QLRT-2000-01151). Ich möchte mich bei allen Kooperationspartnern für die gute Zusammenarbeit bedanken: Dr. Elisabeth Drs und Irene Fürtler-Leitzenberger (IFA Tulln, Österreich); Dr. Monique Bremer (RIKILT-Institute of Food Safety, Niederlande); Dr. Victoria Tomkies, Dr. Chris Danks und Dr. Paul Reece (Central Science Laboratory, Großbritannien); Dr. Philip Wilson (Central Manchester and Manchester Children's University Hospitals, Großbritannien); Dr. Ulrike Immer und Dr. Karl Schmitt (R-Biopharm AG, Darmstadt); Dr. Emanuela Corsini (Università degli Studi di Milano, Italien); Sofia Mendonça (DECO Proteste, Portugal). Prof. Dr. Rudolf Krska und Dr. Sabine Baumgartner (IFA Tulln) haben durch sehr engagierte Koordination wesentlichen Anteil am Erfolg des „AllergenTest“-Projekts.

Dank gebührt nicht zuletzt meinen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe „Bioanalytik II“ Dr. Barbara Fall, Isabel Schaupt, Bertram Knecht und Susanne Fabel für die gute Zusammenarbeit und für das freundliche und motivierende Arbeitsklima.

Danke auch an Prof. Dr. Dietmar Knopp, Diana Matschulat und Dr. Petra Degelmann von der Arbeitsgruppe „Bioanalytik I“ für zahlreiche Diskussionen und schnelle Hilfe bei Versorgungsengpässen.

Allen Kolleginnen und Kollegen danke ich für Unterstützung und für die angenehme Atmosphäre am Institut, besonders Prof. Dr. Ulrich Panne, Dr. Christoph Haisch, Dr. Thomas Baumann, Dr. Ulrich Pöschl, Dr. Harald Prestel, Dr. Armin

Messerer, Dr. Thomas Franze, Dr. Thomas Schmid, Tobias Fehrenbach, Ulrike McKeon, und allen hier nicht namentlich erwähnten.

Auch den Studentinnen und Studenten Anne Kramer, Katalin Hajnal, Diem Hang Tran Nguyen, Martin Ziller, Matthias Scherr, Stefan Wunderlich und Ulf Dettmer möchte ich Dank aussprechen für ihre engagierte Mitarbeit.

Schließlich danke ich meinen Eltern für ihr Vertrauen und ihre Unterstützung vor und während des Studiums. Auch meinen Freunden bin ich zu Dank verpflichtet. Besonders bedanken möchte ich mich schließlich bei meiner Freundin Conny für ihre Geduld und für so manch aufmunterndes Wort.

**Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht:**

M. Kiening, R. Niessner, E. Drs, S. Baumgartner, R. Krska, M. Bremer, V. Tomkies, P. Reece, C. Danks, U. Immer and M. G. Weller: Sandwich Immunoassays for the Determination of Peanut and Hazelnut Traces in Foods, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53** (2005) 3321–3327.

M. Kiening, R. Niessner and M. G. Weller: Microplate-based Screening Methods for the Efficient Development of Sandwich Immunoassays, *The Analyst* **130** (2005) 1580–1588.

I. Fürtler-Leitzenberger, U. Immer, K. Schmitt, S. Baumgartner, C. Danks, V. Tomkies, P. Reece, M. Bremer, P. Wilson, E. Corsini, M. Kiening, R. Niessner, M. G. Weller, M. Janotta and R. Krska: Detection of Peanut and Hazelnut Protein in Food Matrices by Prototype ELISA Test Kits: Results of a Collaborative Trial, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2005) eingereicht.



“I have not failed. I’ve just found  
10,000 ways that won’t work.”  
*Thomas A. Edison*



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Problemstellung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Theoretische Grundlagen</b>	<b>5</b>
2.1	Allergien . . . . .	5
2.1.1	Entstehung von Allergien . . . . .	5
2.1.2	Allergiediagnostik . . . . .	7
2.1.3	Therapie von Allergien . . . . .	10
2.1.4	Grundlagen von Lebensmittelallergien . . . . .	11
2.1.4.1	Abgrenzung und Symptome . . . . .	11
2.1.4.2	Problematik der versteckten Allergene . . . . .	13
2.1.4.3	Häufigkeit von Lebensmittelallergien . . . . .	15
2.1.4.4	Lebensmittelallergene . . . . .	16
2.1.5	Erdnüsse . . . . .	18
2.1.5.1	Allgemeines . . . . .	18
2.1.5.2	Erdnussproteine . . . . .	19
2.1.5.3	Erdnussallergien . . . . .	22
2.1.6	Haselnüsse . . . . .	23
2.1.6.1	Allgemeines . . . . .	23
2.1.6.2	Haselnussproteine . . . . .	23
2.1.6.3	Haselnussallergien . . . . .	24
2.1.7	Gesetzliche Bestimmungen . . . . .	24
2.2	Analytik von Allergenen . . . . .	26
2.2.1	Anforderungen an die Analytik . . . . .	26
2.2.2	Analytische Methoden . . . . .	26
2.2.2.1	Proteinchemische Methoden . . . . .	27
2.2.2.2	Molekularbiologische Methoden . . . . .	27
2.2.2.3	Immunchemische Methoden . . . . .	28
2.3	Antikörper und deren Gewinnung . . . . .	28
2.3.1	Eigenschaften von Antikörpern . . . . .	28
2.3.2	Polyklonale Antikörper . . . . .	30
2.3.3	Monoklonale Antikörper . . . . .	30
2.3.4	Rekombinante Antikörper . . . . .	32
2.3.5	Konjugation von Antikörpern . . . . .	33
2.4	Charakterisierung von Antikörpern . . . . .	33

2.4.1	Affinität von Antikörpern . . . . .	33
2.4.2	Kreuzreaktivität . . . . .	35
2.5	Immunoassays . . . . .	36
2.5.1	Kompetitive Immunoassays . . . . .	38
2.5.2	Immunoassays mit immobilisiertem Antigen . . . . .	40
2.5.3	Sandwich-Immunoassays . . . . .	40
2.5.4	Teststreifen-basierte Systeme . . . . .	44
2.6	Stand der Analytik . . . . .	46
2.6.1	Mikrotiterplattenbasierte Immunoassays . . . . .	46
2.6.1.1	Erdnuss . . . . .	47
2.6.1.2	Haselnuss . . . . .	49
2.6.2	Teststreifen . . . . .	50
2.6.3	PCR . . . . .	51
2.6.4	Biosensoren . . . . .	52
2.6.5	Diverse Formate . . . . .	52
<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>55</b>
3.1	Untersuchung verschiedener Assayformate . . . . .	55
3.1.1	Kompetitive Immunoassays . . . . .	55
3.1.2	Immunoassays mit immobilisiertem Antigen . . . . .	59
3.1.3	Sandwich-Immunoassay . . . . .	60
3.2	Charakterisierung der polyklonalen Antikörper . . . . .	62
3.2.1	Antikörper vom Huhn . . . . .	62
3.2.2	Antikörper vom Schaf . . . . .	64
3.2.3	Antikörper vom Kaninchen . . . . .	65
3.3	Charakterisierung der monoklonalen Antikörper . . . . .	68
3.3.1	Bestimmung der IgG-Konzentrationen . . . . .	68
3.3.2	Bestimmung von Affinitäten mittels Immunoassays mit immobilisiertem Antikörper . . . . .	71
3.3.3	Bestimmung von Affinitäten mittels kompetitiver Immunoassays . . . . .	76
3.4	Untersuchung der Antikörperselektivitäten . . . . .	79
3.4.1	Kreuzreaktivitäten . . . . .	79
3.4.2	Gelchromatographische Fraktionierungen . . . . .	82
3.4.3	Gereinigte Allergene . . . . .	85
3.5	Screening von homologen Antikörperpaaren . . . . .	86
3.5.1	Markierung mittels Fab-Fragmenten . . . . .	86
3.5.2	Biotinylierung von Antikörpern . . . . .	88
3.5.3	Markierung mittels Protein G . . . . .	89
3.5.4	Markierung mittels anti-Maus-Antikörpern . . . . .	91
3.5.5	Kovalent markierte Antikörper . . . . .	93
3.5.6	Vergleich der Markierungsmethoden . . . . .	95
3.6	Screening von heterologen Antikörperpaaren . . . . .	101
3.6.1	Immobilisierung von polyklonalen Antikörpern . . . . .	101

3.6.2	Immobilisierung von monoklonalen Antikörpern . . . . .	103
3.6.3	Zusammenfassung heterologe Antikörperpaare . . . . .	107
3.7	Enzyme-Channeling-Assays . . . . .	111
3.8	Auswahl des Extraktionspuffers . . . . .	113
3.8.1	Matrixeffekte komplexer Lebensmittel . . . . .	113
3.8.2	Kreuzreaktivitäten . . . . .	121
3.8.2.1	Erdnuss-Immunoassay . . . . .	121
3.8.2.2	Haselnuss-Immunoassay . . . . .	126
3.9	Optimierung der Immunoassays . . . . .	128
3.9.1	Mikrotiterplattenbasierte Immunoassays . . . . .	128
3.9.2	Lateral-Flow-Schnelltests . . . . .	129
3.10	Validierung der Immunoassays . . . . .	130
3.10.1	Präzision . . . . .	131
3.10.2	Wiederfindungen . . . . .	131
3.10.3	Kreuzreaktivitäten . . . . .	134
3.10.4	Nachweisgrenzen . . . . .	135
3.10.5	Ringversuche . . . . .	136
3.11	Messung von Realproben . . . . .	139
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>145</b>
<b>5</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>149</b>
5.1	Verwendete Geräte . . . . .	149
5.2	Chemikalien und Reagenzien . . . . .	150
5.2.1	Chemikalien . . . . .	150
5.2.2	Verfügbare Antikörper . . . . .	151
5.2.3	Immunchemische Reagenzien . . . . .	153
5.2.4	Puffer . . . . .	153
5.2.5	Spezialreagenzien . . . . .	155
5.3	Standardprozeduren . . . . .	156
5.3.1	Herstellung von Standards und Probenextrakten . . . . .	156
5.3.2	Immunoassay mit immobilisiertem Antigen . . . . .	157
5.3.3	Immunoassay mit immobilisiertem Antikörper . . . . .	157
5.3.4	Indirekt-kompetitiver Immunoassay . . . . .	158
5.3.5	Messung von Erdnuss- bzw. Haselnussprotein . . . . .	158
5.3.6	Messung von Maus-IgG . . . . .	159
5.3.7	Screening von heterologen Antikörperpaaren . . . . .	159
5.3.8	Proteinmessung mittels BCA-Assay . . . . .	160
5.3.9	Konjugation von Antikörpern mit Peroxidase . . . . .	160
5.3.10	<i>In-situ</i> -Markierung von Antikörpern . . . . .	161
5.3.10.1	Markierung mittels Fab-Fragmenten . . . . .	161
5.3.10.2	Markierung mittels Protein G . . . . .	161
5.3.10.3	Markierung mittels anti-Maus-Antikörper . . . . .	162
5.3.11	Biotinylierung von Antikörpern . . . . .	162

5.3.12 Biotinylierung von Proteinextrakten . . . . .	162
5.3.13 Herstellung von Schokoladen . . . . .	162
5.3.14 Lateral-Flow-Schnelltests . . . . .	163
5.4 Gelchromatographie . . . . .	163
<b>6 Abkürzungen</b>	<b>165</b>
<b>7 Literaturverzeichnis</b>	<b>167</b>

# 1 Einleitung und Problemstellung

Während des 20. Jahrhunderts wurde eine deutliche Zunahme von Allergien besonders in westlichen Ländern beobachtet, und als Begleiterscheinung der Industrialisierung erachtet [1]. In den meisten Fällen äußern sich allergische Reaktionen durch relativ milde Symptome wie beispielsweise Juckreiz, Hautrötung oder Rhinoconjunctivitis. Bei sehr empfindlichen Patienten und hochgradiger Sensibilisierung können die Symptome schwerwiegender sein und von Asthma, Urticaria bis zu anaphylaktischem Schock reichen. Systemische Reaktionen können, wenn keine schnelle Notfallmedikation erfolgt, letal verlaufen [2]. Bis jetzt sind die Ursachen für das Auftreten von Allergien noch nicht vollständig aufgeklärt. Ein wichtiger Aspekt ist die genetische Disposition, die Anfälligkeit für Allergien scheint zumindest teilweise vererbt zu werden. Ein Zusammenhang von Allergien mit Umwelteinflüssen, wie Luftschadstoffen, ist gleichfalls wahrscheinlich. So kann stickoxidbelastete Luft die Allergenität von Pollenproteinen steigern. Auch Lebensmittel haben allergenes Potential. Einerseits kommen Verbraucher durch internationalen Handel mit einer größeren Auswahl an Nahrungsmitteln und damit an allergenen Proteinen in Kontakt. Zum anderen erwiesen sich einige Lebensmittel-Zusatzstoffe, wie Benzoesäure oder Sulfite, als pseudoallergen. Obwohl die Symptome nach Kontakt mit Pseudoallergenen (Idiosynkrasie) nicht IgE-mediert sind und damit von echter Allergie abzugrenzen sind, ist die Symptomatik sehr ähnlich. Auch ein Zusammenhang zwischen verbesserten Hygienestandards, resultierend in einer Unterforderung des Immunsystems, und erhöhter Inzidenz von Allergien wird vermutet [3].

Therapiemöglichkeiten von Allergien beschränken sich auf die weitestgehende Vermeidung des Kontaktes zum entsprechenden Allergen, symptom-suppressive medikamentöse Therapie mit beispielsweise Antihistaminika oder Hyposensibilisierung. Letztere ist zwar als Routinebehandlung etabliert, aber häufig mit teils schweren und unkalkulierbaren Nebenwirkungen verbunden. Zudem sind die Erfolgsquoten bei Hyposensibilisierungen nur mäßig. Bei vielen Allergien ist die Methode wegen möglicher schwerer Nebenwirkungen unpraktikabel. Daher wird bei Multiallergikern und bei Lebensmittelallergikern von dieser Therapie gänzlich abgeraten [4].

Lebensmittelallergien stellen ein besonderes Problem dar, da einerseits oftmals große Mengen an allergenen Proteinen aufgenommen werden und damit teils heftige Reaktionen ausgelöst werden können. Zudem tritt der Patient im Gegensatz zur z. B. Pollenallergie meist unwissentlich in Kontakt mit dem Allergen. Allergene, die mangels Deklaration im Lebensmittel nicht vermutet werden, bezeichnet man daher als „versteckte Allergene“. Mehrere Ursachen für derartige Kontaminationen

sind bekannt, ein häufig auftretendes Problem ist Kreuzkontakt bei industrieller Produktion von Lebensmitteln. Bei Produkten, die im selben Produktionsgebäude oder sogar auf der selben Produktionsstraße hergestellt werden, können entsprechende Kreuzkontaminationen erfolgen. Auf direktem Wege erfolgt dies oft durch ungenügend gereinigte Anlagen und auf indirektem Wege beispielsweise durch über Lüftungssysteme transportierte Stäube. Die Kontamination von Schokoladen mit Haselnuss ist ein oft beschriebenes Beispiel. Da viele Schokoladen Haselnuss als Zutat enthalten, werden Spuren von Haselnuss oftmals auch in Schokoladen gefunden, bei denen laut Zutatenverzeichnis Haselnuss nicht zu erwarten ist [5].

Da der allergische Konsument je nach Grad der Sensibilisierung das Allergen nur begrenzt zu sich nehmen kann oder strikt meiden muss, ist er auf zuverlässige Lebensmittelkennzeichnung angewiesen. Vor Verabschiedung der Richtlinie 2003/89/EG waren Allergene nicht grundsätzlich deklarationspflichtig. Nach der sog. „25-%-Regel“ konnte sogar die Aufschlüsselung einer zusammengesetzten Zutat entfallen, wenn diese zusammengesetzte Zutat weniger als 25 % des gesamten Lebensmittels ausmachte. Mit Inkrafttreten der Richtlinie 2003/89/EG müssen in Anhang IIIa genannte Inhaltsstoffe grundsätzlich deklariert werden [6]. Es handelt sich dabei um Lebensmittel, die besonders häufig Allergien und Intoleranzen auslösen. Neben glutenhaltigem Getreide sind Krebstiere, Eier, Fische, Erdnüsse, Soja, Milch, Schalenfrüchte, Sellerie, Senf, Sesamsamen, Schwefeldioxid und Sulfite respektive deren Erzeugnisse aufgeführt. Bei Lactose, Schwefeldioxid und Sulfiten handelt es sich um Substanzen, die Intoleranzen oder Pseudoallergien auslösen können. Die restlichen Lebensmittel können aufgrund der enthaltenen Proteine echte, IgE-medierte Allergien verursachen.

Für die Umsetzung und Kontrolle der Allergenkennzeichnung werden selektive und empfindliche analytische Methoden benötigt, die in verschiedensten, komplexen Lebensmitteln verlässliche Ergebnisse liefern. Zum Nachweis der Lebensmittelallergene sind proteinbasierte Methoden wie Immunoassays geeignet, wobei abhängig vom verwendeten Antikörper das entsprechende Allergen direkt gemessen werden kann [7]. Als Alternative kommen DNA-basierte Methoden wie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in Betracht. Hierbei werden DNA-Fragmente der zu identifizierenden Spezies selektiv amplifiziert und detektiert. Damit wird indirekt auf eine Kontamination mit entsprechenden Allergenen geschlossen [8].

Das Ziel dieses Projektes war die Entwicklung von Methoden für den Nachweis von Erdnuss- bzw. Haselnuss-Spuren in komplexen Lebensmitteln. Dabei sollten sowohl mikrotiterplattenbasierte Immunoassays (ELISAs), als auch Schnelltestsysteme in Form von Teststreifen entwickelt werden.

Die Auswahl der Antikörper ist ein entscheidender Schritt für die Entwicklung leistungsfähiger Immunoassays. Antikörper-Parameter wie Affinität und Kreuzreaktivität spiegeln sich in der Leistungsfähigkeit des finalen Tests wider. Die innerhalb des Projektes generierten Antikörper mussten daher vor der Beurteilung ausführlich charakterisiert werden. Des Weiteren musste ein geeignetes Immunoassay-Format festgelegt, die Immunoassays optimiert und eine Extraktionsmethode entwickelt werden. Schließlich sollten die entwickelten Methoden validiert und zur

Analyse von Realproben verwendet werden.

Für die Akzeptanz von neuen Analysemethoden ist eine möglichst kurze Testdauer unumgänglich, verbunden mit der Möglichkeit, hohen Probendurchsatz zu bewältigen. Dabei soll für die Analytik von Allergenen in Lebensmitteln die zu erreichende Nachweisempfindlichkeit  $\approx 1$  mg/kg Protein im Lebensmittel betragen. Dieser Wert wurde von aus Provokationstests bekannten Daten abgeleitet [9; 10]. Um falsch positive bzw. falsch negative Resultate zu minimieren, sind zum einen minimale Kreuzreaktivitäten der Immunoassays und zum anderen hohe Wiederfindungen in vielen Lebensmittelmatrices erforderlich [11].

Bisher bekannte Methoden für den Spurennachweis von Erdnuss oder Haselnuss in Lebensmitteln sind oftmals nicht empfindlich genug oder nicht für alle relevanten Lebensmittelmatrices geeignet. Bei vielen veröffentlichten Methoden sind zudem die entsprechenden Antikörper nicht mehr verfügbar.



# 2 Theoretische Grundlagen

## 2.1 Allergien

### 2.1.1 Entstehung von Allergien

Als Allergien werden immunologische Abwehrreaktionen des Körpers bezeichnet, die beim Kontakt mit normalerweise harmlosen Stoffen (Proteine oder Glycoproteine) auftreten. Das Wort „Allergie“ entstammt den griechischen Begriffen „áλλο“ – anders, fremd und „έργο“ – Arbeit, Reaktion.

Bereits im Jahre 1570 wurde von Symptomen eines Katzen-Allergikers berichtet. Die erste anaphylaktische Reaktion gegen Ei wurde gleichfalls im 16. Jahrhundert beschrieben, gegen Fisch im 17. Jahrhundert [12]. Allergien sind daher nicht grundsätzlich als Zivilisationskrankheit zu sehen. Schätzungen zufolge sind in Deutschland 25–30 % der Bevölkerung Allergiker. Entsprechend der Expositionsdauer unterscheidet man zwischen saisonalen Allergien, beispielsweise gegen Pollen, und ganzjährigen (perennialen) Allergien, beispielsweise gegen Milbenexkrete [1].

Nach COOMBS und GELL werden vier Mechanismen von allergischen Reaktionen unterschieden [13]. Die Allergie vom Typ 1 wird auch Soforttyp oder anaphylaktischer Typ genannt. Voraussetzung hierfür ist eine durch Kontakt mit dem Allergen vorausgegangene Sensibilisierung. Das Antigen wird von Antigenpräsentierenden Zellen (Makrophagen, dendritischen Zellen oder B-Lymphocyten) an einen MHC-Rezeptor (Haupthistokompatibilitätskomplex-Rezeptor) gebunden und T-Lymphocyten präsentiert [14]. Daraufhin kommt es zu Bildung von Antigen ererkennendem Immunglobulin E (IgE) und sensibilisierten Mastzellen (Abb. 2.1 a). Bei erneutem Kontakt des sensibilisierten Patienten mit dem Allergen können Typ-1-Reaktionen, welche die Blutgefäße betreffen (vaskuläre Reaktionen), ausgelöst werden. Die Symptome reichen von urtikarieller Quaddelbildung (Nesselsucht) bei lokaler Exposition bis zu Bronchialasthma oder anaphylaktischem Schock (schwere, systemische Reaktion). Ursache ist erhöhte Permeabilität der Kapillaren, welche Gewebsödeme und Kontraktion der glatten Muskulatur und schließlich entzündliche Läsionen nach sich ziehen kann. Als Mediatoren von Typ-1-Reaktionen sind beispielsweise Histamin, Serotonin, Heparin, SRS (Slow Reacting Substance), ECF (Eosinophil Chemitactic Factor) und Bradykinin bekannt, die teils aus Mastzellen, Basophilen oder Granulocyten freigesetzt werden oder aus dem Blutplasma stammen. Zur Granulafreisetzung kommt es, wenn durch das Antigen zwei IgE-Moleküle, welche über hochaffine Rezeptoren (FcεRI) auf der

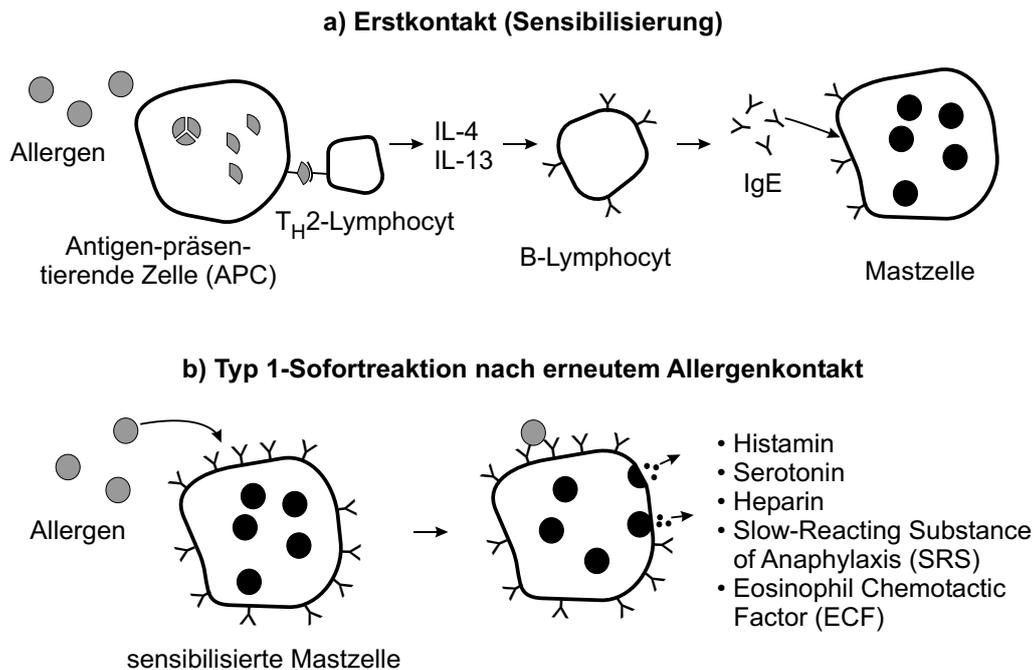


Abb. 2.1: a) Allergen-Erstkontakt mit Bildung von IgE und Sensibilisierung von Mastzellen. b) Bei weiterem Kontakt kommt es zur Ausschüttung von Mediatoren und zur Ausbildung von klinischen Symptomen.

Oberfläche von Mastzellen gebunden sind, überbrückt werden („bridging“, Abb. 2.1 b) [15; 16; 17; 18]. Eine Bildung von IgE erfolgt nur bei Typ-1-Reaktionen. Die ursprüngliche Bedeutung von IgE scheint der Schutz vor parasitären Infektionen zu sein [2; 19]. Die cytotoxische oder Typ-2-Reaktion ist charakterisiert durch Bildung von Immunkomplexen aus körpereigenem Immunglobulin G und Immunglobulin M (IgG und IgM) mit zellständigen Antigenen z. B. aus transfundiertem Blut oder nach Aufnahme von bestimmten Medikamenten. Bei Aktivierung von cytotoxischen Killerzellen und dem Komplementsystem kann es zur Lyse der entsprechenden Zellen kommen. Bei Typ-3-Reaktionen, Immunkomplex-Typ oder Arthus-Reaktion, sind ebenfalls cytotoxische Reaktionen beteiligt. Zunächst bilden sich Antigen-Antikörper-Komplexe in hoher Menge in Blut oder Extrazellulärmedium, die nicht schnell genug aus der Blutbahn entfernt werden. Anlagerung dieser Komplexe an Zellmembranen und anschließende Komplementaktivierung führt zur Phagozytose der Komplexe und zur Freisetzung von gewebeangreifenden Enzymen. Typ-4- oder Spättyp-Reaktionen beruhen dagegen auf einer Antigenerkennung mittels sensibilisierter T-Lymphocyten, die zu lokaler Immunglobulin-Bildung und Freisetzung von Lymphokinen bzw. Aktivierung des Komplementsystems führt. Als Beispiele für Spättyp-Reaktionen sind Läsionen infolge Infektionen, einige Arzneimittelallergien, Kontaktekzeme oder Abstoßungsreaktionen nach Gewebetransplantationen zu nennen [20].

Ein wichtiger Faktor für das Auftreten von allergischen Erkrankungen ist die

genetische Disposition, Allergieanfälligkeit wird zu einem gewissen Teil also vermutlich vererbt. Beispielsweise stimmt das Auftreten von Erdnuss-Allergien bei eineiigen Zwillingen signifikant häufiger überein als bei zweieiigen [21]. Oftmals ist die Sensibilisierung auch beruflich bedingt, bei Klinikpersonal werden beispielsweise gehäuft Latex-Allergien beobachtet [1]. Allein in Deutschland leiden über 40.000 Menschen an einer Überempfindlichkeit gegen das in vielen Getreidesorten vorkommende Kleberprotein Gluten (Zöliakie). Die Zahl der Lebensmittelallergiker wird weltweit auf mehr als 200 Millionen geschätzt, bei Kuhmilch-Unverträglichkeit (hauptsächlich Lactose-Intoleranz) wird von 600 Millionen Kindern und 2,3 Milliarden Erwachsenen ausgegangen [22].

Die größte Zunahme der Allergien in westlichen Ländern wurde zwischen 1960 und 1990 beobachtet, als mögliche Ursachen hierfür werden mehrere Hypothesen diskutiert [3]. Lebensumstände und Umwelteinflüsse in industrialisierten Ländern scheinen das Auftreten von Allergien zu begünstigen. Auch muss berücksichtigt werden, dass sich die Diagnostik in den letzten Jahrzehnten deutlich verbessert hat. Als psychosoziale Faktoren, die das Auftreten von Allergien begünstigen sollen, werden der gestiegene Individualismus, eine hohe Stressbelastung und geringere Familiengrößen genannt. Daneben wird die Rolle der Allergenexposition diskutiert. Die Bevölkerung kommt beispielsweise durch den Konsum von exotischen Lebensmitteln mit einer höheren Anzahl von Allergenen in Kontakt. Die Allergenität kann durch Umwelteinflüsse zudem beeinflusst werden, was sich bei Allergenen von mit Luftschadstoffen behandelten Pollen zeigt. Auch ein direkter Einfluss der Umweltverschmutzung an sich wird in Zusammenhang mit steigendem Auftreten von Allergien gebracht. Ferner wird häufig eine Unterforderung des Immunsystems als mögliche Ursache angegeben („Hygiene“- bzw. „Urwaldhypothese“) [23]. Vermutlich liegen bei Allergien in vielen Fällen weitere Krankheiten zugrunde, wie Diabetes (Typ I), und auch eine mögliche Verstärkung von Allergien durch anti-allergische Medikation wie H1-Antagonisten wird diskutiert [24].

Über 400 allergene Proteine sind laut IUIS (International Union of Immunological Societies) bekannt. Mit bioinformatischen Methoden ist es zwar möglich, die Wahrscheinlichkeit von Kreuzallergien abzuschätzen, die Allergenität eines neuen Proteins zu ermitteln ist dagegen kaum möglich [25].

### 2.1.2 Allergiediagnostik

Der erste Schritt bei der Allergiediagnostik ist in der Regel eine systematische Anamnese, wobei es sich hauptsächlich um eine Befragung durch den Arzt handelt. In vielen Fällen stimmt der anamnetische Befund, wenn der Patient also beispielsweise von Reaktionen nach Verzehr eines bestimmten Lebensmittels berichtet, mit den bei der weiteren Diagnostik erhaltenen Befunden überein [26]. Als weitere diagnostische Methoden stehen im Wesentlichen Hauttests, Provokationstests und *in-vitro*-Methoden zur Verfügung.

Verschiedene Hauttestungsmethoden werden je nach individuellen Faktoren wie Alter des Patienten oder Grad der Sensibilisierung angewendet [27]. Entsprechend

dem zugrunde liegenden Mechanismus sind Hauttests nur für die Diagnostik von echten Allergien geeignet, nicht dagegen für z. B. Intoleranzen [27]. Als einer der ältesten Hauttests wurde der Scratchtest bereits 1873 von BLACKLEY beschrieben [28]. Das Allergen wird dabei cutan (in die obere Epidermisschicht) auf der Beugeseite des Unterarms appliziert, indem die Haut nach Aufbringung eines Allergenextrakts mit einer Lanzette angeritzt wird [29]. Da hierbei große Hautareale benötigt werden und da der Test wegen starker Hautreizung nicht immer ein eindeutiges Ergebnis liefert, hat der Scratchtest gegenüber anderen Hauttests stark an Bedeutung verloren [29].

Beim Haut-Pricktest, welcher 1926 erstmalig von LEWIS und GRANT beschrieben wurde, werden Allergenextrakte ebenfalls cutan appliziert [30; 31]. Auf den Arm wird ein Tropfen des Allergenextrakts aufgetragen und mit einer Lanzette die Haut an dieser Stelle etwa 1 mm tief durchstoßen. Im Falle einer bestehenden Allergie gegen die Testsubstanz bildet sich nach etwa 20 Minuten an dieser Stelle eine Quaddel. Die Hautreaktion wird über die Bestimmung von Quaddel- bzw. Erythemgröße (Rötungsareal) relativ zu einer Negativ- und Positivprobe (Histamin) ausgewertet [29]. Beim Intrakutan-Test (i. c.-Test) werden Extrakte von Allergenen bzw. Allergengruppen in die Beugeseite des Unterarmes bzw. in die Rückenhaut injiziert und die Größe des entstehenden Erythems bzw. der Quaddel beobachtet [1; 32]. Im Gegensatz zum Haut-Prick-Test wird beim Intrakutan-Test die Testlösung durch die Injektion in tiefere Hautschichten (Lederhaut) eingebracht. Der Intrakutan-Test wird nicht in der Routinediagnostik angewendet, da die Durchführung oftmals mit nicht unerheblichen Schmerzen verbunden ist. Der Reibtest dagegen ist sehr unempfindlich, da hierbei lediglich mit dem entsprechenden Stoff auf der Innenseite des Armes gerieben wird. Der Reibtest wird daher vorwiegend bei hochgradig sensibilisierten Patienten durchgeführt [1]. Beim Epikutantest, auch Lämpchentest oder Perkutantest genannt, wird ein Leinenstück mit Testsubstanzen beschickt und auf der Haut fixiert. Die Dokumentation von entstehenden Ekzemen erfolgt nach 24–48 Stunden. Der Test dient vorwiegend der Diagnose von epidermalen Sensibilisierungen, die zu allergischen Kontaktekzemen führen können [33].

Interessanterweise werden in einigen Fällen Differenzen zwischen Hauttests und klinischen Befunden festgestellt. Bei Asthmatikern waren in einer Studie beispielsweise Hauttests mit Hausstaub zu 73 % positiv bei entsprechend positivem Befund der Anamnese und zu 44 % positiv, ohne dass entsprechende anamnetische Hinweise vorlagen [26; 27]. Hauttests zeigen im allgemeinen hohe Sensitivität und damit gute Vorhersage von negativen Befunden. Die Selektivität und damit die Vorhersage von positiven Befunden ist allerdings relativ schlecht [34].

Bei *in-vitro*-Tests wird zunächst die Gesamtkonzentration von IgE im Serum mittels Radioimmunosorbent-Test bzw. -Assay (RIST, RISA), Papier-Radioimmunosorbent-Test (PRIST) bzw. entsprechenden Enzymimmunoassays gemessen. IgE wurde im Jahre 1966 von JOHANSSON und ISHIZAKA entdeckt und als Auslöser von Allergien identifiziert [35; 36; 37]. Die Serumkonzentrationen von IgE beträgt bei nicht atopischen Menschen etwa 17–450 ng/mL und ist damit wesentlich

geringer als die Konzentration von IgG mit 8–16 mg/mL, was die relativ späte Entdeckung von IgE erklärt [38].

Eine erhöhte IgE-Gesamtkonzentration kann auf Allergien hinweisen, kann aber auch durch parasitäre Erkrankungen bzw. maligne Tumore verursacht werden [39]. Auch aus dem Vorhandensein von Antigen erkennendem IgG kann nicht unmittelbar auf das Vorliegen einer Allergie geschlossen werden. Zwar wird bei Erdnussallergikern verglichen mit Nichtallergikern neben Antigen erkennendem IgE auch eine erhöhte Menge an entsprechendem IgG im Serum gefunden. Bei vielen Nichtallergikern wird allerdings ebenso Antigen erkennendes IgG nachgewiesen, was auf regelmäßigen Verzehr von Erdnuss zurückzuführen ist [40]. Die Bestimmung von allergenselektivem IgE im Patientenserum erfolgt mittels Radioallergosorbent-Tests (RAST) bzw. entsprechenden enzymbasierten Assays (EAST). Dabei wird immobilisiertes Antigen mit Patientenserum inkubiert und gebundenes IgE im zweiten Schritt nach Einführung einer Markierung radiometrisch bzw. enzymatisch detektiert. Anhand der gemessenen Konzentration des entsprechenden IgE wird der Grad der Sensibilisierung ermittelt und in vier sog. RAST-Klassen eingeteilt [1]. Inzwischen sind auch auf Microarray-Technologie basierende Testsysteme für die Messung von Antigen erkennendem IgE verfügbar, welche durch Multianalytffähigkeit und Parallelisierung die Messung vieler Parameter unter hohem Durchsatz ermöglichen [41]. Als weitere *in-vitro*-Tests für die Allergenidentifikation und für das Allergiescreening wären Assays zu nennen, mit denen die Menge an Histamin gemessen wird, welches aus Basophilen nach Behandlung mit Allergen freigesetzt wird („Basophil Histamine Release Assays“) [8; 42].

In seltenen Fällen werden Provokationstest zur Absicherung und zur Überprüfung der Aktualität der klinischen Symptome durchgeführt. Die Verabreichung des Allergens kann in unterschiedlichen Konzentrationen nasal, konjunktival, bronchial, alveolar oder oral erfolgen. Für die Diagnostik von Lebensmittelallergien werden Provokationstests, die hier in der Regel oral durchgeführt werden, als Goldstandard erachtet [1; 34]. Dabei werden die Nahrungsmittel nativ in steigenden Konzentrationen sublingual oder zum Schlucken verabreicht [43]. Im Unterschied zu Haut- oder *in-vitro*-Tests können mit Provokationstests neben echten Allergien auch Intoleranzen diagnostiziert werden. Idealerweise wird für die Diagnostik von Lebensmittelallergien ein doppelblinder, placebokontrollierter Provokationstest (DBPCFC, Double-Blind Placebo-Controlled Food Challenge) durchgeführt. Die praktische Bedeutung von doppelblinden Provokationstests ist allerdings wegen des hohen praktischen Aufwandes hauptsächlich in der klinischen Forschung zu suchen [42].

Ein Zusammenhang zwischen positivem Prick-Test, Nachweis von entsprechendem IgE im Blut und positivem Ergebnis in Provokationstests ist nicht in allen Fällen gegeben. Es wurden beispielsweise zwischen RAST- und Hauttests Übereinstimmungen von 67–100 % ermittelt, wobei sich die *in-vitro*-Methoden als unempfindlicher, aber selektiver (weniger falsch positive Ergebnisse) erwiesen [34; 39]. Histaminfreisetzung-Assays korrelieren zu ca. 87 % mit RAST-Tests und zu 74 % mit Prick-Tests, aber nur zu 50 % mit Provokationstests [42]. Allgemein kann

mit *in-vitro*- und Hauttests nur den Grad der Sensibilisierung erfasst werden, der nicht notwendigerweise mit der klinischen Aktualität korreliert. Bei klinischer Lebensmittelallergie wird zwar Antigen erkennendes IgE gefunden, bei positivem IgE-Test müssen aber nicht zwangsläufig klinische Symptome vorliegen [44]. Es bedarf daher in der Allergiediagnostik stets gründlicher Anamnese. Im Zweifelsfalle bedarf es einer Absicherung durch Provokationstests, welche jedoch nicht in Betracht kommen, wenn anhand der Historie schwere anaphylaktische Reaktionen zu erwarten sind [34; 45].

### 2.1.3 Therapie von Allergien

Mehrere Möglichkeiten bieten sich zur Therapie von Allergien an, die jedoch risikobehaftet sind, relativ geringe Erfolgsaussichten oder schlechte Langzeitprognosen aufweisen oder nur die Suppression von Symptomen bewirken. Eine allgemein bekannte Methode ist die Allergen-Immuntherapie, auch Hyposensibilisierung oder Impfstherapie genannt. Sie hat das Ziel, die Antwort auf die allergieauslösende Substanz zu verringern und damit die Schwere der allergischen Symptome zu reduzieren. Bei der subcutanen Immuntherapie werden dem Patienten steigende Mengen eines Allergenextrakts subcutan injiziert, und damit die Bildung von entsprechendem IgG induziert. Eine halbstündige ärztliche Überwachungsphase nach Allergengabe dient als Sicherheit im Falle von systemischen Reaktionen. Alternativen zur subcutanen Immuntherapie sind die orale und die sublinguale Immuntherapie, bei der ebenfalls Allergen in steigenden Mengen appliziert wird. Besonders die sublinguale Immuntherapie hat sich in den letzten Jahren als Alternative zur subcutanen Immuntherapie besonders für hoch sensibilisierte Allergiker etabliert, da die Erfolgsaussichten bei geringeren Risiken ähnlich sind [1; 46; 47; 48]. Vor jeder immuntherapeutischen Behandlung müssen allerdings die Erfolgsaussichten in Anbetracht der nicht unerheblichen Risiken in jedem einzelnen Fall beurteilt werden [49]. Immuntherapien werden oft erfolgreich zur Behandlung von Insektenstich-Allergien und zur Therapie von Inhalationsallergien (allergische Rhinokonjunktivitis, Asthma) eingesetzt [46; 50; 51; 52; 53]. Die Effizienz der Immuntherapie ist dagegen niedrig zur Behandlung von atopischer Dermatitis (Neurodermitis), Nesselsucht und Kopfschmerzen und kommt wegen des hohen Risikos einer systemischen Reaktion bei der Behandlung von Antibiotika- oder Lebensmittelallergien nicht in Betracht [4; 54; 55]. Als Mechanismus der Immuntherapie wird die Induktion von T-Zell-Toleranz propagiert. Es wurde beobachtet, dass durch Immuntherapie die allergeninduzierte Infiltration von CD4<sup>+</sup>-T-Lymphocyten supprimiert und die mRNA-Expression von Typ-T<sub>H</sub>1-Cytokinen erhöht wird [56].

Die Peptid-Immuntherapie ist ein neuer Ansatz zur Therapie von Allergien. Die dabei zugrunde liegende Idee ist, die Behandlung mit Peptiden durchzuführen, welche von T-Zellen erkannt werden, aber keine Überbrückung von IgE auf Mastzellen und damit keine schweren Nebenwirkungen bewirken können. Auch eine Therapie mit molekularbiologisch modifizierten Allergenen, bei denen durch eine Mutation eine deutlich verringerte IgE-Bindung bei gleich bleibender Stimulation von

T-Zellen erfolgt, erscheint erfolgversprechend [55]. Rekombinante DNA-Techniken erlauben die Herstellung von theoretisch unbegrenzten Mengen eines bestimmten Proteins mit konstanter Qualität [57]. Etwa 40 Lebensmittelallergene sind bereits in rekombinanter Form verfügbar und finden Anwendung zu diagnostischen Zwecken oder, als Allergen mit verminderter IgE-Erkennung, für die Immuntherapie [58; 59]. Beispielsweise wurden die wichtigsten Allergene der Erdnuss rekombinant mit Mutationen in IgE-bindenden Epitopen hergestellt. Die IgE-Bindung wurde dadurch deutlich geschwächt, ohne die T-Zell-Stimulation zu vermindern [60]. Bei Birkenpollenallergikern, die mit hypoallergenem, rekombinantem Birkenpollenallergen Bet v1 immunisiert wurden, zeigte sich eine signifikante Besserung der klinischen Symptome. Der Befund wurde mit Bildung von Antigen ererkennendem IgG durch T-Zell-Stimulation erklärt, wobei das IgG quasi als Kompetitor zu IgE fungiert. Zudem wurde eine Abnahme der Konzentration von Antigen ererkennendem IgE beobachtet [61]. Für der Entwicklung von oraler Toleranz spielen vor allem Antigen-präsentierende Zellen und verschiedene regulatorische T-Zellen eine Rolle [62].

Als weitere Möglichkeit für die Therapie von Allergien könnte sich zukünftig die DNA-Immunsierung erwiesen, die sich aber noch im experimentellen Stadium befindet. Es wurde beobachtet, dass Plasmid-DNA von Antigen-präsentierenden Zellen aufgenommen, translatiert und auf deren Oberfläche präsentiert werden kann. Der MHC-Komplex vermittelt daraufhin eine Zunahme der IgG<sub>2</sub>-Produktion und eine Suppression der IgE-Produktion. Die Immunsierung mit DNA-Sequenzen basiert dabei auf dem stimulatorischen Effekt von Cytosin-Guanin-Motiven auf Antigen-präsentierende Zellen und Killerzellen. Das Ziel ist, die Immunantwort vom allergischen T<sub>H</sub>2- auf den T<sub>H</sub>1-Phänotyp umzulenken [17; 63]. Die Anti-IgE-Immuntherapie basiert dagegen auf der Applikation von humanisierten monoklonalen anti-IgE-Antikörpern. Diese sollen freie IgE-Moleküle abfangen und damit deren Bindung an Mastzellen und Basophilen inhibieren [54; 64].

Für die medikamentöse Therapie von Allergien stehen u. a. Corticosteroidpräparate und Antihistaminika zur Verfügung, welche eine Linderung von Symptomen bewirken. Im Falle von akuten Schockzuständen muss zusätzlich rasche Injektion oder Inhalation eines Adrenalinpräparates zur Stabilisierung des Kreislaufs erfolgen [45; 55].

## 2.1.4 Grundlagen von Lebensmittelallergien

### 2.1.4.1 Abgrenzung und Symptome

Negative Reaktionen nach dem Verzehr von Lebensmitteln können verschiedene Ursachen haben. Beim Auslöser kann es sich zum einen um Bestandteile des Lebensmittels selbst, eingebrachte Allergene von beispielsweise Schimmelpilzen, Additive wie Konservierungsmittel oder um Kontaminanten handeln [43]. Es lassen sich primär toxische und nichttoxische Effekte unterscheiden. Bei den nicht-toxischen Effekten sind die nichtimmunmedierten Pseudoallergien und Intoleran-

zen (z. B. ideosynkratisch, enzymatisch, pharmakologisch) von den echten Allergien abzugrenzen, auch wenn in beiden Fällen ähnliche Symptome ausgelöst werden [65; 66]. Pseudoallergische Symptome werden zwar durch gleiche Mediatoren ausgelöst, das Immunsystem ist dabei jedoch nicht beteiligt. Pseudoallergien treten dosisabhängig auf und können bereits beim Erstkontakt mit dem Auslöser Symptome auslösen, da kein Sensibilisierungsschritt erfolgt [43; 67]. Ein Beispiel für eine Pseudoallergie ist die Histaminose, verursacht durch den Verzehr von mit biogenen Aminen belastetem Käse oder Rotwein. Weitere wichtige Pseudoallergene sind Farbstoffe (z. B. Azofarbstoffe), Konservierungsmittel (z. B. Sorbinsäure, Benzoat, Sulfite), Antioxidantien (z. B. Propylgallat, Tocopherol, BHT), Glutamat, Süßstoffe (z. B. Cyclamat, Aspartam), natürliche Inhaltsstoffe wie Salicylate und Benzoate [66]. Reaktionen infolge von Intoleranzen basieren auf Komplementantworten, auf Degranulation von labilen Basophilen oder Mastzellen oder auf Arachidonsäurestoffwechselstörungen. Zu den häufigsten Lebensmittelintoleranzen gehören die Zöliakie und die Lactoseintoleranz [66]. Zöliakie beruht auf autoimmunologischen Reaktionen gegenüber Gluten, Lactoseintoleranz manifestiert sich als Folge eines Enzymdefekts.

Wie in Kap. 2.1.1 erörtert, werden mit echten Lebensmittelallergien immunologische Reaktionen bezeichnet, bei denen ein IgE-Mechanismus zugrundeliegt [42]. Bis zu 8% der Kinder und 2% der Erwachsenen haben erwiesenermaßen Lebensmittelallergien, das subjektive Empfinden in der Bevölkerung ist allerdings deutlich höher [42]. Lebensmittelallergien lassen sich in zwei Klassen unterteilen. Bei Lebensmittelallergien der Klasse I (z. B. Allergien gegen Hühnerei, Kuhmilch oder Leguminosen) wird angenommen, dass die Sensibilisierung über den Gastrointestinaltrakt erfolgt, durch gegenüber gastrischem Verdau resistente Allergene. Lebensmittelallergien der Klasse I sind häufig bei Kindern anzutreffen und können in vielen Fällen mit zunehmendem Alter verschwinden. Lebensmittelallergien der Klasse II (z. B. Haselnussallergie) betreffen dagegen meist Jugendliche und Erwachsene. Es wird davon ausgegangen, dass zur Ausbildung von Lebensmittelallergien der Klasse II eine Sensibilisierung gegenüber Inhalationsallergenen vorausgegangen sein muss. Aufgrund von IgE-Kreuzreaktivitäten, die auf hoher Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz und Homologien in der Proteinstruktur beruhen, manifestiert sich die Lebensmittelallergie klinisch [58; 68].

Allergien, die aus einer Sensibilisierung gegenüber einem kreuzreaktiven Protein resultieren, werden auch Kreuzallergien oder pollenassoziierte Lebensmittelallergien genannt. Häufig sind beispielsweise Birkenpollenallergiker von Kreuzallergien betroffen. Einige Epitope des Birkenpollenallergens Bet v1 sind ähnlich zu Epitopen, die in Proteinen von Apfel, Kiwi, Sellerie, Steinfrüchten, Karotte oder Haselnuss vorkommen. Daher können bei Birkenpollenallergikern in etwa 70% der Fälle Allergien ausgelöst werden, wenn die genannten Früchte in roher Form verzehrt werden. Aufgrund der geringen Hitzestabilität mancher Allergene lösen einige dieser Früchte in wärmebehandelter Form keine Symptome mehr aus [69; 70]. Allergiker gegen Ragweed (Traubenkraut) sind oftmals allergisch gegen Melonen und Bananen, und Gräserpollenallergiker häufig gegen rohe Tomaten [62].

Viele Lebensmittelallergene zeichnen sich durch ihre Stabilität während der Lebensmittelverarbeitung aus. Allergene sind zudem meist resistent gegenüber Verdau im Gastrointestinaltrakt und weisen mindestens ein konformationsstabiles Epitop auf. Eine Vorhersage der Allergenität ist bisher nicht möglich [18]. Die meisten Lebensmittelallergene sind Glycoproteine mit einem Molekulargewicht von 10–60 kDa. In vielen Fällen bleibt die Allergenität nach Hitzeeinwirkung, Säureeinwirkung oder proteolytischem Verdau erhalten [42].

Im Rahmen einer Studie wurde bei Allergikern gegen Erdnüsse oder Baumnüsse (z. B. Haselnuss, Walnuss, Paranuss, Macadamia, Pekannuss) festgestellt, dass die Patienten in  $\approx 75\%$  der Fälle allergische Reaktionen bereits nach dem ersten wahrgenommenen Kontakt mit Erdnuss beobachteten. Dieser Sachverhalt wurde darauf zurückgeführt, dass in vielen Fällen Säuglinge bereits über die Muttermilch sensibilisiert werden. Oft erfolgt die Sensibilisierung auch durch ein Lebensmittel, in dem das Allergen nicht vermutet wird oder es handelt sich um Kreuzsensibilisierung [71].

Als die häufigsten allergieauslösenden Baumnüsse erwiesen sich Walnuss, Mandel, Haselnuss und Pekannuss. Im Mittel werden bei sensibilisierten Patienten allergische Symptome drei Minuten nach dem Verzehr beobachtet [72]. Die durch Lebensmittelallergien ausgelösten Symptome können vielschichtig sein. Systemische Reaktionen, wie Atemwegsverschluss, Krämpfe, Nesselsucht, Blutdruckabfall und Arrhythmie treten vorwiegend beim Verzehr großer Mengen des Allergens bzw. bei hochgradig sensibilisierten Allergikern auf (anaphylaktischer Schock) [73]. Die häufigsten mildereren Symptome sind Übelkeit, Schwellungen, Erythembildung, Konjunktivitis, Unterleibschmerzen, Juckreiz in Hals und Mund, Niesreiz, Erbrechen, Diarrhoe oder atopische Dermatitis [74; 75].

#### 2.1.4.2 Problematik der versteckten Allergene

Die allergene Karenz als Standardtherapie bei Lebensmittelallergien erweist sich oft als problematisch, da z. B. bei zusammengesetzten Lebensmitteln aus verschiedenen Gründen dem Verbraucher oft nicht alle Zutaten bekannt sind. Allergene, die sich unvorhergesehen im Lebensmittel befinden, etwa weil sich auf der Verpackung kein Hinweis befindet oder weil die Restaurantmahlzeit unvorhergesehene Zutaten enthält, werden daher „versteckte Allergene“ genannt [71]. In Kuchen sind meist Ei- und Milchprotein enthalten und nicht deklarierte Spuren von Erdnuss bzw. Haselnuss werden oftmals in bestimmten Produktgruppen wie Schokoladen und Backwaren gefunden [76]. Auch von Fischallergikern mit allergischen Reaktionen nach Verzehr von Hühnereiprodukten wurde berichtet und konnte auf Fischprotein enthaltendes Hühnerfutter zurückgeführt werden [1]. Etwa drei Viertel der Todesfälle durch Lebensmittelallergien sind auf Verzehr von Speisen in Restaurants oder Cafés zurückzuführen [77].

Alle Gastronomieprodukte bzw. verarbeiteten Lebensmittel sind für Allergiker potentiell gefährlich. Neben industriell hergestellten Lebensmitteln können auch Produkte z. B. von Restaurants (insbesondere von asiatischen bzw. orientalischen

Restaurants), Eisdielen und Bäckereien versteckte, nicht zu erwartende Allergene enthalten [55]. Hochgradig sensibilisierten Allergikern werden daher von ärztlicher Seite verschiedene Vorsichtsmaßnahmen angeraten, beispielsweise sich stets Allergenfreiheit bestätigen zu lassen, generell Buffets zu vermeiden, und bei Desserts und Mischungen wie Saucen, Dressings und Suppen vorsichtig zu sein [78].

Neben Schulungen zur Vermeidung von versteckten Allergenen brauchen hoch sensibilisierte Allergiker gezielte Einweisungen zur akuten Selbstmedikation mit z. B. Adrenalin, um das Risiko, einen anaphylaktischen Schock zu erleiden, zu senken bzw. um selbstständig Gegenmaßnahmen einleiten zu können [79; 80].

Bei einer Befragung von Erdnuss- und Baumnussallergikern wurde das Auftreten von allergischen Reaktionen nach Verzehr von Mahlzeiten außer Haus untersucht. Dabei stellten sich als die größten Risiken der Verzehr in asiatischen Restaurants (19%), Eisdielen (14%) und Bäckereien (13%) heraus. In 43% der Fälle wurden Allergien durch Desserts ausgelöst. In 50% der Fälle handelte es sich um versteckte Allergene in Soßen, Dressings u. ä. und 22% der Fälle wurden verursacht durch gemeinsam genutzte Utensilien, wie Kellen oder Eiskugelbereiter [74].

Als häufige Quellen für versteckte Allergene erweisen sich Fehler in der Formulierung, Wiederverwendung eines Produkts und ungenügende Reinigung von gemeinsam genutzten Geräten oder Anlagen, wie beispielsweise bei der Herstellung von Eiscreme, Backwaren, Frühstückscerealien oder Süßwaren [81]. Weitere mögliche Ursachen von Kontaminationen mit Allergenen sind kontaminierte Rohstoffe, gemeinsame Transportbehältnisse, ungenügende Kennzeichnung (insbesondere auch importierte Waren) und ungenügend hydrolysierte Proteinhydrolysate [34; 82]. Als weiteres Allergierisiko wurde die illegale Substitution von teureren Bestandteilen in Lebensmitteln erkannt. Derartige Kontaminationen mit Allergenen wurden u. a. in Süßwaren, Eiscreme, Fleischprodukten und Teigwaren gefunden [83]. Oft genannte mögliche Maßnahmen bei der Herstellung von Lebensmitteln, um das Kontaminationsrisiko zu verringern, sind die Prüfung von Herstellungsmethoden bei den Rohstofflieferanten (Auditierung), die Verwendung zertifizierter Rohstoffe, die Benutzung von separaten und saubereren Transportbehältnissen, die räumliche Trennung der Produktionslinien und die Durchführung zusätzlicher Reinigungsschritte [5].

Von einigen Lebensmittelherstellern werden Listen herausgegeben, in denen allergene Zutaten in Produkten ausgewiesen werden. Auch hier wird allerdings aus rechtlichen Gründen auf eine mögliche Kontamination bei Erzeugung, Transport oder Lagerung ausdrücklich hingewiesen [84].

Für die Lebensmittelindustrie ist in vielen Fällen eine Nulltoleranz von Allergenen aus praktischen Gründen nicht möglich. Es gibt oft keine Produktionslinien, auf denen ausschließlich ein einziges Produkt hergestellt wird. Zudem lassen sich Kreuzkontaminationen, die durch transportierte Stäube verursacht werden, auf praktischen Gründen oft nicht ausschließen und auch die Verlässlichkeit der Zulieferkette ist wesentlich. Die Aufnahme von Allergenen innerhalb von HACCP-Konzepten („Hazard Analysis and Critical Control Points“, vorbeugendes System zur Gewährleistung der Lebensmittelsicherheit), die zuverlässige Reinigung der

Produktionsanlagen und entsprechende Etikettierung der Produkte sind daher für eine Begrenzung des Risikos unumgänglich [85].

#### 2.1.4.3 Häufigkeit von Lebensmittelallergien

In den Vereinigten Staaten von Amerika sind  $\approx 6-8\%$  der Kinder unter 4 Jahren und  $\approx 2\%$  der Erwachsenen von Lebensmittelallergien betroffen. Jährlich werden dadurch in den Vereinigten Staaten ca. 30.000 Fälle von anaphylaktischem Schock, 2.000 Krankenhausaufenthalte und etwa 125 Todesfälle registriert [71]. Ein letaler anaphylaktischer Schock nach Verzehr von allergenen Lebensmitteln ist in über 90% der Fälle durch Allergene aus Erdnüssen oder Baumnüssen verursacht. Bei den Todesfällen handelt es sich in den meisten Fällen um Kinder und junge Erwachsene bis zu einem Alter von 30 Jahren mit klinischem Asthma [86].

Bis zu 22% der Bevölkerung nimmt Symptome nach dem Verzehr von bestimmten Lebensmitteln wahr, obwohl es deutlich weniger Fälle von echten Lebensmittelallergien gibt. Die Differenz lässt sich vermutlich auf Lebensmittelintoleranzen und auf psychologische Faktoren zurückführen [87].

Etwa 6% der amerikanischen Bevölkerung zeigt serologische Evidenz (Bildung von Antigen erkennendem IgE) gegenüber Erdnussproteinen, in den meisten Fällen treten jedoch keine klinischen Symptome auf [88]. In einer 1997 in den Vereinigten Staaten durchgeführten Untersuchung berichteten 1,4% der Befragten von Allergien gegen Erdnüsse oder Baumnüsse; Erwachsene mit 1,6% dabei häufiger als Kinder unter 18 Jahren mit 0,6%. Die Prävalenz von Erdnussallergien lag dabei mit 0,6% nur knapp über der Prävalenz von Haselnussallergien mit 0,5% [89; 90].

Insbesondere bei Erdnussallergien wurde eine Zunahme der Inzidenz beobachtet. In einer Altersgruppe amerikanischer Kinder war zwischen 1990 und 1994 die Häufigkeit knapp doppelt so groß wie in einer vergleichbaren Altersgruppe zwischen 1980 und 1984 [88; 91]. Im Vereinigten Königreich wurde ebenso beobachtet, dass bei Kindern die Häufigkeit der Sensibilisierung gegenüber Erdnuss zwischen 1989 und 1996 von 1,1% auf 3,3%, und der Erdnussallergien von 0,5% auf 1,0% stieg [88; 92]. In einer weiteren, im Jahre 1999 veröffentlichten Studie wurde dagegen beschrieben, dass im Vereinigten Königreich  $\approx 0,5\%$  der Erwachsenen und  $\approx 0,6\%$  der Kinder im Alter von 5–14 Jahren allergisch gegen Erdnüsse sind, häufig assoziiert mit weiteren Allergien wie Baumnussallergien [93]. In einer französischen Studie wurden sogar in 8% der Fälle bei Kindern unter 4 Monaten positive Prick-Tests beim Test auf Erdnuss beobachtet [88].

In einer Gruppe von Erdnuss- und Baumnussallergikern hatten 68% der Allergiker eine isolierte Erdnussallergie, 9% eine isolierte Baumnussallergie und 23% hatten kombinierte Erdnuss- und Baumnussallergien. Im Durchschnitt wurde bei Kindern die erste Reaktion gegen Erdnüsse im Alter von 14 Monaten und gegen Baumnüsse im Alter von 36 Monaten beobachtet, im Falle von Erdnuss oftmals beim ersten bekannten Kontakt. Die Schwere der Allergien wird in einigen Fällen sogar mit der Zeit schlimmer [94]. Junge atopische Kinder sollten daher Erdnüsse und Baumnüsse meiden, um weitergehende Sensibilisierung zu vermeiden [95].

Bei jungen Kindern verursachen Kuhmilch, Eier, Erdnüsse, Soja und Weizen  $\approx 90\%$  der Lebensmittelallergien bzw. Intoleranzen und bei Erwachsenen werden  $\approx 85\%$  der Lebensmittelallergien von Erdnüssen, Fisch, Krustentieren und Baumnüssen ausgelöst [12; 96]. Im Gegensatz zu Unverträglichkeiten gegen Kuhmilch, Hühnerei, Soja und Weizen verschwinden Allergien gegen Erdnüsse, Baumnüsse und Fisch bei Kindern daher nur in seltenen Fällen im späteren Alter [71; 97; 98]. Im Falle von Erdnussallergie entwickelt sich beispielsweise nur bei  $\approx 20\%$  der Kinder im späteren Alter eine Toleranz [78].

Obwohl die Menge an konsumierten Erdnüssen in China vergleichbar ist, ist die Häufigkeit an Allergien interessanterweise deutlich geringer als in den Vereinigten Staaten. Trotz des genetischen Einflusses der Allergieentstehung stellte sich heraus, dass die Häufigkeit von Erdnussallergien bei amerikanischen Staatsbürgern ähnlich der von chinesischen Einwanderern ist. Es wird daher vermutet, dass das unterschiedliche Auftreten der Allergien von der Allergenität der Erdnüsse abhängt, welche in hohem Maße von der Lebensmittelverarbeitung bzw. -zubereitung beeinflusst wird [88].

### 2.1.4.4 Lebensmittelallergene

Zu den wichtigsten Lebensmittelallergenen werden Proteine aus Hühnerei, Kuhmilch, Fisch, Krustentieren, glutenhaltigem Getreide, Erdnüssen und Schalenfrüchten gezählt.

Systematische Untersuchungen von Proteinen führte erstmals OSBORNE durch [99]. Die Proteine wurden dabei nach ihrer Löslichkeit in vier Klassen eingeteilt. Die üblichen Extraktionsmittel sind Wasser (Albumine), 0,5–1,0 M NaCl (Globuline), 60–70 % Ethanol (Prolamine) und verdünnte Säure oder Alkali (Gluteline). Oft werden für die Extraktion von Proteinen auch Zusätze wie Reduktionsmittel, Detergentien oder Chaotrope verwendet [19].

Anhand ihrer Funktion können Pflanzenproteine in Strukturproteine, metabolische Proteine, protektive Proteine und Speicherproteine eingeteilt werden. Es wurde festgestellt, dass fast alle Pflanzenallergene protektive Proteine oder Speicherproteine sind [19].

Von protektiven Proteinen, welche bei der Pathogenabwehr der Pflanze eine Rolle spielen, sind 17 Klassen bekannt (PR-1 bis PR-17, „pathogenesis-related“) [19; 68; 100]. Viele Lebensmittelallergene, beispielsweise von Avocado, Banane, Kastanie, Feige und Kiwi und das Latexallergen Hev b2, sind homolog zu pilzabwehrenden Proteinen vom Typ PR-2 ( $\beta$ -1,3-Glucanasen), was die Ursache für das Latex-Frucht-Syndrom (Kreuzallergie) ist. Wichtige Allergene homolog zu Proteinen vom Typ PR-10 (homolog zum Birkenpollenallergen Bet v1) kommen in Apfel, Kirsche, Birne, Karotte und Sellerie vor und auch das wichtigste Haselnussallergen Cor a1 zeigt Homologie zum Birkenpollenallergen Bet v1 [68].

Nahezu alle Proteine, die über den gastrointestinalen Weg allergische Reaktionen auslösen können, lassen sich in zwei auf strukturellen Ähnlichkeiten basierenden Superfamilien einteilen. Zur Prolamin-Superfamilie gehören die drei

Allergengruppen 2S-Albumine, Lipidtransfer-Proteine und  $\alpha$ -Amylase/Trypsin-Inhibitoren aus Getreide, welche hohe thermische und proteolytische Stabilität aufweisen [101]. Die Cupin-Superfamilie umfasst die wichtigsten Globulin-Speicherproteine vieler Pflanzenarten. Cupine sind Proteine mit einer gemeinsamen  $\beta$ -Fass-Struktur, oft als Doppelstrang- $\beta$ -Helix bezeichnet („jellyroll“). Neben den Mitgliedern der zwei Superfamilien sind zwei einzelne Proteine bekannt, welche über den gastrointestinalen Weg allergische Reaktionen auslösen können. Dabei handelt es sich um sog. Cysteinproteasen der C1-Familie, also um papainähnliche Proteasen [19].

Die globulären 11S-Speicherproteine und Euviciline (7S-Speicherproteine) sind zweidomänige Cupine. 11/12S-Globuline sind für Leguminosen charakteristisch und werden daher oft Legumine genannt [102]. Sie bestehen aus sechs nicht kovalent miteinander verbundenen Untereinheiten mit Molekulargewichten von je  $\approx 60$  kDa, entsprechend einer Gesamtmasse von 300–450 kDa. Jede Untereinheit besteht wiederum aus einer sauren ( $\approx 40$  kDa) und einer basischen ( $\approx 20$  kDa) Kette, welche über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. 11S/12S-Globuline sind selten glycosyliert und falten sich erst bei  $> 94^\circ\text{C}$  auf. Bei der SDS-Gelelektrophorese sind daher unter nichtreduzierenden Bedingungen Banden von 60-kDa-Ketten und unter reduzierenden Bedingungen Banden von 40-kDa- und 20-kDa-Ketten sichtbar [19; 103]. Glycine, die zu den Leguminen gehören, werden aus Precursor-Proteinen mit einem Molekulargewicht von  $\approx 60$  kDa synthetisiert [68].

7/8S-Globuline werden oft Viciline genannt (Gattungsname *Vicia*, Wicken) und sind typischerweise trimere Proteine mit Molekulargewichten von 150–190 kDa. Sie bestehen aus Untereinheiten von 40–80 kDa und sind häufig glycosyliert. Aufgrund vielfältiger proteolytischer Prozesse oder Glycosylierung bei der Biosynthese treten die Proteine als breites Pattern bei der SDS-PAGE auf. Viciline enthalten keine Disulfidbrücken und haben einen charakteristischen Temperaturübergang bei 70–75  $^\circ\text{C}$  [19; 103].

2S-Albumin-Speicherproteine werden als Einzelketten von 10–15 kDa synthetisiert, posttranslational prozessiert und bilden kleine und große Untereinheiten, welche meist über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Wichtige allergene 2S-Albumine sind z. B. in Erdnuss und Paranuss enthalten [104; 105].

Profiline binden an Actinmoleküle und sind damit bei der Regulation des Cytoskeletts beteiligt. Allergene Profiline kommen u.a. in Haselnuss und Erdnuss (Ara h5) vor [14; 68].

Bei der Lebensmittelverarbeitung werden oftmals physikalische und chemische Prozesse wie Hitzebehandlung, Hochdruckbehandlung, Mikropartikulation, Ultrafiltration, Bestrahlung, Proteolyse, Fermentation oder Raffination und biotechnologische Verfahren angewendet. Durch die Verarbeitung kann die Allergenität eines Lebensmittels beeinflusst werden [106; 107; 108]. Es wurden Versuche unternommen, mittels physikalischer oder chemischer Methoden Allergene aus Lebensmitteln zu entfernen oder Epitope zu modifizieren, um damit nicht- oder hypoallergene Lebensmittel herzustellen [109; 110; 111; 112; 113]. Es zeigte sich,

dass durch verschiedene Hitzebehandlungen die Allergenitäten von Proteinen unterschiedlich beeinflusst werden, typischerweise verursacht durch Veränderungen der dreidimensionalen Proteinstruktur (vgl. thermische Deaktivierung von Enzymen). Haselnussproteine verlieren beispielsweise bei trockenem Erhitzen bei 170 °C größtenteils ihre Allergenität [109]. Sowohl sequentielle Epitope als auch Konformationsepitope sind für die Auslösung von Allergien verantwortlich. Hauptsächlich bei durch Konformationsepitope ausgelösten Allergien wird die entsprechende Allergenität durch thermische Verfahren oder partielle Hydrolyse aufgehoben [62].

Im Rahmen einiger Studien zeigte sich, dass die klinische Reaktion eines Allergikers nach Verzehr von erdnusshaltigen Lebensmitteln auch stark von der Formulierung abhängt. Beispielsweise wurde bei Allergikern eine signifikante Erhöhung der Toleranz bei Steigerung des Fettgehalts in entsprechenden Lebensmitteln beobachtet [114]. Auch gibt es Hinweise, wonach allergische Reaktionen durch die Zugabe von bestimmten Polysacchariden wie Carrageen zum Lebensmittel abgeschwächt werden können [115].

Die Vorhersage von allergischen Kreuzreaktivitäten ist schwierig. Auch bei verwandten Pflanzen und strukturellen Homologien der Proteine sind deren Allergenitäten nicht notwendigerweise ähnlich. Beispielsweise ist die Kreuzreaktivität von IgE zwischen Erdnuss und Soja *in-vitro* oft hoch, klinische Kreuzreaktivität ist in diesem Fall dagegen relativ selten. Nur bei etwa 6,5 % der Erdnussallergiker werden allergische Symptome nach dem Verzehr von Soja beobachtet [116].

### 2.1.5 Erdnüsse

#### 2.1.5.1 Allgemeines

Die Erdnuss (*Arachis hypogaea* L.) gehört zur Familie der *Papilionaceae* (*Fabaceae*, *Leguminosae*, Schmetterlingsblütler), Subfamilie *Papilionoideae* [75]. Die Erdnusspflanze ist ein einjähriges Kraut mit bis zu 30–80 cm langen Sprossachsen. Die gelben Schmetterlingsblüten enthalten je einen mittelständigen Fruchtknoten mit 1–6 Samenanlagen und acht fertile und zwei sterile Staubblätter. Nach vollzogener Selbstbestäubung wächst der Karpophor (Fruchtträger) 5–6 cm in den Boden. Mittels ihrer Geokarpie (Erdfrüchtigkeit, Selbstpflanzler) erhöht die Erdnusspflanze die Aussicht auf Fortpflanzung. Die Frucht entwickelt sich innerhalb von 4–5 Monaten und enthält bis zu 4 Samen, die jeweils von einer rötlichen, dünnen Schale eingeschlossen sind [117]. Bei der Ernte werden die Sprosse mit daran hängenden Früchten aus dem Boden gehoben und getrocknet. Die Nüsse werden anschließend gedroschen bzw. maschinell gebrochen. Die Jahresproduktion von Erdnuss lag 2001/2002 weltweit bei  $\approx$  33 Mio. Tonnen. Haupterzeugerländer sind China, Indien, USA, Nigeria und Indonesien [118].

Die rohe Erdnuss enthält durchschnittlich 5,2 % Wasser, 25,3 % Protein, 48,1 % Fett, 12,1 % Kohlenhydrate, 7,1 % Ballaststoffe und 2,2 % Mineralstoffe. In der gerösteten Erdnuss sind durchschnittlich 1,6 % Wasser, 25,6 % Protein, 49,4 % Fett, 13,4 % Kohlenhydrate, 7,4 % Ballaststoffe und 2,6 % Mineralstoffe enthalten [119].

Die Zusammensetzung von Erdnüssen ist dabei weitgehend unabhängig von der Varietät. Aufgrund des hohen Fettgehaltes wird die Erdnuss zu den Ölsaaten gezählt. Obwohl die Erdnuss zu den Leguminosen gehört, ist sie morphologisch als Nuss zu sehen, da die Frucht der Erdnuss geschlossen bleibt. Erdnüsse wurden bereits um 3000–2000 v. Chr. in den Anden Boliviens angebaut. Bei der Entdeckung Amerikas kamen sie nur in kultivierter Form vor, eine Wildform ist nicht bekannt. Im 16. Jhd. gelangte die Erdnuss nach Afrika und verbreitete sich dann weltweit aufgrund ihres hohen Nährstoffgehalts [117].

Für die Gewinnung von Erdnussöl werden die gemahlene Samen zunächst warm gepresst und der Rückstand anschließend mit Hexan extrahiert. Erdnussöl ist eines der wichtigsten Speiseöle, dient aber auch der Margarineherstellung (Hydrierung) und wird auch für die Herstellung von Kosmetika verwendet [120]. Das extrahierte Erdnuss-Schrot wird in der Regel als Futtermittel verwendet oder dient gemahlen als Lebensmittel. Erdnüsse werden in den Erzeugerländern auch zu Brei, Fladen, Erdnussmehl oder Erdnussmilch verarbeitet, in USA ist Erdnussbutter beliebt und ganze Samen werden häufig in gerösteter (ca. 40 min bei 140°C) und gesalzener Form verzehrt [108; 117]. Oft ist Erdnuss auch in Frühstückscerealien, Eiscreme, Sirup, Saucen oder Suppen (Proteinzusatz) enthalten [8; 45].

Erdnüsse sind der häufigste Auslöser von letalen oder lebensbedrohlichen allergischen Reaktionen [121]. Zahlreiche Institute und Organisationen wie das „German Nut Council“ (Hamburg), das „Peanut Institute“ (Albany, GA, USA) oder das „American Peanut Council“ (Alexandria, VA, USA) zeugen von der wirtschaftlichen Bedeutung von Erdnüssen [118; 122; 123].

### 2.1.5.2 Erdnussproteine

Bereits im Jahre 1880 berichtete RITTHAUSEN über systematische Untersuchungen von Erdnussproteinen [124]. Die klassische Einteilung der Erdnussproteine beruht auf der Löslichkeit in Wasser (Albumine) und in Kochsalzlösung (Globuline). Die Globuline stellen die Hauptspeicherproteine der Erdnuss dar [45]. JOHNS und JONES berichteten 1916 über die Fraktionierung von Erdnuss-Globulinen mittels Ammoniumsulfat-Präzipitation. Dabei wurden zwei Hauptfraktionen gefunden und diese Arachin und Conarachin genannt [125; 126; 127]. Mit einem Massenanteil von  $\approx 24\%$  in entfetteter Erdnuss liegt der Gehalt der Arachin-Fraktion deutlich über dem von Conarachin mit  $\approx 9\%$  [128; 129; 130]. Modernere Verfahren zur Trennung von Proteinen aus Erdnuss bedienen sich elektrophoretischen oder chromatographischen Methoden, zumeist mittels Ionenaustauschchromatographie bzw. Gelfiltration [131; 132].

Die Menge von mit wässrigem Puffer extrahierbaren Proteinen ist bei rohen oder blanchierten Erdnüssen verschiedener Varietäten ähnlich ( $\approx 20\%$  der gesamten Erdnuss), bei stark gerösteten Erdnüssen sinkt dagegen der Anteil von extrahierbaren Proteinen auf bis zu  $\approx 10\%$ . Aus trocken gerösteten Erdnüssen ist

dabei deutlich weniger Protein extrahierbar als aus in Öl gerösteten Erdnüssen [133; 134].

Über 30 verschiedene Erdnussproteine sind bekannt, klinisch am relevantesten sind die Speicherproteine Ara h1, Ara h2 und Ara h3, wobei es sich um Glycoproteine mit Molekulargewichten von 64,5 kDa, 17,5 kDa und 14 kDa handelt [135; 136]. Die Allergene Ara h1 bis Ara h3 gehören zur Vicilin-, Conglutin- bzw. Glycinin-Familie [68]. Die Erdnussallergene Ara h1 bis Ara h8 wurden rekombinant hergestellt.

Das Erdnussallergen Ara h1 wird auch Conarachin genannt und ist ein 7S-Globulin (Vicilin). Der Gehalt von Ara h1 bezogen auf das Gesamtprotein in Erdnuss beträgt  $\approx 12\text{--}16\%$  [137; 138]. Ara h1 bildet stabile Homotrimeren (Selbstassoziation), welche bei Hitzebehandlung in Folge von Quervernetzungen (Maillard-Reaktionen) weiter stabilisiert werden. [139; 140; 141; 142; 143; 144; 145]. Die Allergenität (Erkennung durch IgE) bleibt den Trimeren dabei erhalten [146]. Ara h1 besteht aus 626 Aminosäuren und enthält 23 IgE-Epitope, von denen vier immundominant sind und von  $> 80\%$  der Erdnussallergiker erkannt werden [145; 147]. Ara h1 ist stabil gegenüber mehreren Proteasen (z. B. Pepsin), hitzestabil bis  $\approx 75^\circ\text{C}$  und erscheint bei SDS-PAGE als Bande bei 63,5 kDa [148; 149]. Der isoelektrische Punkt von Ara h1 beträgt 4,55 [150]. Ara h1 wurde mittels Ionenaustausch- und Gelchromatographie aufgereinigt [151; 152; 153]. Thermisch induzierte Konformationsänderungen von isoliertem Ara h1 hatten keine Veränderung der Allergenität zur Folge [152].

Ara h2 ist ein schwefelreiches 2S-Albumin der Prolamin-Superfamilie (Conglutin) und besteht aus 156 Aminosäuren mit 10 IgE-Epitopen [59; 142; 154; 155]. Der Gehalt von Ara h2 in Erdnuss beträgt 5,9–9,3% bezogen auf das Gesamtprotein [137]. Hitzebehandlung von Ara h2 führt zu intramolekularen Quervernetzungen und damit zu erhöhter Stabilität gegenüber Verdauungsenzymen [144]. Ara h2 erscheint in der SDS-PAGE als Doppelbande bei 17 und 20 kDa und hat einen isoelektrischen Punkt von 5,2 [153; 156].

Das Erdnussallergen Ara h3, auch Arachin (Legumin) genannt, ist ein 11S-Globulin (Glycinin) der Cupin-Superfamilie und besteht aus 510 Aminosäuren und 4 IgE-bindenden Epitopen [64; 157; 158; 159]. Ara h3 bildet Hexamere, ist thermostabil bis  $92^\circ\text{C}$  und wurde chromatographisch gereinigt [160; 161]. Ara h3 erscheint in der SDS-PAGE als dicke Bande bei 61 kDa. Als Untereinheiten von Ara h3 wurden saure und basische Polypeptide identifiziert, die bei der SDS-PAGE als Banden bei 14, 16, 25, 28, 42 und 45 kDa sichtbar sind [160]. Insbesondere die basischen Untereinheiten zeigen hohe Übereinstimmung mit verwandten Lupin- und Sojaproteinen, woraus hohe Kreuzreaktivitäten entsprechender Antikörper resultieren [162; 163; 164]. Es wurde herausgefunden, dass die Epitope von Ara h3 nicht an der Ausbildung der Tertiärstruktur beteiligt sind und hohe Thermostabilität aufweisen [165].

Ara h4 ist eine Isoform von Ara h3 mit einer Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz von 91% [142]. Ara h4 erscheint als Bande bei 54 kDa [143].

Das Erdnussallergen Ara h5 ist ein Profilin (Actin-bindendes Protein) und hat ein Molekulargewicht von 14 kDa [143].

Ara h6 ist ein 2S-Albumin der Prolamin-Superfamilie und homolog zu Conglutin. Das Molekulargewicht von Ara h6 beträgt 14,5 kDa [68; 142; 143; 166].

Das Erdnussallergen Ara h7 ist ebenfalls ein 2S-Albumin und wird zur Prolamin-Superfamilie (homolog zu Conglutin) gerechnet. Ara h7 hat ein Molekulargewicht von 15,8 kDa [68; 143].

Ara h8 ist dagegen ein PR-10-Protein und homolog zum Birkenpollenallergen Bet v1. Das Molekulargewicht beträgt 17 kDa [167].

Lectine (Agglutinine) binden selektiv an Kohlenhydratseitenketten von Glycoproteinen und kommen vor allem in Leguminosen vor. Das Agglutinin in Erdnuss hat ein Molekulargewicht von 31 kDa. Lectine können unspezifisch mit IgE-Zuckerresten reagieren und als Pseudoallergen dadurch allergieähnliche Symptome auslösen [19; 68; 168].

Bezüglich der Ermittlung des wichtigsten Erdnussallergens gibt es unterschiedliche Ansichten. In einer australischen Studie wurde beispielsweise in jedem Serum IgE gegen Ara h3 gefunden [169]. In einer in den Vereinigten Staaten durchgeführten Untersuchung erwiesen sich Ara h1 und Ara h2 als die wichtigsten Allergene, da sie von über 95 % der Seren von sensibilisierten Personen erkannt wurden [159]. In einer niederländischen Studie wurde dagegen Ara h2 von den meisten Patientenseren erkannt, Ara h1 und Ara h3 deutlich seltener [170]. In einer italienischen Studie wurde wiederum beobachtet, dass die basische Untereinheit von Ara h3 in  $\approx 95\%$  der Fälle von Serum aus Kindern mit Erdnussallergien gebunden wurde [171]. Es kann also festgehalten werden, dass die Allergene Ara h1 bis Ara h3 vermutlich die drei wichtigsten Erdnussallergene sind.

Bei gerösteten Erdnüssen ist zwar aufgrund der beim Rösten stattgefundenen Maillard-Reaktionen bzw. Denaturierungsprozesse die Menge extrahierbarer Proteine geringer. MALEKI et al. beobachteten in kompetitiven Immunoassays aber von einer 90fach erhöhten IgE-Bindungskapazität von Proteinen aus gerösteten Erdnüssen gegenüber Proteinen aus rohen Erdnüssen. Die stärkere Bindung von Proteinen aus gerösteten Erdnüssen wurde mit verbesserter Exposition entsprechender Epitope bzw. Bildung von neuen IgE-Bindungsstellen erklärt [172]. SAMPSON et al. stellten fest, dass beim Rösten im Vergleich zum Kochen oder Frittieren infolge der höheren Temperaturen die Allergenität der drei wichtigsten Erdnussallergene deutlich gesteigert wird [88]. GRUBER et al. stellten bei der Auswertung von IgE-Westernblots ebenso fest, dass die Allergenität der gerösteten Proteine signifikant erhöht ist [173]. Der Anteil von Ara h1 am Gesamtprotein wird durch Frittieren oder Kochen im Gegensatz zum Rösten reduziert. Die IgE-Bindung von Ara h1 bis Ara h3 aus frittierten oder gekochten Erdnüssen ist zudem signifikant schwächer als von Ara h1 bis Ara h3 aus gerösteten Erdnüssen. Frittieren oder Kochen bei 120 bzw. 100 °C scheint also die Allergenität von Erdnüssen zu verringern, Rösten bei hohen Temperaturen von 150–170 °C die Allergenität zu erhöhen [106]. Beim Kochen von Erdnüssen wurde zudem ein signifikanter Übertritt von niedermolekularen Proteinen in das Kochwasser beobachtet, was vermutlich eine wichtige Ursache für die verminderte Allergenität von gekochten Erdnüssen ist [108; 174]. Bei den aufgrund von thermischer Behandlung unlöslich gewordenen

Proteinen konnte unter Amylase- bzw. Säureeinwirkung partiell wieder Solubilität und Allergenität zurückgewonnen werden [107].

Aufgrund von botanischen Verwandtschaften der Pflanzen zeigen Erdnussproteine Homologien zu entsprechenden Sojaproteinen [175]. Auch gibt es strukturelle Verwandtschaften der Erdnussproteine untereinander. Monoklonale Antikörper (IgM), die gegen eine Erdnussfraktion von 15–25 kDa erzeugt wurden, erkannten neben einer Fraktion bei 25 kDa auch weitere Proteine bis 55 kDa [176].

Über das Studium der IgE-Bindungsverhalten der Allergene und die Einführung gezielter Mutationen verspricht man sich eine Reduktion der Allergenität [159; 177; 178]. Neue Ansätze beschäftigen sich mit der Verringerung der Allergenität durch eine Modifizierung bzw. durch Abschaltung entsprechender Proteine [179]. Erdnusspflanzen, die durch Abschaltung entsprechender Gene erhalten wurden, zeigten bislang allerdings noch keine Fruchtbildung [180; 181; 182]. Es wurde auch versucht, die Allergene in Erdnuss durch Fermentierungsprozesse zu inaktivieren, was aber nur bis zu  $\approx 70\%$  gelang [110].

### 2.1.5.3 Erdnussallergien

Eine Erdnuss enthält im Mittel etwa 200 mg Protein, subjektive allergische Symptome werden aber bereits nach Ingestion von 100  $\mu\text{g}$  Erdnussprotein und objektive Symptome nach Ingestion von 2–50 mg Erdnussprotein beobachtet. Die Symptome erscheinen innerhalb von 60 Minuten und können bis zu 4 Stunden nach Aufnahme des Allergens andauern [34; 183].

Bei einer Untersuchung mit 60 Erdnussallergikern wurde herausgefunden, dass nur 10% auf rohes Erdnussöl reagieren, raffiniertes Öl verursachte bei keinem Patienten Symptome, offenbar wegen Entfernung der Proteine während des Raffinationsprozesses [184]. Die Fettzusammensetzung in der Erdnuss scheint dagegen keinen Einfluss auf die Allergenität zu haben. Bei Erdnüssen mit höherem Ölsäuregehalt wurde jedenfalls keine veränderte Allergenität festgestellt [185].

Das Serum der meisten Patienten mit Erdnussallergie enthält IgE, welches Ara h1, h2 oder h3 erkennt. Obwohl andere Leguminosen ähnliche Proteine enthalten, haben weniger als 15% der Erdnussallergiker auch Allergien gegen andere Leguminosen. Erstaunlicherweise haben aber 30–50% der Erdnussallergiker auch Allergien gegen Baumnüsse wie Haselnüsse, Walnüsse, Cashews oder Pistazien, obwohl diese zu einer anderen botanischen Familie gehören [186].

In einer Gruppe von Erdnussallergikern, die zu  $\approx 85\%$  gestillt worden waren, wurden in mehr als 70% der Fälle allergische Symptome beim ersten wahrgenommenen Kontakt mit Erdnuss bemerkt. Da IgE die Plazenta nicht passieren kann, deutet dies auf eine Sensibilisierung im Uterus bzw. während des Stillens hin [88]. Nach Verzehr von Erdnüssen können jedenfalls Erdnussallergene in der Muttermilch nachgewiesen werden [187].

Allergische Reaktionen wurden bei sensibilisierten Patienten bereits durch Inhalation von Erdnusspartikeln in Flugzeugen verursacht. Offensichtlich erfolgte hier eine Verbreitung von Partikeln über das Lüftungssystem [80; 188]. Es sind sogar

Fälle bekannt, bei denen Erdnussallergiker bedroht wurden, indem allergenhaltige Lebensmittel als Waffe eingesetzt wurden [189; 190].

## 2.1.6 Haselnüsse

### 2.1.6.1 Allgemeines

Die Haselnuss, botanisch *Corylus avellana* L., gehört zur Familie der *Betulaceae* (Birkengewächse). Aufgrund des verholzten Perikarps ist die Frucht eine echte Nuss. Der Haselnuss-Strauch ist einhäusig und wächst sympodial, der Haupttrieb wird also von aneinandergereihten Sproßgenerationen gebildet. Die männlichen Blüten befinden sich in dichasialen (gleich starke Seitentriebe bei Verzweigung) Teilblütenständen an langen Kätzchen, die dichasialen 8–16 weiblichen Blüten bleiben jeweils von einer Knospe umhüllt. Die Blütezeit liegt zwischen Januar und März, die Nüsse entwickeln sich bis Herbst und sind von einer blattähnlichen Hülle (Cupula) umgeben. Der Samen ist von einer fest anliegenden Samenschale umhüllt. Die Nuss enthält durchschnittlich 5,2 % Wasser, 12,0 % Protein, 61,6 % Fett, 11,4 % Kohlenhydrate, 7,4 % Ballaststoffe und 2,4 % Mineralstoffe [119]. Das Öl ist nur wenig haltbar und findet Verwendung als Speiseöl, in der Ölmalerei, in der Kosmetik und zur Herstellung von Ölsäure. Die Samen werden häufig roh verzehrt oder gemahlen für die Herstellung von Backwaren, Süßwaren und Speiseeis verwendet [117].

### 2.1.6.2 Haselnussproteine

Bei rohen Haselnüssen schwankt die Menge extrahierbarer Proteine bezogen auf ganze Haselnuss je nach Varietät von 6,6–12,4 %. Bei gerösteten Haselnüssen sinkt die Menge an extrahierbarem Protein auf bis zu 3,8 % [191].

Als eines der wichtigsten Haselnussallergene wird Cor a1.04 von vielen Patientenseren erkannt. Das Allergen ist homolog zum Birkenpollenallergen Bet v1 und hat ein Molekulargewicht von 18 kDa. Cor a1.04 ist ein hitzelabiles, protektives Protein (PR-10) und wurde rekombinant hergestellt [14; 192; 193]. Das Haselnussallergen Cor a8 ist ein hitzestabiles Lipid-Transferprotein und hat ein Molekulargewicht von 9 kDa [192]. Cor a9, auch unter dem Trivialnamen Corylin bekannt, hat ein experimentell bestimmtes Molekulargewicht von 35 kDa. Cor a9 ist ein 11S-Speicherprotein der Cupin-Superfamilie und wurde ebenfalls rekombinant hergestellt [161; 192; 194]. Das Haselnussallergen Cor a11 ist ein 7S-Globulin (Vicilin) und gehört zur Cupin-Superfamilie. Es hat ein Molekulargewicht von 47 kDa und bildet Trimere. Haselnuss-Profilin ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 14 kDa und zeigt Homologie zum Birkenpollenallergen Bet v2 [195].

### 2.1.6.3 Haselnussallergien

Allergien gegen Haselnüsse sind in den meisten Fällen verknüpft mit Pollenallergien (z. B. Birke, Erle, Hasel, Buche, Eiche), es wurden allerdings auch nicht-pollenassoziierte Haselnussallergene identifiziert [196]. In  $\approx 50\text{--}70\%$  der Fälle werden bei Baumpollenallergikern Allergien gegen Haselnussproteine festgestellt [8; 197]. Die minimale Dosis für die Auslösung von allergischen Reaktionen wurde mit 1–100 mg Haselnussprotein, entsprechend 6,4–640 mg Haselnuss ermittelt [198]. Schwere asthmatische Reaktionen wurden beispielsweise bei Allergikern bereits nach Verzehr von 3–6 g einer mit 0,2 % Haselnuss belasteten Schokolade beobachtet (6–12 mg Haselnuss) [199].

Bei SDS-PAGE mit Immunoblotting und EAST-Versuchen unter Verwendung von Humanserum zeigten WIGOTZKI et al., dass die Allergenität von verschiedenen Haselnussprodukten durch die Prozessierung meist sinkt, aber nicht eliminiert wird [200].

In Untersuchungen mit einer Simulation von gastrischem und duodenalem Verdau zeigten VIETHS et al., dass Haselnussproteine weniger stabil gegenüber Verdau sind als Erdnussproteine [201]. Nach dem Verdau wurde bei Haselnussextrakt weder Bindung eines anti-Haselnuss-Kaninchenserums noch von Seren von Haselnussallergikern in SDS-Immunoblots beobachtet. Im Falle Erdnuss war die Bindung durch das Serum nach dem Verdau deutlich abgeschwächt, aber immer noch vorhanden. Unter den nativen Bedingungen im EAST wurde eine Reduktion der Bindungskapazität von Haselnussproteinen um 90 % festgestellt, verglichen mit 50 % bei Erdnussproteinen.

### 2.1.7 Gesetzliche Bestimmungen

Lebensmittel, die in Fertigpackungen gewerbsmäßig in den Verkehr gebracht werden, müssen mit den in § 3 der Lebensmittel-Kennzeichnungsverordnung (LMKV) vorgeschriebenen Kennzeichnungselementen (z. B. Verkehrsbezeichnung, Zutatenverzeichnis) versehen sein. Bei kleinen Fertigpackungen (größte Einzelfläche weniger als  $10\text{ cm}^2$ ) können allerdings einige Angaben entfallen, darunter das Verzeichnis der Zutaten. Auch beim Verkauf von loser Ware muss kein Zutatenverzeichnis angegeben werden, da die LMKV nicht auf lose Ware anwendbar ist [202]. Mögliche Kreuzkontaminationen müssen zudem prinzipiell nicht deklariert werden [7]. Zum Ausschluss von Haftungsrisiken bringt der Hersteller allerdings nach den Grundsätzen der Produkthaftung oftmals einen Warnhinweis an, wenn er bei der Produktion mit Kreuzkontakt mit einem allergenen Lebensmittel zu rechnen hat. Diese Kennzeichnung (z. B. „Produkt kann Spuren von Erdnuss enthalten“) sollte jedoch Ausnahme bleiben und nicht grundsätzlich zur Absicherung vor Haftungsrisiken aufgedruckt werden [203].

In den meisten Fällen sind allergische Reaktionen nach dem Verzehr von industriell hergestellten Produkten allerdings darauf zurückzuführen, dass auf das

Allergen nicht hingewiesen wird. Ein häufiger Grund hierfür war die bisher gültige 25-%-Regel, wonach Bestandteile von zusammengesetzten Zutaten nicht angegeben werden mussten, wenn diese Zutat weniger als 25 % des Enderzeugnisses ausmacht. Demnach enthielten Produkte mit der Zutat „Gewürz“ in einigen Fällen Sellerie und Produkte mit der Zutat „Nougat“ enthalten Haselnuss, ohne dass Sesam bzw. Haselnuss explizit aufgeführt werden mussten. Des Weiteren müssen Zusatzstoffe (z. B. Sulfite) im Rohstoff, die im Endprodukt keine technologische Funktion ausüben, nicht deklariert werden („carry-over“-Prinzip). Auch bei neu entwickelten Produkten oder bei Produkten mit geänderten Zusammensetzungen ist vielen Verbrauchern oft nicht klar, welche Allergene enthalten sein können (z. B. Sojaprotein in Brot) [204].

Mit der Richtlinie 2003/89/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 10.11.2003 wurde die Richtlinie 2000/13/EG vom 20.03.2000 novelliert [6; 205]. Hintergrund für die Novellierung ist die Verbesserung der Lebensmitteletikettierung in Hinblick des Gesundheitsschutzes speziell von Verbrauchern mit Lebensmittelallergien und Intoleranzen. In Anhang IIIa der Richtlinie 2003/89/EG sind die Zutaten aufgeführt, die auf der Verpackung angegeben werden müssen, wenn diese selbst oder daraus gewonnene Zutaten, z. B. Öle, bei der Herstellung von Lebensmitteln verwendet wurden [206]. Dabei handelt es sich um:

- glutenhaltiges Getreide
- Krebstiere und -erzeugnisse
- Eier und -erzeugnisse
- Fisch und -erzeugnisse
- Erdnuss und -erzeugnisse
- Soja und -erzeugnisse
- Milch und -erzeugnisse, Lactose
- Schalenfrüchte und -erzeugnisse
- Sellerie und -erzeugnisse
- Senf und -erzeugnisse
- Sesamsamen und -erzeugnisse
- Schwefeldioxid und Sulfite bei Konzentrationen  $>10$  mg/kg oder  $>10$  mg/L

Die Richtlinie bezieht sich allerdings nur auf allergene Bestandteile oder Erzeugnisse, die im Lebensmittel als Zutat eingesetzt werden. Unbeabsichtigt eingetragene Allergene, beispielsweise aufgrund kontaminierter Rohstoffe, aufgrund technisch unvermeidbarer Einträge oder durch Kreuzkontaminationen während des Produktionsprozesses, bleiben weiterhin unberücksichtigt und sind über die allgemeine Produkthaftung des Herstellers abgedeckt [206]. Für das Inkrafttreten der Richtlinie 2003/89/EG wurde der 25.11.2004 festgelegt, mit einer Übergangsfrist bis 25.11.2005. In der Übergangsfrist durften Produkte, welche der Richtlinie noch nicht entsprachen, bis zur Erschöpfung der Lagerbestände verkauft werden. Mit der Richtlinie wurde auch die 25-%-Regel abgeschafft und damit für den Verbraucher die Zusammensetzung der Lebensmittel transparenter. Die Umsetzung der Richtlinie in deutsches Recht erfolgte im Rahmen einer Änderung der LMKV.

Zum Schutz von Verbrauchern, die unter Lebensmittelallergien oder Intoleranzen leiden, ist die vollständige Kennzeichnung aller möglicherweise enthaltenen Allergene und Pseudoallergene auf dem Etikett von Lebensmittelverpackungen vermutlich der einzig gangbare Weg. Die Festlegung von ADI-Werten, wie bei Lebensmittelzusatzstoffen oder Toxinen üblich, oder sogar Nulltoleranz ist aus verschiedenen Gründen bei Allergenen nicht sinnvoll [207].

## 2.2 Analytik von Allergenen

### 2.2.1 Anforderungen an die Analytik

Die geringsten Dosen, bei denen in Provokationstests allergische Symptome ausgelöst wurden, liegen bei Erdnuss bei 0,25–125 mg ganzer Erdnuss. Absolute Schwellenwerte sind experimentell kaum zu ermitteln, da die individuellen Sensibilisierungsgrade stark unterschiedlich sind [10]. Provokationstests sind zudem oft nicht vergleichbar, da sie zur Vermeidung eines hohen Aufwandes oft nicht placebokontrolliert und doppelblind durchgeführt werden. Außerdem sind die verwendeten Proben nicht standardisiert. Auch muss zwischen subjektiven und objektiven Reaktionen unterschieden werden [208]. In einem Konsensprotokoll wurde festgehalten, dass bei den meisten Allergikern die Grenze für die Auslösung von Symptomen bei einer Menge allergener Proteine im unteren Milligrammbereich liegt [10].

Mittels Modellrechnungen ermittelten BINDSLEV-JENSEN et al. Schwellenwerte für die Auslösung von allergischen Symptomen, basierend auf Daten von veröffentlichten Provokationstests. Demnach werden nach dem Verzehr von 20 µg ganzer Erdnuss allergische Reaktionen bei einer Person in einem Kollektiv von einer Million Erdnussallergiker erwartet. Wird ein Kollektiv von einhundert Allergikern zugrunde gelegt, beläuft sich der berechnete Schwellenwert auf 2,7 mg ganze Erdnuss, welcher nach Verzehr allergische Reaktionen bei einer Person auslöst [9].

Für die Akzeptanz von Methoden sollte die Nachweisgrenze des Allergens im Lebensmittel zwischen 1 und 100 mg/kg liegen, möglichst aber unter 10 mg/kg [81]. Oft ist die erreichbare Nachweisgrenze jedoch unzureichend, wenn eine Minor Komponente als Target ausgewählt wurde [8]. Eine weitere Anforderung an die Analytik speziell von Lebensmittelallergenen ist zufriedenstellende Selektivität auch bei verarbeiteten Lebensmitteln. Außerdem soll der Test schnell und einfach durchzuführen sein [8; 11].

### 2.2.2 Analytische Methoden

Methoden für den Nachweis von Allergenen in Lebensmitteln basieren auf dem Nachweis von Protein oder DNA [8]. Es wird also entweder ein ausgewähltes (evtl. allergenes) Protein selbst gemessen oder ein Marker, der auf die Anwesenheit des Proteins hinweist. DNA und Proteine, respektive deren Gehalt, können allerdings

durch Verarbeitungsprozesse, insbesondere bei thermischer Behandlung, unabhängig und in unterschiedlicher Weise modifiziert werden [8].

### 2.2.2.1 Proteinchemische Methoden

Für die proteinchemische Analytik von Lebensmittelallergenen erfolgt zunächst eine Extraktion des Lebensmittels mit einem der OSBORNE-Fraktion entsprechenden Extraktionsmittel. Bei der Extraktion von Proteinen aus Nüssen und Saaten ist zu beachten, dass Probleme durch den hohen Fettgehalt z. B. bei anschließender elektrophoretischer oder chromatographischer Trennung auftreten können. Die Proben werden daher vor der Extraktion häufig mit Hexan oder Aceton entfettet [209]. Zur Auftrennung der Proteine werden oft ein- oder zweidimensionale Gelelektrophoresen durchgeführt. Mittels Polyacrylamid-Elektrophorese (PAGE) lassen sich die Proteine anhand ihrer molekularen Masse trennen, unter denaturierenden (SDS-PAGE) reduzierenden oder nichtreduzierenden Bedingungen oder auch nativ [38; 210]. Die Auftrennung der Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt erfolgt mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF). Für immunchemische Untersuchungen wird das Gel mit den elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Membran (z. B. Nitrocellulose, Nylon, Polyvinylidendifluorid, Polypropylen) geblottet und beispielsweise mit Patientenserum, Serum von immunisierten Wirbeltieren oder monoklonalem Antikörper (Immunoblot, Western Blot) inkubiert [38]. Mittels zweidimensionaler PAGE lassen sich insbesondere Isoallergene identifizieren, die aufgrund nur geringer Unterschiede in der Aminosäuresequenz zwar sehr ähnliche Molekulargewichte, aber unterschiedliche isoelektrische Punkte haben [7].

Chromatographische Methoden bedienen sich häufig Ionenaustauschermedien, Gelsäulen, Umkehrphasen, hydrophoben Interaktionsmedien und Affinitätssäulen [151; 209; 211]. Zunehmende Bedeutung hat die massenspektrometrische Proteinanalytik erlangt, um Proteinmassen zu bestimmen (MALDI-TOF-MS) oder um eine C-terminale Sequenzierung durchzuführen [38].

### 2.2.2.2 Molekularbiologische Methoden

Methoden zur Detektion von DNA basieren meist auf deren Amplifikation mittels PCR-Techniken. Die amplifizierte DNA wird gewöhnlicherweise mittels Fluoreszenzfarbstoff oder Southern-Blotting nach Elektrophorese in einem Agarosegel qualitativ detektiert [8]. Ein Vorteil von DNA-basierten Methoden ist die effizientere und matrixunabhängigere Extraktion der DNA im Vergleich zu Proteinen. Ein weiterer Vorteil von PCR-Techniken ist die kürzere Entwicklungsdauer der Methode, wenn die DNA-Sequenz bekannt ist; die Generierung von Antikörpern für die Verwendung in Immunoassays ist dagegen relativ langwierig [7]. Dennoch sind PCR-Techniken durch Degradation von DNA während der Verarbeitung limitiert, und bei quantitativer PCR werden durchaus Matrixeffekte bei der Quantifizierung beobachtet [7].

Bei der real-time-PCR wird die Amplifizierung in Echtzeit beobachtet. Dazu wird beispielsweise eine Sonde verwendet, welche einen „Reporter“- und einen „Quencher“-Farbstoff enthält. Durch deren Nachbarschaft wird eine Fluoreszenz verhindert. Die Sonde heftet sich nach Denaturierung der DNA zunächst an einen DNA-Einzelstrang und wird dann durch die 5'-Exonucleaseaktivität der Polymerase gespalten. Die Erhöhung des Fluoreszenzsignals ist proportional zur Menge des PCR-Produkts. Bei real-time-PCR-Methoden können daher quantitative Ergebnisse erhalten werden [8].

Beim PCR-ELISA wird zunächst mittels entsprechender Primer ein definiertes DNA-Fragment amplifiziert. Das PCR-Produkt wird denaturiert und auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Anschließend erfolgt die Hybridisierung mit einer speziellen DNA-Sonde, welche nach Zugabe eines markierten Antikörpers quantifiziert werden kann [8].

### 2.2.2.3 Immunchemische Methoden

Immunchemische Methoden ermöglichen die qualitative und quantitative Analyse sowohl von kleinen Molekülen (Haptene) als auch von Proteinen (Antigenen). Durch die Auswahl geeigneter Antikörper können Immunoassays mit hoher Empfindlichkeit, Selektivität, Robustheit, Automatisierbarkeit und hohem Durchsatz entwickelt werden. Die wichtigsten Methoden zur Proteinanalytik mit immunchemischer Detektion sind der Radioallergosorbent-Test (RAST), der Enzymallergosorbent-Test (EAST), die Rocket-Immunelektrophorese (RIE), das Immunoblotting und der Enzymimmunoassay (ELISA). RAST und EAST finden dabei vorwiegend in der klinischen Allergiediagnostik Verwendung. Beim Dot-Immunoblot werden die Proteine auf eine Membran gespottet und mittels Zugabe von Antikörper semiquantitativ detektiert [8]. Bei der RIE migrieren Antigene in einem Antikörper-enthaltendem Gel, bis Antigen-Antikörper-Komplexe im Äquivalenzbereich präzipitieren. Die Höhe der raketenförmigen Präzipitationsgrenzen ist proportional zur Menge an enthaltenem Antigen [8]. Mittels RIE und Immunoblotting erhält man lediglich qualitative bzw. semiquantitative Ergebnisse. Mit Enzymimmunoassays (EIA), die in der Routineanalytik weit verbreitet sind, ist dagegen eine Quantifizierung möglich [8]. Immunoassays werden ausführlich in Kap. 2.5 behandelt.

## 2.3 Antikörper und deren Gewinnung

### 2.3.1 Eigenschaften von Antikörpern

Antikörper, auch Immunglobuline (Ig) genannt, sind Glycoproteine, die von höheren Vertebraten (Wirbeltieren) gebildet werden. Sie dienen vorwiegend der Abwehr von Infektionserregern bzw. von körperfremden Stoffen, indem sie diese selektiv erkennen und binden [16; 212]. Abb. 2.2 zeigt den schematischen Aufbau eines Moleküls der mengenmäßig bedeutendsten Immunglobulinklasse IgG.

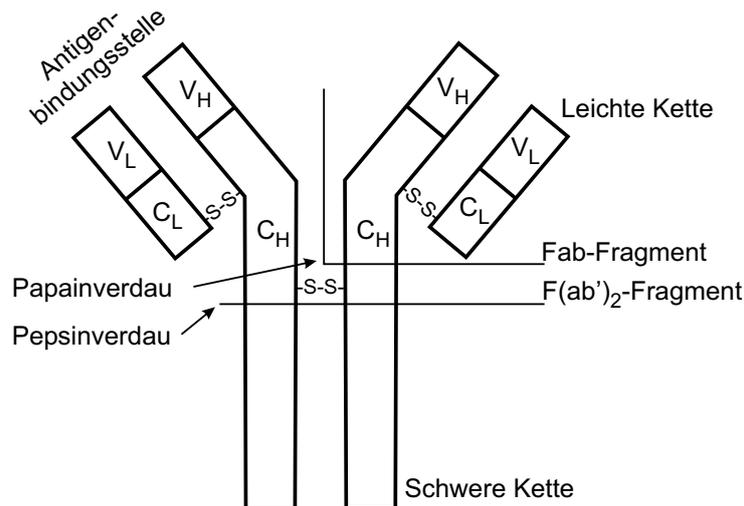


Abb. 2.2: Schematische Darstellung von Immunglobulin G.

Durch Verdau mit Papain erhält man zwei Antigen-bindende Fab-Fragmente („Fragment Antigen Binding“) und ein nichtbindendes Fc-Fragment („Fragment Crystallizable“) [213]. Die konstante Region von Antikörpern ( $C_H$ ,  $C_L$ ) ist innerhalb einer Tierspezies identisch, die variable Region ( $V_H$ ,  $V_L$ ) dient der selektiven Erkennung des Antigens. Dabei kommt es zu einer reversiblen Bindung eines Epitops des Antigens mit dem Paratop (Bindungstasche) des Antikörpers [16]. Die Antigen-Antikörper-Bindungen kommen hauptsächlich aufgrund von vier Typen von intermolekularen Wechselwirkungen zustande. Zunächst ist die elektrostatische Anziehung (COULOMB-Wechselwirkung) zu nennen, welche auf der Anziehung zwischen entgegengesetzt geladenen Gruppen beruht, beispielsweise einer positiv geladenen Guanidinogruppe der Aminosäure Arginin und einer negativ geladenen Carboxylatgruppe der Aminosäure Glutaminsäure. Wasserstoffbrückenbindungen bilden sich jeweils zwischen einem Wasserstoffatom und einem freien Elektronenpaar einer OH-, NH<sub>2</sub>- oder COOH-Gruppe eines benachbarten Moleküls. VAN-DER-WAALS-Kräfte werden schließlich durch schnelle Änderungen in der Elektronenverteilung im Molekül induziert [16]. Hydrophobe Wechselwirkungen treten dagegen zwischen hydrophoben Aminosäureseitenketten auf, beispielsweise zwischen den Aminosäuren Isoleucin und Valin. Es findet hierbei im Gegensatz zu den drei zuvor erwähnten Wechselwirkungen nur eine sehr geringe Anziehung aufgrund unterschiedlicher Ladungen bzw. Ladungsverteilungen statt. Die Triebkraft ist vielmehr der Entropiegewinn durch Verdrängung von Wassermolekülen aus der Bindungstasche. Bis zu 50 % der Antikörper-Bindungsstärke lässt sich auf hydrophobe Wechselwirkungen zurückführen.

Zur Gewinnung von Antikörpern werden Vertebraten wie Mäuse, Kaninchen, Hühner oder Schafe zunächst durch Injektion eines Antigens bzw. eines Hapten-Konjugats immunisiert. Die Qualität der Antikörper und damit des Immunoassays hängt dabei stark von der Reinheit des für die Immunisierung verwendeten Anti-

gens bzw. Hapten-Konjugats ab [214]. Polyklonale Antikörper werden direkt aus Serum (in der Regel IgG) bzw. Eiern (IgY) der immunisierten Tiere gewonnen. Die Produktion von monoklonalen Antikörpern (vorwiegend Maus, aber auch Ratte, Kaninchen) erfolgt durch Hybridomzellen, welche mittels Fusionierung erhalten werden.

### 2.3.2 Polyklonale Antikörper

Polyklonale Antikörper werden direkt aus dem Serum oder aus Eidotter von immunisierten Vertebraten gewonnen. Vorteile von Antikörpern aus Eidotter (in der Regel Hühnerei) sind dabei die große Menge an verfügbarem Antikörper (10 g/L IgY in Eidotter) und die nichtinvasive Gewinnung [215]. Obwohl das von immunisierten Tieren gewonnene Serum direkt für Immunoassays eingesetzt werden kann, werden die gewünschten Antikörper aus Stabilitätsgründen und zur Minimierung von unspezifischen Bindungen meist aufgereinigt. Die Aufreinigung der Immunglobuline erfolgt dabei häufig mittels PEG- (Aufreinigung von IgY) bzw. Ammoniumsulfat-Fällung oder affinitätschromatographisch, meist unter Verwendung von Medien aus Protein A oder Protein G.

Die aus Serum gewonnenen Immunglobuline werden von verschiedenen B-Zellklonen in der immunisierten Spezies synthetisiert. Polyklonale Antikörper entsprechen also Mischungen von unterschiedlich konzentrierten Immunglobulin-Spezies mit unterschiedlichen Eigenschaften wie Affinität und Kreuzreaktivität. Polyklonale Antikörper werden daher gelegentlich affinitätschromatographisch weiter aufgereinigt, z. B. an Säulen mit immobilisiertem Analyten oder mit immobilisierten Kreuzreaktanden. Dadurch erzielt man eine selektive An- bzw. Abreicherung von stark kreuzreagierenden Klonen [216; 217].

### 2.3.3 Monoklonale Antikörper

KÖHLER und MILSTEIN berichteten im Jahre 1975 erstmalig von der Gewinnung monoklonaler Antikörper [218; 219]. Bei dieser Technologie werden zunächst Antikörper sekretierende B-Zellen aus der Milz von immunisierten Tieren (Maus, Ratte, Kaninchen) gewonnen. Die B-Zellen werden im nächsten Schritt mit Myelomzellen (entartete Lymphocyten) fusioniert. Bei erfolgreicher Fusionierung erhält man sog. Hybridomzellen, welche das entsprechende Immunglobulin synthetisieren und zugleich theoretisch unbegrenzt teilbar und lebensfähig sind. Die Arbeitsschritte zur Gewinnung von monoklonalen Antikörpern sind in Abb. 2.3 schematisch dargestellt.

Monoklonale Antikörper sind das vorherrschend genutzte Immunreagenz [220]. Neben diagnostischen Zwecken weisen monoklonale Antikörper als Therapeutika ein hohes wirtschaftliches Potential auf.

Der entscheidende Punkt bei der Entwicklung von monoklonalen Antikörpern ist die Selektion der gewünschten Klone. Hierfür steht jeweils nur eine begrenzte Zeit zur Verfügung, in der oftmals hunderte bis tausende verschiedene Klone

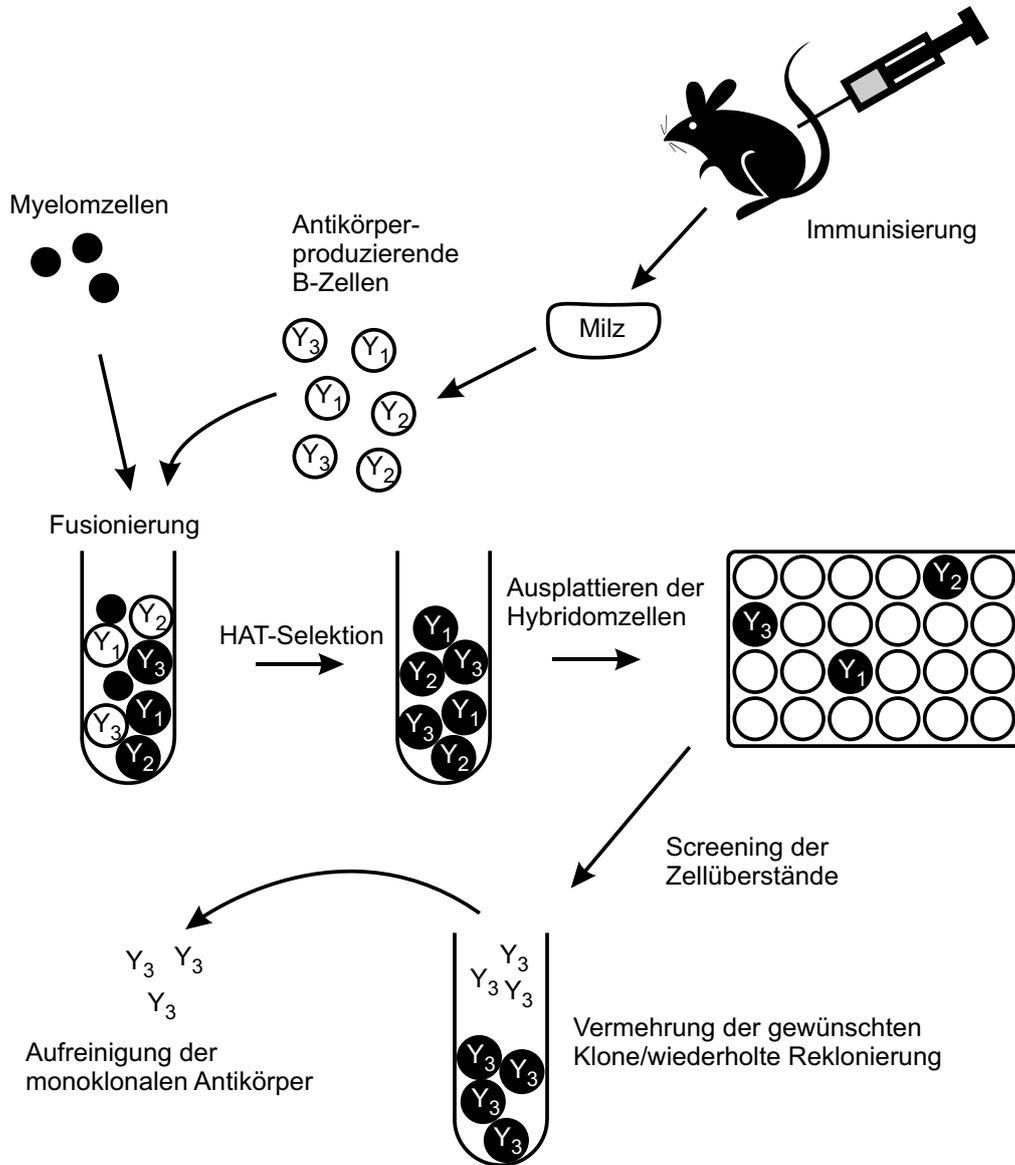


Abb. 2.3: Gewinnung von monoklonalen Antikörpern.

gescreent werden müssen. Die Selektion von Hybridomzellen für die Produktion von monoklonalen Antikörpern sollte auch aus praktischen Gründen möglichst frühzeitig erfolgen. Die Menge an verfügbarem Zellkulturüberstand ist in diesem Stadium allerdings limitiert. Schnelle und leistungsfähige Screeningmethoden sind daher unabdingbar. Beim HUPO-Projekt (Human Proteome Organization) soll beispielsweise sogar eine Antikörperbibliothek für zunächst 10.000 der geschätzten 200.000–1.000.000 menschlichen Proteine angelegt werden [221; 222; 223; 224].

Die Standardmethode zum Screenen von Zellkulturüberständen ist der Enzym-Immunsorbent-Assay [225; 226]. Biosensoren versprechen eine Beschleunigung des Screeningprozesses bei zugleich geringerem Verbrauch an Reagenzien. Dabei werden beispielsweise die Antikörper auf Oberflächen gespottet und mit markiertem Antigen inkubiert [227; 228]. Neben hohem Durchsatz ist mit Biosensoren auch Parallelisierbarkeit und Automatisierbarkeit möglich [220; 229].

### 2.3.4 Rekombinante Antikörper

Mit rekombinanten Techniken ist es möglich, Antikörper in großen Mengen herzustellen. Haupteinsatzgebiet dieser Techniken ist die Entwicklung von Antikörpern für therapeutische Zwecke [230].

Antikörpergene können aus Antikörper-sekretierenden B-Lymphocyten oder aus Hybridomzellen gewonnen werden. Dafür wird die RNA zunächst isoliert und mittels reverser Transkriptase in cDNA (komplementäre DNA) umgeschrieben. Mittels PCR wird die cDNA amplifiziert und die der schweren und leichten Kette entsprechenden Abschnitte gelelektrophoretisch aufgetrennt. Einen Meilenstein zur Selektion der gewünschten Gene aus den konstruierten Genbibliotheken stellt die Phagendisplay-Technologie dar [57; 231; 232]. Der Genotyp, entsprechend einem DNA-Abschnitt im Phagen, ist hierbei direkt an den Phänotyp gekoppelt, da der filamentöse Bakteriophage die Proteinsequenz auf seiner Oberfläche präsentiert. Die Gene werden in einen Expressionsvektor (Phagemid) kloniert und Wirtszellen, in der Regel *Escherichia coli* (*E. coli*), transfiziert. Nach Coinfektion mit Helferphagen wird die Produktion der rekombinanten Phagen in der Wirtszelle induziert. Das Screening der Phagenbibliotheken erfolgt mittels immobilisierter Antigene. Phagen, die entsprechende Antikörperfragmente präsentieren, werden damit selektiv angereichert, nichtbindende Phagen werden gewaschen. Die gewünschten Phagen werden eluiert und erneut eine Transfektion von *E. coli* durchgeführt. In der Regel werden 3–6 derartige, als „Biopanning“ bezeichnete Zyklen durchgeführt und daraufhin einzelne Bakterienkolonien isoliert. Für manche Applikationen können die isolierten Phagen direkt als Reagenz verwendet werden, alternativ wird eine Expression von Fab-Fragmenten in *E. coli* induziert. Um noch größere Vielfalt zu erhalten, kann auch auf halbsynthetische Genbibliotheken zurückgegriffen werden, die durch Rekombination aus vereinigten Genbibliotheken oder mit Hilfe von randomisierten Nucleotidsequenzen gewonnen werden können. Die Synthese ganzer Antikörpermoleküle ist aufgrund mangelnder Glykosylierungsmechanismen und schlechter Faltung in Bakterien nicht möglich. Zu

diesem Zweck wird daher eine entsprechende Fc-codierende Sequenz angefügt und der komplette Antikörper in eukaryontische Zellen wie *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert. Für die Produktion von sehr großen Mengen an rekombinanten Proteinen werden neuerdings biotechnologische Verfahren in Betracht gezogen, bei denen die gewünschten Proteine aus Säugetierzellen, aus Milch von transgenen Säugetieren, aus Hühnereiern oder aus Pflanzen gewonnen werden können [233].

### 2.3.5 Konjugation von Antikörpern

Die Detektion bei Enzym-Immunoassays erfolgt mittels Enzymmarkern, die in der Regel kovalent an einen Antikörper oder an das Antigen gebunden sind. Einige der wichtigsten Anforderungen an die Enzymmarker sind hohe selektive Aktivität, Stabilität auch in konjugierter Form, möglichst eine geringe Toxizität und Vorhandensein von reaktiven Gruppen für die Durchführung der Konjugation. Die meist verwendeten Enzymmarker sind Peroxidase aus Meerrettich mit ABTS (2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazolinsulfonat(6)]) oder TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) als Substrat, alkalische Phosphatase aus Kälberdarm mit pNPP (p-Nitrophenylphosphat) oder  $\beta$ -Galactosidase aus *E. coli* mit oNPG (o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid) [214; 234; 235].

Obwohl die Konjugation eines Antikörpers mit einem Enzymmarker als Routinearbeit gesehen werden kann, werden in der Praxis verschiedene Methoden angewendet und oft werden schwankende Ausbeuten und schlechte Reproduzierbarkeit beobachtet. Prinzipiell lassen sich drei Methoden für die Herstellung von Antikörper-Enzym-Konjugaten unterscheiden: Aktivierung des Antikörpers, Aktivierung des Enzymmarkers oder Eintopfreaktionen. Die Aktivierung der Aminogruppen von Aminosäure-Seitenketten erfolgt häufig mit NHS-Ester-Maleimid-Crosslinkern, 2-Iminothiolan (Traut's Reagenz) oder Glutaraldehyd. Alternativ kann eine Saccharid-Seitenkette durch oxidative Spaltung vicinaler OH-Gruppen mit Periodat aktiviert werden. Eintopfkonjugationen werden durch Zugabe von Glutaraldehyd zu Mischungen von Antikörper und Enzym durchgeführt, sind aber relativ unattraktiv, da unkontrollierbare Oligomerisierungen stattfinden [214; 234; 236].

## 2.4 Charakterisierung von Antikörpern

### 2.4.1 Affinität von Antikörpern

Die Affinität zum entsprechenden Antigen oder Hapten ist ein wichtiger wertbestimmender Parameter eines Antikörpers [237]. Für die meisten Anwendungen wie Immunoassays ist hohe Affinität erforderlich, für manche Applikationen wie Immunaффinitätschromatographie sind dagegen Antikörper mit geringeren Affinitäten erwünscht, um ausreichende Dissoziation unter milden Bedingungen erreichen zu können [238; 239].

Die Reaktion von Antikörper mit Antigen wird durch die Gleichgewichtsreaktion (Gl. 2.1) beschrieben.



Unter Anwendung des Massenwirkungsgesetzes kann die Gleichgewichtskonstante  $K$  ermittelt werden (Gl. 2.2).

$$K = \frac{[AkAb]}{[Ak][Ab]} \quad (2.2)$$

Bei Antikörpern mit geringen Affinitäten beträgt die Gleichgewichtskonstante  $K \approx 10^6-10^7$ , bei hochaffinen Antikörpern etwa  $K \approx 10^9-10^{12}$  [238].

Der in Gleichung 2.2 aufgestellte Zusammenhang ist allerdings nur bei Wechselwirkung eines monovalenten Antigens mit einer Antikörperbindungsstelle gültig. Bei Verwendung von multivalenten Antigenen, welche gleichzeitig von mehreren Antikörpern gebunden werden können, treten dagegen mehrere Wechselwirkungen gleichzeitig auf (Gl. 2.3).



Die gesamte freie Bindungsenergie  $\Delta G$  entspricht in diesem Fall der Summe der einzelnen freien Bindungsenergien. Die Affinität multivalenter Bindungen wird Avidität genannt, wobei die Aviditätskonstante näherungsweise dem Produkt der einzelnen Affinitätskonstanten entspricht [16].

Die Bestimmung von Antikörper-Affinitäten ist nicht trivial und viele Methoden sind stark fehlerbehaftet. Die Abschätzung der Affinitäten erfolgt in der Regel über die Messung von gebundenen und freien Liganden und basiert auf dem Massenwirkungsgesetz [240; 241]. Die Auswertung gestaltet sich in manchen Fällen aufgrund mangelnder Linearität der Graphen als schwierig. Oftmals ist auch die zur Affinitätsbestimmung verfügbare Menge des Liganden limitiert. In der Regel werden daher Verdünnungsanalysen durchgeführt, um grobe Abschätzungen zu erhalten bzw. Rangfolgen beim Screening vieler Antikörper zu ermitteln [238]. Hierbei werden zweckmäßigerweise kompetitive Immunoassays unter Verwendung einer ausreichend geringen Menge an Kompetitor durchgeführt. Ebenso muss die Konzentration des zu untersuchenden Antikörpers optimiert werden [242; 243; 244].

Die Kalorimetrie gilt als die Referenzmethode zur Bestimmung von Antikörper-Affinitäten. Gl. 2.4 zeigt die Korrelation zwischen Affinitätskonstante und freier Standardenthalpie.

$$\Delta G^0 = -kT \cdot \ln K^0 \quad (2.4)$$

Der entscheidende Nachteil der kalorimetrischen Affinitätsmessung ist der relativ geringe Betrag der freigesetzten Energie, verbunden mit dem Verbrauch einer erheblichen Menge an Antikörper. Bei Antikörpern mit Affinitätskonstanten von

$10^6$ ,  $10^9$  bzw.  $10^{12} \text{ M}^{-1}$  beträgt die freigesetzte Energie  $\Delta G$  beispielsweise 35,2, 52,8 bzw. 70,3 kJ/mol [240].

Zur Charakterisierung von Antikörpern werden daher in der Regel klassische, mikrotiterplattenbasierte Formate oder Dot-Blots angewendet. Allerdings lässt sich ein zunehmender Trend in Richtung Biosensoren beobachten [245]. Optische Biosensoren wurden zunächst in den Life Sciences und in der pharmazeutischen Forschung verwendet. Inzwischen werden Biosensoren in der Forschung u.a. zur parallelen und automatisierten Messung von Kinetiken, Affinitäten, Bindungseigenschaften und Kreuzreaktivitäten verwendet. In der Praxis kommen Biosensoren bereits bei der qualitativen und quantitativen Bestimmung vieler Analyten zum Einsatz [246; 247; 248; 249; 250; 251]. Auf Oberflächenplasmonresonanz (SPR, Surface Plasmon Resonance, z. B. Biacore<sup>®</sup> oder Spreeta<sup>™</sup>) basierende Sensoren sind weit verbreitet zur Messung von Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen *in-situ*, ohne dass eine Markierung eingeführt werden muss. Dabei werden Reaktionen auf einer mit Gold beschichteten Sensoroberfläche beobachtet. Auf der Seite des Sensors, die der Probe gegenüberliegt, wird die Reflexion von polarisiertem Licht bei einer bestimmten Wellenlänge und einem bestimmten Winkel gemessen. Bei Bindung eines Moleküls im evaneszenten Feld auf der Probenseite kommt es zu einer Änderung des Brechungsindex, welche in einem Sensorgramm aufgezeichnet wird [212; 252].

Bei der Benutzung von SPR-Biosensoren wurde von einer möglichen Charakterisierung von  $\approx 200$  Zellkulturüberständen pro Tag berichtet. Um Aviditätseinflüsse durch bivalente Antikörperbindungen auszuschließen, ist die Immobilisierung von Antikörpern (Vorbeschichtung von anti-Spezies-Antikörper) der Immobilisierung von Antigen vorzuziehen [253].

PÖTZ et al. berichteten von einem auf Microarrays basierenden Verfahren zur Affinitätsbestimmung von Fab-Fragmenten. Dieses beruht zum einen auf der Messung von gebundenen Fab-Fragmenten an immobilisiertem Antigen und zum anderen auf der Messung der Konzentration von Fab-Fragmenten mittels Sandwich-Immunoassays. Aus den beiden Messwerten ermittelten die Autoren relative Affinitäten [254].

SASAKI et al. verglichen „Kinetic Exclusion“-Assays mit mikrotiterplattenbasierten Methoden zur Affinitätsbestimmung von Antikörpern. Bei „Kinetic Exclusion“-Assays wird die Bindung von Antikörpern auf mit Antigen bzw. Hapten beschichteten Partikeln beobachtet. Mit „Kinetic Exclusion“-Assays beobachteten die Autoren geringere Fehlerraten beim Screening von Zellkulturüberständen. Allerdings stellten sie auch fest, dass mit mikrotiterplattenbasierten Methoden höhere Durchsätze erreicht werden können [225].

### 2.4.2 Kreuzreaktivität

Die Kreuzreaktivität eines Antikörpers ist ein Maß für die relative Bindungsstärke eines Kreuzreaktanden bezogen auf den Analyten. Ermittelt wird die Kreuzreaktivität durch Quotientbildung aus Affinität des Antikörpers zum Kreuzreaktanden

und Affinität zum Analyten. Alternativ wird zur Berechnung der Kreuzreaktivität (CR) der Quotient aus Testmittelpunkt des Analyten und Testmittelpunkt des Kreuzreaktanden gebildet, wobei die Testmittelpunkte mittels kompetitiver Immunoassays (Affinitätslimitierung) ermittelt werden (Gl. 2.5).

$$CR = \frac{IC_{50}(Analyt)}{IC_{50}(Kreuzreaktand)} \cdot 100 \% \quad (2.5)$$

Es werden zwei Typen von Kreuzreaktivitäten unterschieden. Bei der „echten“ Kreuzreaktivität binden zwei Liganden an die gleiche Bindungsstelle, allerdings mit unterschiedlicher Affinität. In diesem Falle kann ein Kreuzreaktand bei entsprechend hoher Konzentration den Analyten theoretisch komplett „verdrängen“. Von „Shared Reactivity“ spricht man bei Konkurrenz von Liganden, welche mehrere, von verschiedenen Antikörpern erkannte Epitope aufweisen, wobei einzelne Epitope innerhalb zweier oder mehrerer Liganden vorkommen. Durch Überschuss eines Kreuzreaktanden kann in diesem Falle die Bindung des Analyten nicht komplett inhibiert werden [255].

Die reziproke Kreuzreaktivität eines Antikörpers wird oft auch als Selektivität bezeichnet. Damit wird bei monoklonalen Antikörpern die Selektivität als Quotient aus Affinität zu Analyt und Affinität zu Kreuzreaktand ermittelt und wird bei Werten von  $> 10^3$  als hoch erachtet. Bei polyklonalen Seren sind, wie bei der Bestimmung von Kreuzreaktivitäten, neben den Affinitäten auch die Konzentrationen der Antikörper-Subpopulationen entscheidend [255].

Die Bestimmung von Kreuzreaktivitäten erfolgt oft mittels Dot-Blots (Grid-Blots). Dafür werden die Antigene bzw. Kreuzreaktanden auf einer Membran immobilisiert und die Membran geblockt. Nach einer Inkubation mit Antikörperlösung und Detektion mittels markiertem anti-Spezies-Antikörper kann die Menge an gebundenem Primärantikörper entsprechend der Kreuzreaktivität visualisiert werden. Der Vorteil der Dot-Blots ist der geringe Verbrauch an Antikörperlösung, bei monoklonalen Antikörpern reicht beispielsweise eine Menge von  $\approx 80\text{--}100 \mu\text{L}$  Zellkulturüberstand aus [256]. Wie bei allen Immunoassays mit immobilisiertem Antigen ist bei Dot-Blots zu berücksichtigen, dass die Antikörper bivalent gebunden werden können und dass für die Vergleichbarkeit die Antikörperkonzentration konstant sein muss.

## 2.5 Immunoassays

Radioimmunoassays wurden 1959 von YALOW und BERSON erstmals zur Messung von Insulin beschrieben [257]. Im Jahre 1969 berichtete ABRAHAM von einem Immunosorbent-Assay, der in Röhrchen aus Polystyrol durchgeführt wurde [258].

Immunoassays haben inzwischen breite Anwendung in der klinischen, Umwelt- und Lebensmittelanalytik erlangt, zur Bestimmung beispielsweise von Pflanzenschutzmitteln, Hormonen, Pharmaka und Toxinen [244; 259; 260; 261; 262]. Vor

allem beim Screening einer großen Probenanzahl sind Immunoassays gut geeignet, auch werden nur geringe Probenmengen benötigt [263; 264].

Immunoassays lassen sich in homogene und heterogene Formate unterteilen. Bei heterogenen Immunoassays werden freie und gebundene Liganden getrennt, was durch Immobilisierung eines Reagenz auf einer Festphase gewährleistet wird [214]. Heterogene Immunoassays sind universell einsetzbar und automatisierbar und durch die Verwendung von Festphasen ist eine gute Trennung von gebundenen und freien Liganden möglich [234]. Als Festphasen werden bei Immunosorbent-Assays Materialien aus Polystyrol (oft Mikrotiterplatten oder Röhrchen mit funktionalisierter Oberfläche) oder Partikel aus beispielsweise Polystyrol oder Agarose verwendet. Alternativ werden Membranen verwendet, vorzugsweise aus Nitrocellulose oder Nylon, beispielsweise für Immunoblots [235]. Immunosorbent-Assays mit enzymatischer Detektion werden Enzym-Immunosorbent-Assays (ELISA) genannt [235].

Immunoassays lassen sich auch anhand des Reagenzeinsatzes klassifizieren in Präzipitations-Assays (z. B. OUCHTERLONY-Geldiffusion), Assays mit Reagenzüberschuss (z. B. Sandwich-Immunoassays) und Assays mit Reagenzlimitierung (kompetitive Assays) [234; 265]. Die am häufigsten eingesetzten Immunoassays sind kompetitiv [263; 264]. Eine Entscheidung über das zu verwendende Immunoassay-Format wird anhand von Kriterien wie Größe des Antigens und Vorgaben wie Empfindlichkeit, Genauigkeit und Schnelligkeit gefällt. Antigene mit nur einem Epitop oder mit sterisch gehinderten Epitopen erfordern beispielsweise ein kompetitives Format. Immunoassays mit Reagenzüberschuss dagegen sind empfindlicher als kompetitive Formate, welche ihrerseits empfindlicher als homogene Immunoassays sind [214; 235]. Eine weitere Eigenschaft von Immunoassays mit Reagenzüberschuss ist, dass maximale Empfindlichkeit bei maximalen Reagenzkonzentrationen erreicht wird, die Kreuzreaktionen steigen hierbei jedoch stark an. Die theoretisch maximale Empfindlichkeit von Immunoassays mit Reagenzüberschuss beträgt ein Analytmolekül, in der Praxis wird die Empfindlichkeit durch unspezifische Bindungen limitiert. Weitere Vorteile von Immunoassays mit Reagenzüberschuss sind die höhere Robustheit der Antikörper-Antigen-Reaktion gegenüber Pufferadditiven und die Schnelligkeit des Tests. Bei Assays mit Reagenzlimitierung wird dagegen die maximale Empfindlichkeit bei infinitesimalen Antikörperkonzentrationen erreicht und der Assay ist kontrolliert von der Gleichgewichtskonstante bzw. der Affinität des Antikörpers [234].

Die Gleichgewichtseinstellungen bei Immunosorbent-Assays sind in der Regel diffusionslimitiert, da die Reaktion an der Festphasenoberfläche stattfindet. Daher ist beim Test auf ein großes Verhältnis von Oberfläche zu Volumen zu achten. Zudem werden Mikrotiterplatten meist auf Schüttlern inkubiert. Bei nicht reagenzlimitierten Immunoassays kann alternativ bis zu einem gewissen Grad die Reaktion über eine Erhöhung der Reaktandenkonzentration beschleunigt werden [234; 235].

Fortschritte bei immunanalytischen Verfahren sind in steigender Anwenderfreundlichkeit, Genauigkeit, Selektivität, Sensitivität, Schnelligkeit und Robust-

heit zu sehen. Entscheidend beeinflussbar ist die Empfindlichkeit eines Immunoassays durch die Auswahl des Markers. Die klassischen radioaktiven Marker  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  (RIA) wurden durch Enzyme (EIA), Fluoreszenz- oder Lumineszenzmarker substituiert, aber auch elektrochemische Detektion wird eingesetzt. Eine Empfindlichkeitssteigerung wurde auch durch den Einsatz von DNA-markierten Antikörpern mit anschließender Polymerasekettenreaktion erreicht [266].

### 2.5.1 Kompetitive Immunoassays

Das Prinzip des indirekt-kompetitiven Immunoassays ist in Abb. 2.4 dargestellt. Zunächst wird Antigen auf der Mikrotiterplatte immobilisiert (Abb. 2.4 a). Proteine können in der Regel direkt immobilisiert werden, bei kleineren Analyten (Haptenen) wird oftmals ein Protein-Hapten-Konjugat immobilisiert. Nach einem Waschschrift erfolgt durch Zugabe von Standard oder Probe und Antikörperlösung der Kompetitionsschritt (Abb. 2.4 b). Nach einem weiteren Waschschrift wird durch Zupipettieren von Substrat die Farbentwicklung gestartet (Abb. 2.4 c). Bei Markierung der Antikörper mit Peroxidase wird oft 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), bei Markierung mit alkalischer Phosphatase meist p-Nitrophenylphosphat (pNPP) als Substrat verwendet. Die Farbreaktion wird bei Verwendung von Peroxidase durch Zugabe von Säure, in der Regel 5%ige Schwefelsäure, gestoppt. Dabei wird das Enzym denaturiert und die Farbe des oxidierten Substrats schlägt von Blau nach Gelb um.

Eine idealisierte Kalibrierkurve (Inhibitionskurve) eines indirekt-kompetitiven Immunoassays ist in Abb. 2.5 dargestellt. Die Auftragung der Datenpunkte erfolgt halblogarithmisch. Um robustere Kurven zu erhalten, wird hierfür zweckmäßigerweise der Median der Einzelwerte verwendet. Die Inhibitionskurve wird in der Regel mit einer vierparametrischen Funktionsgleichung (Gl. 2.6) nach RODBARD beschrieben [267].

$$Y = \frac{A - D}{1 + \left(\frac{X}{C}\right)^B} + D \quad (2.6)$$

mit:

- A: obere Asymptote (maximale Absorption)
- B: Steigung im Testmittelpunkt
- C: Testmittelpunkt ( $\text{IC}_{50}$ )
- D: untere Asymptote (minimale Absorption)

Einer der wichtigsten Parameter zur Charakterisierung des Tests ist der Testmittelpunkt ( $\text{IC}_{50}$ ,  $B/B_0 = 50\%$ ), der einer 50%igen Inhibition des Antikörpers entspricht. Im allgemeinen ist die Empfindlichkeit eines Tests indirekt proportional zum Testmittelpunkt, so dass bei einer Testentwicklung meist die Minimierung des Testmittelpunkts forciert wird. Die Nachweisgrenze wird in der Regel durch Interpolation der um die dreifache Standardabweichung verringerten Absorption

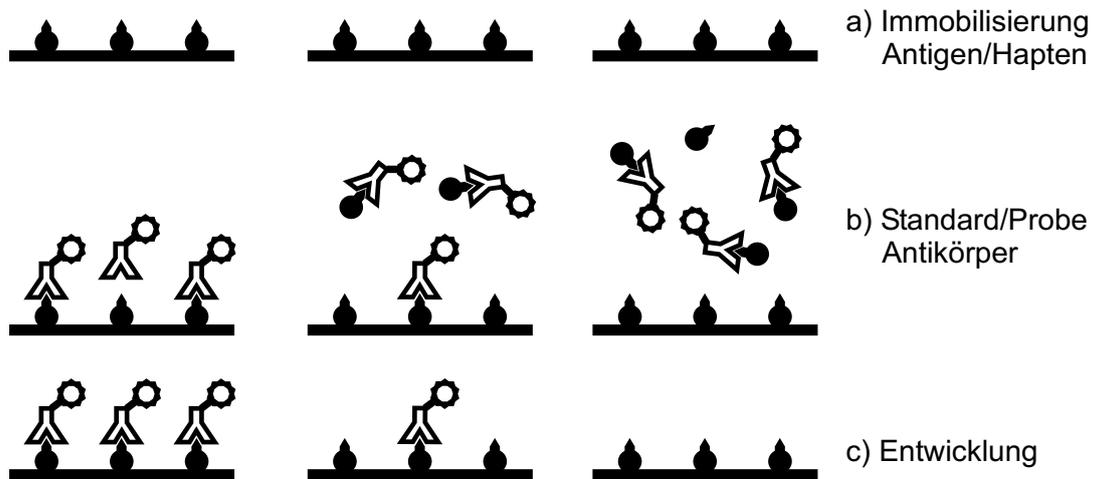


Abb. 2.4: Prinzip des indirekt-kompetitiven Immunoassays; links: Blank, rechts: hohe Analytkonzentration.

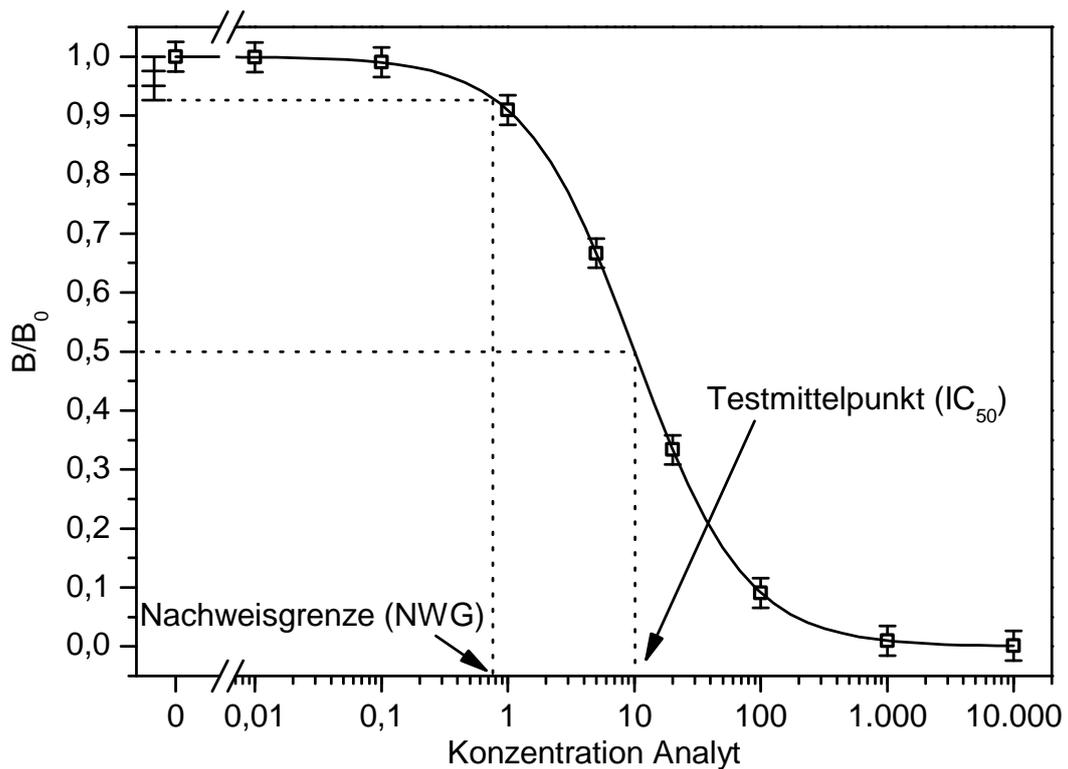


Abb. 2.5: Idealisierte Kalibrierkurve eines indirekt-kompetitiven Immunoassays.

des Blanks ermittelt. Um die Nachweisgrenze präzise ermitteln zu können, ist aus statistischen Gründen eine große Anzahl an Blank-Messwerten erforderlich.

Beim direkt-kompetitiven Immunoassay wird dagegen zunächst Antikörper immobilisiert. Die Konkurrenz findet zwischen Analyt (Standard oder Probe) und markiertem Analyt, welcher in konstanter Menge zugegeben wird, statt.

Für die Optimierung der Empfindlichkeit von kompetitiven Immunoassays muss die Anzahl der verfügbaren Bindungsstellen, entsprechend der Antikörperkonzentration, limitiert werden [235]. Mit sinkenden Konzentrationen von Antikörper und Kompetitor steigt die Empfindlichkeit eines kompetitiven Immunoassays bis zu einem Maximum, welches abhängig von der Affinität des Antikörpers ist [248].

### 2.5.2 Immunoassays mit immobilisiertem Antigen

Das Prinzip von Immunoassays mit immobilisiertem Antigen entspricht dem von Sandwich-Immunoassays (Abb. 2.6), wobei die Immobilisierung von Fängerantikörpern wegfällt. Bei Immunoassays mit immobilisiertem Antigen wird daher zunächst Antigen auf der Festphasenoberfläche beschichtet. Nach einem Waschschriff wird mit markiertem Detektionsantikörper inkubiert und nach einem weiteren Waschschriff mittels Farbreaktion die Menge an gebundenem Detektionsantikörper gemessen. Immunoassays mit immobilisiertem Antigen werden zur Messung der Antigenkonzentration (Beschichtungsschriff) bzw. von Antikörper-Affinitäten verwendet. Zu beachten ist, dass bei Verwendung von hohen Antigenkonzentrationen bei der Beschichtung Verfälschungen (z. B. von Titer, scheinbarer Affinität) durch multivalente Bindungen auftreten können. Nach dem Massenwirkungsgesetz wird die Menge an gebundenem Detektionsantikörper vor allem von dessen Konzentration und Affinität beeinflusst. Mit diesem Format ist daher ein Vergleich von Antikörper-Affinitäten nur möglich, wenn die Antikörperkonzentrationen und Beschichtungsdichten konstant sind [235].

### 2.5.3 Sandwich-Immunoassays

Das Prinzip von Sandwich-Immunoassays ist in Abb. 2.6 dargestellt. Zunächst wird Fängerantikörper auf der Oberfläche der Festphase immobilisiert. Die in der Regel durchgeführte passive Adsorption von Proteinen auf Polystyrol kommt dabei durch Ausbildung von starken hydrophoben Bindungen mit der Festphasenoberfläche zustande [235]. Nach einem Waschschriff wird Standard bzw. Probe inkubiert, wobei der Analyt an immobilisierten Fängerantikörpern bindet (Abb. 2.6 a). Durch die Selektivität des Fängerantikörpers entspricht dieser Schriff einer Immunaffinitätsanreicherung bzw. Immunextraktion [248]. Nach einem weiteren Waschschriff wird Detektionsantikörper zugegeben (Abb. 2.6 b), welcher an ein freies Epitop des Analyten bindet. Der Detektionsantikörper ist entweder direkt markiert oder es erfolgt ein weiterer Inkubationsschriff mit markiertem anti-Spezies-Antikörper. Die Quantifizierung des gebundenen markierten Antikörpers (Abb. 2.6 c) erfolgt wie in Kap. 2.5.1 erläutert. Im Gegensatz zum kompetitiven Immunoassay ist

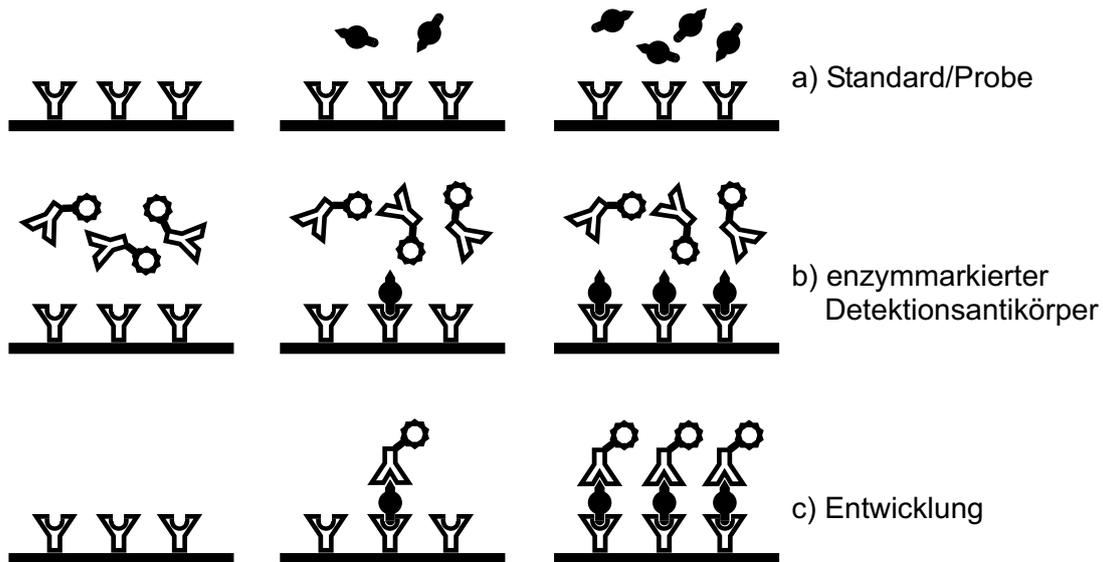


Abb. 2.6: Prinzip des Sandwich-Immunoassays; links: Blank, rechts: hohe Analytkonzentration.

die Korrelation zwischen Analytkonzentration und Signalintensität positiv; höhere Analytkonzentrationen resultieren also in höheren Absorptionen.

Für den Nachweis mittels Sandwich-Immunoassays muss der Analyt mindestens zwei Epitope aufweisen, die gleichzeitig von zwei Antikörpern gebunden werden können, der Analyt muss also relativ groß sein [264]. Als entscheidende Vorteile von Sandwich-Immunoassays sind hohe Empfindlichkeit und Schnelligkeit durch Reagenzienüberschuss und hohe Selektivität durch Erkennung zweier Bindungsstellen zu nennen. Außerdem ist der dynamische Bereich breiter als bei kompetitiven Immunoassays [235; 266]. Die Testdauer eines nicht-kompetitiven Immunoassays lässt sich zudem bis zu einer gewissen Sättigungsgrenze, bei der die unspezifischen Bindungen deutlich erhöht sind, in hohem Maße durch die gewählten Antikörperkonzentrationen beeinflussen [248].

Bei symmetrischen Sandwich-Immunoassays, wenn also der Analyt mehrere identische Epitope aufweist, welche sowohl von Fängerantikörper als auch von Detektionsantikörper erkannt werden, müssen Analyt und Detektionsantikörper sequentiell zugegeben werden. Bei asymmetrischen Konfigurationen ist prinzipiell eine gleichzeitige Zugabe von Analyt und Detektionsantikörper möglich, wobei hier dennoch auf sterische Hinderung oder inhibitorische Effekte (Hook-Effekt bei hohen Antigenkonzentrationen) geachtet werden muss [235]. Als Hook-Effekt werden kompetitive Effekte bezeichnet, die ab einem bestimmten Schwellenwert der Analytkonzentration zu sinkenden Signalintensitäten führen [248].

Zur Bestimmung von Nachweisgrenzen in Sandwich-Immunoassays wird die Einhaltung eines Konfidenzintervalls von 99,8% empfohlen, wodurch sich bei einer großen Stichprobenmenge die Nachweisgrenze durch Interpolation der mittleren Absorption des Blanks plus 2,8facher Standardabweichung ermitteln lässt. In der

Praxis wird meist die dreifache Standardabweichung zur mittleren Absorption des Blanks addiert [234].

Um die Empfindlichkeit von Immunoassays zu erhöhen, sind unspezifische Bindungen zu minimieren, was gewöhnlicherweise durch die Applikation von Blockungsmitteln wie nichtionischen Detergentien oder Proteinen erreicht werden kann [235]. Bei der Immobilisierung von Antikörpern für Sandwich-Immunoassays ist auf die maximale Bindungskapazität der Oberfläche zu achten. Die Antikörperkonzentration sollte  $\approx 10$  mg/L IgG nicht übersteigen, da sich sonst instabile Multischichten ausbilden können. Diese führen zu starker Zunahme von unspezifischen Bindungen und damit zur Verminderung der Empfindlichkeit [235]. Außerdem ist bei Sandwich-Immunoassays zu berücksichtigen, dass bei einer gegebenen Antikörperkombination die Wahl des Fängerantikörpers von der Affinität abhängig zu machen ist. Der Assay ist bei Immobilisierung des affineren Antikörpers und Detektion mit dem weniger affinen Antikörper empfindlicher als umgekehrt [234]. HAYASHI et al. stellten fest, dass nur wenige Schritte von Sandwich-Immunoassays signifikanten Anteil an der Präzision des Tests haben. Dabei handelt es sich um die pipettierten Proben- bzw. Substratvolumina und inhärente Absorptionsschwankungen der einzelnen Kavitäten der Mikrotiterplatte [268].

Die Kreuzreaktivität des Fängerantikörpers bestimmt in hohem Maße die gesamte Kreuzreaktivität des Sandwich-Immunoassays. Hohe Kreuzreaktivitäten des Fängerantikörpers können je nach Selektivität des Detektionsantikörpers zu einer Erhöhung oder Verringerung des Signals bei gegebener Analytkonzentration führen [248]. Durch die in Immunoassays mit Reagenzüberschuss nicht vorhandene Affinitätslimitierung des Detektionsantikörpers ist dessen Selektivitätsanteil geringer als die in kompetitiven Tests ermittelte Selektivität.

Um Antikörperpaare für die Entwicklung von Sandwich-Immunoassays zu finden, werden gewöhnlicherweise zunächst Antikörper unabhängig voneinander gescreent, und in einem weiteren Screeningschritt werden sämtliche Kombinationen aus jeweils zwei positiven Antikörpern getestet. Um die beim Antikörperpaar-Screening gebundene Menge des Detektionsantikörpers messen zu können, wird in der Regel markierter anti-Spezies-Antikörper verwendet, was jedoch voraussetzt, dass die beiden Antikörper jeweils paarweise von verschiedenen Spezies stammen (Abb. 2.7 a) [214]. Bei Screening von homologen Antikörperpaaren, wenn also beide Antikörper von der selben Spezies stammen, kann die Bindung des Detektionsantikörpers mittels Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie labelfrei beobachtet werden, was allerdings nur unter geringem Durchsatz möglich ist [269]. Aufgrund schneller Produktzyklen u. a. in der diagnostischen Forschung sind schnelle Screeningmethoden mit hohem Durchsatz erforderlich. Besonders für die Entwicklung von Sandwich-Immunoassays sind in der Regel sehr viele Tests notwendig, um aus allen möglichen Antikörper-Kombinationen die geeignetsten herauszufiltern. Um beispielsweise 400 Antikörperpaare in einem Oberflächenplasmonresonanz-Biosensor zu testen, wird ein Zeitbedarf von knapp fünf Tagen angegeben [270]. Mikrotiterplattenbasiertes Screening von homologen Antikörperpaaren erfordert dagegen kovalent markierte Detektionsantikörper. Die Konjugation von Antikör-

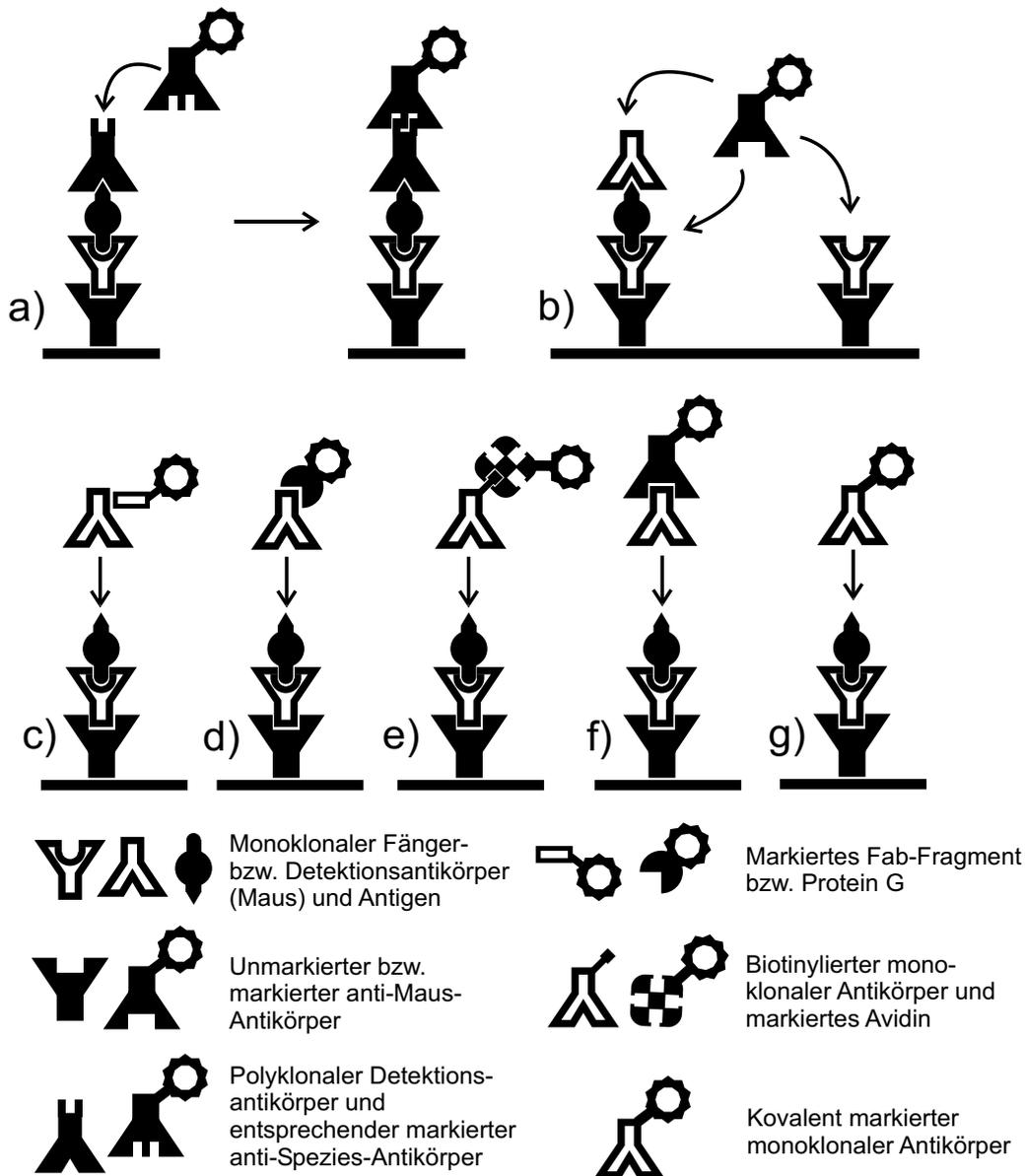


Abb. 2.7: Problematik beim Screening von homologen Antikörperpaaren. a) Bei Verwendung von Antikörpern zweier Tierspezies kann der Detektionsantikörper mit anti-Spezies-Antikörpern detektiert werden. b) Bei Antikörpern der gleichen Tierspezies ist bei Verwendung von anti-Spezies-Antikörpern keine Diskriminierung möglich. c) Monoklonale Antikörper werden mit markierten Fab-Fragmenten vorinkubiert. d) Vorinkubation mit markiertem Protein G. e) Biotinylierung der Detektionsantikörper und Inkubation mit Avidin- bzw. Streptavidin-Konjugat. f) Vorinkubation der Detektionsantikörper mit markierten anti-Spezies-Antikörpern. g) Verwendung von kovalent markierten Detektionsantikörpern.

pern ist allerdings relativ aufwändig, besonders wenn die Antikörper nur als Zellkulturüberstände verfügbar sind und daher vor der Konjugation zunächst aufgereinigt werden müssen [227]. Screening von Antikörperpaaren wird inzwischen als kommerzieller Service angeboten, was dessen Bedeutung veranschaulicht [271].

In dieser Arbeit wurde daher versucht, Detektionsantikörper mit verschiedenen Techniken bzw. Reagenzien *in-situ* zu markieren. Insbesondere sollte untersucht werden, inwieweit die Markierungstechniken für das Screening von homologen Antikörperpaaren geeignet sind, wenn die Antikörper nur als Zellkulturüberstände vorliegen. Eine Übersicht der entsprechenden Screeningstrategien ist in Abb. 2.7 zusammengestellt.

### 2.5.4 Teststreifen-basierte Systeme

Im Rahmen des EU-geförderten Forschungsprojekts „AllergenTest“ sollten neben mikrotiterplattenbasierten Methoden auch einfach durchzuführende Lateral-Flow-Schnelltests (LFD, „Lateral Flow Device“) und homogene Teststreifen entwickelt werden. Lateral-Flow-Schnelltests sind preiswerte und schnelle Alternativen zu mikrotiterplattenbasierten Immunoassays, und ermöglichen eine qualitative Detektion des Analyten im Extrakt, ohne dass weitere Chemikalien oder Geräte benötigt werden [8].

Immunanalytische Lateral-Flow-Schnelltests sind eine Weiterentwicklung von homogenen Latex-Agglutinationstests, welche bereits 1956 beschrieben wurden [272; 273]. Aufbau und Funktionsweise von Lateral-Flow-Schnelltests, basierend auf einem Sandwich-Immunoassay, sind schematisch in Abb. 2.8 dargestellt. Die Probe wird durch eine Öffnung der Einheit auf ein Kissen getropft, auf dem sich mit entsprechendem Antikörper beschichtete Latexpartikel in hohem Überschuss befinden (Abb. 2.8 a). Kapillarkräfte bewirken den Transport der Flüssigkeit über eine Membran, die meist aus Nitrocellulose besteht. Am anderen Ende der Membran befindet sich ein weiteres Kissen, welches die Flüssigkeit aufsaugt. Somit wird ein lateraler Fluss der Lösung einige Minuten lang aufrechterhalten. In der Probe enthaltene Analytmoleküle werden zunächst von Antikörpern gebunden, welche auf den Latexpartikeln beschichtet sind. Beim Passieren der aus immobilisierten Fängerantikörpern bestehenden Testlinie (T) werden die Komplexe aus Latexpartikeln und Analyt gebunden (Abb. 2.8 b). Dadurch entwickelt sich im Detektionsfenster an entsprechender Stelle eine blaue Färbung. Überschüssige Latexpartikel werden im weiteren Verlauf des Tests an der Kontrolllinie (C) gebunden (Abb. 2.8 c). Diese besteht aus immobilisierten anti-Spezies-Antikörpern und dient als Kontrolle für den korrekten Ablauf des Schnelltests. Der Test ist damit positiv, wenn an der Test- und an der Kontrolllinie ein Signal sichtbar ist. Wenn nur an der Kontrolllinie ein Signal erkennbar ist, liegt die Analytkonzentration im Extrakt unterhalb der Nachweisgrenze. Falls sich an der Kontrolllinie kein Signal entwickelt, ist der Test als fehlerhaft zu werten und muss wiederholt werden [212].

Homogene Teststreifen basieren auf verschiedenen Technologien. Zur Detektion von Haptenen verwendete Teststreifen basieren oft auf Apoenzym-Reaktivierungs-

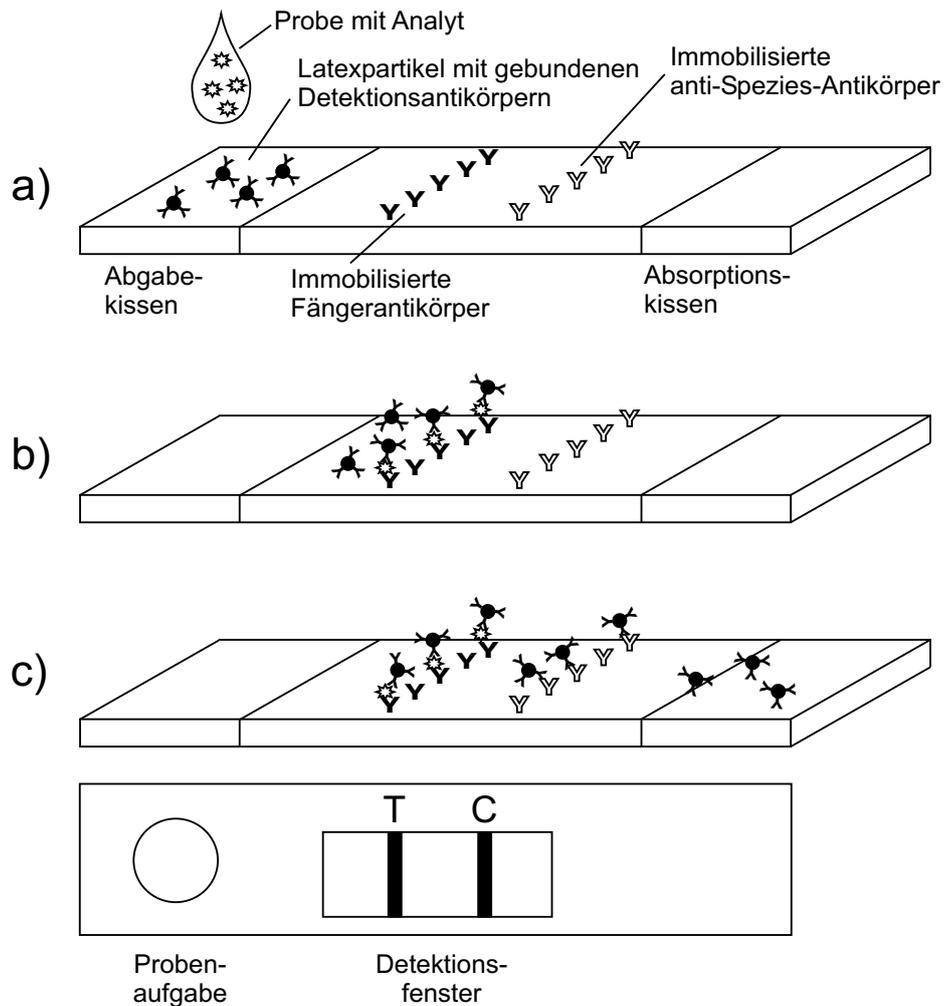


Abb. 2.8: Funktionsweise des Lateral-Flow-Schnelltests. C: Kontrolllinie, Signalentwicklung bei korrektem Testverlauf. T: Testlinie, Signalentwicklung bei positivem Ergebnis.

Immunoassays (ARIS) [214; 274]. Hierbei wird das aus Apoenzym reaktivierte Holoenzym gemessen, wobei die Menge an für die Reaktivierung verfügbarem Cofaktor limitiert ist und mit der Analytmenge korreliert. Neben der oftmals schwierigen Darstellung des Apoenzyms ist bei diesem Testformat ein geeigneter Kompetitor entscheidend, welcher vom Antikörper oder Apoenzym (unter Regeneration des Holoenzym) gebunden werden kann, aber nicht von beiden gleichzeitig [275; 276].

Eine weitere Möglichkeit zur Entwicklung von homogenen Teststreifen ist die Anwendung der „Enzyme-Channeling“-Technologie. Dabei wird eine Reaktion beobachtet, in der zwei Enzyme involviert sind. Bei der ersten Enzymreaktion wird hierbei ein Produkt gebildet, welches als Substrat der zweiten Enzymreaktion fungiert. Sowohl kompetitive als auch nichtkompetitive Enzyme-Channeling-

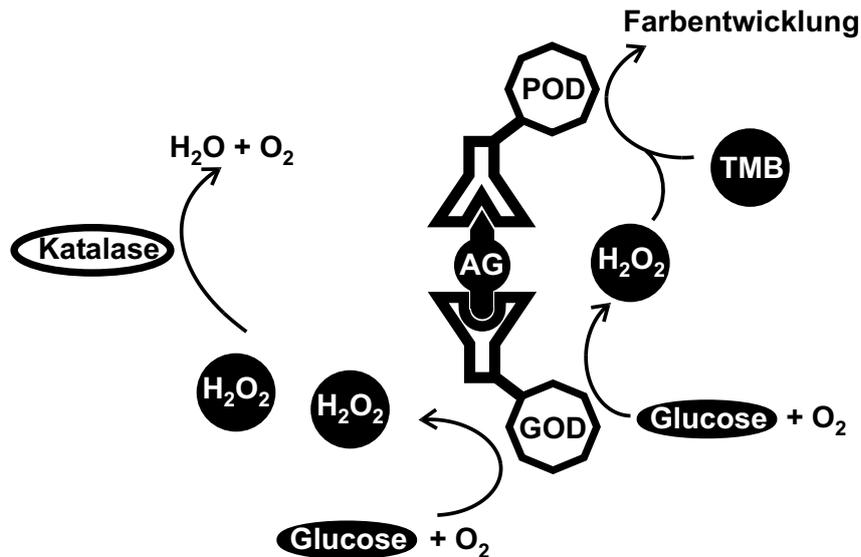


Abb. 2.9: Schematische Darstellung eines Sandwich-Immunoassays mit Detektion über Enzyme-Channeling (AG: Antigen; GOD: Glucoseoxidase; POD: Peroxidase; TMB: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin).

Immunoassays wurden beschrieben [214; 234]. Bei vielen Enzyme-Channeling-Immunsensoren erfolgt die Detektion elektrochemisch [277; 278; 279]. Von Glucoseoxidase erzeugtes Wasserstoffperoxid oxidiert zunächst Peroxidase, welche dann elektroenzymatisch reduziert wird. Die Messung des elektrochemischen Potentials erfolgt gegen eine Ag/AgCl-Referenzelektrode. Im Rahmen dieser Arbeit sollten auch Teststreifen entwickelt werden, die auf der Enzyme-Channeling-Technologie basieren. Das dabei zugrundeliegende Prinzip ist in Abb. 2.9 dargestellt. Glucose, TMB und Katalase liegen bei diesem Format im Überschuss in der Lösung vor. Glucose wird zunächst von Glucoseoxidase zu Gluconsäure unter Bildung von Wasserstoffperoxid oxidiert. Wenn sich Peroxidase in Nachbarschaft zur Glucoseoxidase befindet, wird TMB mit Hilfe des entstandenen Wasserstoffperoxid unter Farbwertung oxidiert. Da die beiden Enzyme jeweils kovalent an einen Antikörper gebunden sind, ist der Abstand der beiden Enzyme zueinander gering, wenn die Antikörper einen Sandwich-Komplex ausbilden. Das im Überschuss gebildete Wasserstoffperoxid wird bei nicht sofortiger Reaktion mit Peroxidase von Katalase inaktiviert, welche sich im Überschuss in der Lösung befindet.

## 2.6 Stand der Analytik

### 2.6.1 Mikrotiterplattenbasierte Immunoassays

Viele Immunoassays zum Nachweis von Proteinen aus Erdnuss oder Baumüssen, wie Haselnuss, Mandel oder Cashew, wurden bereits veröffentlicht [280; 281; 282]. In den meisten Fällen wird von den verwendeten Antikörpern nur eines oder we-

nige der Erdnuss- bzw. Baumnussproteine erkannt. Wenn allerdings eine Probe positiv ist, also mindestens ein Protein oder Allergen gefunden wurde, ist davon auszugehen, dass sämtliche Proteine bzw. Allergene der entsprechenden Spezies (Erdnuss oder Baumnuss) in der Probe vorhanden sind. Die Stabilität der verschiedenen Erdnuss- bzw. Baumnussproteine ist zwar stark unterschiedlich, dem Allergiker ist jedoch normalerweise nicht bekannt, gegen welche Proteine er allergisch ist [81]. Für einen zuverlässigen Nachweis muss also gewährleistet sein, dass eine Korrelation zwischen Speziesnachweis und dem Vorhandensein von (allergenen) Proteinen besteht [206].

### 2.6.1.1 Erdnuss

Mit einem Radioimmunoassay (RIA) unter Verwendung von Patientenserum erreichten KEATING et al. eine Nachweisgrenze von 87,5 mg/kg Erdnuss [283].

HOLZHAUSER et al. entwickelten einen indirekt-kompetitiven Immunoassay mit polyklonalen Antikörpern aus Kaninchen, die Extraktion der Proben erfolgte mit einem Tris-Tricin-Puffer (pH 8,6). Die Nachweisgrenze des Tests lag bei 2 mg/kg Erdnussprotein, die Wiederfindung zwischen 84–126 % bei > 13 mg/kg Erdnussprotein in der Probe [133]. YEUNG et al. entwickelten einen kompetitiven Immunoassay mit polyklonalen Antikörpern aus Kaninchen mit einer Nachweisgrenze von 0,4 mg/kg Erdnussprotein und Wiederfindungen von 45–100 %. Extraktionspuffer war PBS bzw. PBST und Kreuzreaktivitäten bei Konzentrationen der Kreuzreaktanden von  $\leq 40$  mg/L wurden nicht beobachtet [284].

Mit einem Sandwich-Immunoassay, basierend auf monoklonalen Fängerantikörpern (Maus), und polyklonalen Detektionsantikörpern (Kaninchen), erreichten HEFLE et al. eine Nachweisgrenze von 40 mg/L Erdnussprotein. Als Extraktionspuffer wurde PBS bei pH 7,0 verwendet [285]. Mit einem Sandwich-Immunoassay, bestehend aus zwei monoklonalen Antikörpern (Maus) konnten POMES et al. das Erdnussallergen Ara h1 bis zu einer Nachweisgrenze von 30  $\mu$ g/L detektieren, die Extraktion der Proben erfolgte mit PBS. Die Wiederfindung lag zwischen 6–105 %, bei Messungen in Schokoladen wurden allerdings oft falsch negative Ergebnisse erhalten [286]. STEPHAN und VIETHS entwickelten einen Sandwich-Immunoassay zum Nachweis von Erdnussprotein. Die Extraktion erfolgte mit Tris-Tricin-Puffer (pH 8,6) und die Nachweisgrenze betrug 70  $\mu$ g/kg Erdnussprotein. Die Wiederfindung lag bei Schokoladen zwischen 64,3 und 141,8 % [287]. KOPPELMAN et al. entwickelten einen Sandwich-Immunoassay zur Detektion des Erdnussallergens Ara h1 mit einer Nachweisgrenze von 0,1 mg/kg Erdnuss und einer Wiederfindung zwischen 35–75 % [8]. Mit einem Sandwich-Immunoassay mit polyklonalen Antikörpern aus Kaninchen erreichten ERIKSSON et al. eine Nachweisgrenze von 1 mg/kg Erdnussprotein [288]. KECK-GASSENMEIER et al. berichteten von einem Sandwich-Immunoassay mit einer Nachweisgrenze von 2 mg/kg Erdnussprotein. Die Testdauer betrug mehrere Stunden und die Extraktion der Proben erfolgte mit TBS (pH 8,2). Durch Zusatz von 12,5 % Fischgelatine zum Extraktionspuffer konnten die Autoren die Wiederfindung von 2–3 % auf 61–97 % erhöhen [289].

Tab. 2.1: Kommerziell erhältliche Testkits zum Nachweis von Erdnussprotein.  
Bei sämtlichen Testkits handelt es sich um Sandwich-Immunoassays.

Hersteller (Produkt)	Targetprotein	NWG [mg/kg]
ElisaSystems (Peanut Allergen)	Ara h2	1
Pro-Lab Diagnostics (Prolisa Peanut Pak Kit)	Erdnussprotein	1,6
Tepnel (BioSystems Peanut)	Ara h1	< 0,1
R-Biopharm AG (Ridascreen Fast Peanut)	Erdnussprotein	2
Neogen (Veratox for Peanut)	Erdnussprotein	< 2,5
Elisa Technologies (Elisa-Tek Peanut)	Ara h1	0,5

NEWSOME et al. kombinierten Immunoaffinitätsanreicherung mit Enzymimmunoassays und konnten Erdnussprotein mit einer Wiederfindung von 72–84 % in Schokoladen bei einer Nachweisgrenze von 0,1 mg/kg nachweisen [290].

Kommerziell erhältliche Testkits zum Nachweis von Erdnussprotein, basierend auf Sandwich-Immunoassays, sind in Tab. 2.1 zusammengefasst [8; 291]. Fünf der kommerziell erhältlichen Testkits zum Nachweis von Erdnussprotein wurden im Rahmen eines europäischen Ringversuchs untersucht. Als Lebensmittelmatrix wurden Kekse und Zartbitterschokolade verwendet, welche mit 0–10 mg/kg Erdnuss dotiert wurden. Die Wiederfindungen, gemittelt für jeden Testkit, reichten von 73–191 % für Kekse und 44–152 % für Zartbitterschokolade. Falsch negative Resultate wurden nur bei den geringen Dotierungen < 2,5 mg/kg Erdnuss im Lebensmittel erhalten, der Anteil falsch negativer Resultate lag dabei zwischen 0–25 % [292]. Oftmals waren die Wiederfindungen besonders niedrig in Schokoladen mit hohem Kakaoanteil [291].

Quantitative Ergebnisse bzw. Wiederfindungen bei kommerziell erhältlichen Immunoassays zur Bestimmung von Erdnuss können signifikant voneinander abweichen. Aus Gründen der Vergleichbarkeit ist daher die Verwendung von identischen Standards zwingend notwendig. Bei Dotierung mit rohen Erdnüssen werden beispielsweise deutlich höhere Wiederfindungen als bei Dotierung mit gerösteten Erdnüssen gefunden, wenn die vom Testhersteller mitgelieferten Standards verwendet werden [291; 293]. Eine entscheidende Rolle für die Variabilität spielt auch die Probenahme. Bei der Messung von Erdnuss in Müsliriegeln und Schokoladen führten TRUCKSESS et al. > 97 % der gesamten Varianz auf die Probenahme zurück, die Varianz der eigentlichen Messung war vernachlässigbar. Für richtige Ergebnisse muss daher die Stichprobe möglichst groß gewählt werden [294]. Bei weiteren Messungen konnten TRUCKSESS et al. mit dem Testkit von Neogen Erdnuss zu 73–89 % in Müsliriegeln und zu 78–104 % in Milkschokolade wiederfinden [294]. Die beim Testkit von R-Biopharm verwendeten polyklonalen Antikörper wurden durch Immunisierungen mit Extrakten aus rohen und gerösteten Erdnüssen gewonnen. Der Test kann für die Untersuchung von Cerealien, Schokoladen, Keksen und Eiscreme eingesetzt werden und die Testdauer wird mit 30 min angegeben

[295]. Mit dem Testkit von R-Biopharm wurde Erdnuss in Eiscreme, Keksen und Frühstückscerealien zu 60–81 % wiedergefunden [296]. Bei von WHITAKER et al. durchgeführten Studien wurden die geringsten Abweichungen (maximale Richtigkeit) von 16 % bei Verwendung des Testkits von Neogen ermittelt, gefolgt von mittleren Abweichungen von 26 % bei Verwendung des Testkits von R-Biopharm. Die besten Präzisionen wurden dagegen mit dem Testkit von R-Biopharm erhalten (CV = 4.2 %), an zweiter Stelle rangierte der Testkit von Neogen. Mit den Testkits von Pro-Lab Diagnostics und Elisa Technologies wurden deutlich geringere Richtigkeiten und Präzisionen erhalten [297].

### 2.6.1.2 Haselnuss

HOLZHAUSER et al. entwickelten einen Sandwich-Immunoassay zum Nachweis von Haselnuss, basierend auf polyklonalen Antikörpern aus Kaninchen und aus Schaf. Die Proben wurden extrahiert mit Tris-Tricin-Puffer (pH 8,6). Die Nachweisgrenzen lagen bei 30–430 µg/kg Haselnussprotein in vielen Matrices, die Wiederfindungen beliefen sich auf 67–132 % [191]. Mit einem Sandwich-Immunoassay erreichten KOPPELMAN et al. unter Verwendung von polyklonalen Antikörpern aus Kaninchen eine Nachweisgrenze von 5 µg/L Haselnussprotein im Extrakt, entsprechend 0,1 mg/kg Haselnussprotein im Lebensmittel. Die Kreuzreaktivitäten betragen bis zu 0,08 % und die Extraktion erfolgte mit Tris-Puffer bei pH 8,2 [298]. Mit einem Sandwich-Immunoassay unter Verwendung von polyklonalen Antikörpern aus Huhn erreichten BLAIS et al. Nachweisgrenzen von 0,5 mg/kg Haselnussprotein in Frühstückscerealien, von 0,25 mg/kg in Eiscreme und von 0,12 mg/kg in Kuchen [299].

DRS et al. entwickelten einen indirekt-kompetitiven Immunoassay, basierend auf polyklonalen Antikörpern aus Huhn. Die Nachweisgrenze lag bei 0,1 mg/kg Haselnussprotein, die Kreuzreaktivitäten für einige Nüsse und Saaten lagen allerdings trotz Affinitätsreinigung bei bis zu 8 % [300]. Mit einem indirekt-kompetitiven Immunoassay unter Verwendung von Patientenserum erreichten KOPPELMAN et al. Nachweisgrenzen von 30 µg/L Haselnussprotein im Extrakt (0,6 mg/kg Haselnussprotein im Lebensmittel). Allerdings wurden starke Kreuzreaktivitäten festgestellt, vor allem gegenüber Walnuss [298]. Ein indirekt-kompetitiver Immunoassay mit polyklonalen Antikörpern (Kaninchen) wurde von BEN-REJEB et al. mit einer Nachweisgrenze von 0,45 mg/kg Haselnussprotein beschrieben. Die Wiederfindung lag bei 64–97 % in Schokoladen, Cerealien, Keksen und Eiscreme und der Extraktionspuffer bestand aus PBST mit Zusatz von Triton X-100 [301].

Mit einem Sandwich-Immunoassay-Testkit der Firma R-Biopharm kann Haselnuss bis zu einer Nachweisgrenze von 1,5 mg/kg Haselnuss bei einer Testdauer von 30 min detektiert werden. Ein Testkit der Firma ElisaSystems, ebenso basierend auf einem Sandwich-Immunoassay, detektiert Haselnuss bis zu einer Nachweisgrenze von 1 mg/kg [8].

Wie bei den Immunoassays zum Nachweis von Erdnuss beobachtet, spielt auch bei der Wiederfindung von Haselnuss die Dotierung bzw. der verwendete Kalibrier-

standard eine entscheidende Rolle. Bei den kommerziellen Testkits werden in der Regel keine Angaben über Sorte, Röstgrad, Extraktionsbedingungen o. ä. der mitgelieferten Standards gemacht, also Parameter, die entscheidend die Wiederfindungen beeinflussen. Auch aufgrund der geringen Stabilität von Haselnussproteinen werden daher häufig schlechte Wiederfindungen erhalten, wenn die mitgelieferten Standards zur Kalibrierung verwendet werden und die Dotierung der Proben mit selbst hergestellten Haselnussextrakten oder mit Haselnussmehl erfolgt [302].

## 2.6.2 Teststreifen

Teststreifenbasierte Sandwich-Immunoassays beruhen meist auf heterogenen Formaten, welche mehrere Waschschritte erfordern. Zunächst wird Antikörper auf der Oberfläche des Teststreifens (z. B. Membran) immobilisiert, dann erfolgt eine Inkubation der Probe und schließlich wird mit Antikörper detektiert, der z. B. mit kolloidalem Farbstoff oder mit einem Enzym markiert ist. Mit Sandwich-Immunoassay-Teststreifen wurden bei Verwendung von Proteinlösungen Nachweisgrenzen bis zu 10 µg/L Protein erreicht [303; 304; 305; 306; 307; 308; 309]. Die Testdauer von Teststreifen, welche mehrere Waschschritte erfordern, ist allerdings, verglichen mit mikrotiterplattenbasierten Immunoassays, meist nicht signifikant kürzer. Zudem kann in der Regel nur eine Probe je Teststreifen gemessen werden.

STEPHAN et al. entwickelten Teststreifen zum Nachweis von Erdnuss- und Haselnussprotein, welche auf Sandwich-Immunoassays basieren. Mit den Teststreifen erreichten sie Nachweisgrenzen von 10 µg/L Erdnuss- bzw. Haselnussprotein, entsprechend 1 mg/kg Erdnuss- bzw. Haselnussprotein im Lebensmittel, bei einer Testdauer von 3 bzw. 4 Stunden [310]. LEITZENBERGER et al. entwickelten Teststreifen, die auf Sandwich-Immunoassays basieren und bei denen mehrere Wasch- und Inkubationsschritte durchgeführt werden müssen. Mit polyklonalen Antikörpern aus Huhn wurde Erdnuss und Haselnuss detektiert. Die Nachweisgrenzen betragen 200 µg/L Haselnuss bzw. < 200 µg/L Erdnuss im Extrakt, entsprechend 2 mg/kg Haselnuss bzw. < 2 mg/kg Erdnuss im Lebensmittel [311]. Zum Nachweis von Ara h1 entwickelten MILLS et al. heterogene Teststreifen im Sandwich-Immunoassay-Format mit polyklonalen Antikörpern aus Kaninchen. Die Nachweisgrenzen betragen 0,01 % Erdnuss in Marzipan und 0,1 % Erdnuss in Schokolade. Die Testdauer war 35 min und die Extraktion der Proben erfolgte mit TBS bei pH 8,2 [151].

BLAIS et al. entwickelten einen heterogenen Sandwich-Immunoassay auf Polyesterstreifen (Dot-Immunoblot) mit polyklonalen Antikörpern aus Huhn. Es konnten 1,2 mg/kg Erdnussprotein in Matrices wie Eiscreme oder Kartoffelchips nachgewiesen werden, bei Schokoladen lag die Nachweisgrenze höher. Die Extraktion der Lebensmittel erfolgte mit PBST mit einem Zusatz von 4 % Magermilchpulver [312]. Mittels Dot-Blot-Sandwich-Immunoassays mit polyklonalen Antikörpern aus Huhn zur parallelen Detektion von Erdnuss, Haselnuss und Paranuss erreichten BLAIS et al. Nachweisgrenzen zwischen 0,1 und 1 mg/kg [313]. Mit Dot-Immunoblots zur Detektion von Erdnuss, basierend auf humanem Serum,

erreichten SCHÄPPI et al. Nachweisgrenzen von 50 mg/kg Erdnuss in Cerealien, Keksen, Kuchen und Snacks. Die Extraktion der Proben erfolgte in Puffer mit 6 M Harnstoff [5].

Bei den am häufigsten beschriebenen Teststreifensystemen muss also der Teststreifen in die Probe und mehrfach in Reagenzien eingetaucht werden. Zwischen den Inkubationsschritten finden Waschschrte statt. Bei heterogenen Teststreifen dieser Art ist der apparative und zeitliche Aufwand relativ hoch. Dagegen liegt die Testdauer von Lateral-Flow-Schnelltests (siehe Kap. 2.5.4) in der Regel bei  $\leq 15$  min. Es muss lediglich Probe aufgegeben und die Signalentwicklung abgewartet werden; der Gesamtaufwand ist dabei also minimal. Allerdings ist die Methodenentwicklung bei Lateral-Flow-Schnelltests meist zeitintensiver.

WEN et al. entwickelten einen kompetitiven Lateral-Flow-Schnelltest zum Nachweis des Erdnussallergens Ara h1. Auf dem Startpunkt befanden sich mit Sulforhodamin B gefärbte Liposomen, die auf der Oberfläche mit Biotin markiert und mit Ara h1 beschichtet waren. Auf der Testlinie wurde anti-Ara-h1-Antikörper immobilisiert, auf der Kontrolllinie Avidin. Die erreichte Nachweisgrenze betrug 0,45 mg/L Ara h1 im Extrakt bzw. 10 mg/kg Ara h1 im Lebensmittel bei Berücksichtigung des angegebenen Extraktionsverhältnisses [211].

Kommerziell erhältliche Lateral-Flow-Schnelltests der Firma Neogen detektieren Erdnussprotein bei einer Testdauer von 10 min. Die Nachweisgrenze wird mit 5 mg/kg Erdnuss angegeben [8].

### 2.6.3 PCR

HIRD et al. entwickelten eine real-time-PCR-Methode zum Nachweis eines DNA-Abschnitts des Ara-h2-Gens. Die Nachweisgrenze betrug 2 mg/kg Erdnuss in Keksen, Kreuzreaktivitäten wurden nicht beobachtet [314]. STEPHAN und VIETHS entwickelten eine real-time-PCR, ebenfalls mit einer Ara-h2-codierenden Region als Target. Die Nachweisgrenze lag hier bei 10 mg/kg Erdnuss [287]. Über den Nachweis eines Fragments von Cor-a1.0401-codierender cDNA mittels PCR wiesen HOLZHAUSER et al. Haselnuss qualitativ nach. Die Nachweisgrenze betrug 10 mg/kg Haselnuss, Kreuzreaktivitäten wurden nicht beobachtet [315].

Beim PCR-ELISA wird die extrahierte DNA zunächst mittels PCR amplifiziert und die PCR-Produkte auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Nach Denaturierung erfolgt ein Hybridisierungsschritt mit einer Sonde, welche von einem enzymmarkierten Antikörper erkannt wird. Beim Vergleich von Sandwich-Immunoassay mit PCR-ELISA (Cor-a1.0401-Gen) beobachteten HOLZHAUSER et al. beim Sandwich-Immunoassay falsch positive Ergebnisse aufgrund von Kreuzreaktivitäten, beim PCR-ELISA weder falsch positive Ergebnisse noch inhibitorische Effekte in komplexen Matrices. Bei beiden Methoden lagen die Nachweisgrenzen bei 10 mg/kg Haselnuss. Der Aufwand, sowohl in apparativer als auch in zeitlicher Hinsicht, war allerdings beim PCR-ELISA höher [316].

Von Congen GmbH und Tepnel BioSystems sind PCR-ELISA und real-time-PCR-Tests für den Nachweis von Haselnuss erhältlich. Zum Nachweis von Erdnuss

vertreiben die beiden Firmen PCR mit Gelelektrophorese, PCR-ELISA und real-time-PCR-Tests. Die Nachweisgrenzen werden jeweils mit  $< 10$  mg/kg Erdnuss bzw. Haselnuss angegeben [8].

### 2.6.4 Biosensoren

Biosensor-basierte Methoden zum Nachweis von Erdnuss oder Haselnuss sind in der Routineanalytik noch nicht verbreitet. MOHAMMED et al. konnten zwar mittels Oberflächenplasmonresonanz-Sensoren  $0,7$  mg/L Erdnussprotein im Extrakt nachweisen, entsprechend  $7$  mg/kg Erdnussprotein im Lebensmittel. Die Autoren berichteten allerdings von starken Matrixeffekten [284; 317]. Gleichfalls mit Oberflächenplasmonresonanz erreichten JONSSON et al. Nachweisgrenzen bis  $42$   $\mu$ g/L Haselnussprotein. In Milkschokoladen konnten die Autoren  $6$  mg/kg Haselnussprotein nachweisen, in Zartbitterschokoladen  $5$  mg/kg. Auch bei diesen Arbeiten wurde jedoch von starken unspezifischen Bindungen und Matrixinhibition berichtet [318]. Unter Verwendung eines microarraybasierten Biosensors mit SEA-Detektion („Surface Enhanced Absorption“, Signalverstärkung mittels goldmarkierter Sonden) war VERHEIJEN et al. die parallele Detektion von Erdnuss- und Haselnussproteinen möglich [319].

### 2.6.5 Diverse Formate

Mittels Rocket-Immunelektrophorese konnten MALMHEDEN-YMAN et al. Erdnuss und Haselnuss bis zu einer Nachweisgrenze von  $20$  mg/kg nachweisen. Die Extraktion der Proben erfolgte mit Tris-Puffer bei pH  $8,6$  [83; 199]. ERIKSSON et al. entwickelten eine Rocket-Immunelektrophorese unter Verwendung eines polyklonalen Serums aus Kaninchen und berichteten von einer Nachweisgrenze von  $70$  mg/kg Erdnuss [288]. Mit einer Rocket-Immunelektrophorese erreichten HOLZHAUSER et al. eine Nachweisgrenze von  $2$  mg/kg Erdnuss [320].

Die doppelte Geldiffusion nach OUCHTERLONY (Immundiffusion) basiert auf der radialen Diffusion von Analyt und Antikörper in einem Gel, wobei es in der Äquivalenzzone zur Bildung einer Präzipitationslinie kommt [199]. Bei einem Ringversuch stellten MALMHEDEN-YMAN et al. fest, dass mittels Immundiffusion Erdnussprotein ab einem Gehalt von  $400$  mg/kg in Schokoladen und Haselnussprotein ab  $80$  mg/kg in Schokoladen in den meisten Laboratorien sicher nachgewiesen werden konnte [321]. KOPPELMAN et al. erreichten mittels SDS-PAGE mit Immunoblotting unter Verwendung von Patientenserum Nachweisgrenzen von  $25$  mg/L Haselnussprotein im Extrakt, entsprechend  $0,5$  % Haselnuss im Lebensmittel. Die Autoren stellten allerdings starke Kreuzreaktivitäten zu Erdnuss und Hühnerei fest [298]. Bei SDS-PAGE/Immunoblotting mit polyklonalen Antikörpern aus Kaninchen erreichten KOPPELMAN et al. eine Nachweisgrenze von  $0,3$ – $10$  % Haselnuss im Lebensmittel bei schwachen Kreuzreaktivitäten [298]. SCHEIBE et al. wiesen Haselnuss in Schokoladen mittels SDS-PAGE mit Immunoblotting unter Verwendung von polyklonalem Serum aus Kaninchen und Chemilumineszenzdetektion

bis zu einer Nachweisgrenze von 5 mg/kg Haselnussprotein nach. Die Extraktion der Proben erfolgte mit Tris-Puffer (pH 8,8) mit Zusatz von SDS, DTT und Glycerin. Es zeigten sich allerdings deutliche Kreuzreaktivitäten des Serums zu Mandelproteinen [322].



# 3 Ergebnisse und Diskussion

## 3.1 Untersuchung verschiedener Assayformate

Verschiedene Immunoassay-Formate wurden untersucht, um die jeweilige Eignung für die empfindliche, schnelle, präzise und robuste Detektion von Erdnuss bzw. Haselnuss in komplexen Lebensmitteln zu vergleichen. Dabei wurden sowohl nicht-kompetitive Formate (Reagenzüberschuss), wie Immunoassays mit immobilisiertem Antigen und Sandwich-Immunoassays, als auch indirekt-kompetitive Immunoassays (Reagenzlimitierung) in Betracht gezogen.

Die im Folgenden angegebenen Analytkonzentrationen basieren auf der in Kap. 5.3.1 (S. 156) beschriebenen Extraktionsprozedur. Hierbei werden Stammlösungen mit definierten Konzentrationen von 9 g/L ganze Erdnuss bzw. 10 g/L ganze Haselnuss erhalten. Die Verdünnung der Stammlösungen zu den jeweils angegebenen Konzentrationen erfolgte mit Extraktionspuffer.

### 3.1.1 Kompetitive Immunoassays

Der entscheidende Schritt im indirekt-kompetitiven Immunoassay ist der Kompetitionsschritt. Die weiteren Schritte dienen nur zur Messung des im Kompetitionsschritt gebundenen Antikörpers. Daher ist es entscheidend, die Kinetik im Kompetitionsschritt zu berücksichtigen, um die Leistungsfähigkeit des Immunoassays zu optimieren. Zu diesem Zweck wurden indirekt-kompetitive Immunoassays durchgeführt, bei denen jeweils Antikörper mit Erdnuss-Standard vorinkubiert wurden (jeweils 150  $\mu$ L Standard und Antikörper pro Kavität). Bei dem Antikörper handelte es sich um ein polyklonales Antiserum aus Kaninchen, welches kommerziell erhältlich ist (AbKem Iberia, Spanien). Die Dauer der Vorinkubation betrug 18 Stunden und wurde in Mikrotiterplatten aus Glas durchgeführt, um eine Adsorption der Proteine an der Oberfläche zu verhindern. Jeweils 200  $\mu$ L der Mischungen wurden in eine mit Erdnussextrakt vorbeschichtete und geblockte (1,5 % BSA in PBS) Platte zu definierten Zeitpunkten überführt und die Kompetition durch Waschen der Mikrotiterplatte gleichzeitig abgebrochen. Dabei wurden Kalibrierkurven mit unterschiedlich langer Inkubationsdauer der Mischungen aus Antigen und Antikörper auf der Polystyrol-Mikrotiterplatte erhalten. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte mittels Peroxidase-markiertem anti-Kaninchen-Antikörper und sukzessiver Inkubation mit Substratlösung.

Ohne Normierung der Inhibitionskurven ist optisch zunächst kein Unterschied erkennbar, die Kurven scheinen lediglich in Richtung der Ordinate gestreckt (Abb.

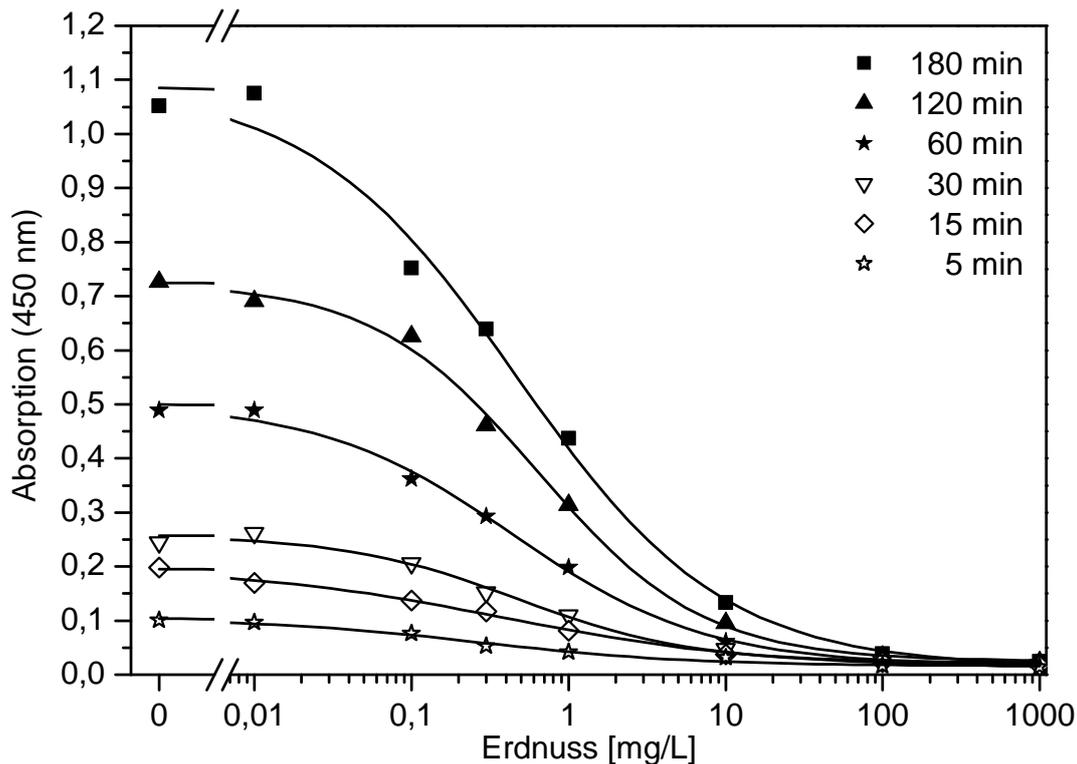


Abb. 3.1: Indirekt-kompetitiver Immunoassay (Erdnuss), Einfluss der Kompetitionsdauer von vorinkubierten Mischungen aus Antiserum (AbKem Iberia, polyklonal aus Kaninchen) und Standard (Antigenkonzentration bei Beschichtung 0,5 mg/L Erdnuss, Antikörperverdünnung 1 : 20.000).

3.1). Ein besserer optischer Vergleich ist bei Normierung der Kalibrierkurven möglich. Dazu werden die Kurven zunächst um den Betrag der unteren Asymptote nach unten verschoben und anschließend um einen Faktor gestreckt, welcher der reziproken oberen Asymptote entspricht. Nach der Transformation betragen die unteren Asymptoten aller Kurven damit  $D = 0$ , die oberen Asymptoten  $A = 1$  (vgl. Gl. 2.6, S. 38). Die beiden verbleibenden Parameter der vierparametrischen Funktionsgleichung sind somit der Testmittelpunkt ( $B/B_0 = 0,5$ ) und die Steigung im Wendepunkt. Die Testmittelpunkte und damit die Sensitivitäten können also direkt verglichen werden. Der Steigungsparameter lässt oftmals auf Eigenschaften von polyklonalen Seren rückschließen (Verteilung der Klone), ist aber hier von untergeordneter Bedeutung. Bei Verwendung niedriger Antigenkonzentrationen bei der Beschichtung (0,5 mg/L Erdnuss) und niedriger Antikörperkonzentrationen (Verdünnung 1 : 20.000) sind keine signifikant unterschiedlichen Verläufe der normierten Kurven erkennbar (Abb. 3.2). Die Empfindlichkeit der Immunoassays ist somit identisch und unter den gewählten Bedingungen unabhängig von der Kompetitionsdauer. Auf den ersten Blick ist dieser Sachverhalt verwunderlich, da z. B. Kalibrierkurven mit maximale Absorptionen von unter 70 mAU bei fünfminütiger

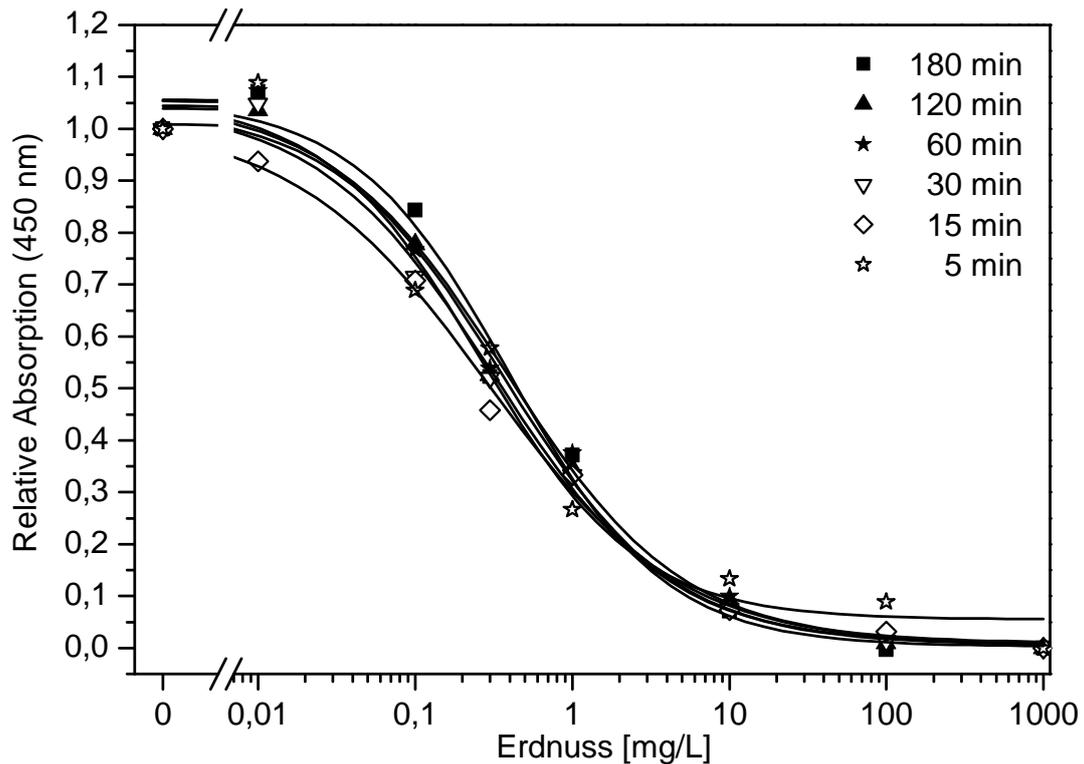


Abb. 3.2: Indirekt-kompetitiver Immunoassay (Erdnuss), normierte Kurven, Einfluss der Kompetitionsdauer von vorinkubierten Mischungen aus Erdnuss-Antiserum (AbKem Iberia, polyklonal aus Kaninchen) und Standard (Antigenkonzentration bei Beschichtung 0,5 mg/L Erdnuss, Antikörperverdünnung 1 : 20.000).

Inkubation als unbrauchbar erscheinen.

Bei Verwendung höherer Antigenkonzentrationen bei der Beschichtung und bei höheren Antikörperkonzentrationen sind bei den normierten Kurven dagegen deutliche horizontale Verschiebungen abhängig von der Kompetitionsdauer zu beobachten (Abb. 3.3). Mit steigender Inkubationsdauer wurde eine Erhöhung des Testmittelpunkts beobachtet, entsprechend einem Sensitivitätsverlust. Zwischen kürzester und längster Inkubation (5 min bzw. 180 min) wurde ein Unterschied in der Empfindlichkeit um einen Faktor  $\approx 10$  ermittelt. Diese Tatsache lässt sich auf die Ausbildung von bivalenten, praktisch irreversiblen Bindungen des Antikörpers auf der Oberfläche zurückführen. Mit der Inkubationsdauer steigt die Anzahl der ausgebildeten bivalenten Antikörperbindungen durch die hohe Antigenichte auf der Oberfläche. Die reversiblen monovalenten Bindungen mit immobilisiertem oder gelöstem Antigen werden zurückgedrängt. Dadurch wird der Test unempfindlicher. Da bivalente Bindungen bei hinreichend geringer Antigenkonzentration bei der Beschichtung und geringer Antikörperkonzentration unterdrückt werden können, ist bei der Entwicklung kompetitiver Immunoassays besonderes Augenmerk

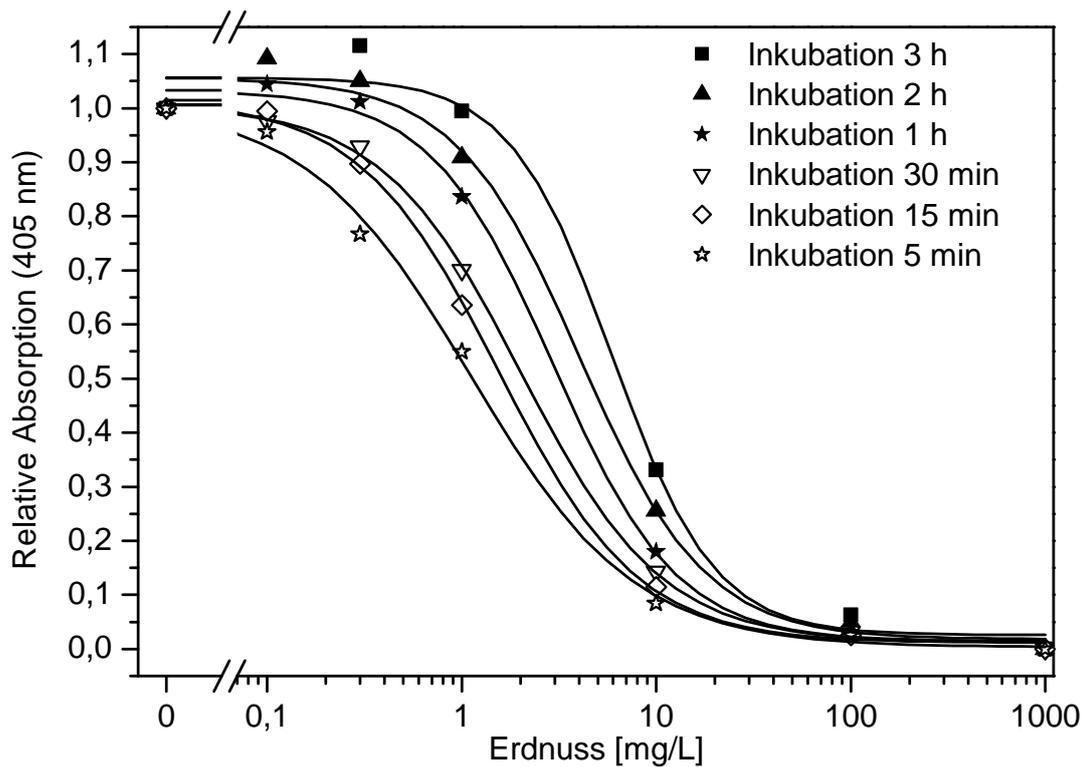


Abb. 3.3: Indirekt-kompetitiver Immunoassay (Erdnuss) mit hohen Antigenkonzentrationen bei der Beschichtung und hohen Antikörperkonzentrationen, normierte Kurven, Einfluss der Kompetitionsdauer von vorinkubierter Mischung aus Antiserum (AbKem Iberia, polyklonal aus Kaninchen) und Standard (Antigenkonzentration bei Beschichtung 10 mg/L Erdnuss, Antikörperverdünnung 1 : 5.000).

auf die Optimierung von Kompetitor- und Antikörperkonzentration zu richten [243]. Für die Routineanalytik ist ein zusätzlicher Vorinkubationsschritt bzw. eine nur fünfminütige Inkubationszeit dagegen nicht praktikabel und zudem mit weiteren Fehlerquellen behaftet. Andererseits eröffnet sich durch zeitlich aufgelöste Inkubation einer vorinkubierten Mischung aus Antikörper und Antigen bzw. Hapten eine Alternative zur Abschätzung von Antikörper-Affinitäten. Die Ermittlung von Antikörper-Affinitäten ist eine der wichtigsten Aufgaben beim Screening von vielen Antikörpern.

Weitere indirekt-kompetitive Immunoassays wurden mit dem polyklonalen Antiserum aus Kaninchen (AbKem Iberia, Erdnuss) durchgeführt. Die Antigenkonzentrationen bei der Beschichtung und die Verdünnungen des Antiserums wurden bei konstanter Kompetitionsdauer variiert. Der Vergleich der Testmittelpunkte erfolgte nach der Kurvenanpassung. Wie erwartet, sanken mit den Antikörperkonzentrationen und mit den Antigenkonzentrationen bei der Beschichtung auch die Testmittelpunkte. Durch Umformung des Massenwirkungsgesetzes lässt sich ein

Zusammenhang zwischen minimalem Testmittelpunkt und Affinität des Antikörpers aufstellen [243]. Unter optimalen Assaybedingungen entspricht der Testmittelpunkt (molare Antigenkonzentration) der reziproken Affinität des Antikörpers. Da in der Praxis bei sehr niedrigen Antikörperkonzentrationen keine Detektion mehr möglich ist, lässt sich die Affinität hiermit meist nur näherungsweise bestimmen. Bei dem untersuchten Erdnuss-Antiserum ergab sich durch Extrapolation ein Grenzwert von 0,15 mg/L Erdnussprotein als minimaler Testmittelpunkt. Ausgehend von einem Molekulargewicht der detektierten Erdnussproteine von 30–50 kDa ergibt sich damit eine Affinitätskonstante von mindestens  $4,0\text{--}6,7 \cdot 10^9$  L/mol.

### 3.1.2 Immunoassays mit immobilisiertem Antigen

Beim Immunoassay mit immobilisiertem Antigen werden zunächst Probe bzw. Standards auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Anschließend wird sukzessive mit Antigen-bindendem Antikörper, markiertem anti-Spezies-Antikörper und Substrat inkubiert. Zwischen jeweils zwei Inkubationsschritten wird ein Waschschritt durchgeführt.

Es wurde zunächst die Signalabhängigkeit von der Konzentration des Erdnuss-Antiserums aus Kaninchen (AbKem Iberia) untersucht. Die Mikrotiterplatte wurde mit einer Verdünnungsreihe von Erdnussextrakt beschichtet und mit 1,5 % BSA in PBS geblockt. Es wurden Verdünnungen des Serums von 1 : 2.000–20.000 und Inkubationszeiten von 1–3 Stunden untersucht. Die Menge an gebundenem IgG wurde nach Zugabe von Peroxidase-markiertem anti-Kaninchen-Antikörper und Zugabe von Substrat photometrisch gemessen. Um die erhaltenen Kalibrierkurven optisch vergleichen zu können, wurden sie normiert. Erwartungsgemäß zeigte sich, dass die Empfindlichkeit des Immunoassays mit immobilisiertem Antigen von der Verdünnung des Antiserums und von der Inkubationsdauer abhängig ist (Abb. 3.4). Allerdings war eine direkte Proportionalität unter den gewählten Bedingungen nicht gegeben, d. h. bei einer Verdopplung der Antikörperkonzentration oder der Inkubationsdauer halbierte sich nicht die Antigenkonzentration, bei der halbmaximales Signal erreicht wurde. Damit bewegten sich die Serumkonzentrationen und die Inkubationszeiten bereits im Bereich einer Sättigung, eine weitere signifikante Steigerung der Empfindlichkeit war daher nicht zu erwarten.

Auch der Einfluss des markierten anti-Kaninchen-Antikörpers wurde untersucht. Dabei zeigte sich, dass durch Erhöhung der Konzentration des markierten Antikörpers bzw. der Inkubationsdauer die Empfindlichkeit des Tests ebenfalls bis zu einer Sättigung erhöht werden kann. Eine Verdünnung des markierten anti-Kaninchen-Antikörpers von 1 : 10.000 und eine einstündige Inkubation erwiesen sich als optimal. Bei höherer Konzentration oder längerer Inkubationsdauer dieses Antikörpers verstärkte sich lediglich die unspezifische Bindung, wodurch kein weiterer Gewinn an Sensitivität möglich ist. Als minimale Nachweisgrenze wurden bei Verwendung des Immunoassays mit immobilisiertem Antigen  $\approx 5$  µg/L Erdnuss im Extrakt ermittelt, entsprechend der Konzentration bei einer Absorption des Blindwertes plus dreifacher Standardabweichung ( $n = 5$ ). Bei Interpolation

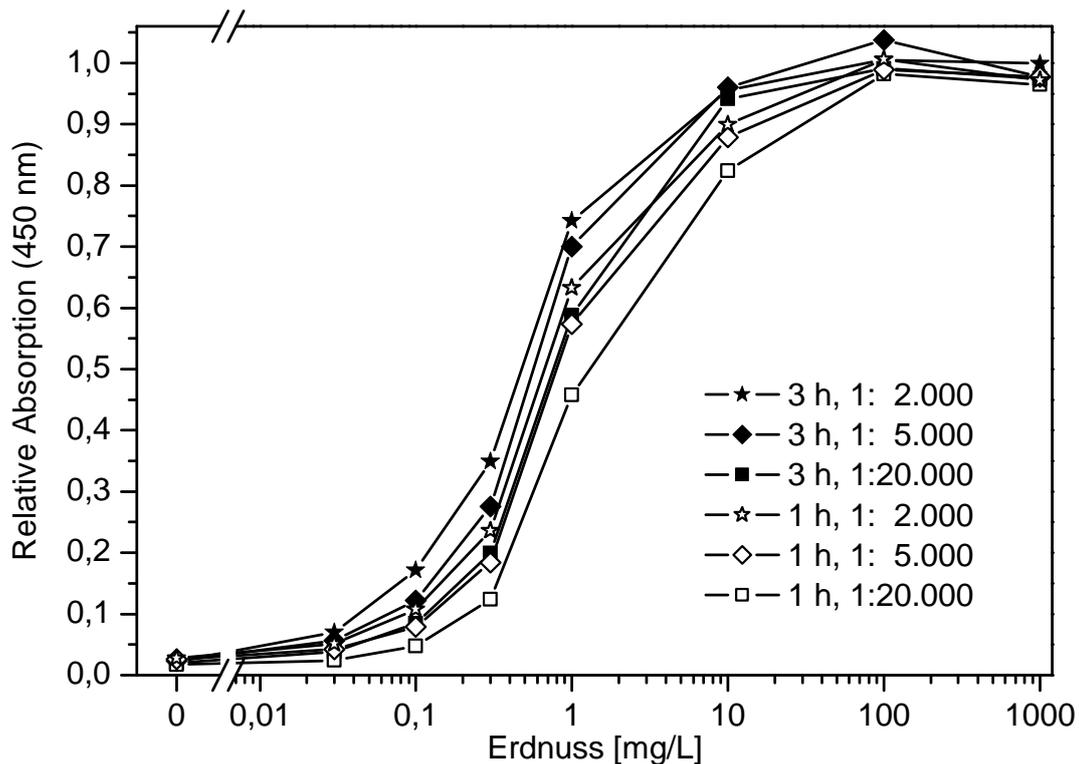


Abb. 3.4: Immunoassay mit immobilisiertem Antigen (Erdnuss), normierte Kurven, Einfluss der Verdünnung des Antiserums (AbKem Iberia, polyklonal aus Kaninchen) und der Inkubationsdauer.

einer unteren angenommenen Nachweisgrenze bei  $B/B_0 = 15\%$  ergibt sich diese zu  $\approx 50 \mu\text{g/L}$  Erdnuss. Wenn ein Extraktionsverhältnis von 1 g Lebensmittel mit 20 mL Extraktionsmittel angenommen wird, entspricht eine Analytkonzentration von  $50 \mu\text{g/L}$  dabei einer Konzentration von 1 mg/kg (1 ppm) in der Probe.

### 3.1.3 Sandwich-Immunoassay

Da die Speicherproteine von Erdnuss und Haselnuss jeweils mehrere Epitope besitzen, ist es bei entsprechender Selektion von Antikörpern möglich, Sandwich-Immunoassays zu entwickeln. Aufgrund des Antikörperüberschusses ist außerdem eine höhere Empfindlichkeit bei Verwendung von Sandwich-Immunoassays als bei kompetitiven Assays zu erwarten. Zudem sind mit Sandwich-Immunoassays im Vergleich zu Immunoassays mit immobilisiertem Antigen höhere Selektivitäten zu erwarten, da zwei voneinander verschiedene Epitope erkannt werden müssen.

Da nicht bekannt war, welche Epitope von den vorhandenen Antikörpern gebunden werden, wurde zunächst versucht, mit einer Kombination von zwei willkürlich ausgewählten Antikörpern einen Sandwich-Immunoassay zu entwickeln. Es wurden exemplarisch zwei polyklonale Antikörper (#01, Huhn und Kaninchen,

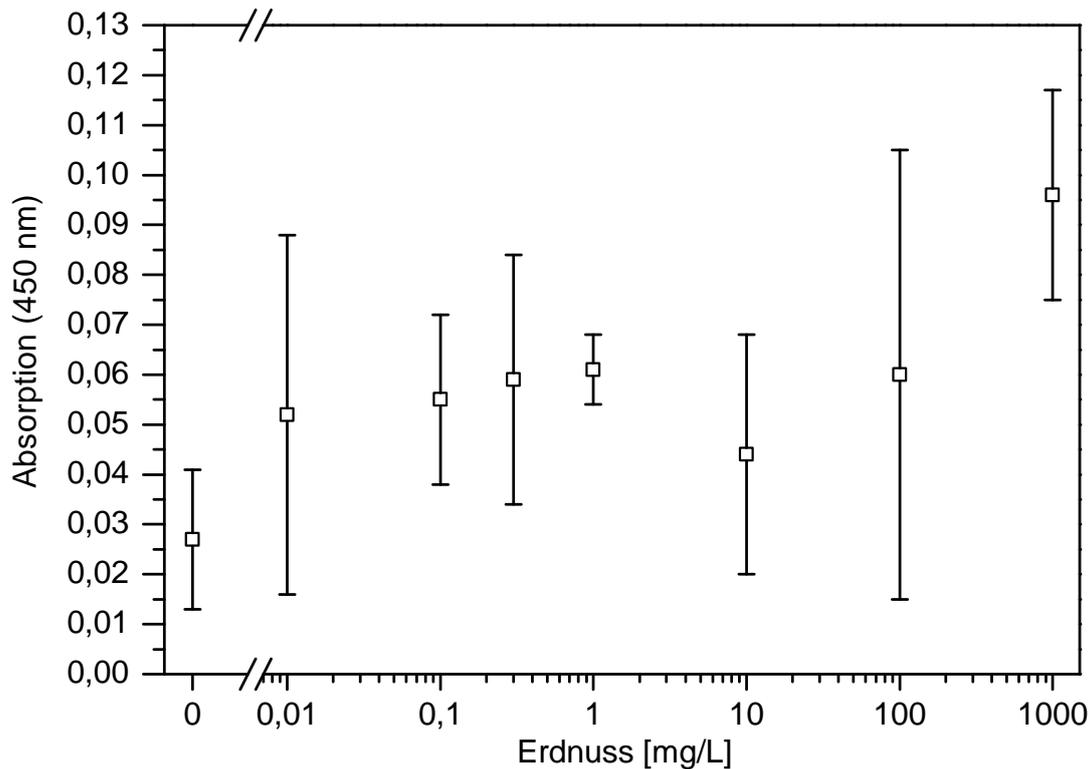


Abb. 3.5: Sandwich-Immunoassay (Erdnuss) mit polyklonalem Fängerantikörper (1 : 20.000, AbKem Iberia, Kaninchen) und polyklonalem Detektionsantikörper (1 : 5.000, #01, Huhn).

AbKem Iberia) verwendet und diese in verschiedenen Verdünnungen eingesetzt (1 : 1.000–20.000). Unter den gewählten Bedingungen war jedoch keine Messung von Erdnussprotein möglich, sowohl bei Verwendung des Kaninchen-Antikörpers als Fängerantikörper und des Huhn-Antikörpers als Detektionsantikörper als auch in umgekehrter Konstellation (Abb. 3.5).

Die verwendeten Antikörper erkennen offensichtlich nicht zwei paarweise verschiedene Epitope am gleichen Protein. Bei Mischimmunisierungen, wie hier am Beispiel Erdnussproteine der Fall, werden oftmals nur Antikörper gegen ein Antigen (pseudomonoklonales Serum) bzw. Antikörper gegen wenige verschiedene Antigene gebildet. Vermutlich erkennen die in den Seren jeweils vorherrschenden Immunglobuline verschiedene Proteine oder möglicherweise das gleiche Epitop. Weitere mögliche Ursachen für den negativen Befund sind sterische Hinderung, also zu geringer räumlicher Abstand der beiden erkannten Epitope zueinander, oder geringe Affinität der Antikörper.

Geeignete Antikörperpaare zur Entwicklung von Sandwich-Immunoassays sind offenbar nicht leicht zu finden, selbst bei Verwendung von polyklonalen Seren. Um darüber hinaus höchstmögliche Empfindlichkeit des finalen Tests zu erreichen, erschien ein umfassendes Screening der vorhandenen Antikörper unumgänglich.

## 3.2 Charakterisierung der polyklonalen Antikörper

Für die Entwicklung von Erdnuss- bzw. Haselnuss-Antikörpern ist prinzipiell eine Immunisierung mit ungereinigten Proteinextrakten („Protein-Assay“) oder mit einem ausgewählten Protein denkbar, beispielsweise einem Allergen („Allergen-Assay“) [11]. Da im frühen Stadium des Projekts noch keine aufgereinigten Proteine zur Verfügung standen, wurden die Antikörper mittels Immunisierungen mit Proteinextrakten generiert. Zur Herstellung der Proteinextrakte wurden geröstete Erdnüsse bzw. Haselnüsse mit Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS, 20 mM Tris, 1 M NaCl, pH 7,4) extrahiert.

### 3.2.1 Antikörper vom Huhn

Eine Übersicht der verfügbaren polyklonalen Erdnuss- und Haselnuss-Antikörper aus Huhn befindet sich in Tab. 5.1 bzw. Tab. 5.2 (Kap. 5.2.2, S. 151). Die Antikörper wurden mittels Präzipitation aus Eidotter von immunisierten Hühnern gewonnen [216]. Antikörper #01 erwies sich als wenig affin und wurde daher im folgenden nicht weiter untersucht. Die zur Detektion verwendeten Peroxidase-markierten anti-Huhn-Antikörper verschiedener Hersteller zeigten signifikante Qualitätsunterschiede. Bei Verdünnungen, die noch nicht zu deutlich erhöhten unspezifischen Bindungen führten, waren Signalunterschiede unter gleichen Bedingungen von einem Faktor  $\approx 3-10$  zu beobachten. Der markierte anti-Huhn-Antikörper der Firma Jackson erwies sich als am empfindlichsten und wurde daher in den weiteren Experimenten für die Detektion verwendet.

Zur Charakterisierung der Erdnuss-Antikörper aus Huhn wurden die Antigenkonzentrationen bei der Beschichtung und die Antikörperkonzentrationen bei Verwendung in indirekt-kompetitiven Immunoassays optimiert. Die erhaltenen Testmittelpunkte sind in Abb. 3.6 dargestellt. In Tab. 3.1 sind die wesentlichen Charakteristika der Erdnuss-Antikörper aus Huhn zusammengefasst. Die niedrigsten Testmittelpunkte und damit die höchsten Sensitivitäten wurden bei Verwendung der Erdnuss-Antikörper #02, #03 und #16 ermittelt. Die Proteinkonzentrationen der Antikörperlösungen wurden mittels MicroBC-Assay gemessen [323], unter Verwendung von Ovalbumin als Standard. Zusätzlich ist eine relative Farbentwicklung in mAU/min angegeben, die aus dem Blank der Inhibitionskurve bei einer Antigenkonzentration bei der Beschichtung von 0,1 mg/L Erdnuss und einer Antikörperverdünnung von 1:500 ermittelt wurde. Aus der relativen Farbentwicklung lassen sich Rückschlüsse auf die Konzentration an aktivem Antikörper (Titer) und auf die Affinität der Antikörper ziehen. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass bei Betrachtung der Blanks das Prinzip eines Immunoassays mit immobilisiertem Antigen zugrundeliegt. Zum direkten Rückschluss von relativen Farbentwicklungen auf Affinität und Konzentration der Antikörper muss exakterweise die unspezifische Bindung berücksichtigt werden. Der „Sockelwert“ der Inhibitionskurve ist also zu minimieren und für alle zu vergleichenden Antikörper zu nivellieren. Alternativ kann für eine Näherung die Absorption jeweils um den

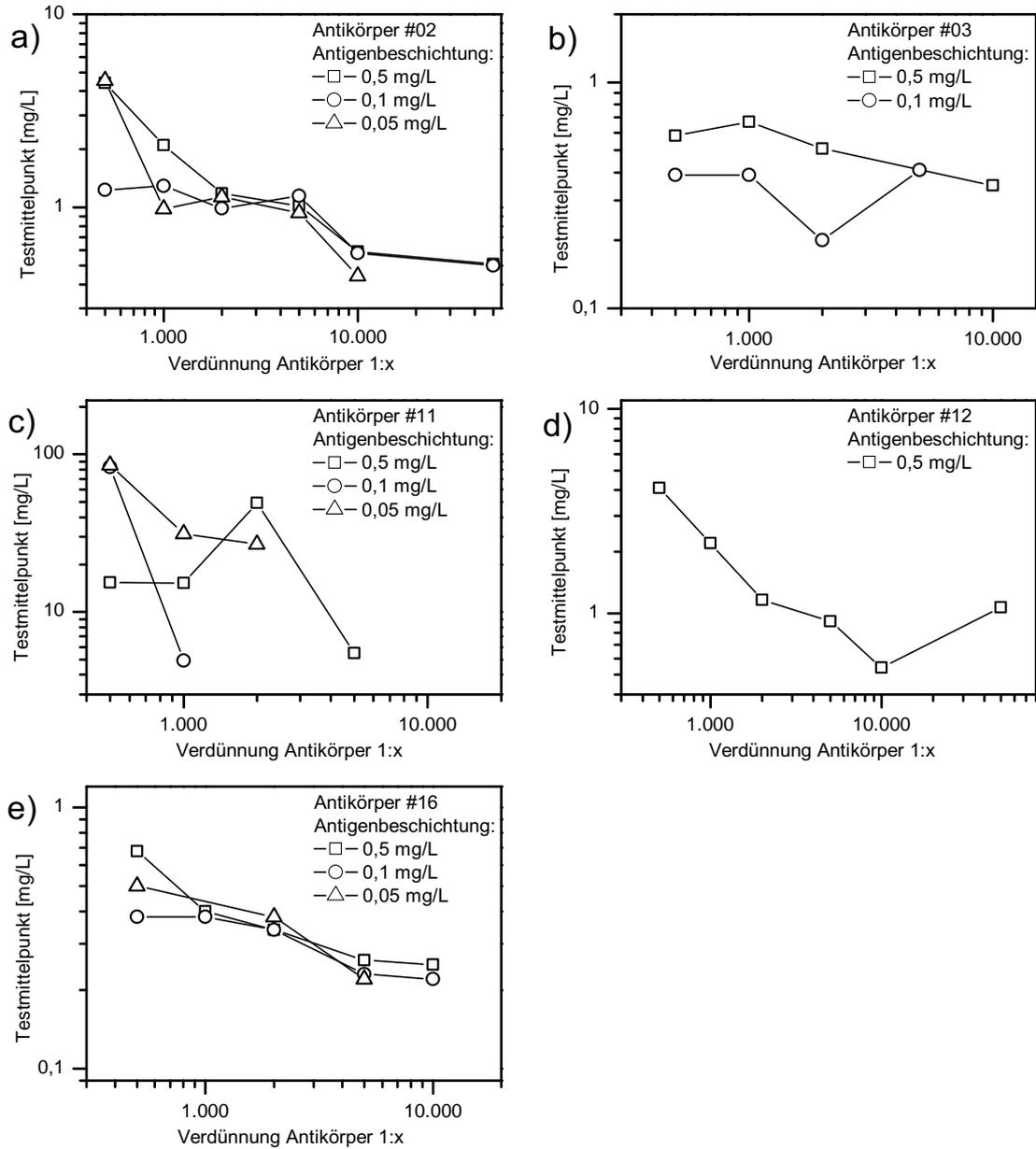


Abb. 3.6: Erdnuss-Antikörper (polyklonal aus Huhn), Testmittelpunkte in indirekt-kompetitiven Immunoassays bei Variation der Antikörperkonzentration #02, #03, #11, #12 und #16 (a-e) und bei Variation der Antigenkonzentration bei der Beschichtung.

Tab. 3.1: Charakteristika der polyklonalen Erdnuss-Antikörper aus Huhn.

Antikörper	min. Testmittelpunkt [mg/L]	rel. Farbentwicklung [mAU/min]	Proteinkonz. [g/L]
#02	0,44	201	27
#03	0,20	15,7	26
#11	4,9	20,0	36
#12	0,54	12,9	34
#16	0,22	36,1	27
#17	790	< 3	38

Tab. 3.2: Charakteristika der polyklonalen Haselnuss-Antikörper aus Huhn.

Antikörper	min. Testmittelpunkt [mg/L]	rel. Farbentwicklung [mAU/min]	Proteinkonz. [g/L]
#04	1,0	160	40
#05	0,8	28	27
#14	0,8	214	28
#15	0,9	277	31
#18	1,3	293	30
#41	1,2	80	32

entsprechenden „Sockelwert“ reduziert werden. Bei zu hohen Reagenzkonzentrationen ist außerdem besonders auf die Linearität der Detektion (Photometer) zu achten.

Die bei Messung der polyklonalen Haselnuss-Antikörper aus Huhn erhaltenen Ergebnisse sind in Tab. 3.2 aufgeführt. Die relative Farbentwicklung wurde hier bei Verwendung einer Antigenkonzentration bei der Beschichtung von 0,5 mg/L Haselnuss und einer Antikörperverdünnung von 1 : 10.000 gemessen. Nach den im indirekt-kompetitiven Immunoassay erhaltenen Resultaten sind die Antikörper #05, #14 und #15 am affinsten, der Titer des Antikörpers #05 erwies sich jedoch als relativ niedrig. Interessanterweise ist die Spannweite der minimalen Testmittelpunkte bei den Haselnuss-Antikörpern deutlich geringer als bei den Erdnuss-Antikörpern. Eine Diskriminierung aufgrund der Testmittelpunkte ist daher bei den Haselnuss-Antikörpern aus statistischen Gründen nicht eindeutig.

### 3.2.2 Antikörper vom Schaf

Bei den Schaf-Antiseren (siehe Kap. 5.2.2, S. 151) wurde in allen vier Fällen (Erdnuss MF und RB, Haselnuss RB und MF) ein sehr niedriger Titer und eine relativ geringe Affinität festgestellt. Unter vergleichbaren Bedingungen wurde beispielsweise im indirekt-kompetitiven Immunoassay mit einem 1 : 500 verdünnten Serum von Schaf (Erdnuss MF) ein maximales Signal von 0,4 AU erzielt, mit dem Kaninchenserum R646 dagegen bereits bei einer Verdünnung von 1 : 250.000 ein Signal

von 0,8 AU. Zur Abklärung des Sachverhalts wurden Peroxidase-markierte anti-Schaf-Antikörper von verschiedenen Herstellern untersucht. Die dabei gemessenen Signalintensitäten waren jedoch in allen Fällen ähnlich niedrig. Bei Verwendung von zu hohen Konzentrationen der anti-Schaf-Antikörper wurde dagegen eine starke unspezifische Bindung beobachtet. Die markierten anti-Schaf-Antikörper konnten daher als Ursache für die negativen Resultate ausgeschlossen werden. Aufgrund der sehr geringen Titer und aufgrund der geringen Affinitäten kamen Antikörper vom Schaf für die Entwicklung von Sandwich-Immunoassays daher nicht in Betracht. Die Ursache für die geringen Affinitäten ist vermutlich bei der Generierung der Antikörper zu suchen. Eine stark ausgeprägte Affinitätsreifung ist entscheidend, um polyklonale Antikörper mit hoher Affinität zu erhalten. Hierfür müssen mehrere Immunisierungsschritte mit optimierten Techniken durchgeführt werden. Die Generierung hochaffiner Antikörper ist also mit einem entsprechenden Zeitbedarf verbunden. Vermutlich war zum Zeitpunkt der Blutabnahme die Affinitätsreifung in den Schafen nur wenig fortgeschritten.

### 3.2.3 Antikörper vom Kaninchen

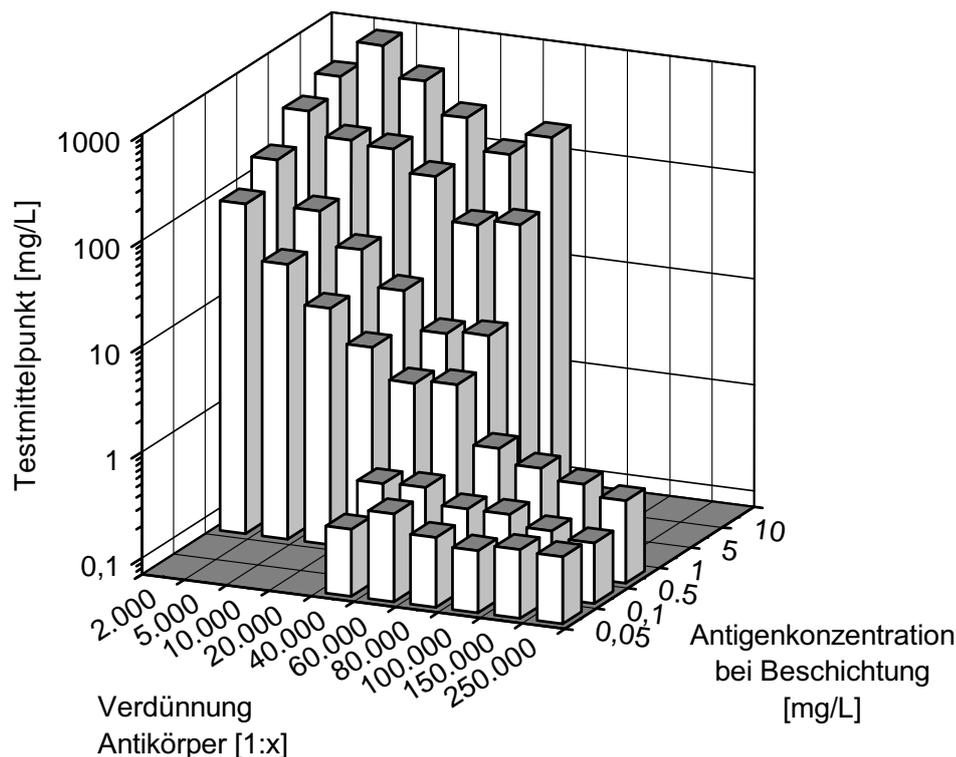


Abb. 3.7: Erdnuss-Antikörper R646 (polyklonal von Kaninchen), zweidimensionale Optimierung der Testmittelpunkte im indirekt-kompetitiven Immunoassay.

In den Tab. 5.1 und Tab. 5.2 (Kap. 5.2.2, S. 151) sind die innerhalb des Projekts generierten polyklonalen Antikörper aus Kaninchen aufgeführt. Auch die Affinitäten dieser Antikörper wurden mittels indirekt-kompetitiven Immunoassays abgeschätzt. Die zweidimensionale Optimierung der Testmittelpunkte erfolgte erneut durch Variation der Antikörperverdünnungen und der Antigenkonzentrationen bei der Beschichtung.

In Abb. 3.7 sind die mit dem Antikörper R646 erhaltenen Testmittelpunkte dargestellt. Die Inhibitionskurven wurden aufgenommen bei Antikörperverdünnungen von 1:2.000–250.000 und bei Antigenkonzentrationen bei der Beschichtung von 0,05–10 mg/L Erdnuss. Aus der Abbildung ist deutlich ersichtlich, dass mittels zweidimensionaler Optimierung der Testbedingungen eine massive Steigerung der Assaysensitivität möglich ist. Bei hohen Antigenkonzentrationen bei der Beschichtung und bei hohen Antikörperkonzentrationen betragen die Testmittelpunkte  $\approx 1.000$  mg/L. Durch die Optimierung konnten minimale Testmittelpunkte von  $0,3 \pm 0,05$  mg/L Erdnuss erhalten werden, entsprechend einem Sensitivitätsgewinn von Faktor  $\approx 3.000$ .

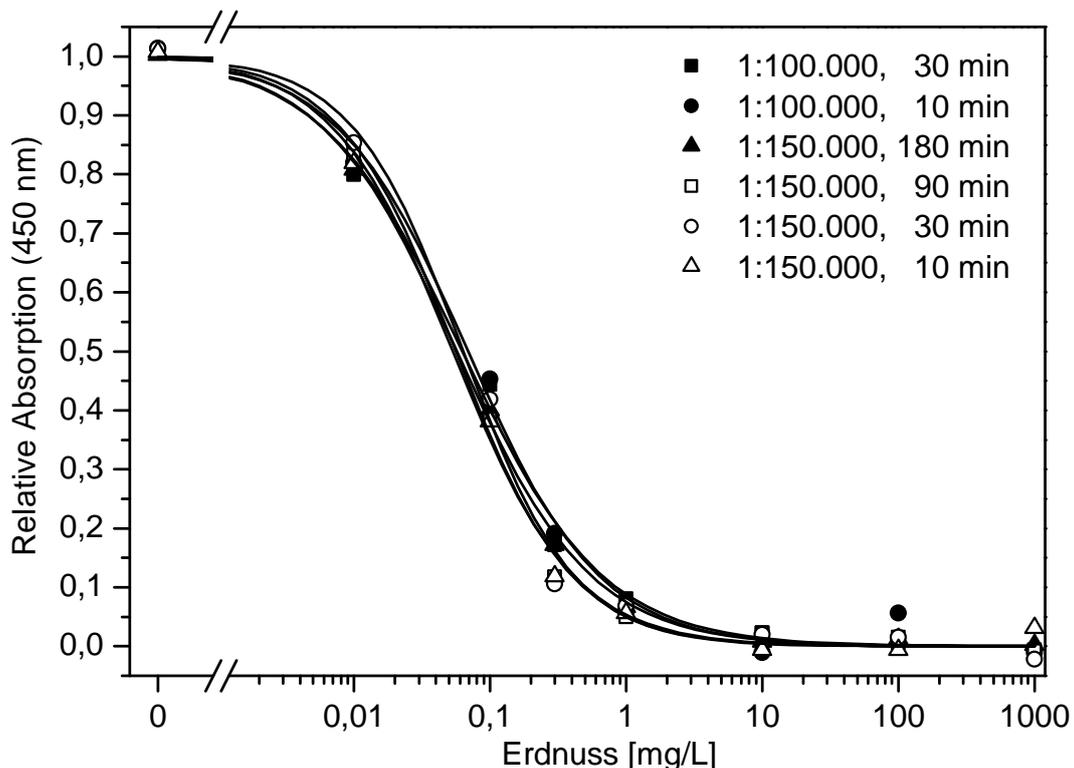


Abb. 3.8: Erdnuss-Antikörper R646 (polyklonal von Kaninchen), Einfluss der Inkubationsdauer im indirekt-kompetitiven Immunoassay bei Vorinkubation der Antikörperlösung mit den Standards (angegeben sind die Verdünnungen des Antikörpers und die Inkubationsdauer der vorinkubierten Komplexe auf der mit Antigen beschichteten Mikrotiterplatte).

Bei ausreichend langer Vorinkubation von Erdnuss-Standard mit Antikörper (siehe Kap. 3.1.1) wurde eine weitere, allerdings nur marginale Verringerung der Testmittelpunkte beobachtet. In Abb. 3.8 sind normierte Inhibitionskurven zusammengefasst, die nach Vorinkubation des polyklonalen Erdnuss-Antikörpers R646 aus Kaninchen mit Standard aufgenommen wurden. Die Mischungen aus Antigen und Antikörper wurden dabei über Nacht vorinkubiert, anschließend erfolgte die Inkubation der Mischungen für 10–180 min in einer mit Antigen beschichteten und geblockten (1,5 % BSA in PBS) Mikrotiterplatte. Die Antigenkonzentration bei der Beschichtung betrug hierbei 0,05 mg/L Erdnuss und die Verdünnung der Antikörper 1:100.000–150.000. Die Testmittelpunkte aller Kurven im indirekt-kompetitiven Immunoassay mit zusätzlichem Vorinkubationsschritt lagen zwischen 56–69 µg/L Erdnuss. Aufgrund der übereinstimmenden Werte ist davon auszugehen, dass der Test unter optimalen Bedingungen, also affinitätslimitiert, stattfand. Die niedrigeren Testmittelpunkte bei Vorinkubation sind vermutlich auf Alterung und daraus resultierender erhöhter Stabilität der Antigen-Antikörper-Komplexe zurückzuführen. Dies führt offensichtlich zu geringeren Dissoziationsraten und damit zu einer Erhöhung der scheinbaren Affinität.

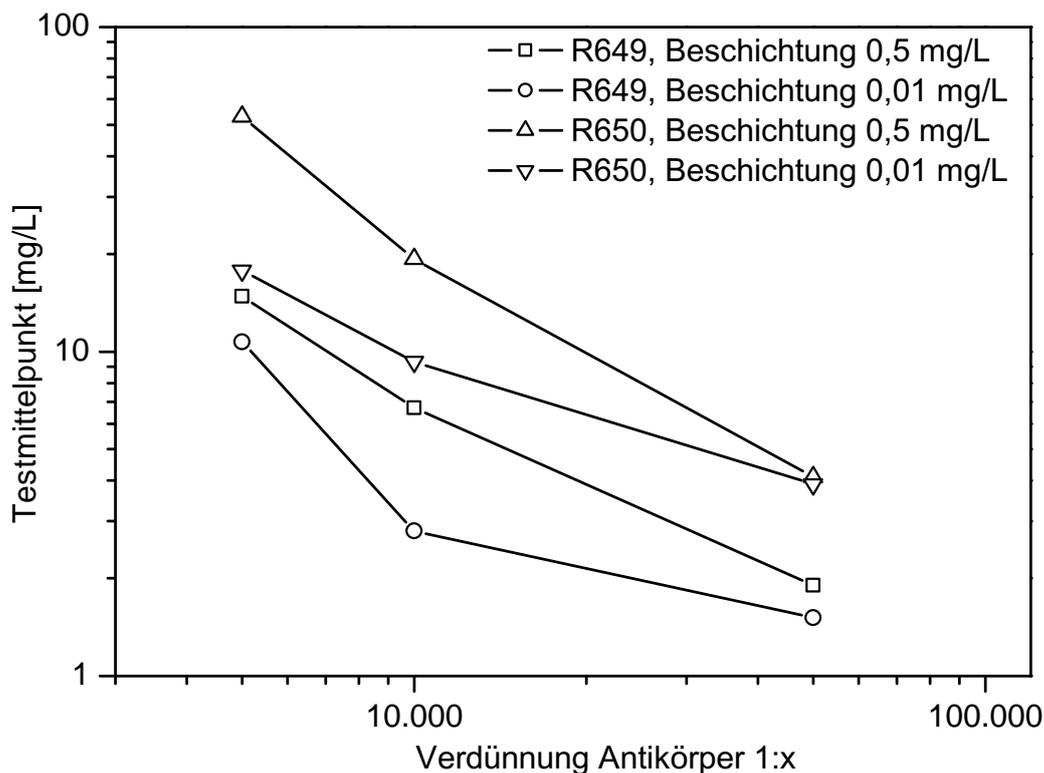


Abb. 3.9: Haselnuss-Antikörper R649 und R650 (polyklonal von Kaninchen), Testmittelpunkte bei Verwendung der polyklonalen Antikörper im indirekt-kompetitiven Immunoassay (Antigenkonzentration bei der Beschichtung 0,01 bzw. 0,5 mg/L Haselnuss).

Die polyklonalen Haselnuss-Antikörper aus Kaninchen wurden ebenfalls mittels zweidimensionaler Optimierung der Antigenkonzentration bei der Beschichtung und der Antikörperkonzentration charakterisiert. Inhibitionskurven mit gutem Kurvenverlauf wurden bei Antikörperverdünnungen von 1:5.000–50.000 erhalten. Die Antigenkonzentrationen bei der Beschichtung betragen 0,01–0,5 mg/L Haselnuss. Bei Verwendung des Antikörpers R649 wurde ein minimaler Testmittelpunkt von  $1,5 \pm 0,5$  mg/L Haselnuss ermittelt. Der Antikörper R650 zeigte mit einem minimalen Testmittelpunkt von  $3,9 \pm 1,6$  mg/L Haselnuss eine etwas geringere Affinität (Abb. 3.9). Bei Untersuchung des polyklonalen Antikörpers R648 ergab sich ein minimaler Testmittelpunkt von  $1,9 \pm 0,6$  mg/L Haselnuss. Hiervon praktisch kaum unterscheidbar war der ebenfalls polyklonale Antikörper R651 mit einem minimalen Testmittelpunkt von  $1,8 \pm 0,4$  mg/L Haselnuss (Ergebnisse nicht gezeigt).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die in indirekt-kompetitiven Immunoassays erreichbaren Testmittelpunkte bei Vergleich von Antikörpern aus Huhn und Kaninchen nahezu speziesunabhängig waren. Die mit den jeweils affinsten Antikörpern durchgeführten Immunoassays zeigten einen sehr ähnlichen Kurvenverlauf. Im Gegensatz hierzu erwiesen sich die polyklonalen Antikörper aus Schaf als wenig affin und sind daher nicht für die Entwicklung von sensitiven Immunoassays geeignet.

## 3.3 Charakterisierung der monoklonalen Antikörper

Da im finalen Test die Verwendung von monoklonalen Antikörpern (Tab. 5.1 und Tab. 5.2, Kap. 5.2.2, S. 151) aufgrund ihrer Verfügbarkeit präferiert wurde, stand deren Charakterisierung im Fokus. Sowohl Immunoassays mit immobilisiertem Antigen als auch mit immobilisiertem Antikörper wurden zur Bestimmung von Affinitäten und Selektivitäten eingesetzt.

### 3.3.1 Bestimmung der IgG-Konzentrationen

Bei vielen Immunoassays zur Charakterisierung von Antikörpern ist die Nivellierung der IgG-Konzentrationen hilfreich oder sogar notwendig. Besonders bei Assayformaten mit immobilisiertem Antigen ist es vorteilhaft, zunächst eine Messung der IgG-Konzentrationen durchzuführen, da die Menge an gebundenem Antikörper hauptsächlich von der Affinität und von der Konzentration der Antikörper abhängt. Wenn die Antikörper durch Verdünnung auf einheitliche IgG-Konzentrationen nivelliert werden, sind die relativen Affinitäten direkt vergleichbar. Bei Assayformaten mit immobilisiertem Antikörper ist es in der Praxis dagegen zweckmäßiger, eine konstante Beschichtung von IgG vorzugsweise mittels vorbeschichtetem anti-Spezies-Antikörper zu erzielen.

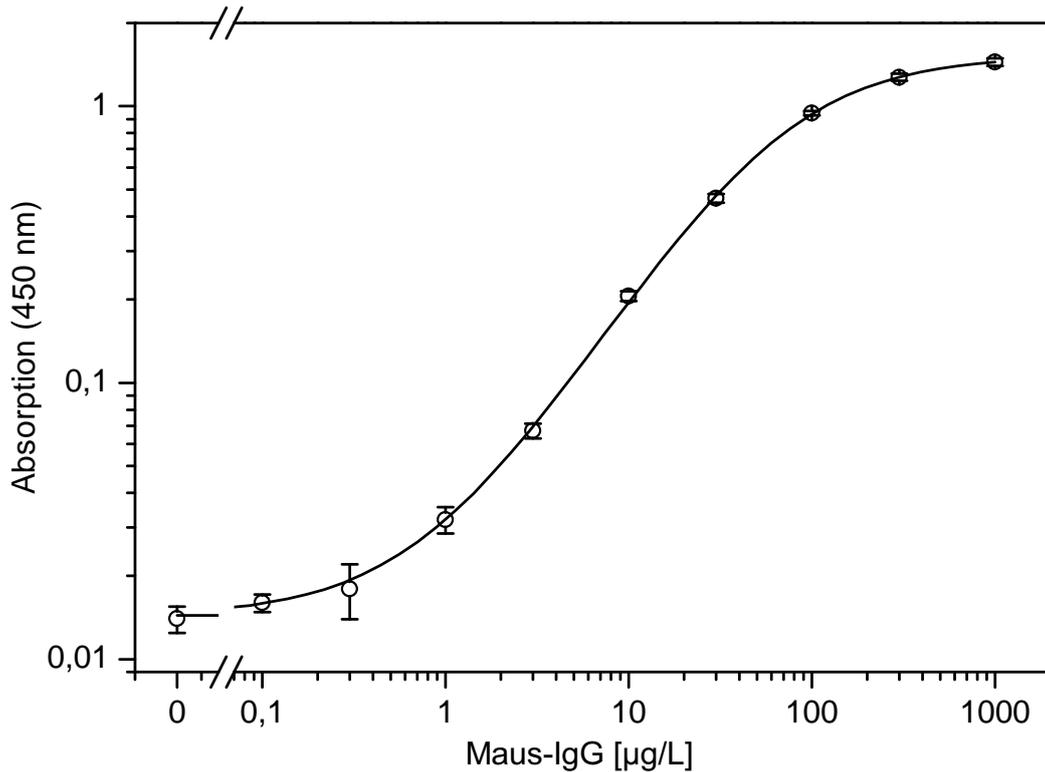


Abb. 3.10: Bestimmung von Maus-IgG, typische Kalibrierkurve des Sandwich-Immunoassays ( $n = 3$ , Nachweisgrenze  $0,3 \mu\text{g/L}$  Maus-IgG).

Tab. 3.3: Haselnuss-Antikörper, in Sandwich-Immunoassays gemessene Konzentrationen von IgG in Zellkulturüberständen und in gereinigten monoklonalen Antikörpern ( $n = 2-4$ , entsprechend Anzahl der in Messbereich befindlichen Verdünnungen; \*gereinigte Antikörper: Y61 bis Y63).

Klon	Konz. IgG [mg/L]	CV [%]	Klon	Konz. IgG [mg/L]	CV [%]
45-2E11	110	0,1	50-4F2	120	1,0
45-4G2	99	6,8	50-5H9	110	4,2
45-6G4	100	8,2	50-6B12	110	7,2
45-7B3	110	11,7	50-6B3	64	9,8
48-10F3	57	2,6	50-6E1	82	5,6
48-3B1	40	2,3	50-6G7	62	1,8
48-8G1	22	4,7	50-7B8	120	11,9
48-9F1	110	6,5	50-8A3	120	11,5
50-1G10	94	6,1	50-8B11	79	17,5
50-1G2	150	4,5	Y61*	1100	17,9
50-2D9	120	0,8	Y62*	870	1,1
50-3A11	150	6,8	Y63*	1200	19,9

Tab. 3.4: Erdnuss-Antikörper, in Sandwich-Immunoassays gemessene Konzentrationen von IgG in Zellkulturüberständen und in gereinigten monoklonalen Antikörpern (n = 2–4, entsprechend Anzahl der in Messbereich befindlichen Verdünnungen; \*gereinigte Antikörper: Y68 bis Y79).

Klon	Konz. IgG [mg/L]	CV [%]	Klon	Konz. IgG [mg/L]	CV [%]
44-10D10	53	8,9	51-3D12	65	1,6
44-10H8	66	2,7	51-3G7	71	1,1
44-1B11	86	3,8	51-4E10	230	0,9
44-1C12	130	0,1	51-5D3	97	12
44-4G2	50	9,0	51-5G9	310	0,8
44-7A7	24	41	51-6F6	33	4,3
44-8B1	49	5,8	51-7C1	20	8,9
44-8G7	24	5,0	51-7G8	190	3,2
44-8H7	35	3,6	51-9F1	65	3,8
49-2D11	97	0,9	51-9G2	110	7,9
49-4D4	160	1,5	51-9H10	90	8,1
51-10C5	<1	–	Y68*	1800	16
51-10F5	120	4,9	Y69*	1500	17
51-10G5	77	3,6	Y70*	2300	19
51-12D2	110	2,4	Y71*	1700	15
51-12D7	75	4,0	Y72*	250	7,8
51-12E3	78	2,3	Y76*	400	3,9
51-1B6	75	6,1	Y77*	160	63
51-2A12	95	0,9	Y78*	500	12
51-2H5	150	2,9	Y79*	190	56

Die Bestimmung der IgG-Konzentrationen aller vorhandenen monoklonalen Antikörper war somit Voraussetzung für die Anwendung von verschiedenen Assayformaten. Sandwich-Immunoassays erwiesen sich als geeignet für die Messung der IgG-Konzentrationen. Als Fängerantikörper wurde ein anti-Maus-Antikörper verwendet, als Detektionsantikörper ein Konjugat aus anti-Maus-Antikörper mit Peroxidase. Die Kurvenanpassung erfolgte mit Hilfe der vierparametrischen Funktionsgleichung (Gl. 2.6, S. 38).

Durch Addition der dreifachen Standardabweichung zur Blankabsorption und Interpolation wurde eine Nachweisgrenze von 0,3 µg/L Maus-IgG ermittelt. Eine typische Kalibrierkurve für die Bestimmung der IgG-Konzentrationen ist in Abb. 3.10 abgebildet.

Zur Messung der IgG-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen und in den Lösungen der aufgereinigten monoklonalen Antikörper wurden Verdünnungsreihen hergestellt. Nach Umformung der vierparametrischen Funktionsgleichung errechneten sich die IgG-Konzentrationen aus den gemessenen Absorptionen. In

Tab. 3.3 bzw. Tab. 3.4 sind die ermittelten IgG-Konzentrationen der monoklonalen Haselnuss- bzw. Erdnuss-Antikörper zusammengefasst. Bei den Zellkulturüberständen liegen die IgG-Konzentrationen in den meisten Fällen zwischen 40–150 mg/L. Die IgG-Konzentrationen der aufgereinigten monoklonalen Antikörper (Y61 bis Y79) sind erwartungsgemäß höher und liegen in den meisten Fällen bei  $\geq 500$  mg/L IgG.

### 3.3.2 Bestimmung von Affinitäten mittels Immunoassays mit immobilisiertem Antikörper

Testformate mit immobilisierten Antikörpern zur Bestimmung von Affinitäten bieten entscheidende Vorteile. Zum einen ist es möglich, vorzugsweise mittels Vorbeschichtung eines anti-Spezies-Antikörpers, die Menge des immobilisierten Antikörper zu nivellieren. Damit sind Antikörper-Charakterisierungen ohne vorherige Messungen der IgG-Konzentrationen bzw. ohne empirische Optimierung von Antikörperverdünnungen möglich. Zudem werden Verfälschungen der ermittelten Affinität durch Multivalenzen reduziert. Die bivalente Bindung von Antikörpern ist ein wesentliches Problem bei Immunoassays mit immobilisiertem Antigen oder bei indirekt-kompetitiven Immunoassays unter suboptimalen Bedingungen.

Zur Einführung einer Markierung wurden die Erdnuss- bzw. Haselnussproteine zunächst biotinyliert. Als geeignet hierfür erwies sich eine Umsetzung von Erdnuss- bzw. Haselnussextrakten mit Biotin-NHS-Ester. Mikrotiterplatten wurden mit anti-Maus-Antikörper vorbeschichtet und der Antigen erkennende Antikörper nach einem Waschschrift in relativ hoher Konzentration zupipettiert, um eine Nivellierung zu erreichen. Die Detektion erfolgte nach Inkubation mit einem Konjugat aus Streptavidin und alkalischer Phosphatase. Es zeigte sich allerdings, dass die biotinylierten Proteine auch dann stark an die Mikrotiterplatte binden, wenn kein Antigen erkennender Antikörper immobilisiert wurde. Dieser Sachverhalt lässt sich aus der beobachteten hohen Hintergrundabsorption schließen (unspezifische Bindung). Um einen separaten Blockingschritt zu umgehen, wurden die biotinylierten Standards daher in Magermilch mit 0,5 % Tween 20 verdünnt, was zu einer Senkung des unspezifischen Signals auf  $< 30$  mAU führte (Standard 1.000 mg/L Erdnuss bzw. Haselnuss, kein Antigen erkennender Antikörper immobilisiert).

Die bei Inkubation mit dem biotinylierten Standard entsprechend 1 mg/L Erdnuss oder Haselnuss ( $n = 3$ ) erhaltenen Absorptionen wurden normiert, indem die Absorptionen der Blanks gleich 0 und die Absorptionen des Standards 1.000 mg/L (Sättigung) gleich 1 gesetzt wurden. Abb. 3.11 zeigt, dass bei Immobilisierung der monoklonalen Erdnuss-Antikörper 51-10C5, 51-12D7 und 51-2H5 die höchsten relativen Signale beim untersuchten Standard erhalten wurde. Dies lässt auf hohe Affinitäten der genannten Antikörper schließen.

Neben relativen Signalen wurden auch Quotienten aus der Absorption des biotinylierten Standards (1 mg/L und 1000 mg/L Erdnuss bzw. Haselnuss) und der

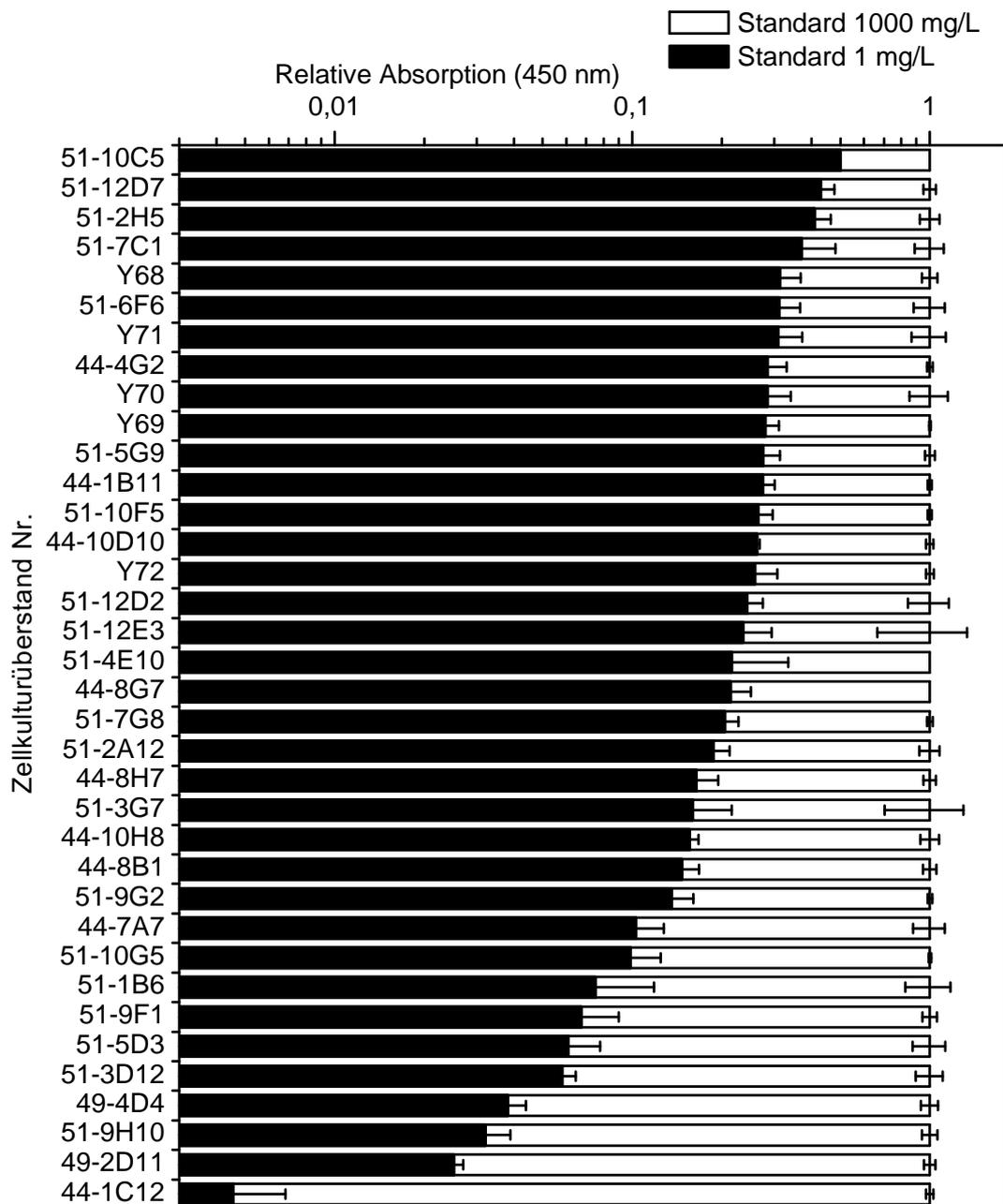


Abb. 3.11: Biotinylierte Erdnussproteine, Bindung im Immunoassay mit immobilisiertem Antikörper (n=3, Normierung: Blank gleich 0, Standard 1000 mg/L Erdnuss gleich 1).

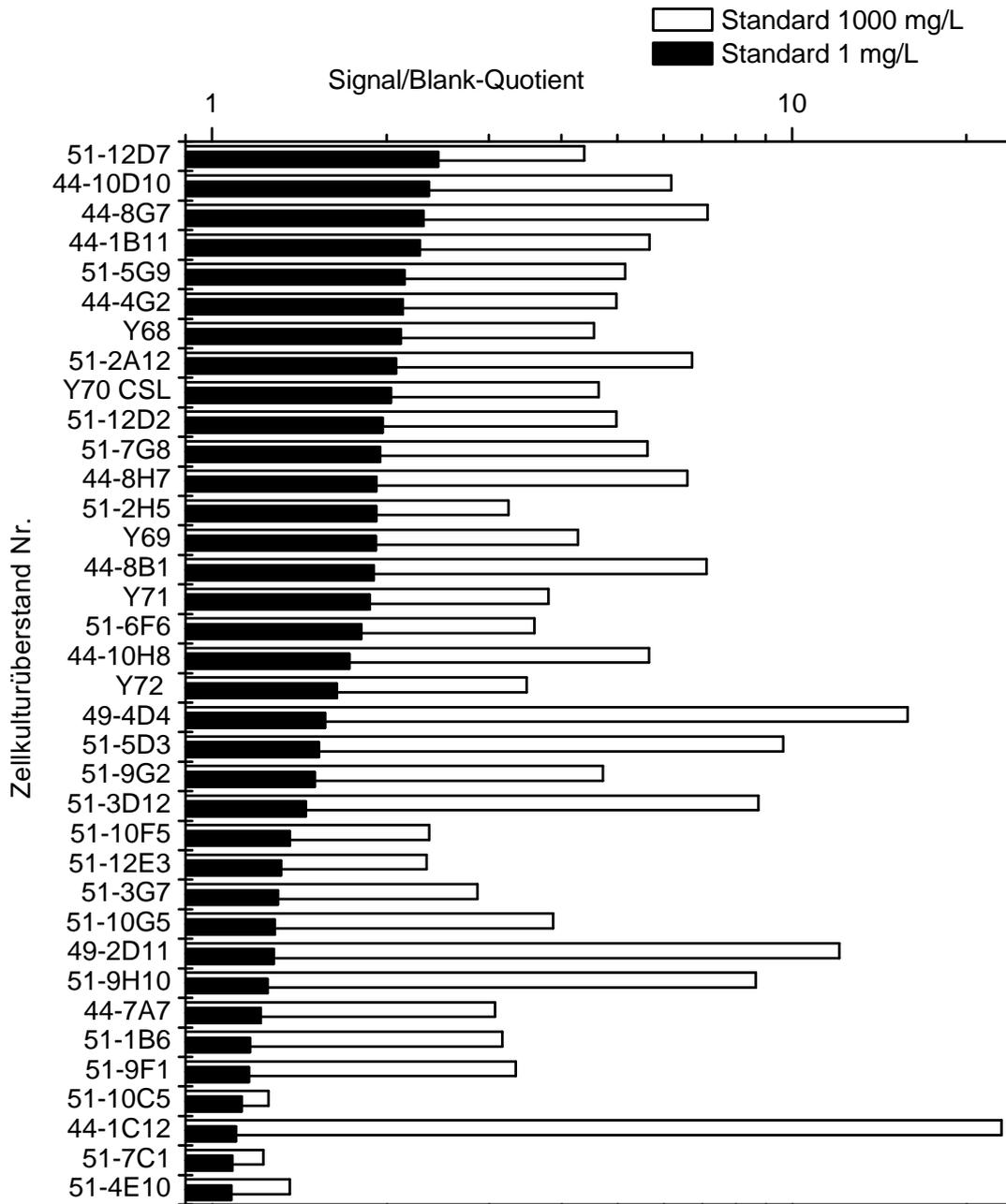


Abb. 3.12: Biotinylierte Erdnussproteine, Signal/Blank-Quotienten bei Bindung im Immunoassay mit immobilisiertem Antikörper (n = 3).

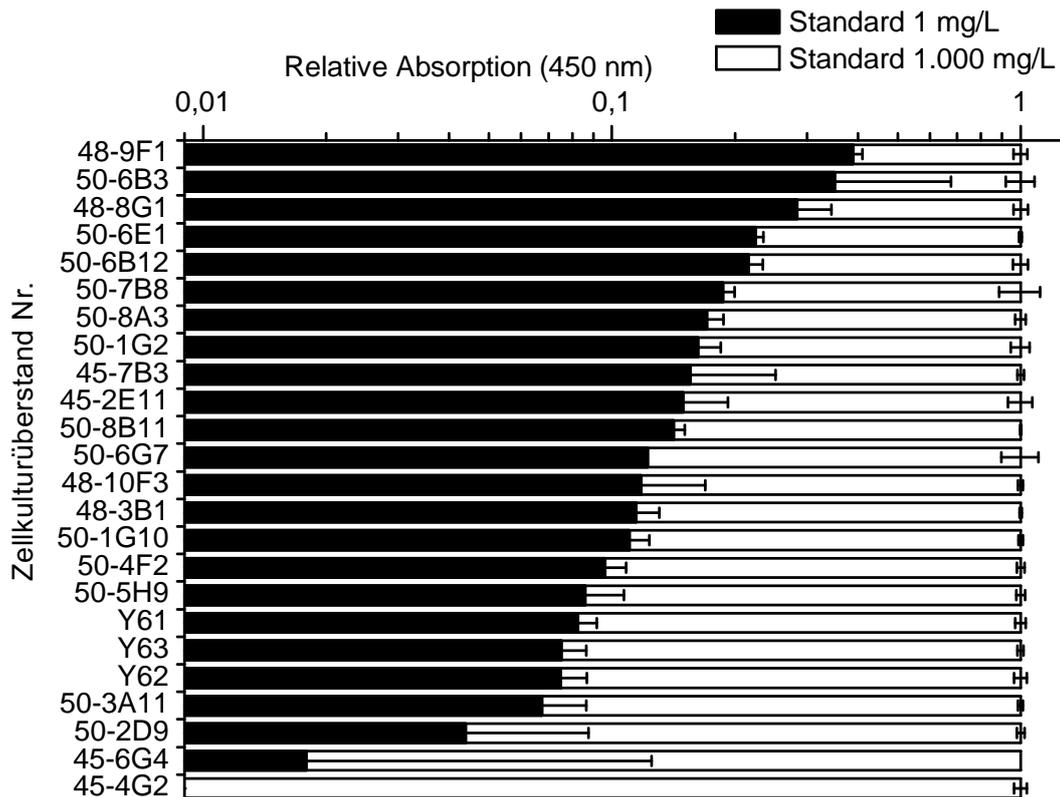


Abb. 3.13: Biotinylierte Haselnussproteine, Bindung im Immunoassay mit immobilisiertem Antikörper (n = 3, Normierung: Blank gleich 0, Standard 1000 mg/L Haselnuss gleich 1).

Absorption des Blanks berechnet. Die ermittelten Signal/Blank-Quotienten bei Verwendung der monoklonalen Erdnuss-Antikörper sind in Abb. 3.12 zusammengefasst. Bei Betrachtung des Standards 1 mg/L Erdnuss ergaben sich die höchsten Signal/Blank-Quotienten bei den Antikörpern 51-12D7, 44-10D10 und 44-8G7. Einschränkend sei erwähnt, dass in allen Fällen weder die Epitoperkennung der Antikörper bekannt ist, noch die aus der Tertiärstruktur resultierenden bevorzugten Biotinylierungsstellen der Proteine. Neben den Antikörperaffinitäten spiegeln sich auch die Konzentrationen der einzelnen Proteine in den Ergebnissen wider, da die Proteine naturgemäß nicht in äquimolaren Mengen in dem Extrakt vorliegen.

Bei den monoklonalen Haselnuss-Antikörpern wurde ebenso zunächst eine Normierung der Absorptionen (Blank gleich 0; Standard 1.000 mg/L Haselnuss gleich 1) durchgeführt. Bei Verwendung des Antikörpers 48-9F1 ergab sich beim Standard 1 mg/L Haselnuss die höchste relative Absorption, entsprechend der stärksten Bindung. Die zweit- und dritthöchsten relativen Absorptionen wurden bei Immobilisierung der Antikörper 50-6B3 und 48-8G1 ermittelt (Abb. 3.13).

Ein Vergleich der Signal/Blank-Quotienten aller untersuchten monoklonalen Haselnuss-Antikörper ist in Abb. 3.14 gezeigt. Es stellte sich heraus, dass bei Betrachtung des Standards 1 mg/L ein ähnliches Ranking wie in Abb. 3.13 erhal-

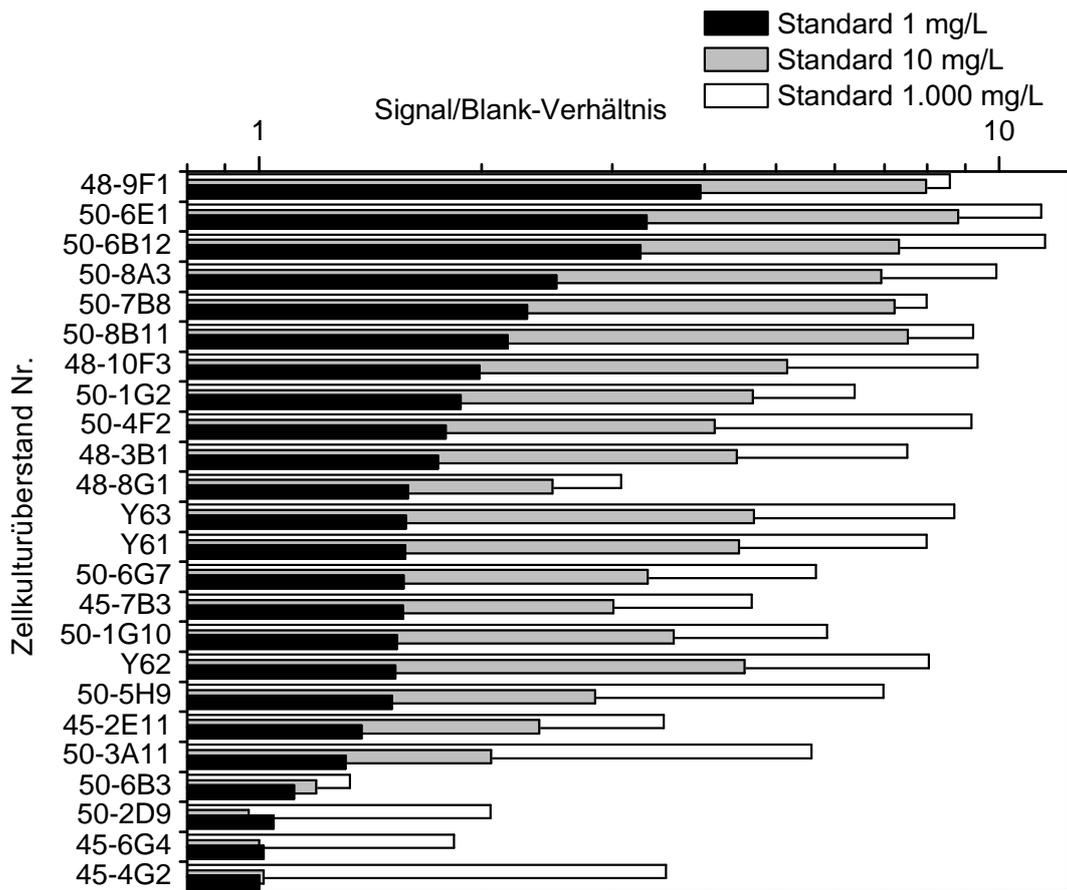


Abb. 3.14: Biotinylierte Haselnussproteine, Signal/Blank-Quotienten bei Bindung im Immunoassay mit immobilisiertem Antikörper ( $n = 3$ ).

ten wird. Die Signal/Blank-Quotienten beim Standard 1.000 mg/L lagen bei den meisten Antikörpern im Bereich zwischen 6–11, was für ähnliche Mengen an immobilisierten Antikörpern und einen Überschuss an biotinyliertem Antigen spricht. Außerdem wird offensichtlich, dass eine Diskriminierung für die Abschätzung von Affinitäten nur bei Verwendung von niedrig konzentrierten Standards möglich ist. Dennoch sind in wenigen Fällen Diskrepanzen im Ranking zwischen Betrachtung von relativen Absorptionen (Abb. 3.13) und von Signal/Blank-Quotienten (Abb. 3.14) erkennbar. Diese lassen sich am Beispiel des Antikörpers 50-6B3 verdeutlichen, welcher sich bei relativen Absorptionen an zweiter Stelle, bei Signal/Blank-Quotienten an viertletzter Stelle befindet. Bei Betrachtung der Rohdaten ist die niedrige Absorption von  $\approx 50$  mAU beim höchsten Standard und gleichzeitig die hohe Absorption des Blanks von  $\approx 40$  mAU auffällig, was einen relativ hohen Fehler verursacht. Bei Antikörpern mit niedrigem Signal/Blank-Quotienten ist entweder die Konzentration von aktivem IgG niedrig oder die Affinität ist gering. Für das Ranking der Antikörper ist somit die Berechnung von Signal/Blank-Quotienten die robustere Alternative. Bei der Betrachtung der relativen Absorptionen muss dagegen zusätzlich die Spannweite für jeden Antikörper berücksichtigt werden.

### 3.3.3 Bestimmung von Affinitäten mittels kompetitiver Immunoassays

Eine Abschätzung der Affinitäten wurde mit den Zellkulturüberständen und aufgereinigten monoklonalen Antikörpern (Maus) auch mittels indirekt-kompetitiver Immunoassays durchgeführt, zunächst ohne Berücksichtigung der jeweiligen IgG-Konzentrationen.

Die Antigenkonzentration bei der Beschichtung betrug dabei 0,5 mg/L Erdnuss

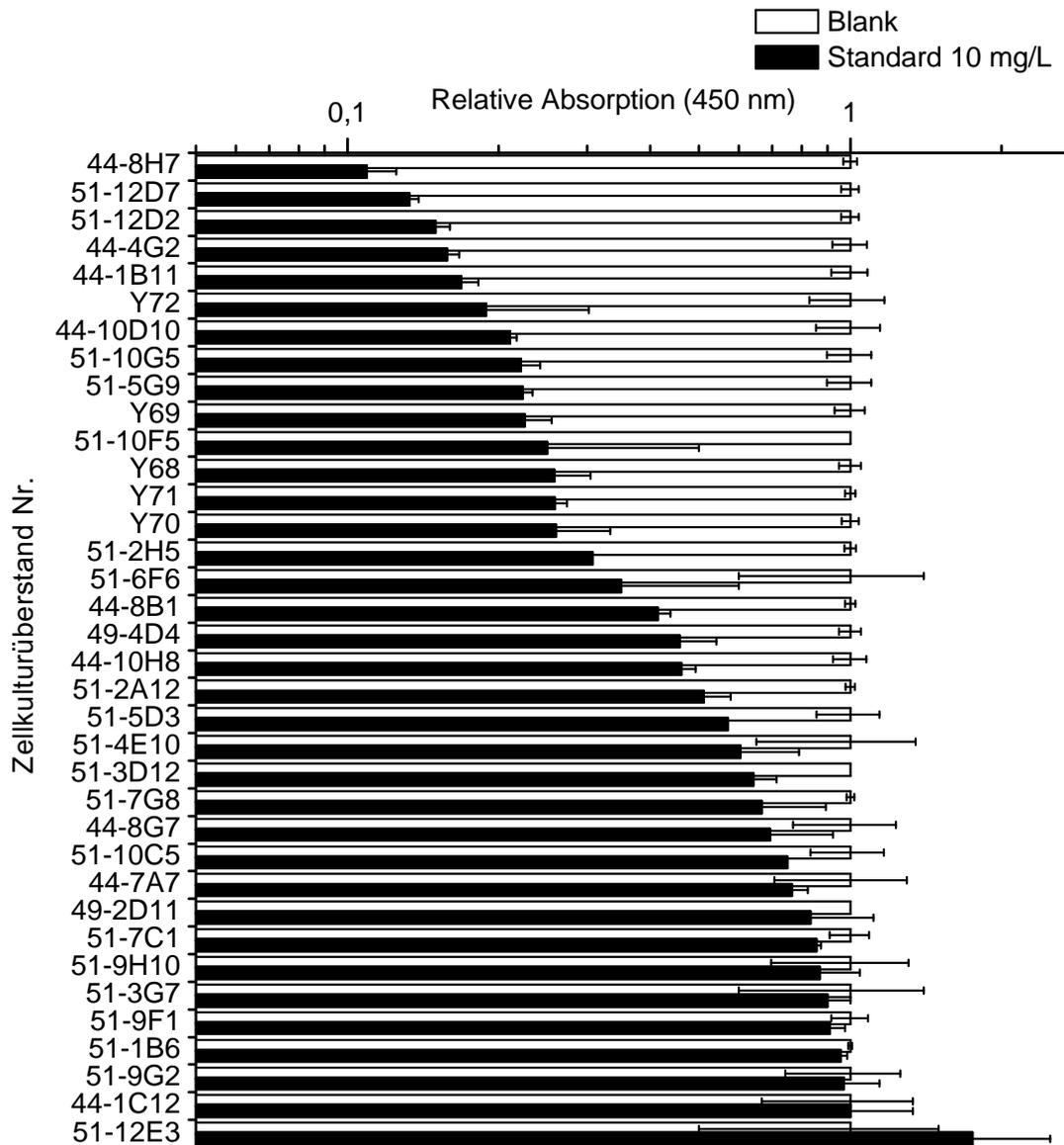


Abb. 3.15: Monoklonale Erdnuss-Antikörper, Messung von Inhibitionen in indirekt-kompetitiven Immunoassays ( $n = 2$ ; Antigenkonzentration bei der Beschichtung 0,5 mg/L Erdnuss; Verdünnung Zellkulturüberstände 1 : 2.000, aufgereinigte Antikörper 1 : 20.000).

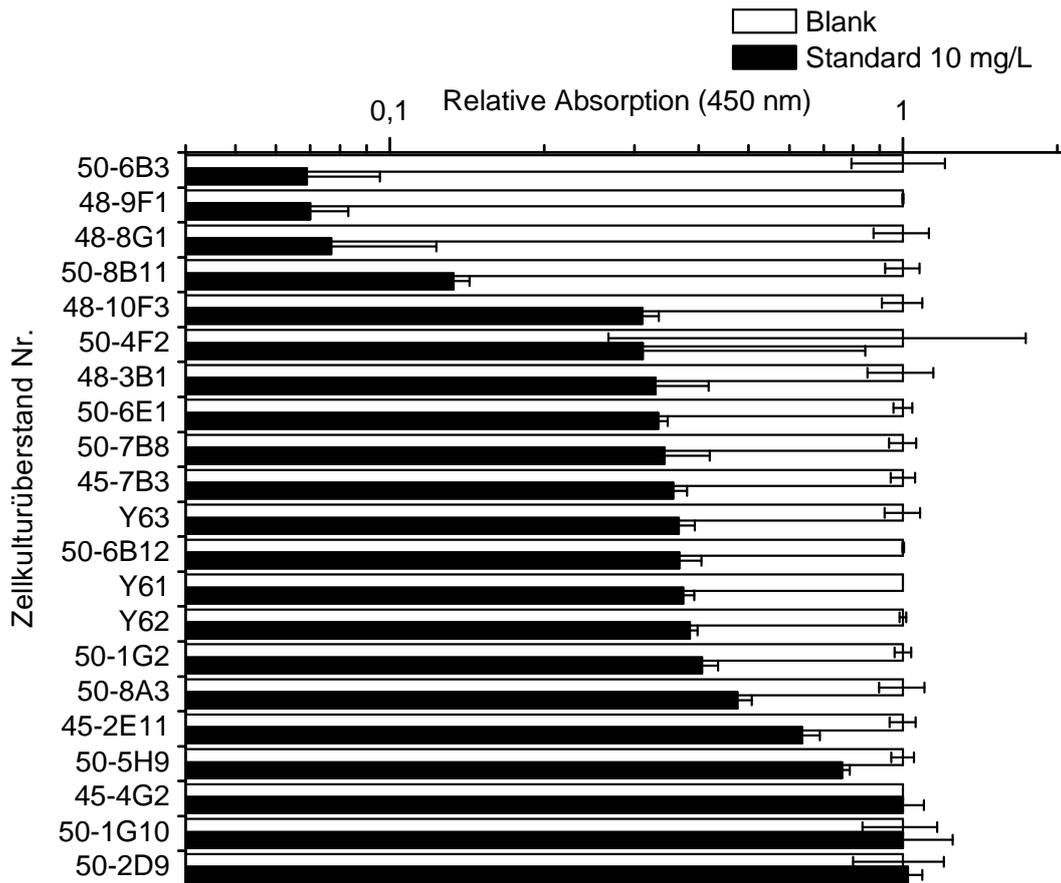


Abb. 3.16: Monoklonale Haselnuss-Antikörper, Messung von Inhibitionen in indirekt-kompetitiven Immunoassays ( $n = 2$ ; Antigenkonzentration bei der Beschichtung  $0,5 \text{ mg/L}$  Haselnuss; Verdünnung Zellkulturüberstände  $1 : 2.000$ , aufgereinigte Antikörper  $1 : 20.000$ ).

bzw. Haselnuss und die Zellkulturüberstände wurden  $1 : 2.000$ , die aufgereinigten Antikörper  $1 : 20.000$  verdünnt. Zum Vergleich der Antikörper wurde die relative Inhibition beim Standard  $10 \text{ mg/L}$  Erdnuss bzw. Haselnuss berechnet. Die Normierung erfolgte, indem die Absorptionen der Blanks gleich 1 und die Absorptionen des Standards  $1.000 \text{ mg/L}$  Erdnuss bzw. Haselnuss gleich 0 gesetzt wurden.

Die Ergebnisse bei Verwendung der monoklonalen Erdnuss-Antikörper sind in Abb. 3.15 dargestellt. Demnach wurden die Antikörper 44-8H7, 51-12D7 und 51-12D2 beim Standard  $10 \text{ mg/L}$  Erdnuss am stärksten inhibiert. Allerdings waren die maximalen Absorptionen im Test stark unterschiedlich, z. B. bei Antikörper 44-8H7 mit  $\approx 50 \text{ mAU}$  sehr niedrig, was auf eine relativ geringe Konzentration an aktivem Antikörper schließen lässt. Da die IgG-Konzentrationen in diesem Test nicht nivelliert wurden, ist davon auszugehen, dass sich die abgeschätzte Affinität insbesondere bei höher konzentrierten Antikörpern als zu niedrig erweist.

Unter den Haselnuss-Antikörpern zeigten die Klone 50-6B3, 48-9F1 und 48-8G1 beim Standard  $10 \text{ mg/L}$  Haselnuss die stärkste Inhibition von über  $90\%$  (Abb.

Tab. 3.5: Monoklonale Erdnuss-Antikörper, in indirekt-kompetitiven Immunoassays ermittelte minimale Testmittelpunkte ( $IC_{50}$ ).

Klon	min. $IC_{50}$ [mg/L]	Klon	min. $IC_{50}$ [mg/L]
44-10D10	2,1	51-3D12	5,8
44-10H8	3,9	51-3G7	14
44-1B11	2,1	51-4E10	–
44-1C12	–	51-5D3	5,3
44-4G2	1,8	51-5G9	1,5
44-7A7	3,2	51-6F6	3,7
44-8B1	1,9	51-7C1	3000
44-8G7	2,1	51-7G8	2,0
44-8H7	1,9	51-9F1	210
49-2D11	–	51-9G2	10
49-4D4	1,5	51-9H10	3,7
51-10C5	470	Y68	0,71
51-10F5	1,1	Y69	0,91
51-10G5	0,81	Y70	1,2
51-12D2	1,3	Y71	0,13
51-12D7	1,3	Y72	0,87
51-12E3	0,50	Y76	0,30
51-1B6	260	Y77	0,61
51-2A12	3,3	Y78	1,2
51-2H5	3,6	Y79	1,1

3.16). Die bei Verwendung des Antikörpers 48-9F1 beobachteten Absorptionen überstiegen zudem die Absorptionen aller anderen Antikörper, bei gleichzeitig niedrigem „Sockelwert“ (unspezifische Bindung). Anhand dieser Befunde kann Antikörper 48-9F1 als einer höchst affinen der vorhandenen monoklonalen Haselnuss-Antikörper mit zudem hoher Konzentration an aktivem IgG beurteilt werden.

Zur genaueren Abschätzung der Antikörper-Affinitäten war eine Optimierung der indirekt-kompetitiven Immunoassays notwendig. Mit allen vorliegenden monoklonalen Antikörpern wurden daher Inhibitionskurven aufgezeichnet, wobei sowohl die Antigenkonzentrationen bei der Beschichtung als auch die Antikörperverdünnungen variiert wurden. Die erhaltenen Testmittelpunkte wurden in ein Koordinatensystem aufgetragen und die Grenzwerte für infinitesimale Antikörperkonzentrationen extrapoliert (vgl. Kap. 3.2.1 und 3.2.3).

Die minimalen Testmittelpunkte der monoklonalen Erdnuss-Antikörper sind in Tab. 3.5 zusammengefasst. Bei Vernachlässigung einer vermutlich unterschiedlichen Erkennung von Antigenen, entsprechend unterschiedlichem Molekulargewicht der Analyten, sind diese Testmittelpunkte indirekt proportional zu einer minimalen Affinitätskonstante. Die niedrigsten Testmittelpunkte (höchste Affinitäten)

Tab. 3.6: Monoklonale Haselnuss-Antikörper, in indirekt-kompetitiven Immunoassays ermittelte minimale Testmittelpunkte ( $IC_{50}$ ).

Klon	min. $IC_{50}$ [mg/L]	Klon	min. $IC_{50}$ [mg/L]
45-2E11	12	50-4F2	50,4
45-4G2	180	50-5H9	4,4
45-6G4	900	50-6B12	3,3
45-7B3	20	50-6B3	1,3
48-10F3	7,1	50-6E1	2,5
48-3B1	4,5	50-6G7	–
48-8G1	0,89	50-7B8	6,1
48-9F1	0,70	50-8A3	4,6
50-1G10	60	50-8B11	1,4
50-1G2	6,2	Y61	7,2
50-2D9	170	Y62	8,5
50-3A11	1,0	Y63	9,6

wurden bei Verwendung der Antikörper Y71, Y76, 51-12E3 und Y77 ermittelt. Bei den Antikörpern 51-7C1, 44-1C12, 49-2D11 und 51-4E10 wurde unter den verwendeten Bedingungen dagegen keine oder nur eine sehr schwache Inhibition beobachtet, was auf mangelnde Antigenerkennung bzw. sehr geringe Affinität schließen lässt.

In Tab. 3.6 sind die bei Untersuchung der monoklonalen Haselnuss-Antikörper erhaltenen minimalen Testmittelpunkte aufgeführt. Die Antikörper der Klone 48-8G1, 48-9F1, 50-3A11, 50-6B12, 50-6B3, 50-6E1 und 50-8B11 erwiesen sich demnach als am affinsten, bei Verwendung des Antikörpers 50-6G7 wurden dagegen keine signifikanten Inhibitionen beobachtet.

## 3.4 Untersuchung der Antikörperselektivitäten

### 3.4.1 Kreuzreaktivitäten

Die Kreuzreaktivitäten einzelner Erdnuss-Antikörper wurden zunächst unter Verwendung von indirekt-kompetitiven Immunoassays ermittelt (vgl. Kap. 2.4.2, S. 35). Mikrotiterplatten wurden dazu mit 0,5 mg/L Erdnuss-Standard beschichtet (Affinitätslimitierung des Antikörpers) und Inhibitionskurven von Verdünnungsreihen der entsprechenden Extrakte aufgenommen. Die Berechnung der Kreuzreaktivitäten erfolgte durch Quotientbildung aus Testmittelpunkt bei Inhibition mit Erdnussextrakt (entfettete, geröstete Erdnuss) und Testmittelpunkt bei Inhibition mit Kreuzreaktand (Gl. 2.5, S. 36). Die Kreuzreaktivitäten wurden damit auf „entfettete, geröstete Erdnuss“ normiert und sind in Tab. 3.7 zusammengefasst.

Tab. 3.7: Kreuzreaktivitäten [%] einiger Erdnuss-Antikörper (bezogen auf Erdnuss geröstet, entfettet; gemessen in indirekt-kompetitiven Immunoassays).

	Y71	Y76	51-12D2	51-12E3	R646	#02
	Maus (monoklonal)				Kaninchen	Huhn
Erdnuss geröstet, entfettet	100	100	100	100	100	100
Erdnuss geröstet	120	100	85	76	120	160
Erdnuss roh, entfettet	240	530	190	130	240	260
Erdnuss roh	300	530	230	190	280	310
Soja	$4,0 \cdot 10^{-3}$	$1,3 \cdot 10^{-3}$	$6,0 \cdot 10^{-3}$	< NWG	$1,7 \cdot 10^{-3}$	< NWG
Mandel	$2,5 \cdot 10^{-3}$	$1,7 \cdot 10^{-3}$	$2,7 \cdot 10^{-3}$	< NWG	$5,2 \cdot 10^{-4}$	< NWG
Tellerlinse	$4,7 \cdot 10^{-3}$	$1,1 \cdot 10^{-3}$	$1,0 \cdot 10^{-2}$	< NWG	$3,3 \cdot 10^{-3}$	< NWG
grüne Erbse	$7,1 \cdot 10^{-3}$	$4,7 \cdot 10^{-3}$	$5,5 \cdot 10^{-3}$	< NWG	$3,7 \cdot 10^{-3}$	< NWG
rote Bohne	$3,9 \cdot 10^{-3}$	$8,3 \cdot 10^{-3}$	$7,3 \cdot 10^{-3}$	< NWG	$3,8 \cdot 10^{-3}$	< NWG
Haselnuss	$1,9 \cdot 10^{-3}$	$4,1 \cdot 10^{-4}$	$4,1 \cdot 10^{-3}$	$1,4 \cdot 10^{-2}$	$5,0 \cdot 10^{-4}$	$6,3 \cdot 10^{-2}$
Walnuss	$3,4 \cdot 10^{-3}$	$9,4 \cdot 10^{-4}$	$7,1 \cdot 10^{-2}$	< NWG	$1,6 \cdot 10^{-3}$	< NWG

Bei allen untersuchten Kreuzreaktanden (außer Erdnuss) lagen die Kreuzreaktivitäten unter 0,1%, in vielen Fällen waren sie nicht messbar bzw. sind nur als Näherungswert zu beurteilen. Oft wurde selbst bei den höchsten Konzentrationen der Kreuzreaktanden (30 g/L) keine vollständige Inhibition beobachtet. Für die Kurvenanpassung standen in diesen Fällen daher nur eine begrenzte Auswahl an Datenpunkten zur Verfügung und die Bestimmung des Testmittelpunkts ist damit stärker fehlerbehaftet.

Da sich die angegebenen Konzentrationen stets auf die ganze Frucht beziehen, wurde die Einwaage bei entfettetem Material um den Fettgehalt reduziert. Es zeigte sich, dass sowohl bei rohen als auch bei gerösteten Erdnüssen ein Entfettungsschritt vor der Extraktion keinen signifikanten Einfluss auf den Testmittelpunkt hat. Die Behandlung mit Aceton beeinflusste also nicht wesentlich die Epitoperkennung durch die Antikörper. Dagegen wurde ein signifikanter Einfluss des Röstgrades auf die Testmittelpunkte beobachtet. Proteine aus ungerösteten Erdnüssen wurden von den Antikörpern stärker gebunden als Proteine aus gerösteten Erdnüssen. Die Ursache für diese Beobachtung ist eine thermisch induzierte Änderung der Tertiärstruktur der Proteine, was zu einer verringerten Affinität des Antikörpers zum entsprechenden Epitop führt bzw. möglicherweise vollständige Verhinderung der Antigen-Antikörper-Bindung zur Folge hat. Die Affinität bei Verwendung von gerösteten Erdnüssen ist bei den meisten Antikörpern um den Faktor  $\approx 2-3$ , beim monoklonalen Antikörper Y76 sogar um einen Faktor  $> 5$  geringer. Wie bei Experimenten mit gereinigten Erdnuss-Allergenen festgestellt wurde, handelt es sich bei Y76 um den einzigen in Tab. 3.7 aufgeführten monoklonalen Antikörper, der das Allergen Ara h2 bindet. Es ist bekannt, dass Ara h2 eines der wenig hitzestabilen Erdnussproteine ist. Für die Analytik ist jedoch Hit-

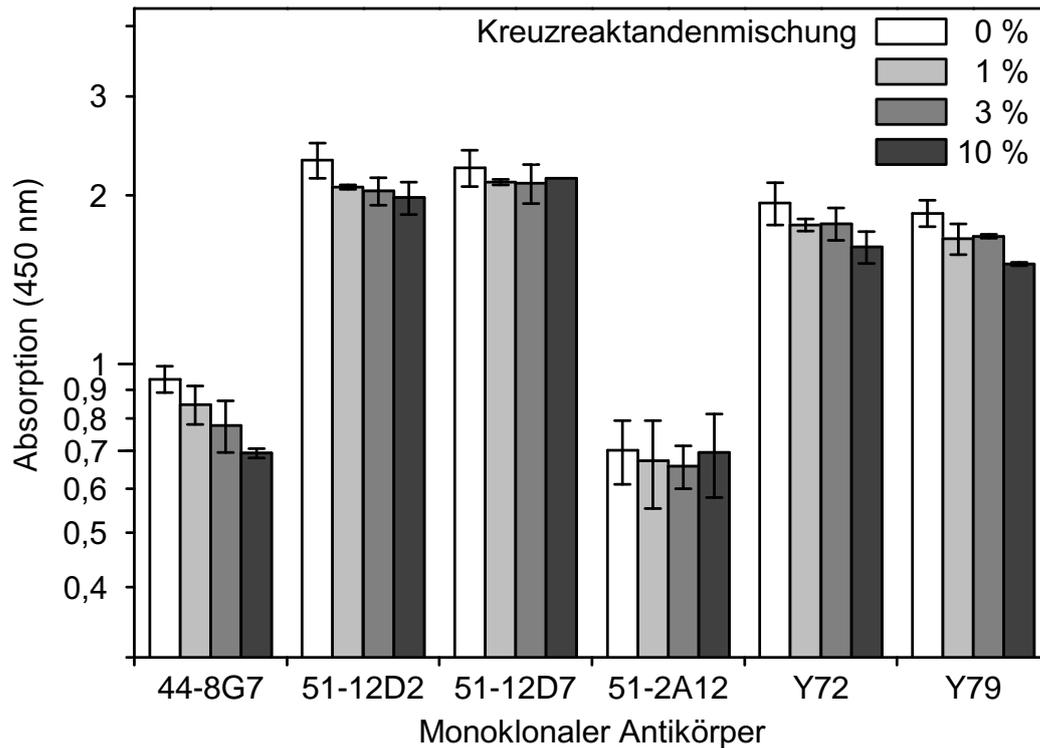


Abb. 3.17: Monoklonale Erdnuss-Antikörper, Signalinhibition im Immunoassay mit immobilisiertem Antigen bei Zugabe von Extrakt einer Kreuzreaktandenmischung zur Antikörperlösung ( $n=2$ ; Konzentration der Kreuzreaktandenmischung 0–10 %).

zestabilität des Targets erwünscht, um auch bei stark prozessierten Lebensmitteln eine hohe Wiederfindung zu erreichen. Dem Lebensmittelallergiker ist in der Regel nicht bekannt, welches Protein die Allergie jeweils auslöst.

Ein effektives Screening von Antikörpern könnte erreicht werden, wenn die Messungen von Affinitäten und Kreuzreaktivitäten in einem Assay kombiniert würden. Es ist denkbar, die Antikörper in Puffer mit hohen Konzentrationen potentiell kreuzreaktiver Proteine zu verdünnen und dadurch stark kreuzreagierende Antikörper zu inhibieren. Zur Durchführung entsprechender Untersuchungen schienen Immunoassays mit immobilisiertem Antigen geeignet. Dazu wurden zunächst mit 10 mg/L Erdnuss bzw. unbeschichtete Mikrotiterplatten (Blank) mit 1,5 % BSA in PBS geblockt. Ein Kreuzreaktandenextrakt wurde hergestellt aus folgenden 19 Nüssen bzw. Saaten: Soja, grüne Erbse, rote Bohne, Mandel, Walnuss, Tellerlinse, Macadamia geröstet, Pinienkern, Kokosnuss, Pekannuss geröstet, braune Kichererbse, weiße Bohne, Kürbiskern, Mottenbohne, Cashew, Sesam, Pistazie geröstet, Sonnenblumenkern und Paranuss. Die Nüsse und Saaten wurden in äquivalenten Massenverhältnissen gemischt, mit der Labormühle fein vermahlen und Extrakte mit den Konzentrationen von 1 %, 3 % und 10 % hergestellt (0,1–1 g Mischung

in 10 mL Fischgelatine-Extraktionspuffer). Je 150  $\mu$ L der Kreuzreaktandenextrakte und 50  $\mu$ L Antikörperlösung (Zellüberstände 1 : 250 bzw. gereinigte Antikörper 1 : 2.000 in PBS verdünnt) wurden in die vorbereiteten Kavitäten der Mikrotiterplatte pipettiert und die Platte nach einer Stunde gewaschen. Die Detektion des gebundenen IgG erfolgte mittels sequentieller Zugabe von Peroxidase-markiertem anti-Spezies-Antikörper und Substratlösung nach jeweils einem Waschschrift. Die gemessenen Absorptionen sind in Abb. 3.17 zusammengefasst. Selbst bei höchster Konzentration des Kreuzreaktandenextrakts wurden nur geringe Inhibitionen beobachtet. Eine Diskriminierung anhand der Kreuzreaktivitäten während des Antikörper-Screenings war daher nicht möglich. Offenbar waren die Antikörper durch die Lieferanten RIKILT bzw. CSL bereits derart vorselektiert, dass unter den gewählten Bedingungen keine signifikante Inhibition erreicht werden konnte. Zu beachten ist allerdings, dass die Konzentrationen der einzelnen Kreuzreaktanden entsprechend der Anzahl der Komponenten relativ niedrig war.

#### 3.4.2 Gelchromatographische Fraktionierungen

Zur weiteren Charakterisierung der Antikörper wurde untersucht, welche Antigene jeweils erkannt werden. Hierfür wurden Erdnussextrakte nativ einer gelchromatographischen Fraktionierung unterzogen. Bei der stationären Phase handelte es sich um Superdex 200 (prep grade) mit einem Fraktionierbereich von 10–600 kDa. Die Chromatographie wurde unter Verwendung einer FPLC-Anlage („Fast Protein Liquid Chromatography“) mit UV-Detektion und angeschlossenem Fraktionssammler durchgeführt. Als mobile Phase erwies sich PBS als geeignet. Ein typisches Chromatogramm einer Fraktionierung von Erdnussextrakt unter optimierten Bedingungen ist in Abb. 3.18 dargestellt. Neben der UV-Detektion (280 nm) des Eluenten wurden die Fraktionen BCA-Tests unterzogen.

Vom Eluenten wurden jeweils Fraktionen von 100  $\mu$ L in Mikrotiterplatten gesammelt. Nach einstündiger Inkubation der Mikrotiterplatte zur Immobilisierung der Proteine wurden Immunoassays mit immobilisiertem Antigen durchgeführt. Die Experimente erfolgten unter Verwendung der monoklonalen Antikörper Y68 bis Y72, Y76 bis Y79, 44-8G7, 51-2A12, 51-12D2 und des polyklonalen Antikörpers R694 aus Kaninchen. Es wurden zwei bei 4,3 und 6,5 mL eluierte Fraktionen identifiziert. Bei jedem der hier untersuchten Antikörper wurde festgestellt, dass Proteine einer der beiden Fraktionen gebunden werden.

Die beiden Fraktionen wurden daraufhin in größeren Mengen dargestellt, um alle vorhandenen monoklonalen Erdnuss-Antikörper in Immunoassays mit immobilisiertem Antigen untersuchen zu können. Zur Erzielung von möglichst hohen Reinheiten der Proteine mussten die Fraktionen knapp geschnitten werden. Bei Untersuchung der Antikörper 44-1C12, 49-2D11, 51-5D3 und 51-9H10 wurde festgestellt, dass jeweils keine Bindung bei beiden Fraktionen erfolgt. Da die Antikörper 44-1C12 und 49-2D11 das Erdnussallergen Ara h1 erkennen (siehe Kap. 3.4.3), ist offensichtlich in keiner der beiden Fraktionen eine signifikante Menge Ara h1 enthalten. Aufgrund der im Vergleich zu Ara h2 höheren Molekularmasse

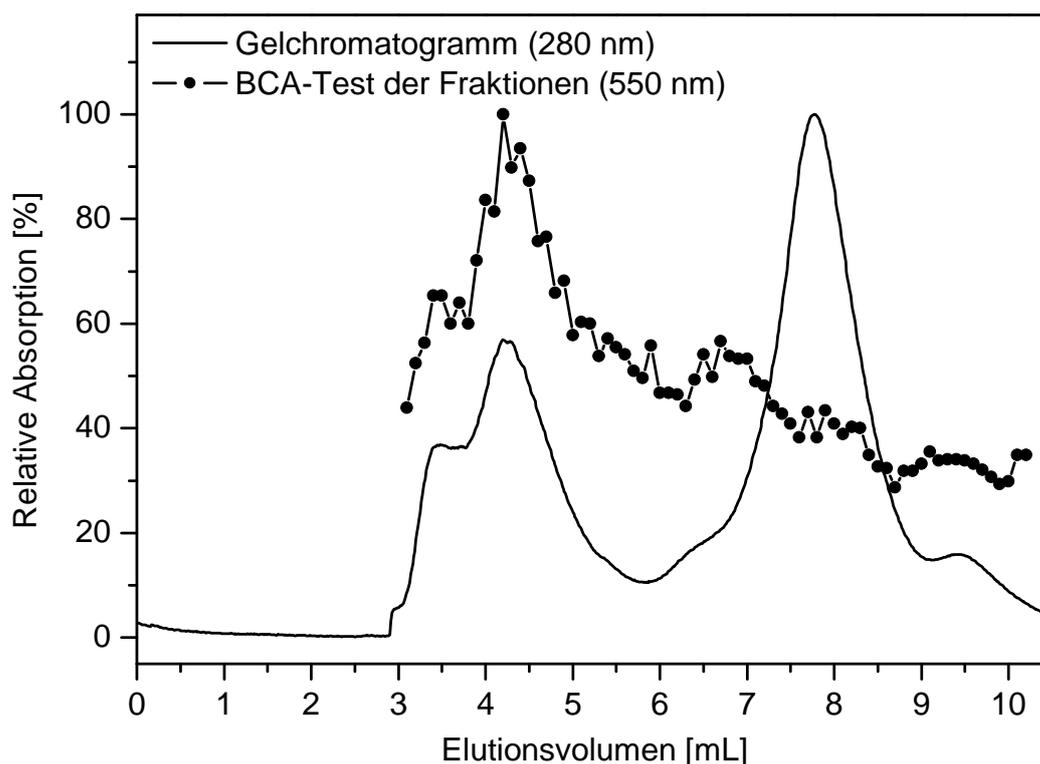


Abb. 3.18: Gelchromatographische Fraktionierung von Erdnussextrakt. Jeweils Fraktionen von 100  $\mu$ L wurden gesammelt und der Proteingehalt der Fraktionen mittels BCA-Test gemessen (Detektor Gelchromatogramm: 280 nm, BCA-Test: 550 nm).

wird eine relativ frühe Elution des Allergens Ara h1 erwartet. Zur weiteren Abklärung des Verbleibs von Ara h1 müssten entsprechend kleine Fraktionen, die in einem Bereich  $<6$  mL eluiert werden, genauer untersucht werden. Denkbar ist auch, dass Ara h1 zwar in einer der beiden Fraktionen enthalten ist, aber unter den gewählten Bedingungen nur schlecht auf der Mikrotiterplatte immobilisiert wird und daher im Immunoassay nur ein schwaches Signal erhalten wird. Da der isoelektrische Punkt von Ara h1 bei 4,6 liegt, wäre vermutlich durch eine Verringerung des pH-Wertes eine effizientere Immobilisierung zu erreichen.

Bei Untersuchung der Antikörper Y76 bis Y79, welche mittels Immunisierung mit gereinigtem Ara h2 generiert wurden, zeigte sich jeweils Bindung bei Proteinen der Fraktion 6,5 mL. Dagegen stellte sich heraus, dass der Antikörper 51-10G5 sogar Proteine beider Fraktionen erkennt.

Die restlichen monoklonalen Erdnuss-Antikörper wurden lediglich bei Immobilisierung von Proteinen der Fraktion 4,3 mL detektiert. In Abb. 3.19 ist das beobachtete Bindungsverhalten exemplarisch für die Antikörper 51-2A12 und Y77 dargestellt. Die Messungen erfolgten mittels Immunoassays mit immobilisiertem Antigen.

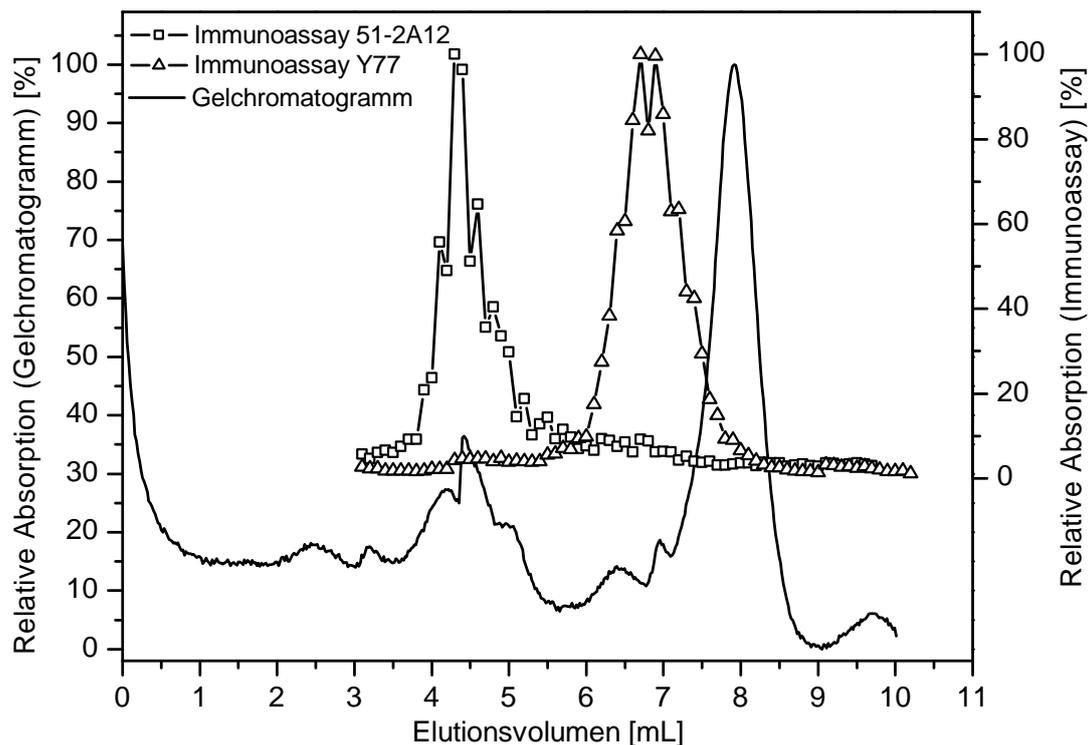


Abb. 3.19: Gelchromatographische Trennung von Erdnussextrakt, Untersuchung der gesammelten Fraktionen mittels Immunoassays mit immobilisiertem Antigen (monoklonale Antikörper; Detektion Gelchromatogramm: 280 nm, Immunoassay: 450 nm).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das Allergen Ara h1 offenbar in keiner der beiden Fraktionen vorhanden ist, Ara h2 dagegen Bestandteil der Fraktion 6,5 mL ist. Bei der zweiten Fraktion bei 4,3 mL wurde bei den meisten Antikörpern eine Bindung beobachtet. Um den Fraktionen Molekularmassen zuordnen zu können, war eine Kalibrierung unter Verwendung von Standardproteinen notwendig. Demnach sind bei der Fraktion 4,3 mL Proteine mit einer Molekularmasse von 200–250 kDa zu erwarten. Möglicherweise handelt es sich dabei um 11S-Globuline (Ara h3).

Bei gelchromatographischen Fraktionierungen eines Haselnussextrakts unter den gleichen Bedingungen wurden Peaks von höhermolekularen Proteinen bei 3,3 und 4,3 mL, sowie Peaks von niedermolekularen Proteinen bei 7,5 mL beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die Fraktionen wurden allerdings nicht weiter immunanalytisch untersucht.

### 3.4.3 Gereinigte Allergene

Im weiteren Verlauf des Projekts standen die Erdnuss-Allergene Ara h1 und Ara h2 in gereinigter Form zur Verfügung. In Immunoassays mit immobilisiertem Antigen wurde untersucht, welche Allergene jeweils von den monoklonalen Erdnuss-Antikörpern gebunden werden. Als Referenz diente Erdnussproteinmischung in Form von Erdnussextrakt. Die Konzentration des Erdnussextrakts bei der Beschichtung betrug 500 µg/L Erdnuss. Um die Mengen an immobilisierten Antigenen zu egalisieren, wurden bei den Allergenlösungen Konzentrationen von 20 µg/L Ara h1 bzw. 10 µg/L Ara h2 gewählt, entsprechend einem Gehalt von  $\approx 4\%$  Ara h1 und  $\approx 2\%$  Ara h2 in Erdnuss [137]. Die bei jedem Antikörper berechneten mittleren Absorptionen sind in Abb. 3.20 dargestellt.

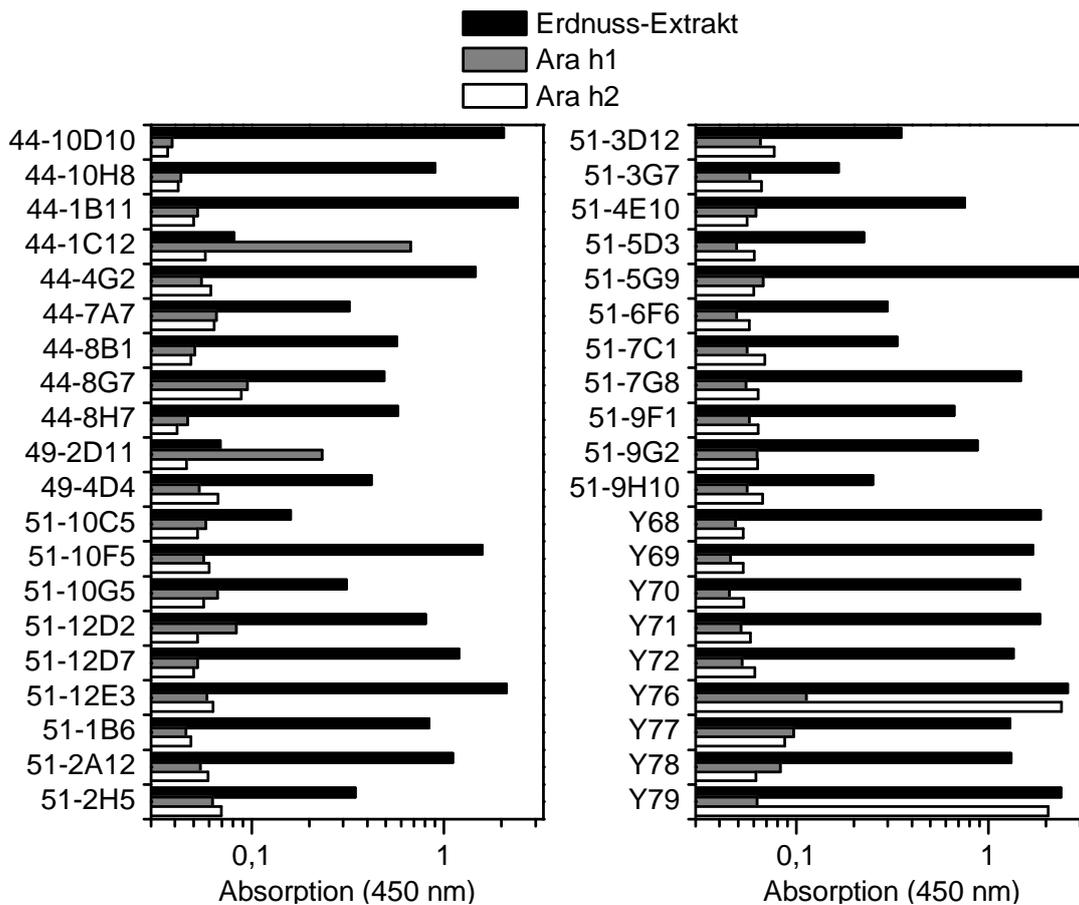


Abb. 3.20: Erdnuss-Antikörper, mittlere Absorptionen im Immunoassay mit immobilisiertem Antigen (Erdnussextrakt, Erdnussallergen Ara h1, Erdnussallergen Ara h2;  $n = 2$ ).

Die Klone Y76 bis Y79 wurden mittels Immunisierung mit chromatographisch aufgereinigtem Ara h2 gewonnen, bei allen anderen Antikörpern wurde Erdnussextrakt zur Immunisierung verwendet. Die Antikörper Y76 und Y79 erkennen offensichtlich tatsächlich das Erdnussallergen Ara h2, bei den Antikörpern Y77

und Y78 wurde dagegen eine Bindung lediglich bei Erdnussextrakt beobachtet, nicht dagegen bei den gereinigten Allergenen. Eine Bindung von Ara h1 wurde lediglich bei den Antikörpern 44-1C12 und 49-2D11 beobachtet und bei keinem Antikörper außer Y76 und Y79 wurde eine Bindung von Ara h2 festgestellt. Alle untersuchten monoklonalen Erdnuss-Antikörper erkannten erwartungsgemäß Erdnussextrakt. Die Ergebnisse zeigen, dass die meisten Antikörper Antigene binden, die nicht in gereinigter Form verfügbar waren. Vermutlich handelt es sich dabei in den meisten Fällen um Arachin (Ara h3), dem quantitativ bedeutendsten Speicherprotein in Erdnuss [171].

## 3.5 Screening von homologen Antikörperpaaren

Das Screening von homologen Antikörperpaaren (Antikörper der gleichen Tierart) zur Entwicklung von Sandwich-Immunoassays ist nur mit erheblichem Aufwand möglich (Kap. 2.5.3, S. 40). Ein gewöhnlicher markierter anti-Spezies-Antikörper würde in dieser Konstellation sowohl an den Detektionsantikörper als auch an den Fängerantikörper binden. Es wurden daher Methoden zur *in-situ*-Markierung von monoklonalen Antikörpern studiert.

### 3.5.1 Markierung mittels Fab-Fragmenten

Antikörper können mittels markierten Fab-Fragmenten (z. B. Zenon™) einfach und effektiv detektiert werden. Markierte Fab-Fragmente werden üblicherweise z. B. in immunhistochemischen Verfahren oder in der Flow-Cytometrie verwendet [324]. Die Markierung erfolgt sukzessive, wie in Immunoassays oder cytochemischen Verfahren, oder auch *in-situ* über einen Vorinkubationsschritt [325]. Die mit Farbstoffen oder Enzymen markierten Fab-Fragmente (aus Ziege) sind erhältlich zur Detektion von Maus-Antikörpern der Klassen IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub> und IgG<sub>2b</sub>. Als Blockingreagenz für die Inaktivierung von überschüssigen Fab-Fragmenten ist den Testkits Mäuseserum beigefügt. Bei den hier vorgestellten Untersuchungen wurden Fab-Fragmente zur Detektion von IgG<sub>1</sub> verwendet, welche mit alkalischer Phosphatase markiert waren. Die Konzentration der markierten Fab-Fragmente im Kit beträgt 200 mg/L, laut Hersteller sind 1 µg zu markierendes Mäuse-IgG mit 5 µL Fab-Konjugat  $\cong$  1 µg Fab-Konjugat (molares Verhältnis Fab : IgG  $\approx$  3 : 1) zu mischen.

Zum Screening von Kombinationen aus monoklonalen Antikörpern wurden Zellkulturüberstände unter Verwendung von vorbeschichtetem anti-Maus-Antikörper in nivellierten Mengen immobilisiert. Im Anschluss wurden Standards bzw. Blanks zugegeben und zur Detektion Antikörper verwendet, die mit markierten Fab-Fragmenten vorinkubiert waren. Es zeigte sich, dass zur Vermeidung eines hohen Hintergrundes freie Bindungsstellen des anti-Maus-Antikörpers, welcher zur Vorbeschichtung verwendet wurde, mittels Inkubation von unspezifischem Mäuseserum geblockt werden müssen.

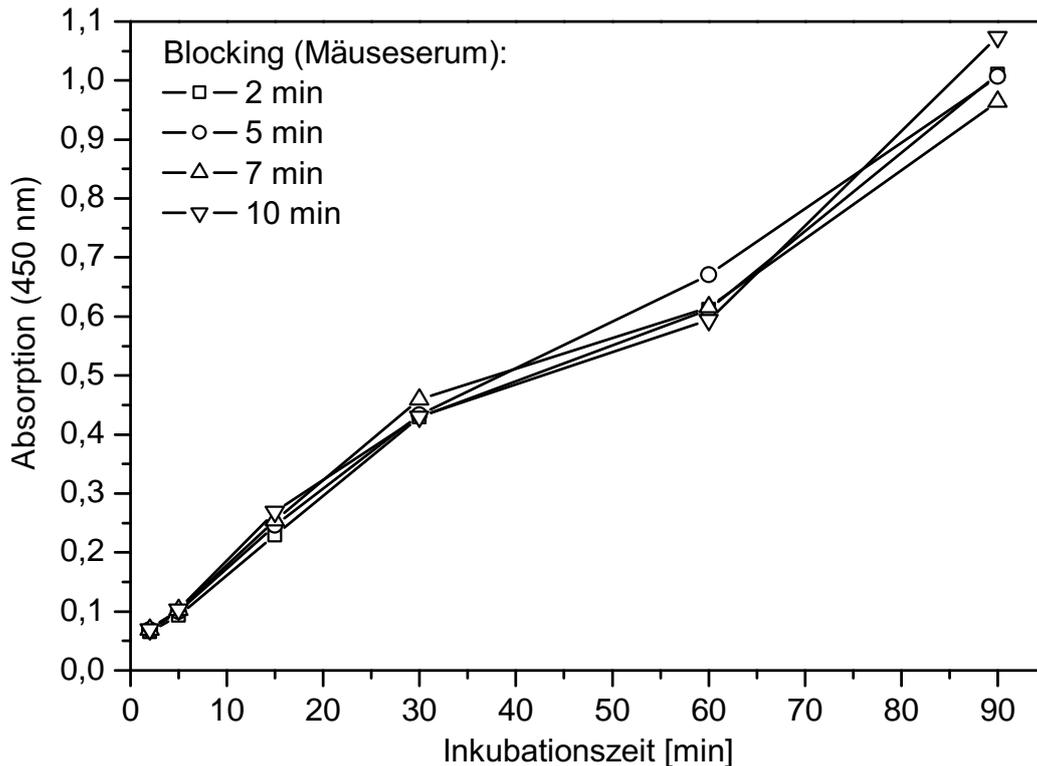


Abb. 3.21: Monoklonaler Erdnuss-Antikörper, Inkubation von geblockten Komplexen aus markierten Fab-Fragmenten und Antikörper auf mit Antigen beschichteten Mikrotiterplatten (Immunoassay mit immobilisiertem Antigen; monoklonaler Antikörper 44-1B11, Zellkulturüberstand 1:1.000 in PBS).

Zunächst wurde die Kinetik für das Blocking der Fab-Antikörper-Komplexe und für die Bindung der Komplexe an vorbeschichtete Mikrotiterplatten mittels Immunoassays mit immobilisiertem Antigen untersucht. Dazu wurden monoklonale Antikörper mit Fab-Fragmenten zwei Stunden vorinkubiert und die Signalentwicklung in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer der Komplexe mit Mäuseserum (Blocking) beobachtet. Außerdem wurde die Inkubationsdauer der Komplexe auf der Mikrotiterplatte variiert. Die Mikrotiterplatten waren jeweils mit Antigen vorbeschichtet und geblockt (1,5 % BSA in PBS).

Aus Abb. 3.21 ist ersichtlich, dass im untersuchten Zeitfenster kein Einfluss der Inkubationsdauer beim Blocking festgestellt wurde. Es findet also keine signifikante Dissoziation der Komplexe mit anschließender Reaktion der Fab-Fragmente mit unspezifischem und im Überschuss vorliegendem Maus-IgG statt. Die Signalintensitäten korrelierten im untersuchten Zeitfenster linear mit der Inkubationsdauer der Komplexe in der Mikrotiterplatte. Die Bindung der Komplexe fand also kinetisch kontrolliert statt und eine Dissoziation der Komplexe tritt offenbar im untersuchten Zeitfenster nicht in signifikantem Ausmaß auf. Als günstig erwiesen sich

ein Blocking von 10 min und eine Inkubationsdauer der Fab-Antikörper-Komplexe von 90 min.

Da die verwendeten Fab-Fragmente nur an Antikörper der Klasse IgG<sub>1</sub> binden, wurden die vorhandenen monoklonalen Antikörper zunächst typisiert. Dazu wurden Zellkulturüberstände und gereinigte Antikörper mittels vorbeschichtetem anti-Maus-Antikörper auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Nach Inkubation mit markierten Fab-Fragmenten und einem Waschschrift wurde die Farbreaktion gestartet. Die Auswertung ergab, dass es sich bei allen monoklonalen Erdnuss-Antikörpern um IgG<sub>1</sub> handelt, mit Ausnahme von 44-7A7, 51-10C5 und 51-10G5. Diese drei Antikörper können daher mit den verwendeten Fab-Fragmenten nicht als Detektionsantikörper verwendet werden. Sämtliche monoklonalen Haselnuss-Antikörper konnten dagegen der Klasse IgG<sub>1</sub> zugeordnet werden. Die *in-situ*-Markierung mit markierten Fab-Fragmenten wurde mit der *in-situ*-Markierung mit ganzen markierten anti-Spezies-Antikörpern verglichen. Erwartungsgemäß zeigte sich eine hohe Korrelation (siehe Kap. 3.5.6, S. 95).

#### 3.5.2 Biotinylierung von Antikörpern

Als weitere Methode wurde versucht, die monoklonalen Antikörper durch Zugabe von Biotin-NHS-Ester zum Zellkulturüberstand zu biotinylieren und damit eine Markierung einzuführen. Zur Abschätzung der molaren Verhältnisse wurden mittlere Konzentrationen von 100 mg/L IgG ( $\approx 0,67 \mu\text{M}$ ) und 1 g/L Begleitproteine (als BSA,  $\approx 15,2 \mu\text{M}$ ) in den Zellkulturüberständen angenommen, die Konzentration des Biotin-NHS-Esters war 10 g/L (29,3 mM). Das Verhältnis der Molekulargewichte von IgG und Biotin-NHS-Ester beträgt  $M(\text{IgG}) : M(\text{NHS-Biotin}) \approx 440$ .

Zunächst wurden monoklonale Antikörper mittels Vorbeschichtung von anti-Maus-Antikörper immobilisiert und die Platte mit Mäuseserum geblockt. Anschließend wurden erst Standards inkubiert und schließlich Zellkulturüberstände, welche durch Zugabe von NHS-Biotin biotinyliert wurden. Überschüssiges NHS-Biotin wurde durch Zugabe von Tris abgefangen. Die Einführung der Enzymmarkierung erfolgte durch einen Inkubationsschritt mit Konjugat aus Streptavidin und alkalischer Phosphatase. Nach einem Waschschrift wurde Substratlösung zugegeben und damit die Farbentwicklung gestartet.

Trotz Optimierung erwies sich die Methode als nicht geeignet für das Screening von homologen Antikörperpaaren. Bei Benutzung von biotinylierten Zellkulturüberständen ergaben sich beim Blank (Standard 0 mg/L) trotz Verwendung von Blockingreagenzien wie Mäuseserum, Tris und Magermilch bei verschiedenen Konzentrationen Absorptionen von stets deutlich über 100 mAU. Die in den Zellkulturüberständen vorhandenen Begleitproteine wurden vermutlich ebenso wie die entsprechenden Immunglobuline biotinyliert. Offensichtlich binden diese unspezifisch auf der Mikrotiterplatte und verursachen einen hohen Hintergrund. Bei weiterer Verdünnung des biotinylierten Detektionsantikörpers wurde eine gleichzeitige Verringerung der Signale von Standard und Blank beobachtet. Auch durch

Variation der Verhältnisse von Antikörper zu Biotinylierungsreagenz konnten keine zufrieden stellenden Signal/Blank-Quotienten erzielt werden.

Unter den genannten Bedingungen war es nicht möglich, Zellkulturüberstände ohne Aufreinigung so zu biotinylieren, dass bei Verwendung als Detektionsantikörper befriedigende Resultate erzielt werden konnten. Bei Verwendung von gereinigten Antikörpern als Detektionsantikörper konnten hingegen gute Signal/Blank-Quotienten erhalten werden. Es zeigte sich also, dass eine Biotinylierung von Antikörpern für das Screening von homologen Antikörperpaaren durch Zugabe von NHS-Biotin nur bei Verwendung von gereinigten Antikörpern, nicht dagegen bei Zellkulturüberständen geeignet ist.

### 3.5.3 Markierung mittels Protein G

Protein G ist ein streptococcales Zellwandprotein, welches aufgrund der Bindung von IgG häufig zur Aufreinigung von Antikörpern verwendet wird. Es wurde erstmals von BJÖRCK und KRONVALL im Jahre 1984 isoliert [326]. Protein G bindet IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> und IgG<sub>3</sub> von Maus mit höherer Affinität als das staphylococcale Zellwandprotein Protein A [327; 328].

Als Reagenz für die *in-situ*-Markierung von Antikörpern wurde ein Konjugat aus Protein G und alkalischer Phosphatase verwendet. Zur Optimierung der Methode wurden zunächst sukzessive polyklonale Antikörper (R646 aus Kaninchen) und Erdnuss-Standards (Blank, 0,1 und 10 mg/L Erdnuss, in Magermilch + 0,5 % Tween 20) auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Zellkulturüberstände wurden mit Protein-G-Konjugat inkubiert und überschüssiges Protein G durch Zugabe von unspezifischem Mäuseserum (1 : 500 in Inkubationspuffer) geblockt. Nach Inkubation der Protein-G-Komplexe in der mit Fängerantikörper und Standards beschichteten Platte und einem Waschschritt wurde die Farbreaktion durchgeführt. Bei Variation der Inkubationszeit (15–120 min) der Protein-G-Komplexe in der Mikrotiterplatte zeigte sich ein linearer Zusammenhang mit der Absorption. Dagegen war das Signal unabhängig von der Inkubationsdauer der Protein-G-Komplexe mit Mäuseserum (5–60 min), das Blocking ist also offenbar in < 5 min abgeschlossen. Unter den untersuchten Bedingungen wurde keine Korrelation der Signalintensität mit der Antigenkonzentration festgestellt, was auf unspezifische Bindung des Konjugats auf der Mikrotiterplatte schließen lässt.

Zur Abklärung des Sachverhalts wurden die Immunoassays durch Eliminierung der Fängerantikörper vereinfacht. Es wurden Immunoassays mit immobilisiertem Antigen durchgeführt (Beschichtung 1 mg/L Erdnuss) und die Mikrotiterplatte geblockt mit SeaBlock™ (10 % in PBS), BSA und Magermilch. Antikörper wurden in verschiedenen Konzentrationen (Verdünnung 1 : 200–10.000) mit Protein G inkubiert und geblockt mit Magermilch bzw. Pferdeserum (unverdünnt bzw. 1 : 10 in PBS). Es wurden mit steigender Verdünnung der Antikörper sinkende Signalintensitäten beobachtet, sowohl auf der mit Antigen beschichteten als auch auf der lediglich geblockten Mikrotiterplatte. Es handelt sich also um unspezifische Bindungen. Bei stärkerer Verdünnung der Antikörper waren allerdings die

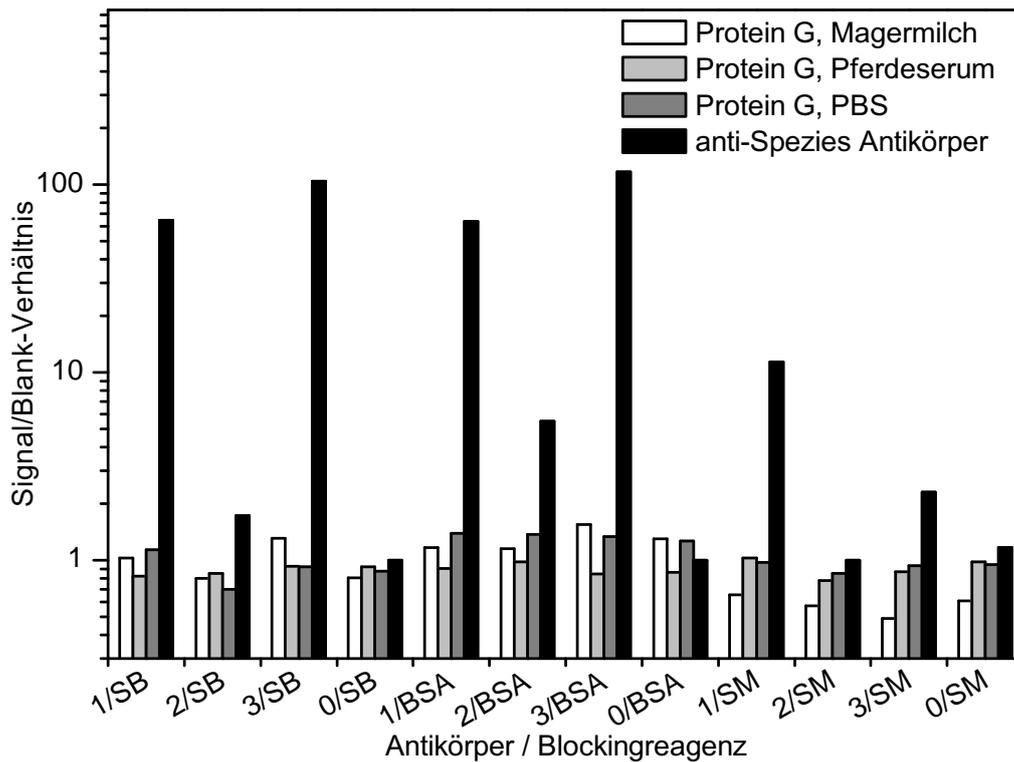


Abb. 3.22: Monoklonale Erdnuss-Antikörper, Signal/Blank-Quotienten in Immunoassays mit immobilisiertem Antigen mit *in-situ*-markierten Antikörpern. Kategorien: Antikörper (1 und 3: hohe Affinität (51-5G9, 51-1B6), 2: geringe Affinität (51-2H5), 0: kein Antikörper) bzw. Reagenz zum Blocking der Mikrotiterplatte (SB: SeaBlock, BSA: bovines Serumalbumin, SM: Magermilch). Säulen innerhalb Kategorien: *in-situ*-Markierungsreagenzien (mittels Protein G und Blocking mit Magermilch/Pferdeserum/PBS bzw. mittels anti-Spezies-Antikörper).

Signale selbst bei 15-stündiger Farbentwicklung niedriger als 0,4 AU. Der maximal ermittelte Signal/Blank-Quotient lag bei 1,9.

Die bei Verwendung verschiedener Inkubations- und Blockingmethoden erhaltenen Signal/Blank-Quotienten sind in Abb. 3.22 zusammengestellt. Zum Vergleich sind Ergebnisse einbezogen, die bei *in-situ*-Inkubation mit markiertem anti-Spezies-Antikörper erhalten wurden (siehe Kap. 3.5.4). Selbst bei Immunoassays mit immobilisiertem Antigen konnte mittels Protein-G-Markierung unter den getesteten Bedingungen in keinem Fall ein Signal/Blank-Quotient von  $> 2$  erhalten werden. Dagegen wurden bei Verwendung von markiertem anti-Spezies-Antikörper in Immunoassays mit immobilisiertem Antigen unter allen Bedingungen deutlich höhere Signalintensitäten erhalten (bei Verwendung von affinen Antikörpern). Die *in-situ*-Markierung mit Protein-G-Konjugat erwies sich somit als nicht geeignet, was vermutlich auf die Bindungsmechanismen oder Affinitäten bzw. Dissoziationsraten zurückzuführen ist.

### 3.5.4 Markierung mittels anti-Maus-Antikörpern

Als eine weitere Möglichkeit für die *in-situ*-Markierung von monoklonalen Antikörpern wurde die Verwendung von markierten anti-Spezies-Antikörpern untersucht. Laut Herstellerangaben beträgt die Konzentration des verwendeten Konjugats aus Peroxidase und anti-Maus-Antikörper  $\approx 1$  g/L und das molare Verhältnis von Peroxidase : Antikörper  $\approx 3 : 1$ .

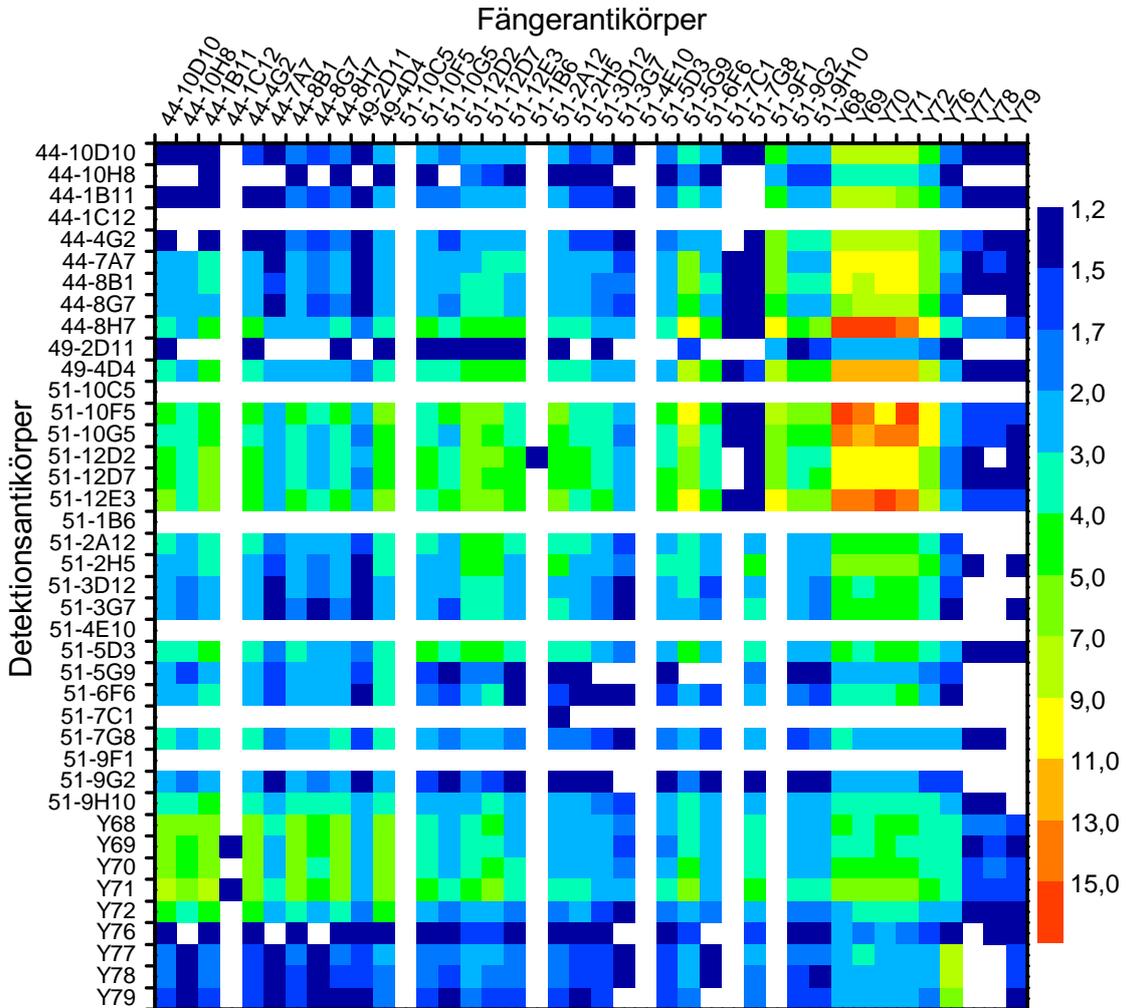


Abb. 3.23: Kombinationen von monoklonalen Erdnuss-Antikörpern, Markierung der Detektionsantikörper *in-situ* mit markiertem anti-Maus-Antikörper (Signal/Blank-Quotienten, Standard 1 mg/L Erdnuss).

Das Konjugat wurde mit monoklonalem Antikörper gemischt und überschüssige anti-Spezies-Antikörper durch Zugabe von unspezifischem Mäuseserum geblockt. Als optimal erwies sich eine finale Verdünnung des markierten anti-Spezies-Antikörpers von 1 : 10.000 (0,1 mg/L Konjugat), bei höheren Konzentrationen waren die Absorptionen des Blanks signifikant erhöht. Bei Verwendung des Konjugats

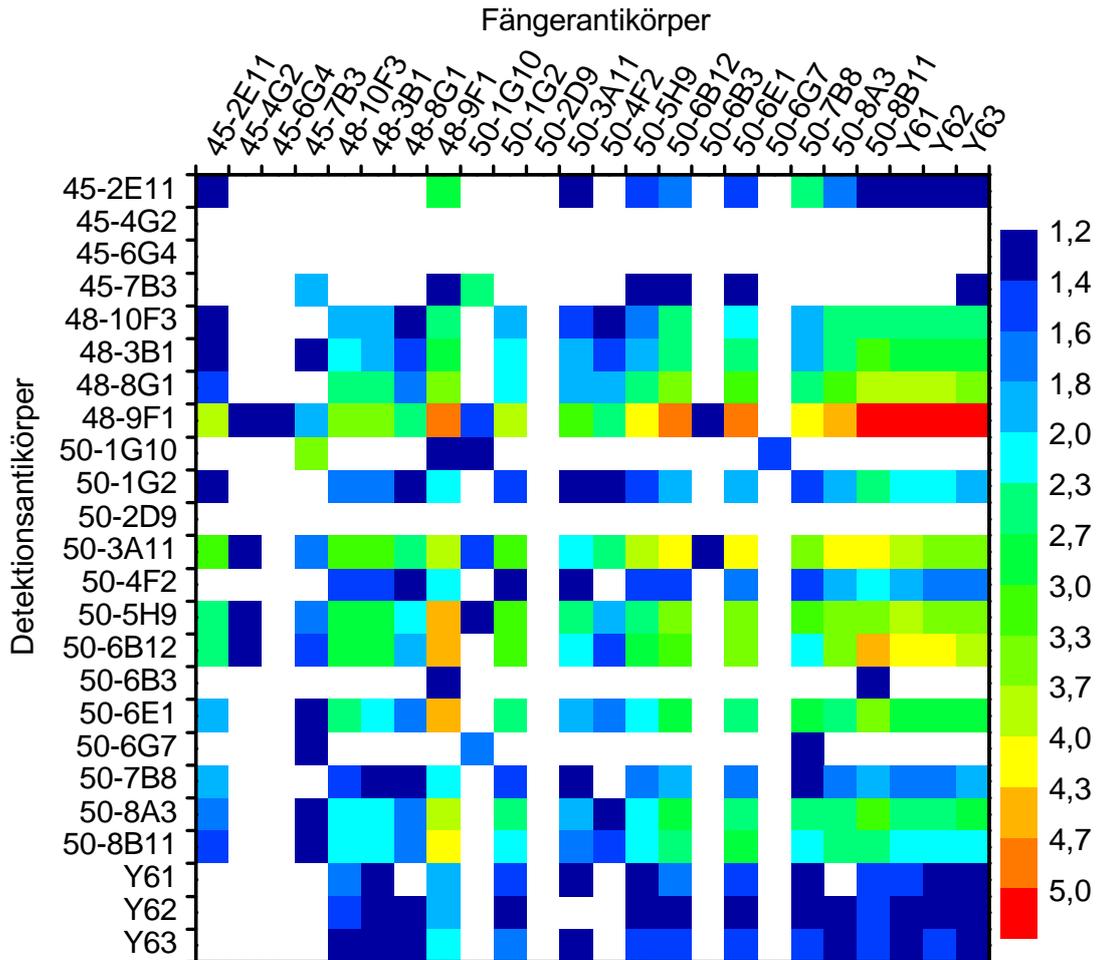


Abb. 3.24: Kombinationen von monoklonalen Haselnuss-Antikörpern, Markierung der Detektionsantikörper *in-situ* mit markiertem anti-Maus-Antikörper (Signal/Blank-Quotienten, Standard 1 mg/L Haselnuss).

in niedrigeren Konzentrationen wurde eine Verringerung der Signalintensitäten beobachtet. Des Weiteren wurde eine finale Verdünnung des unspezifischen Mäuseserums von 1 : 500 gewählt, da bei stärkeren Verdünnungen ebenso ein Anstieg der Absorptionen des Blanks beobachtet wurde. Hohe Absorptionen des Blanks beruhen offenbar auf ungenügendem Blocking von überschüssigen markierten anti-Spezies-Antikörpern bzw. auf einem zu geringen Anteil von unspezifischem Maus-IgG, was für das Abfangen von abdissoziierenden markierten anti-Spezies-Antikörpern relevant ist. Maximale Signal/Blank-Quotienten wurden bei finalen Konzentrationen der monoklonalen Antikörper von  $\approx 100 \mu\text{g/L}$  IgG ermittelt. Für das Screening der homologen Antikörperpaare wurde ein Standard von 1 mg/L Erdnuss bzw. Haselnuss gewählt, da in Vorversuchen festgestellt wurde, dass hiermit eine gute Diskriminierung erreicht wird.

Beim Screening der homologen Paare von Erdnuss-Antikörpern wurden die in Abb. 3.23 zusammengefassten Signal/Blank-Quotienten erhalten. Sowohl die Konzentrationen der Fänger- als auch der Detektionsantikörper wurden nivelliert. Die besten Antikörperkombinationen (höchste Signal/Blank-Quotienten) enthielten die Klone 44-8H7, 51-10F5, 51-12E3 und Y68 bis Y72. Kombinationen mit Beteiligung der Antikörper 44-1C12, 51-10C5, 51-1B6, 51-4E10, 51-7C1 oder 51-9F1 waren dagegen unter den getesteten Bedingungen stets negativ bzw. lieferten stark unterdurchschnittliche Ergebnisse.

Die beim Screening aller möglichen Kombinationen der vorhandenen monoklonalen Haselnuss-Antikörpern erhaltenen Signal/Blank-Quotienten sind in Abb. 3.24 dargestellt. Auch hier wurde die Nivellierung der Fängerantikörper mittels Vorbeschichtung eines anti-Spezies-Antikörpers erreicht. Die Konzentrationen der Detektionsantikörper wurden durch Verdünnung anhand der gemessenen IgG-Konzentrationen nivelliert. Antikörper 48-9F1, welcher bereits in vorangegangenen Messungen die höchste Affinität unter den monoklonalen Haselnuss-Antikörpern aufwies, war Bestandteil der Antikörperkombinationen mit hohen Signal/Blank-Quotienten. Weitere Kombinationen mit hohen Signal/Blank-Quotienten wurden bei Verwendung der Antikörper 50-3A11, 50-5H9 und 50-6B12 erhalten. Die Antigen-Erkennung der Haselnuss-Antikörper ist nicht bekannt. Eine häufige Ursache für negative Antikörperkombinationen ist vermutlich mangelnde Affinität. Auch die Bindung verschiedener Antigene bzw. die Erkennung eines identischen oder räumlich nahen Epitops und damit sterische Hinderung sind potentielle Ursachen für negative Kombinationen.

### 3.5.5 Kovalent markierte Antikörper

Die kovalente Konjugation der in gereinigter Form vorliegenden Antikörper erfolgte über reduktive Aminierung [236; 329]. Bei dieser Methode werden zunächst innerhalb der Polysaccharid-Ketten der Meerrettich-Peroxidase vicinale Diolgruppen mittels Periodat oxidativ gespalten. Die Kopplung der aktivierten Peroxidase erfolgt über die entstandenen reaktiven Aldehydgruppen an eine Aminogruppe des IgG unter intermediärer Bildung einer Schiff'schen Base. Die Doppelbindung wird mit Cyanoborhydrid reduziert und mit Tris als Blockingreagenz werden verbleibende reaktive Aldehydgruppen deaktiviert.

Es zeigte sich, dass die Ausbeute der Konjugation nur bei hohen Antikörper- und Peroxidasekonzentrationen von mindestens 1 g/L befriedigend ist. Das den Antikörpern zur Stabilisierung zugesetzte Glycerin wurde mit Hilfe von PD-10-Gelsäulen zunächst abgetrennt. Anschließend erfolgte eine Aufkonzentrierung der Antikörper-Lösungen mittels Zentrifugenfiltern. Die Peroxidase wurde in entsprechend hoher Konzentration aktiviert und die Fraktion mit aktivierter Peroxidase knapp geschnitten.

Die Qualität aller Konjugate wurde in Immunoassays mit immobilisiertem Antigen untersucht. Die Mikrotiterplatten wurden dabei mit Extrakt entsprechend

0 (Blank), 0,5 bzw. 10 mg/L Erdnuss beschichtet. Nach dem Blocking der Platte wurde die Detektion der immobilisierten Erdnussproteine mit drei Varianten studiert. Zum einen wurde mit Konjugat detektiert, zum zweiten sukzessive mit monoklonalem Antikörper und markiertem anti-Spezies-Antikörper und zum dritten sukzessive mit Konjugat und markiertem anti-Spezies-Antikörper. Die Verwendung aller Immunreagenzien (Antikörper, Konjugate, anti-Spezies-Antikörper) erfolgte in verschiedenen Verdünnungen.

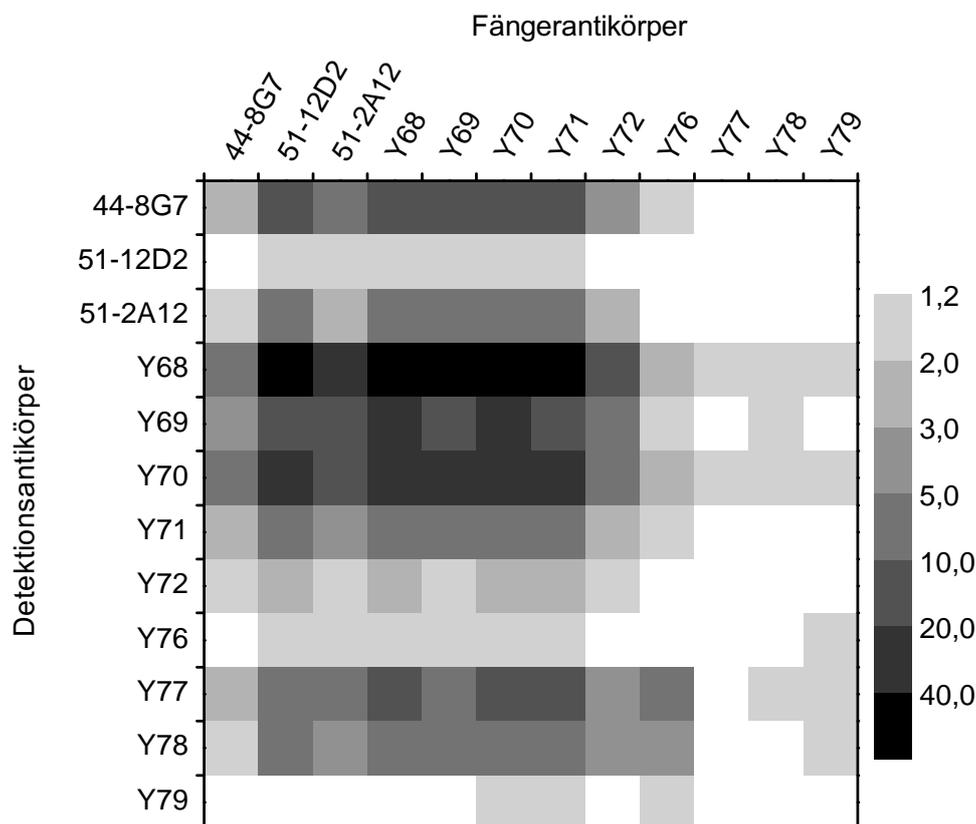


Abb. 3.25: Erdnuss-Antikörper, Signal/Blank-Quotienten beim Screening von homologen, monoklonalen Antikörperkombinationen; Detektion mittels Antikörper-Peroxidase-Konjugaten (Erdnuss-Standard 1 mg/L, n = 2).

Die Konjugation wurde als erfolgreich bewertet, wenn bei sukzessiver Inkubation von monoklonalem Antikörper und anti-Spezies-Antikörper bzw. von Konjugat und anti-Spezies-Antikörper keine signifikant höheren Signal/Blank-Quotienten erhalten wurden als bei Inkubation lediglich mit Konjugat. Um die optimalen Verdünnungen der Konjugate zu evaluieren, wurden in Immunoassays mit immobilisiertem Antigen die Konjugat-Verdünnungen ermittelt, mit denen die maximalen Signal/Blank-Quotienten erhalten werden. Die Antigenkonzentrationen bei der Beschichtung der Mikrotiterplatte betrug 0 (Blank) bzw. 10 mg/L Erdnuss. Es ergaben sich optimale Verdünnungen der Konjugate von 1 : 300 für die Antikörper 51-12D2, Y71, Y72, Y76, Y77 und Y79, 1 : 1.000 für die Antikörper Y69, Y70 und

Y78, 1 : 3.000 für den Antikörper 44-8G7 und 1 : 10.000 für die Antikörper 51-2A12 und Y68.

Für das Screening der homologen Antikörperkombinationen wurden schließlich Sandwich-Immunoassays durchgeführt, wobei die synthetisierten Konjugate als Detektionsantikörper verwendet wurden. Zunächst wurden hierfür sukzessive anti-Maus-Antikörper (Vorbeschichtung) und Erdnuss-Antikörper immobilisiert. Danach wurden in die Kavitäten Standard (1 mg/L Erdnuss in Fischgelatine-Extraktionspuffer) bzw. Fischgelatine-Extraktionspuffer (Blank) pipettiert und 2 h inkubiert. Nach Waschen der Mikrotiterplatten wurden zur Absättigung der vorbeschichteten anti-Maus-Antikörper je 200  $\mu$ L Mäuseserum (1 : 100 in PBS) in jede Kavität pipettiert. Nach einstündiger Inkubation erfolgte die Zugabe von jeweils 50  $\mu$ L Konjugat (entsprechend 0,5 mg/L Antikörper in PBS) und eine weitere einstündige Inkubation. Die nach Messung der gebundenen Peroxidase (Substratzugabe) berechneten Signal/Blank-Quotienten aller untersuchten Antikörperkombinationen sind in Abb. 3.25 zusammengefasst. Der höchste Signal/Blank-Quotient wurde mit der symmetrischen Antikörperkombination Y68/Y68 erhalten. Allgemein enthielten die Kombinationen mit den höchsten Signal/Blank-Quotienten die Antikörper 51-12D2, 51-2A12 oder Y68 bis Y71 als Fängerantikörper und 44-8G7, 51-2A12, Y68 bis Y70 oder Y77 als Detektionsantikörper.

### 3.5.6 Vergleich der Markierungsmethoden

Die bei Verwendung von markierten Fab-Fragmenten (Kap. 3.5.1) und markierten anti-Maus-Antikörpern (Kap. 3.5.4) erhaltenen relativen Signal/Blank-Quotienten sind in Abb. 3.26 gegeneinander aufgetragen. Es wurden dabei jeweils Ergebnisse vom Kombinationen aus monoklonalen Erdnuss-Antikörpern berücksichtigt. Es wurde eine hohe Korrelation von  $R = 0,88$  ( $n = 36$ ) gefunden, was aufgrund der identischen Bindungsmechanismen auch zu erwarten war. Die Eignung der beiden Methoden für die *in-situ*-Markierung zum Screening von homologen Antikörperpaaren ist damit ähnlich.

In Abb. 3.27 sind Signal/Blank-Quotienten bei Verwendung von kovalent markierten Detektionsantikörpern (siehe Kap. 3.5.5) und bei Verwendung von markierten anti-Maus-Antikörpern (siehe Kap. 3.5.4) gegeneinander aufgetragen. Auch hier handelt es sich um Ergebnisse, die beim Screening von Kombinationen aus monoklonalen Erdnuss-Antikörpern erhalten wurden. In diesem Fall wurde ein Korrelationskoeffizient von  $R = 0,72$  ( $n = 132$ ) ermittelt. Der Korrelationsplot weist allerdings eine Aufspaltung der Datenpunkte in zwei Gruppen auf. Offenbar unterscheidet sich die Markierungsausbeute zwischen den beiden Methoden. Vermutlich ist dies darauf zurückzuführen, dass es sich um Antikörper verschiedener Immunglobulin-Subklassen handelt (Kappa- bzw. Lambda-Ketten).

Ein interessanter Zusammenhang lässt sich beim Vergleich der Signal/Blank-Quotienten der homologen Antikörperpaare mit den Affinitäten feststellen (Abb. 3.28). Zur Ermittlung der Signal/Blank-Quotienten beim Screening der homologen Antikörperpaare wurden die Detektionsantikörper *in-situ* mit anti-Maus-

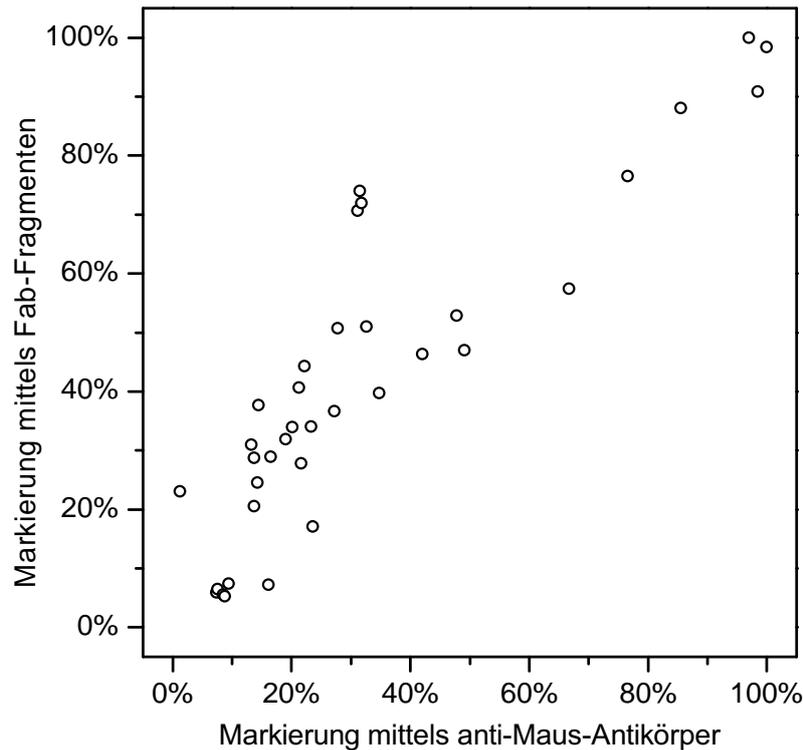


Abb. 3.26: Monoklonale Erdnuss-Antikörper, Korrelation zwischen Markierung des Detektionsantikörpers mittels markierten anti-Maus-Antikörpern und mittels markierten Fab-Fragmenten von anti-Maus-Antikörpern (jeweils relative Signal/Blank-Quotienten,  $n = 36$ ).

Antikörpern markiert (siehe Kap. 3.5.4). Die Bestimmung der relativen Affinitäten erfolgte mittels indirekt-kompetitiver Immunoassays (siehe Kap. 3.3.3). Auffällig an den Plots sind die maximalen Signal/Blank-Quotienten von  $\approx 16$ , die Indizien einer Limitierung sind. Vermutlich trat beim Immunoassay Substratlimitierung bei der Farbentwicklung auf. Erwartungsgemäß sind bei Kombinationen, bei denen hohe Signal/Blank-Quotienten ermittelt wurden, Antikörper mit hohen Affinitäten beteiligt. Dagegen ergeben zwei beliebige Antikörper mit hoher Affinität nicht notwendigerweise eine Kombination, mit der hohe Signal/Blank-Quotienten erzielt werden. Der gefundene Zusammenhang unterstreicht zum einen die große Bedeutung von Affinitätsbestimmungen zur Entwicklung von Sandwich-Immunoassays. Zum anderen ist aber auch die Durchführung eines effektiven Screenings von Antikörperpaaren wesentlich. Zweckmäßigerweise wird dieses Screening beginnend mit den affinsten Antikörpern durchgeführt.

Für die Entwicklung von Sandwich-Immunoassays aus monoklonalen Antikörpern wird die in Abb. 3.29 dargestellte Vorgehensweise vorgeschlagen. Das Ziel ist, geeignete Antikörperpaare möglichst schnell zu identifizieren, da während der frühen Screeningschritte nur ein kurzes Zeitfenster zur Verfügung steht. Empfehlenswert ist vor allem eine frühzeitige Festlegung auf einen Analyten, um mög-

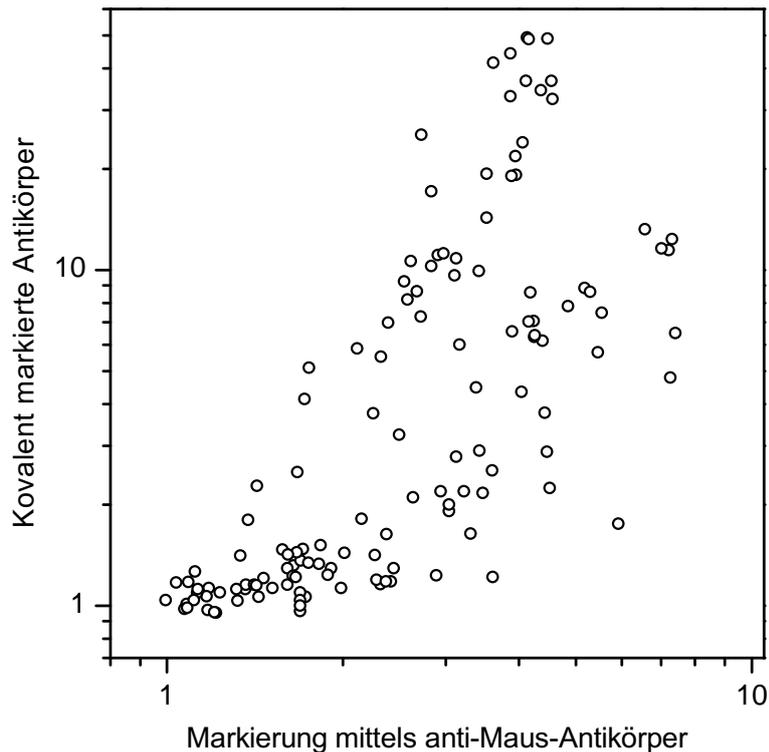


Abb. 3.27: Monoklonale Erdnuss-Antikörper, Korrelation zwischen Markierung des Detektionsantikörpers mittels markierten anti-Maus-Antikörpern und kovalent markierten Antikörpern ( $n = 132$ , jeweils Signal/Blank-Quotienten).

lichst Mischimmunisierungen (z. B. mit Erdnussextrakt) zu vermeiden. Diese sind als unattraktiv zu beurteilen, da die Immunantwort nicht kontrollierbar und nicht vorhersehbar ist. Vielmehr ist es möglich, dass hauptsächlich z. B. Antikörper gegen eine Minorkomponente gebildet werden, was sich als nachteilig für die Sensitivität der zu entwickelnden Immunoassays erweist. Idealerweise wird vielmehr mit einem gereinigten Protein immunisiert, wobei auf die Stabilität und den Anteil dieses Proteins in der Mischung geachtet wird. Als alternative Immunisierungsmethoden sind Peptid-Immunisierungen oder DNA-Immunisierungen denkbar.

Bei der Selektion eines Proteins oder sogar eines Epitops vereinfacht sich die weitere Vorgehensweise wesentlich, da das Screening der Zellkulturüberstände entsprechend ausgerichtet werden kann. Zur Abschätzung der Antikörperaffinitäten werden zweckmäßigerweise Formate mit immobilisierten Antikörpern gewählt, wodurch eine Nivellierung der Menge an immobilisiertem Antikörper ohne vorherige IgG-Bestimmung ermöglicht wird. Ein Screening von Antikörperkombinationen mit angemessenem Aufwand wird daraufhin nur mit Kombinationen durchgeführt, welche die affinsten Antikörper enthalten, nicht dagegen mit allen möglichen Kombinationen ( $n^2$ ).

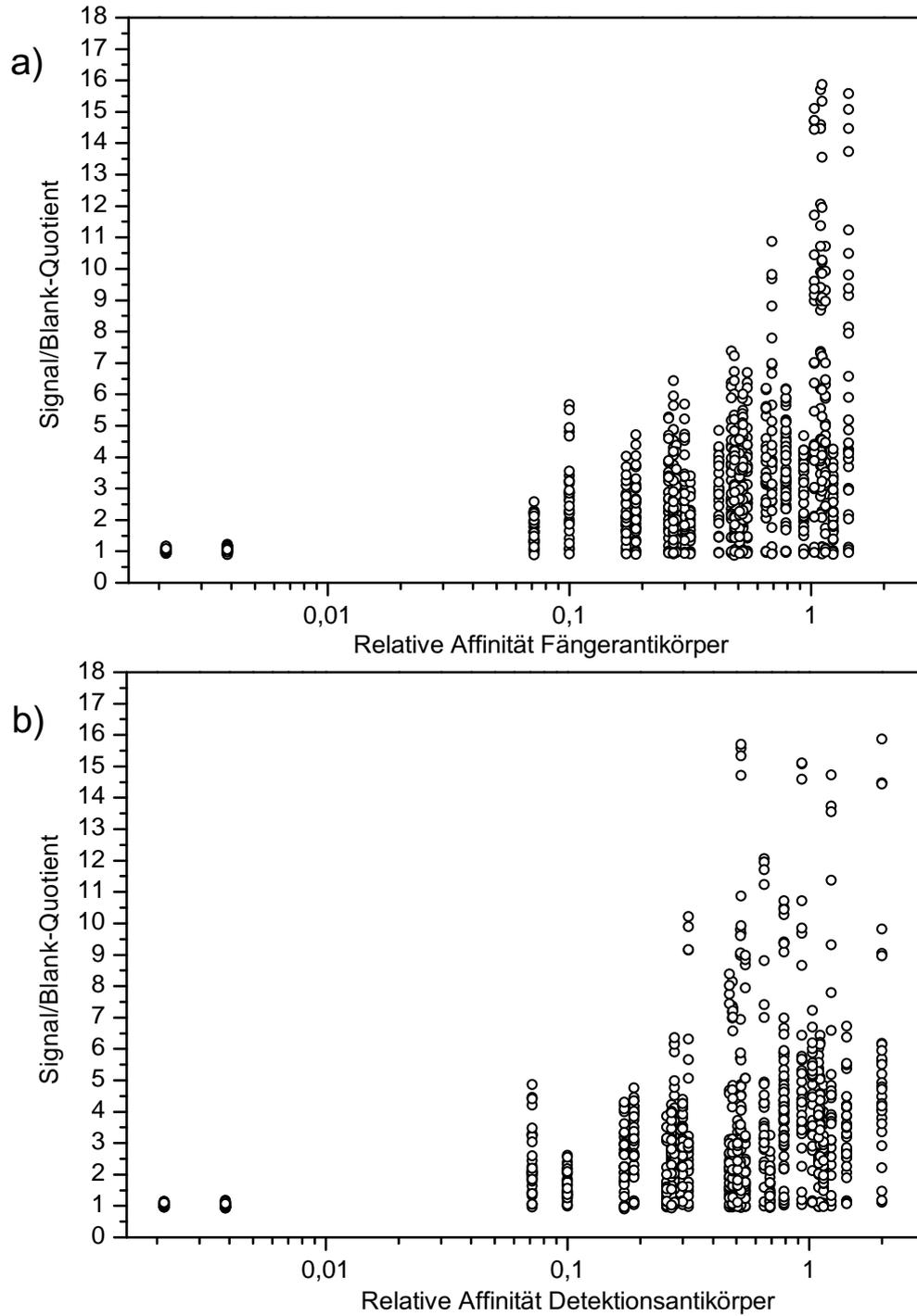


Abb. 3.28: Monoklonale Erdnuss-Antikörper, beim Screening homologer Paare ermittelte Signal/Blank-Quotienten, aufgetragen gegen die relative Affinität des Fängerantikörpers (a) bzw. des Detektionsantikörpers (b) (*in-situ*-Markierung des Detektionsantikörpers mittels markierten anti-Maus-Antikörpern).

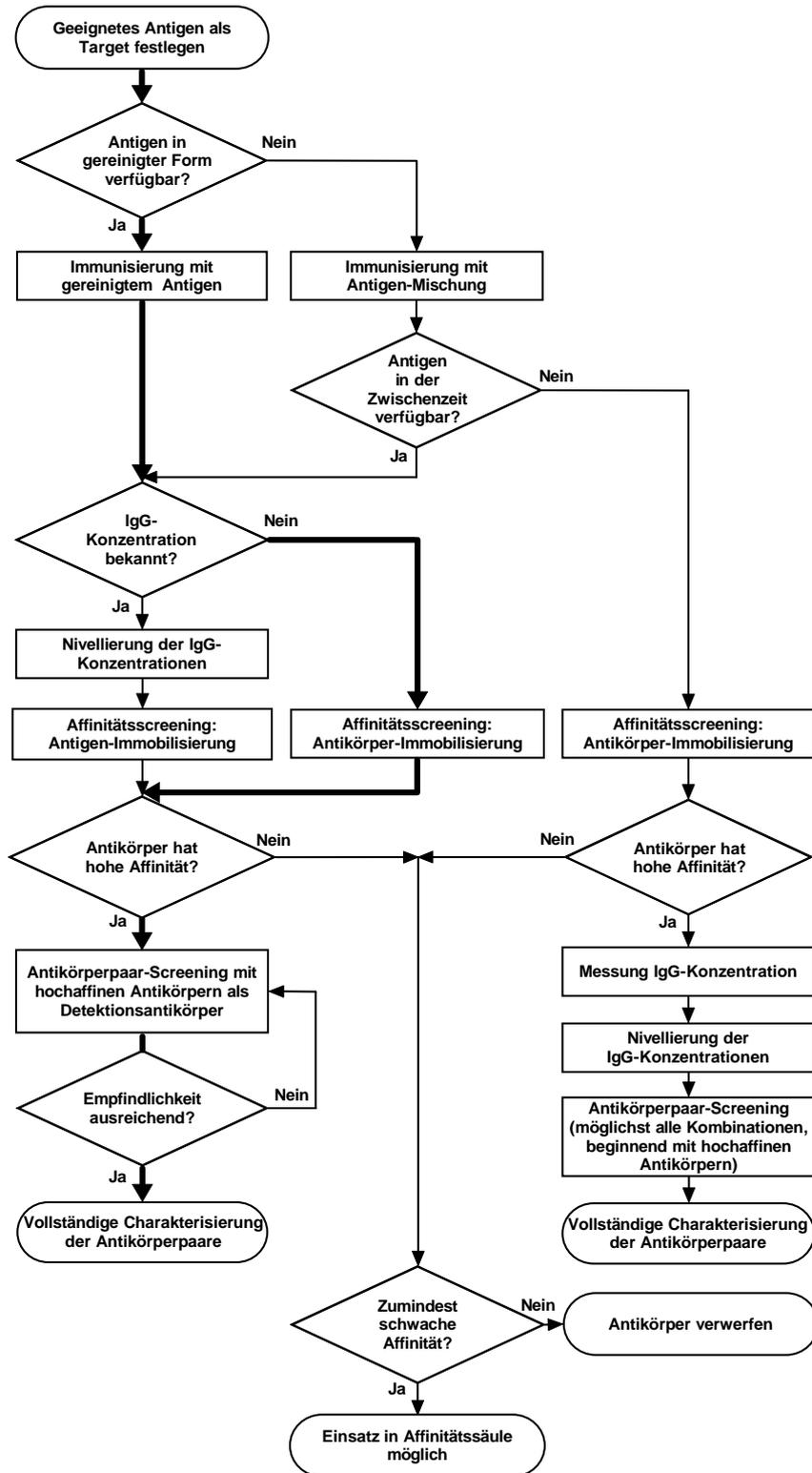


Abb. 3.29: Fließschema für die Entwicklung von Sandwich-Immunoassays, bestehend aus homologen Antikörperkombinationen.

Bei zwei vorgegebenen Antikörpern wird im Sandwich-Immunoassay die höhere Sensitivität erreicht, wenn der affinere der beiden Antikörper als Fängerantikörper und der Antikörper mit der geringeren Affinität als Detektionsantikörper eingesetzt wird. Nach dem hier vorgeschlagenen Schema ist die Immobilisierung des affinsten Antikörpers zum Screening der Antikörperkombinationen jedoch nachteilig. In diesem Fall müssten die IgG-Konzentrationen aller zu untersuchenden Zellkulturüberstände bestimmt werden, um die Konzentrationen des Detektionsantikörpers nivellieren zu können. Günstiger ist vielmehr die Immobilisierung der Zellkulturüberstände, die bei Verwendung eines vorbeschichteten anti-Spezies-Antikörpers zugleich die Nivellierung der Antikörpermengen beinhaltet. Nach Zugabe von Standard kann direkt die Inkubation von *in-situ*-markiertem, hochaffinem Detektionsantikörper erfolgen. Die Abhängigkeit von den IgG-Konzentrationen wird beim Screening der Antikörperkombinationen also minimiert. Damit lässt sich die Entwicklung der Immunoassays auf Affinitäten der Antikörper und sterische Gegebenheiten fokussieren.

Bei der Untersuchung der Antikörperkombinationen ist aus praktischen Gründen das Mitführen von Positiv- und Negativstandards zur Kontrolle empfehlenswert, zudem können mit Hilfe von Überlappungen Verschiebungen zwischen verschiedenen Mikrotiterplatten korrigiert werden. Empfehlenswert beim Screening ist darüberhinaus, die Konzentration des Standards entsprechend der gewünschten Empfindlichkeit des finalen Tests (d. h. niedrig) zu wählen.

Die Überlegungen können durch ein hypothetisches Beispiel illustriert werden. Angenommen wird, dass 1.000 Zellklone vorhanden sind, von denen 100 das Antigen erkennen. Unter diesen Antikörpern seien 10 Kombinationen, mit denen ein sensitiver Sandwich-Immunoassay entwickelt werden kann. Beim konventionellen Screening wären dafür mindestens 4.000 Experimente notwendig, um die Affinitäten und IgG-Konzentrationen aller Klone zu ermitteln. Zur Untersuchung aller möglichen Kombinationen der positiven Klone müssten des weiteren 10.000–20.000 Experimente durchgeführt werden. Bei Verwendung mikrotiterplattenbasierter Methoden (96 Kavitäten) wären hierfür insgesamt  $\approx 150$ – $250$  Mikrotiterplatten notwendig. Mit der in Abb. 3.29 dargestellten Vorgehensweise wären bei der hypothetischen Konstellation 2.000 Experimente zur Abschätzung der Affinitäten erforderlich. Nur diejenigen Antikörperkombinationen würden im folgenden weiter untersucht, welche die 1–3 affinsten Antikörper enthalten, resultierend in 100–600 Experimenten. Für das gesamte Screening wären also nur etwa  $\approx 22$ – $27$  Mikrotiterplatten erforderlich, entsprechend 9–18 % des Bedarfs bei der konventionellen Vorgehensweise. Neben der deutlichen Arbeitersparnis wären alle Arbeitsschritte somit innerhalb des kurzen Zeitfensters durchführbar, welches für das Screening der Zellklone verfügbar ist.

### 3.6 Screening von heterologen Antikörperpaaren

Für das Screening von heterologen Antikörperpaaren wurde zunächst der Fängerantikörper mittels vorbeschichtetem anti-Spezies-Antikörper immobilisiert. Sukzessive erfolgte die Inkubation von Standards, Detektionsantikörper und markiertem anti-Spezies-Antikörper. Die Farbentwicklung wurde durch Zugabe von Substratlösung gestartet.

#### 3.6.1 Immobilisierung von polyklonalen Antikörpern

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse des Screenings von heterologen Antikörperkombinationen bei Verwendung von polyklonalen Fängerantikörpern vorgestellt. Immobilisiert wurden hierfür polyklonale Antikörper aus Huhn oder Kaninchen, die Detektion erfolgte mit monoklonalen Antikörpern (Maus).

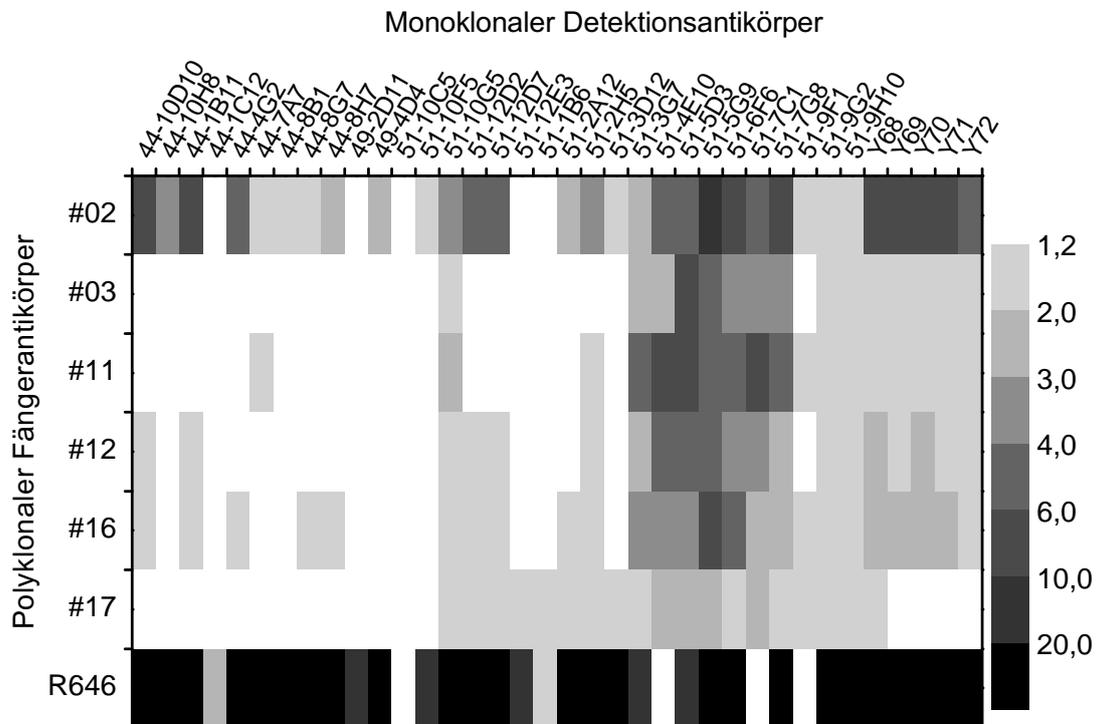


Abb. 3.30: Erdnuss-Antikörper, ermittelte Signal/Blank-Quotienten beim Screening von Kombinationen aus polyklonalen Fängerantikörpern und monoklonalen Detektionsantikörpern (Standard 1000  $\mu\text{g/L}$  Erdnuss;  $n = 2$ ; Fängerantikörper: R646 von Kaninchen, #02 bis #17 von Huhn).

Für das Screening der Erdnuss-Antikörper wurden Standardkonzentrationen von 10 und 1.000  $\mu\text{g/L}$  Erdnuss gewählt. Für die Auswertung erwies sich die Berechnung von Signal/Blank-Quotienten aller untersuchten Kombinationen als geeignet. Bei Variation der Antikörper-Verdünnungen bei der Beschichtung stellten

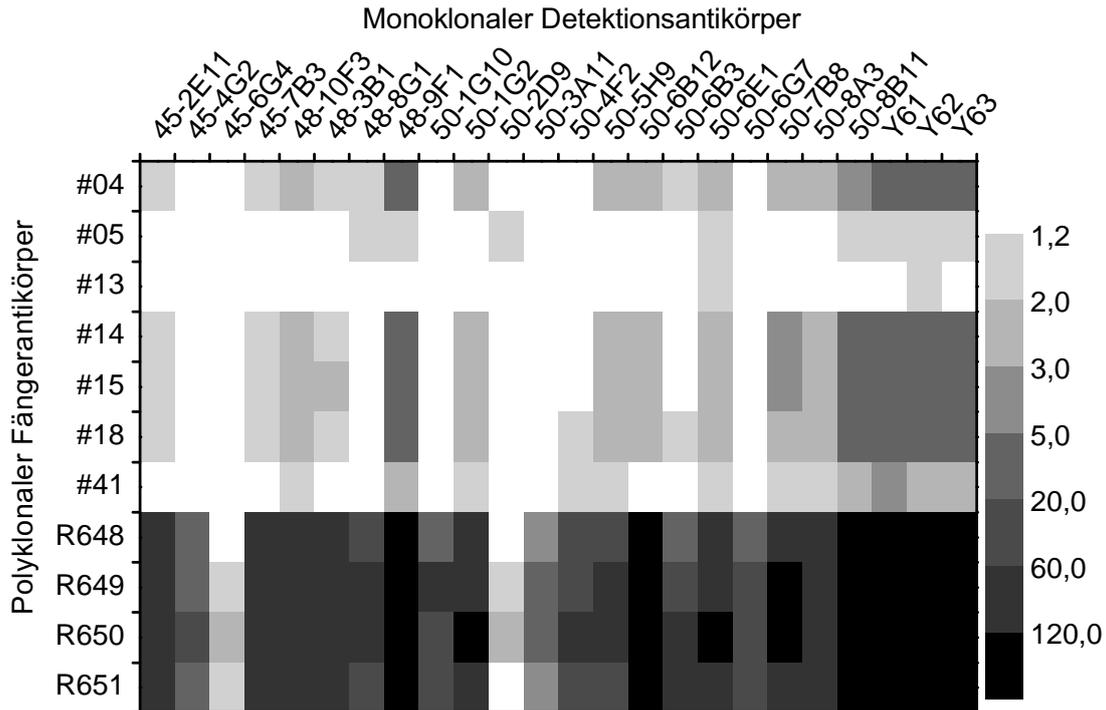


Abb. 3.31: Haselnuss-Antikörper, Signal/Blank-Quotienten beim Screening von Kombinationen aus polyklonalen Fängerantikörpern und monoklonalen Detektionsantikörpern (Standard 10 mg/L Haselnuss; n = 2; Fängerantikörper: R648 bis R651 von Kaninchen, #04 bis #41 von Huhn).

sich für den verwendeten polyklonalen Antikörper aus Kaninchen (R646) eine optimale Verdünnung von 1 : 2.000 und für die polyklonalen Antikörper aus Huhn (#02 bis #17) optimale Verdünnungen von 1 : 1.000 heraus. Bei niedrigeren Konzentrationen wurde ein Abfall in der Signalintensität beobachtet, bei höheren Konzentrationen wurden lediglich überschüssige Antikörper beim Waschschriff entfernt.

Die Ergebnisse beim Screening der Erdnuss-Antikörper sind in Abb. 3.30 zusammengefasst. Bei Verwendung von Antikörper aus Kaninchen (R646) wurden höhere Signal/Blank-Quotienten erhalten als bei Antikörper aus Huhn. Unter den Huhn-Antikörpern wurden mit Antikörper #02 die höchsten Signal/Blank-Quotienten ermittelt. Bei Betrachtung der monoklonalen Detektionsantikörper waren die Klone 51-12D2, 51-12D7, 51-2H5, 51-5G9 und Y68 bis Y70 Bestandteil der besten Antikörperkombinationen. Die Verwendung der polyklonalen Antikörper R694 und R695 (Kaninchen) lieferte ähnliche Muster wie die mit Antikörper R646 erhaltenen (Daten nicht gezeigt). Unter optimierten Bedingungen und dreistündiger Inkubation der Standards konnten mit Sandwich-Immunoassays bei Verwendung der empfindlichsten Antikörperkombinationen Nachweisgrenzen zwischen 1,7 und 20,3 µg/L Erdnuss erreicht werden (Blank + 3 s, n = 6, ohne Lebensmittelmatrix).

Mit den Haselnuss-Antikörpern erfolgte das Screening in analoger Weise. Als Standards wurden 0,1 und 10 mg/L Haselnuss verwendet und für die Auswertung wurden die Signal/Blank-Quotienten für alle Kombinationen ermittelt. Aus Abb. 3.31 sind die höheren Signal/Blank-Quotienten bei Verwendung von Antikörpern aus Kaninchen verglichen mit Huhn ersichtlich. Unter den Antikörpern von Huhn ergaben sich bei Verwendung der Antikörper #04, #14 und #15 die höchsten Signal/Blank-Quotienten. Außerdem zeigte sich, dass die monoklonalen Antikörper 48-9F1, 50-1G2, 50-6B12, 50-8B11 und Y61 bis Y63 Bestandteil der sensitivsten Antikörperkombinationen waren. Beim Vergleich der verschiedenen Antikörper aus Kaninchen wurden keine signifikanten Unterschiede beobachtet. Ähnliche Muster wie mit den Antikörpern R648 bis R651 wurden mit den Antikörpern R696 bis R699 erhalten (Daten nicht gezeigt). Die mit Fängerantikörpern aus Kaninchen und monoklonalen Detektionsantikörpern unter optimierten Bedingungen erreichten minimalen Nachweisgrenzen lagen bei 1,5–24 µg/L Haselnuss (Inkubation Standards 3 h, Blank + 3s, n = 6, ohne Lebensmittelmatrix).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bei Kombinationen mit Kaninchen-Antikörpern in nahezu allen Fällen höhere Sensitivitäten erreicht wurden als bei Kombinationen mit Huhn-Antikörpern. Innerhalb der Kaninchen-Antikörper waren allerdings nur geringfügige Unterschiede in der Sensitivität feststellbar.

### 3.6.2 Immobilisierung von monoklonalen Antikörpern

In einem weiteren Screeningschritt wurden monoklonale Antikörper als Fängerantikörper und polyklonale Antikörper von Huhn und Kaninchen als Detektionsantikörper untersucht.

Bei Verwendung der Standards 10 und 1.000 mg/L Erdnuss wurden bei vierminütiger Farbentwicklung bei vielen Antikörperkombinationen Absorptionen von über 2 AU gemessen. Bei allen Kombinationen mit den monoklonalen Antikörpern 44-1C12, 44-7A7, 51-10C5, 51-10G5, 51-4E10 und 51-7C1 und mit den polyklonalen Antikörpern #11 und #17 wurden signifikant niedrigere Absorptionen ermittelt. Die genannten Antikörper wurden daher von den nächsten Screening-Schritten ausgeschlossen.

Um eine bessere Diskriminierung zu erreichen, wurden in den weiteren Screeningschritten geringere Antigenkonzentrationen von 10 und 100 µg/L Erdnuss eingesetzt. Die mit dem Standard 10 µg/L Erdnuss ermittelten Signal/Blank-Quotienten sind in Abb. 3.32 dargestellt. Die höchsten Signal/Blank-Quotienten wurden erneut bei Kombinationen mit polyklonalen Antikörpern aus Kaninchen erhalten. Unter den monoklonalen Antikörpern wurden die höchsten Signal/Blank-Quotienten bei Verwendung der Antikörper 51-12D2, 51-12D7, 51-7G8 und Y68 bis Y72 erhalten. Die Muster der erhaltenen Signal/Blank-Quotienten bei Verwendung der Antikörper R694 und R695 (polyklonal aus Kaninchen) entsprachen den mit R646 erhaltenen. Mit den Antikörpern aus Schaf konnten dagegen keine positiven Antikörperpaare in Kombination mit monoklonalen Antikörpern gefunden werden.

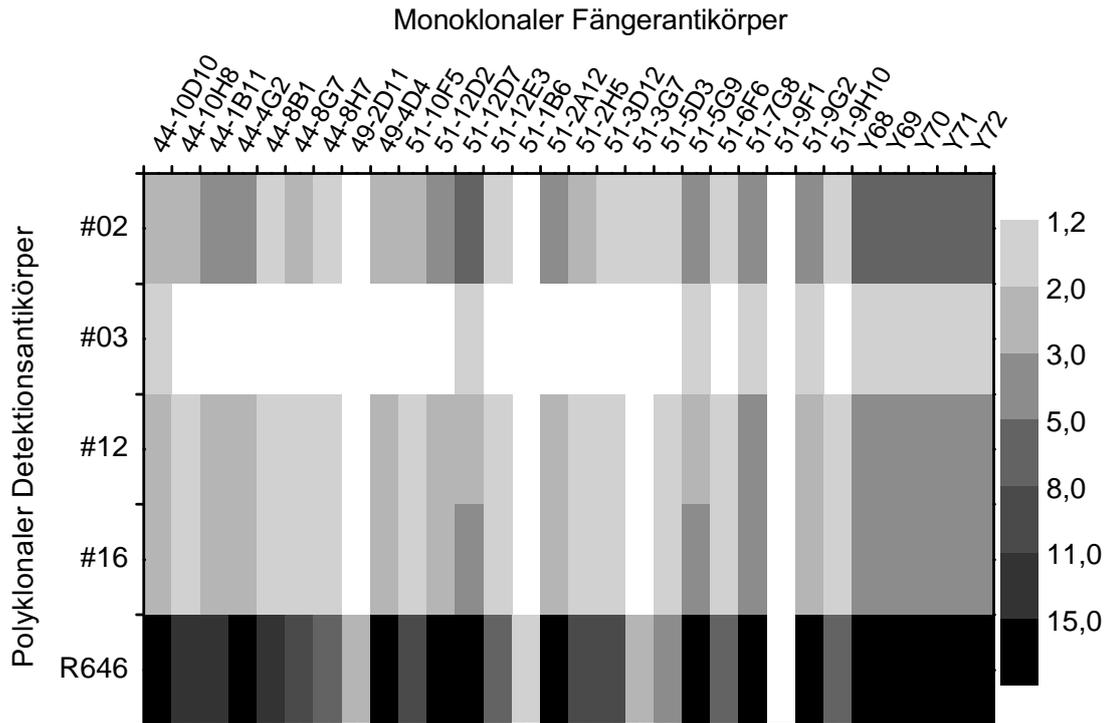


Abb. 3.32: Erdnuss-Antikörper, ermittelte Signal/Blank-Quotienten beim Screening von Kombinationen aus monoklonalen Fängerantikörpern und polyclonalen Detektionsantikörpern (Standard 10 µg/L Erdnuss, n = 2; Detektionsantikörper: R646 von Kaninchen, #02 bis #16 von Huhn).

In Abb. 3.33 sind mit verschiedenen Antikörperkombinationen aufgenommene Kalibrierkurven zusammengefasst. Allgemein waren bei Betrachtung der Kombinationen mit den höchsten Signal/Blank-Quotienten nur geringfügige Unterschiede zu beobachten, wenn zwei affine Antikörper einer Spezies verglichen wurden. Die Kurvenverläufe bei Verwendung von polyklonalen Antikörpern verschiedener Spezies unterscheiden sich dagegen wesentlich im unteren Kurvenbereich. Da die Signalintensitäten der Blanks bei Verwendung von Antikörpern aus Huhn im Vergleich zu Antikörpern aus Kaninchen höher waren, liegt auch die entsprechende Nachweisgrenze höher. Ein selektives Absenken der Absorptionen der Blanks durch stärkere Verdünnung der Antikörper aus Huhn bzw. der markierten anti-Huhn-Antikörper war nicht möglich, da parallel die Absorptionen im oberen Kurvenbereich sanken. Die weitere Optimierung der Nachweisgrenze bei Verwendung von Antikörpern aus Huhn war daher ausgeschlossen.

Mit den Haselnuss-Antikörpern wurde ein analoges, ebenso mehrstufiges Screening durchgeführt. Unter den monoklonalen Antikörpern, welche auf der Mikrotitrierplatte immobilisiert waren, blieben aufgrund geringer Signal/Blank-Quotienten die Klone 45-4G2, 45-6G4, 50-2D9, 50-3A11, 50-6B3 und 50-6G7 (Standardkon-

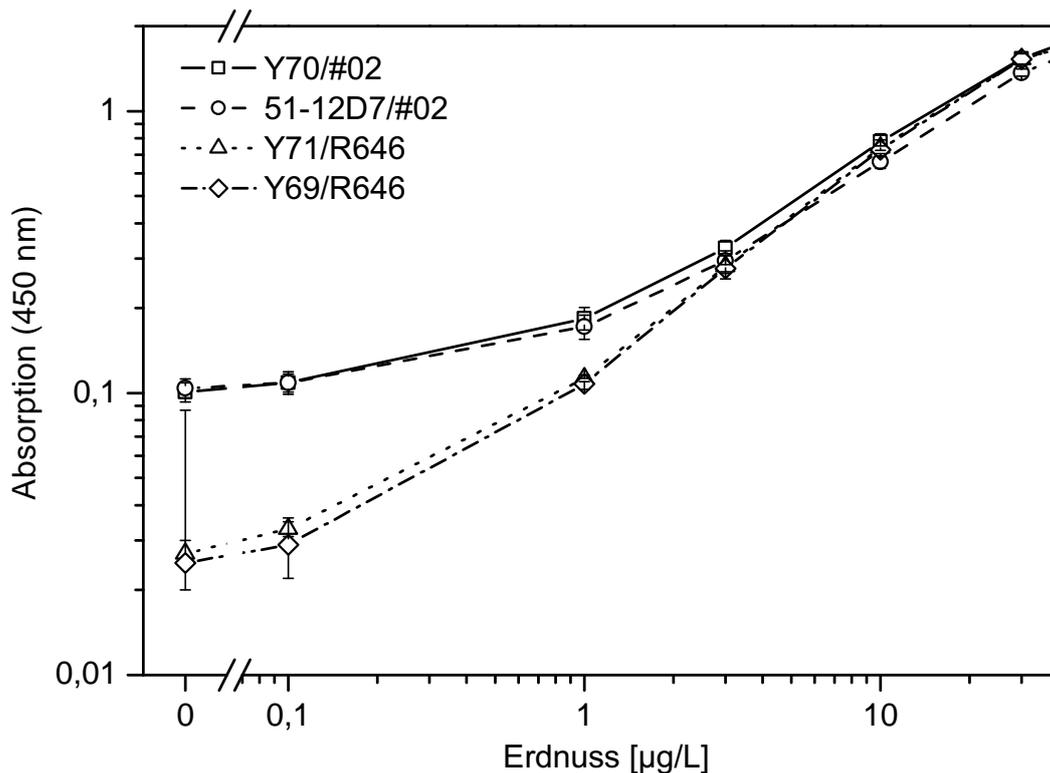


Abb. 3.33: Erdnuss, Kalibrierkurven von Sandwich-Immunoassays bei Verwendung monoklonaler (Y69 bis Y71, 51-12D7) Fängerantikörper und polyklonaler (#02 von Huhn, R646 von Kaninchen) Detektionsantikörper (Inkubation Standards 3 h; n = 3).

zentration 10 mg/L Haselnuss) in den weiteren Schritten unberücksichtigt. Unter den polyklonalen wurden die Antikörper #05, #13 und #41 ebenfalls wegen geringer Empfindlichkeit von weiteren Messungen ausgeschlossen. Wie oben bei den Erdnuss-Antikörpern beobachtet, waren auch hier die Kombinationen mit Antikörpern der Spezies Kaninchen (R648 bis R651) deutlich empfindlicher als mit Antikörpern der Spezies Huhn. Die Antikörper von Kaninchen konnten jedoch untereinander mit den verwendeten Standardkonzentrationen nicht signifikant diskriminiert werden.

In weiteren Screeningschritten wurden geringere Standardkonzentrationen von 10 und 100 µg/L Haselnuss verwendet. Die ermittelten Signal/Blank-Quotienten bei Verwendung des Standards 10 µg/L Haselnuss sind in Abb. 3.34 dargestellt. Die höchsten Signal/Blank-Quotienten wurden erneut bei Verwendung von Antikörpern aus Kaninchen erhalten. Unter den polyklonalen Antikörpern wurden die höchsten Signal/Blank-Quotienten mit #04 bzw. #15 (von Huhn) und R648 bzw. R649 (von Kaninchen) erhalten. Bei den monoklonalen Fängerantikörpern, mit denen die höchsten Signal/Blank-Quotienten ermittelt wurden, handelte es sich um die Klone 48-10F3, 48-9F1, 50-6B12 und 50-6E1. Die den gleichen Individu-

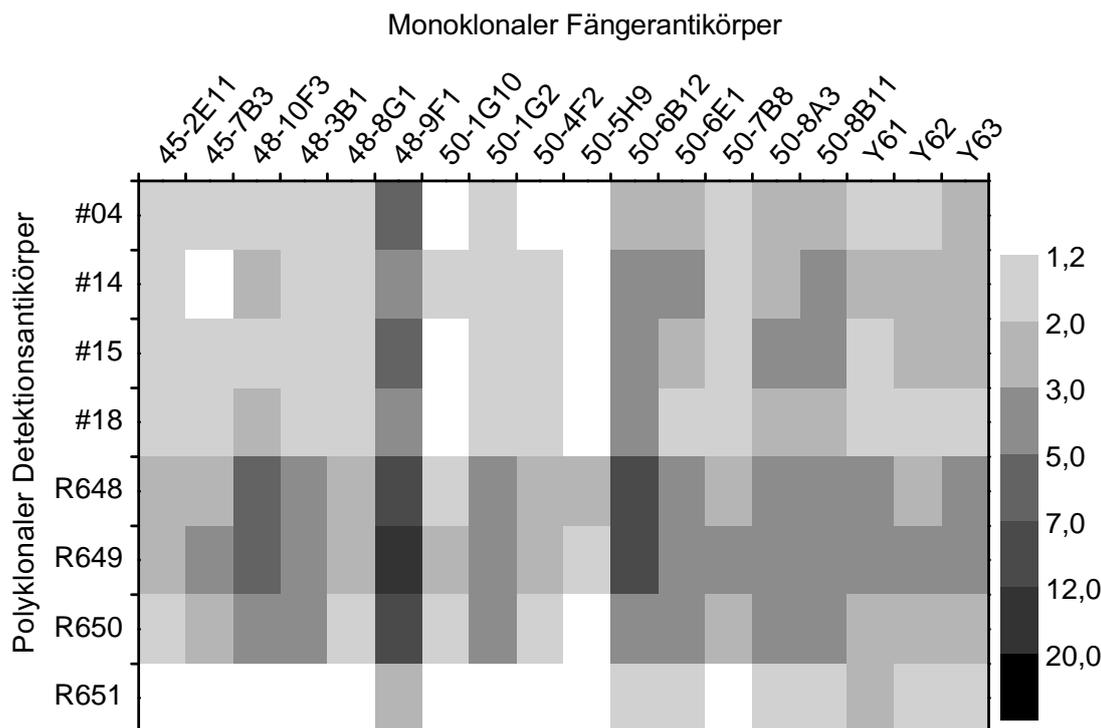


Abb. 3.34: Haselnuss-Antikörper, Signal/Blank-Quotienten beim Screening von Kombinationen aus monoklonalen Fängerantikörpern und polyklonalen Detektionsantikörpern (Haselnuss-Standard 10 µg/L, n = 2; Detektionsantikörper: R648 bis R651 von Kaninchen, #04 bis #18 von Huhn).

en entnommenen Seren R696 bis R699 lieferten ähnliche Ergebnisse wie die Seren R648 bis R651. Dagegen konnten mit den Haselnuss-Antiseren aus Schaf in Kombination mit monoklonalen Antikörpern keine sensitiven Antikörperkombinationen gefunden werden.

In Abb. 3.35 sind mit verschiedenen Kombinationen von Haselnuss-Antikörpern in Sandwich-Immunoassays erhaltene Kalibrierkurven zusammengestellt. Hier unterscheiden sich die mit den besten Antikörperkombinationen erhaltenen Kurvenverläufe ebenfalls stark bei Betrachtung von Detektionsantikörpern verschiedener Spezies. Die Signalintensitäten der Blanks waren bei Verwendung von Antikörpern aus Kaninchen verglichen mit Antikörpern aus Huhn um den Faktor  $\approx 5$  geringer und die Steigungen der Kurven im unteren Konzentrationsbereich signifikant größer. Damit zeigte sich auch bei den Haselnuss-Antikörpern, dass die Kombinationen mit den verfügbaren Antikörpern aus Kaninchen sensitiver sind als die Kombinationen mit Antikörpern aus Huhn.

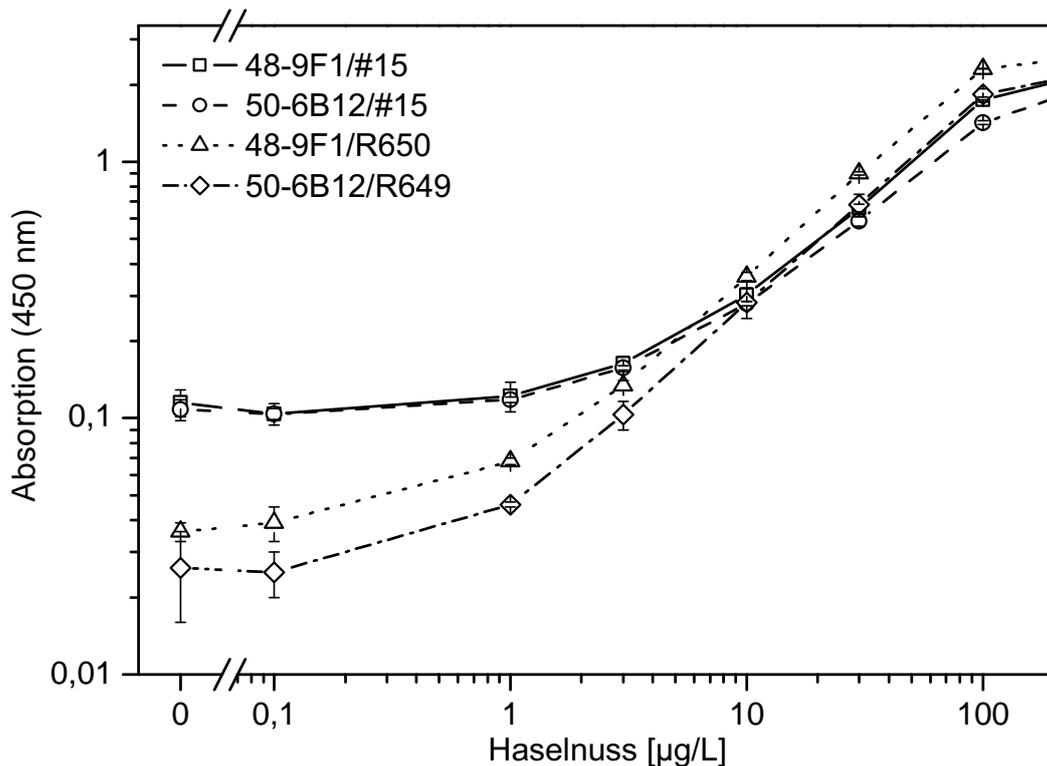


Abb. 3.35: Haselnuss, Kalibrierkurven von Sandwich-Immunoassays bei Verwendung monoklonaler (48-9F1, 50-6B12) Fängerantikörper und polyklonaler (#15 von Huhn; R649, R650 von Kaninchen) Detektionsantikörper (Inkubation Standards 3 h, n = 3).

### 3.6.3 Zusammenfassung heterologe Antikörperpaare

Die beim Screening der heterologen Kombinationen aus Erdnuss-Antikörpern erhaltenen Ergebnisse sind in Box-Whisker-Plots (Abb. 3.36) zusammengefasst. Aus den Plots ist ersichtlich, dass bei Verwendung von immobilisierten monoklonalen Antikörpern bei den eingesetzten Standards (10 µg/L bzw. 100 µg/L) die meisten erhaltenen Signal/Blank-Verhältnisse über dem Wert zwei liegen (Median > 2). Beim höher konzentrierten Standard 100 µg/L wird sogar bei über 75 % der Antikörperkombinationen ein Signal/Blank-Quotient von drei überschritten. Im Falle von polyklonalen Fängerantikörpern liegen trotz Verwendung eines höher konzentrierten Standards von 1.000 µg/L die meisten Signal/Blank-Quotienten unter dem Wert von zwei. Die Kombinationen aus monoklonalem Fängerantikörper und polyklonalem Detektionsantikörper waren also generell sensitiver als die Kombinationen in umgekehrter Anordnung. Dies kann mit der selektiven Erkennung von in der Regel einem Epitop durch den monoklonalen Antikörper erklärt werden, was eine selektive Immobilisierung und Anreicherung eines Proteins der Antigenmischung zur Folge hat. Bei Verwendung von polyklonalen Fängerantikörpern werden dagegen in der Regel verschiedene Proteine immobilisiert. Bei Immunisie-

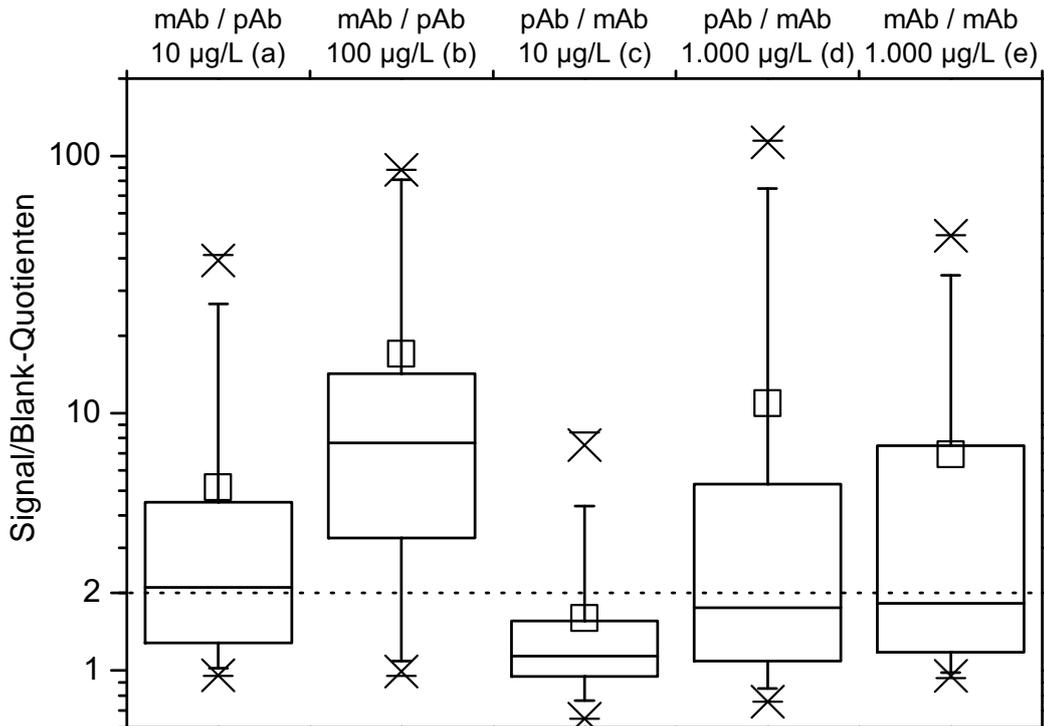


Abb. 3.36: Box-Whisker-Plots der beim Screening von heterologen Kombinationen von Erdnuss-Antikörpern erhaltenen Signal/Blank-Quotienten unter Verwendung verschiedener Standardkonzentrationen ( $n = 180$ ); a) und b) monoklonale Fängerantikörper, polyklonale Detektionsantikörper; c) und d) polyklonale Fängerantikörper, monoklonale Detektionsantikörper; e) zum Vergleich: monoklonale Fängerantikörper, monoklonale Detektionsantikörper.

rungen mit Proteinmischungen werden meist Antiseren generiert, welche multiple Antigene erkennen. Der monoklonale Detektionsantikörper bindet dagegen in der Regel nur eines dieser Proteine, was somit zu verminderter Sensitivität führt.

Unter den gewählten Bedingungen zeigte sich, dass bei den Inkubationsschritten keine Gleichgewichtseinstellung stattfindet. Daher ist durch Variation der Inkubationszeiten eine weitere Optimierung möglich, in Hinblick auf höhere Sensitivität oder kürzere Testdauer.

Beim Vergleich der Sensitivität von homologen (monoklonale Antikörper) mit heterologen Antikörperkombinationen waren signifikante Unterschiede erkennbar. In Abb. 3.37 sind Kalibrierungen zusammengefasst, die mit Kombinationen bestehend aus zwei monoklonalen Antikörpern (Y68/Y68, Y71/51-12D2), polyklonalem Fänger- und monoklonalem Detektionsantikörper (R694/Y68) bzw. monoklonalem Fänger- und polyklonalem Detektionsantikörper (Y70/R694) aufgenommen wurden. Als monoklonale Detektionsantikörper wurden jeweils die entsprechenden

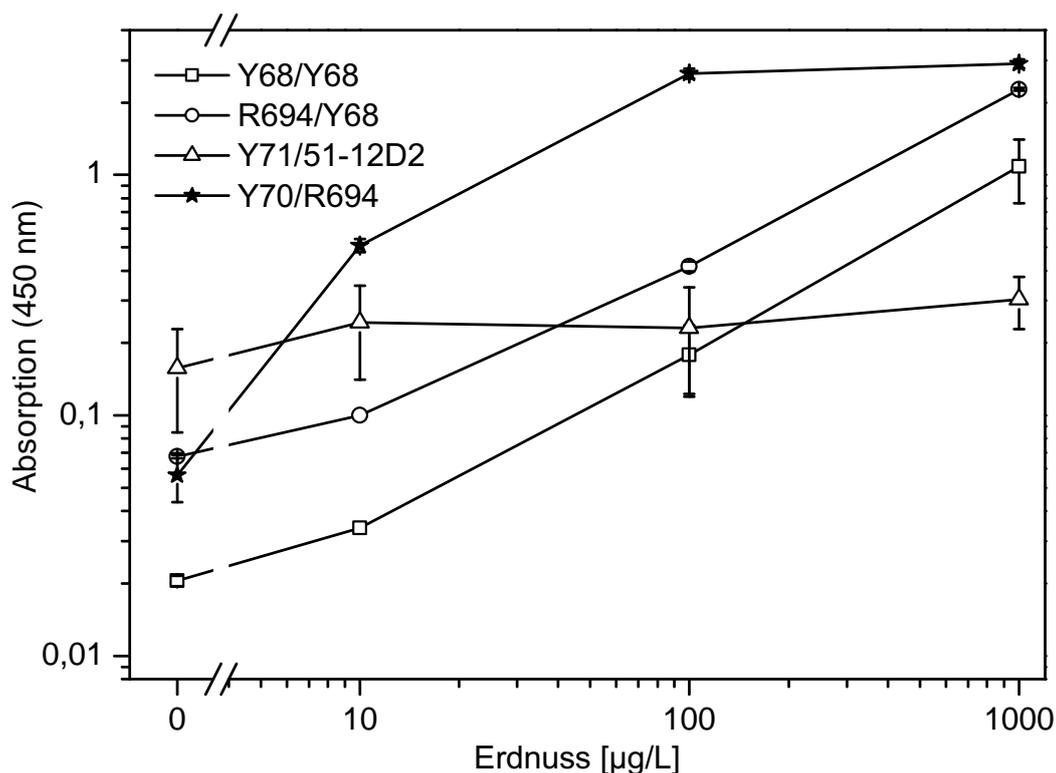


Abb. 3.37: Kalibrierungen (Erdnuss), aufgenommen in Sandwich-Immunoassays unter Verwendung verschiedener Antikörperkombinationen (Y68/Y68 und Y71/51-12D2: monoklonaler Fänger- und Detektionsantikörper; R694/Y68: polyklonaler (Kaninchen) Fänger- und monoklonaler Detektionsantikörper; Y70/R694: monoklonaler Fänger- und polyklonaler (Kaninchen) Detektionsantikörper; Verdünnung Detektionsantikörper: Y68-Konjugat 1 : 3.000, 51-12D2-Konjugat 1 : 300, R694 1 : 10.000).

Peroxidase-Konjugate verwendet. Die Kombinationen von monoklonalem Fängerantikörper und polyklonalem Detektionsantikörper erwiesen sich als am empfindlichsten, überraschenderweise insbesondere empfindlicher als Kombinationen von zwei monoklonalen Antikörpern.

Um den Sachverhalt der niedrigen Empfindlichkeiten von Kombinationen aus zwei monoklonalen Antikörpern abzuklären, wurden Immunoassays mit immobilisiertem Antigen unter Verwendung von verschiedenen Konzentrationen von monoklonalen und polyklonalen Antikörpern durchgeführt. In Abb. 3.38 sind exemplarisch die mit dem monoklonalen Antikörper Y68 und dem polyklonalen Antikörper R694 (Kaninchen) erhaltenen Ergebnisse zusammengefasst. Die Antikörper wurden jeweils 1 : 1.000, 1 : 10.000 bzw. 1 : 100.000 verdünnt und zur Detektion wurden markierte anti-Spezies-Antikörper verwendet. Besonders im unteren Konzentrationsbereich ist deutlich erkennbar, dass die dem polyklonalen Antikörper entsprechende Kurve signifikant steiler ist als die dem monoklonalen Antikörper

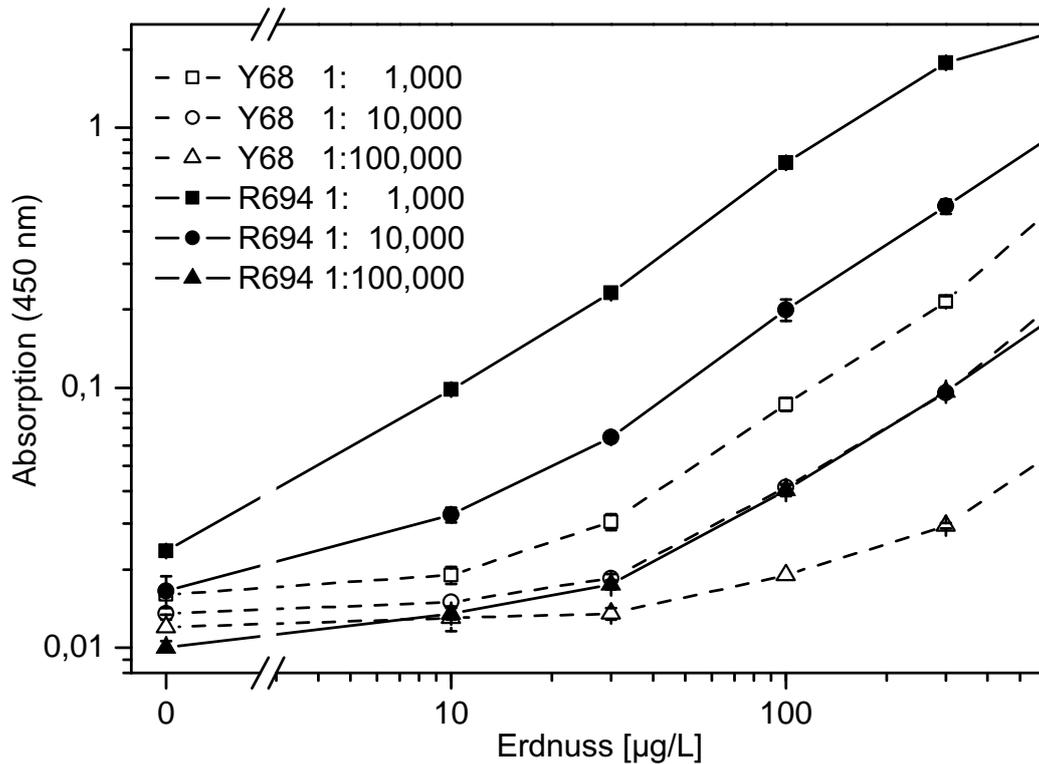


Abb. 3.38: Erdnuss, Immunoassays mit immobilisiertem Antigen; Vergleich von monoklonalen (Y68) und polyklonalen (R694 von Kaninchen) Antikörpern verschiedener Konzentrationen ( $n = 2$ , Detektion mit markierten anti-Spezies-Antikörpern).

entsprechende. Die Empfindlichkeit des Immunoassays mit immobilisiertem Antigen ist damit höher bei Verwendung von polyklonalen Antikörpern als bei Verwendung von monoklonalen Antikörpern. Offensichtlich ist dieser Befund auch auf Sandwich-Immunoassays übertragbar. Die niedrige Empfindlichkeit im Sandwich-Immunoassay bei Verwendung von zwei monoklonalen Antikörpern liegt offenbar nicht an schlechter Kompatibilität der beiden Antikörper, sondern rührt vermutlich von der Verwendung eines monoklonalen Detektionsantikörpers.

Eine Ursache für die Diskriminierung im Immunoassay mit immobilisiertem Antigen ist die Tatsache, dass eine Mischung von Proteinen auf der Mikrotiterplatte immobilisiert wird, von monoklonalen Antikörpern jedoch nur ein Protein bzw. Epitop erkannt wird. Dagegen binden Antikörper des polyklonalen Serums mehrere verschiedene Proteine, was zu erhöhter Empfindlichkeit führt. Möglicherweise können durch verschiedene Antikörper im Serum sogar mehrere Epitope je Protein detektiert werden, was einen deutlichen Sensitivitätsgewinn gegenüber monoklonalen Antikörpern verursachen würde. Einschränkend muss jedoch festgehalten werden, dass beim Immunoassay mit immobilisiertem Antigen im Gegensatz zu Sandwich-Immunoassays mit monoklonalem Fängerantikörper eine gemischte Immobilisierung stattfindet.

## 3.7 Enzyme-Channeling-Assays

Enzyme-Channeling ist in biochemischen Stoffwechselprozessen in Form von Reaktionsketten anzutreffen. Das Produkt einer Enzym-Substrat-Reaktion wird dabei als Substrat in einer weiteren enzymatischen Reaktion umgesetzt [330; 331].

Es wurde versucht, homogene Sandwich-Immunoassays zu entwickeln, bei dem zwei enzymmarkierte Antikörper verwendet werden, wobei das Produkt des einen Enzyms als Substrat für die zweite Enzymreaktion fungiert. Als Modellenzyme sollten Glucoseoxidase und Peroxidase verwendet werden. In der Reaktionskette wird zunächst bei der Oxidation von Glucose zum Gluconolacton Wasserstoffperoxid generiert. Unter Peroxidase-Katalyse wird vorhandenes TMB mittels Wasserstoffperoxid zu einem photometrisch detektierbaren Produkt oxidiert. Bei zu großem Abstand der beiden Enzyme bzw. Antikörper zueinander wird das gebildete Wasserstoffperoxid von in der Lösung befindlicher Katalase inaktiviert (siehe Abb. 2.9, S. 46).

Das Studium der Enzyme-Channeling-Reaktion erfolgte zunächst unter Verwendung mikrotiterplattenbasierte Formate. Mikrotiterplatten wurden mit anti-Maus-Antikörper und Glucoseoxidase (0,1–100 mg/L) und anschließend mit monoklonalem Fängerantikörper (51-12D7) beschichtet und mit 1,5%iger BSA-Lösung geblockt. Nach einem Waschschrift wurden zunächst Lösungen von Peroxidase-markiertem Detektionsantikörper (R646, Kaninchen), Katalase (0,05–25 mg/L) sowie TMB in Substratpuffer in die Kavitäten pipettiert. Standards (1 mg/L Erdnuss) sowie Glucose (0,01–10 g/L) in PBS wurden zugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation und Zugabe von Stopp-Lösung wurde die Platte im Photometer bei 450 nm vermessen.

Es zeigte sich, dass die Signalentwicklung von allen untersuchten Parametern (Konzentrationen von Glucoseoxidase, Katalase, Detektionsantikörper und Glucose) abhängig ist. Eine Erhöhung der Signalintensität wurde bei Erhöhung der Glucoseoxidase-, Antikörper- oder Glucosekonzentration festgestellt. Andererseits verringerte sich die Signalintensität bei Erhöhung der Katalasekonzentration. Alle ermittelten Signal/Blank-Quotienten lagen unter dem Wert zwei und die Maxima waren nur schwach ausgeprägt und lokal. Der höchste Signal/Blank-Quotient von 1,96 wurde beispielsweise bei folgenden Konzentrationen bzw. Verdünnungen erhalten: Glucoseoxidase 1 mg/L, Katalase 0,05 mg/L, Detektionsantikörper (R646 von Kaninchen) 1 : 10.000 und Glucose 0,01 g/L. Die erhaltenen Signale lagen dabei allerdings unter 0,1 AU. Bei Veränderung eines der genannten Parameters wurde eine Verringerung des Signal/Blank-Quotienten beobachtet. Eine Erhöhung der Sensitivität durch Variation des pH-Wertes bei der Enzymreaktion konnte in diesem Assayformat ebenso nicht erreicht werden. Eine weitere Optimierung der Methode, bei der selbst mit dem relativ hoch konzentrierten Erdnuss-Standard von 1 mg/L keine Signal/Blank-Quotienten von über zwei erzielt werden konnten, ist daher vermutlich nur mit einem anderen Assayformat möglich.

Enzyme-Channeling-Immunoassays wurden auch als homogenes Format untersucht. Exemplarische Kalibrierungen der in Mikrotiterplatten durchgeführten

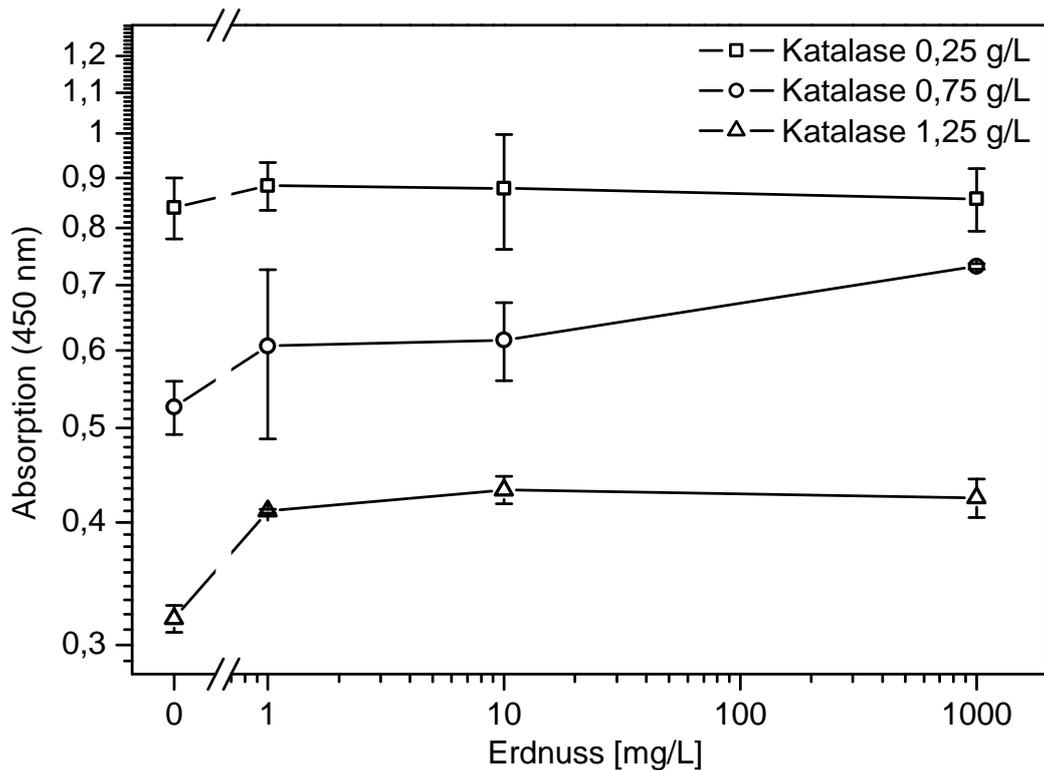


Abb. 3.39: Homogener Enzyme-Channeling-Immunoassay, durchgeführt in Mikrotiterplatten, bei Variation der Katalasekonzentration ( $n = 2$ ).

Assays sind in Abb. 3.39 dargestellt. Je 500  $\mu\text{L}$  der optimierten Reagenzienmischung enthielten 5 mg BSA, 10  $\mu\text{L}$  TMB-Stammlösung, 0,125–0,625  $\mu\text{L}$  Katalaselösung, 0,5  $\mu\text{L}$  POD-Konjugat des monoklonalen Antikörpers Y70 (0,2 g/L), 20  $\mu\text{L}$  biotinylierter Antikörper R695 (polyklonal von Kaninchen, 0,25 g/L) und 1  $\mu\text{L}$  Konjugat aus Avidin und Glucoseoxidase in PBS. In die Kavitäten der Mikrotiterplatte wurden jeweils 50  $\mu\text{L}$  dieser Reagenzienmischung mit je 20  $\mu\text{L}$  Erdnuss-Standard zwei Stunden inkubiert. Jeweils 20  $\mu\text{L}$  2%ige Glucoselösung wurden zugegeben und die Farbentwicklung nach 10 min durch Zugabe von 50  $\mu\text{L}$  Stopp-Lösung gestoppt. Trotz Optimierung der Parameter und auch bei Verwendung verschiedener Antikörperkombinationen konnten keine homogenen Immunoassays mit zufriedenstellender Sensitivität erhalten werden.

Es wurde in weiteren Experimenten die Signalentwicklung bei sequentiellm Aufbau des Sandwich-Antikörperkomplexes untersucht. Dazu wurden zunächst anti-Maus-Antikörper und Glucoseoxidase (0,1 g/L) und nach einem Waschschrift monoklonaler Fängerantikörper (Zellkulturüberstand 51-12D7 1:4.000) auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte ein Inkubationsschrift mit Standard (1 mg/L Erdnuss in Magermilch + 0,5 % Tween 20) bzw. Blank. Nach einem erneuten Waschschrift wurde die Platte sukzessive mit polyklonalem Detektionsantikörper (R646 von Kaninchen) und Peroxidase-mar-

kiertem anti-Kaninchen-Antikörper inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch Pipettieren einer Mischung aus Katalase, TMB und Glucose in PBS gestartet und nach 50 Minuten durch Zupipettieren von Stopp-Lösung beendet. Die maximal ermittelten Signal/Blank-Quotienten betragen bei diesem Format 3,8 und wurden bei einer Glucosekonzentration von 10 g/L und ohne Zugabe von Katalase erreicht. Die Sensitivitätssteigerung bei sequentiellen Aufbau des Sandwich-Komplexes beruht offenbar auf Festphasenanreicherungsschritten.

In Anbetracht der selbst im heterogenen Enzyme-Channeling-Assay niedrigen Signal/Blank-Quotienten von  $< 4$  muss offensichtlich die Konzeption des Assays modifiziert werden. Um zu untersuchen, ob die Menge an für die Oxidation von Glucose vorhandenem Sauerstoff der limitierende Faktor ist, wurden homogene Assays auf Teststäbchen durchgeführt (Ergebnisse nicht gezeigt). Jedoch wurden auch hier trotz Vergrößerung der Kontaktfläche mit Luft keine zufriedenstellenden Ergebnisse erhalten. Vermutlich ist der Abstand der beiden Enzyme zueinander zu groß, selbst wenn ein Sandwich-Komplex vorliegt. Da aufgrund der räumlichen Diffusion die Wasserstoffperoxidkonzentration in dritter Potenz vom Abstand zur Glucoseoxidase abnimmt, ist wahrscheinlich durch Verringerung des Abstandes eine Steigerung der Empfindlichkeit zu erreichen. Denkbar ist hier beispielsweise die Verwendung von markierten Fab-Fragmenten anstelle von markierten, ganzen Antikörpern.

## 3.8 Auswahl des Extraktionspuffers

### 3.8.1 Matrixeffekte komplexer Lebensmittel

Die stärksten Matrixeffekte wurden beim Lebensmittel Schokolade aufgrund der enthaltenen Polyphenole erwartet. Polyphenole, auch pflanzliche Tannine genannt, binden über molekulare Wechselwirkungen zunächst reversibel an Proteine. Bei hohen Polyphenolkonzentrationen können die Komplexe durch Quervernetzungen präzipitieren [332; 333]. Durch die enthaltenen Tannine werden in Schokoladen eventuell vorkommende Erdnuss- bzw. Haselnussproteine gegenüber immunanalytischer Detektion maskiert.

In Vorversuchen wurden kommerziell erhältliche Schokoladen mit Sandwich-Immunoassays untersucht. Dabei wurden in allen Schokoladen Spuren von Erdnuss oder Haselnuss gefunden. Da für die Entwicklung von Immunoassays zuverlässige Blankmatrices benötigt werden, mussten entsprechende Modellschokoladen im Labor hergestellt werden. Die Zutaten zur Herstellung der Schokoladen wurden zuvor mittels Sandwich-Immunoassays auf Spuren von Erdnuss oder Haselnuss überprüft.

Neben Zucker wird für die Herstellung von Schokolade vor allem Kakaomasse und Kakaobutter verwendet. Bei der Kakaomasse handelt es sich um vermahlene Kakaokernbruch, welcher aus fermentierten Kakaobohnen nach Reinigung, Rösten und Brechen gewonnen wird. Zur Gewinnung der Kakaobutter wird alka-

lich aufgeschlossener Kakaokernbruch zerkleinert und danach bei etwa 90–100 °C abgepresst [334; 335]. Für die Herstellung von Schokolade werden die Zutaten homogenisiert und zur Zerkleinerung der Kakaopartikel auf < 30–40 µm gewalzt, danach erfolgt eine etwa 24-stündige Reifung bei 45–50 °C. Zur Herstellung feiner Schokoladen schließt sich ein Conchierungsprozess an. Hierbei werden durch Wärmebehandlung und mechanische Verfahren flüchtige Inhaltsstoffe (vorwiegend Alkohole, Aldehyde) teilweise entfernt und das Fett um alle Partikel gleichmäßig verteilt [334]. Der Fettgehalt beträgt in schwach entöltem Kakaopulver durchschnittlich 24,5 %, in Bitterschokolade 30,0 % und in Milkschokolade 31,5 % [119]. Zartbitterschokolade besteht aus etwa 45 % Kakaomasse, 5 % Kakaobutter und 50 % Zucker, Bitterschokolade aus etwa 60 % Kakaomasse und 40 % Zucker. Milkschokolade enthält etwa 30 % Kakaomasse, 35 % Zucker, 15 % Kakaobutter und 20 % Magermilchpulver [119].

Als Standard für die Dotierung von Lebensmitteln wurden Erdnussbutter des NIST (SRM 2387) und geröstete Haselnuss von Masterfoods verwendet. SRM 2387 ist eine cremige Erdnussbutter und besteht aus > 90 % Erdnüssen, daneben Zucker, Pflanzenölen und Kochsalz und hat einen Proteingehalt von 22,2 % [336]. Für die Dotierung erwies sich eine Verdünnung von Erdnuss bzw. Haselnuss in Carboxymethylcelluloselösung (CMC) mit Zusatz von BSA und NaN<sub>3</sub> als geeignet, weil diese Mischung bei Raumtemperatur > 5 Wochen stabil ist [296]. Da die Erdnussbutter zu einem großen Teil aus Fett besteht, wurde versucht, eine Dotierlösung durch Verdünnung in Pflanzenöl herzustellen. Dazu wurde das niedrig viskose Färberdistelöl ausgewählt und 100 mg Erdnussbutter mit 10 mL Öl versetzt. Es zeigte sich allerdings, dass die Lösung nicht homogen und dadurch präzise Dotierung nicht möglich war. Vermutlich waren die enthaltenen Erdnusspartikel zu groß. Als optimal für die Herstellung der CMC-Dotierlösung erwies sich schließlich ein Saccharoseverschnitt. Erdnussbutter bzw. ganze Haselnüsse wurden dafür zur Minimierung der Partikelgröße mit der neunfachen Menge Saccharose unter Verwendung der Labormühle homogenisiert.

Zur Untersuchung der Matrixeffekte wurden kommerziell erhältliche Vanille-Eiscreme und Zartbitterschokolade mit 1 mg/kg Erdnuss dotiert und die dotierten Proben bzw. Blanks jeweils mit Ridascreen-, Magermilch- oder Fischgelatine-Extraktionspuffer extrahiert (5 g Probe in 50 mL Extraktionspuffer). Die Extrakte wurden in Sandwich-Immunoassays unter Verwendung verschiedener Antikörperkombinationen vermessen und Quotienten aus den erhaltenen Absorptionen von dotierter und undotierter Probe berechnet (Signal/Blank-Quotienten). Zunächst erfolgte die Untersuchung von Kombinationen aus monoklonalen Fängerantikörpern und polyklonalen Detektionsantikörpern. Die bei den Zartbitterschokoladen beobachteten hohen Blankabsorptionen und niedrigen Signal/Blank-Quotienten konnten auf Kontamination der Schokolade mit Erdnuss zurückgeführt werden. Bei der Messung der dotierten Vanille-Eiscreme wurden gute Empfindlichkeiten mit Signal/Blank-Quotienten von teils > 12 beobachtet (Abb. 3.40). Die Signal/Blank-Quotienten sind jedoch erwartungsgemäß in hohem Maße von der gewählten Antikörperkombination, aber auch vom verwendeten Extraktions-

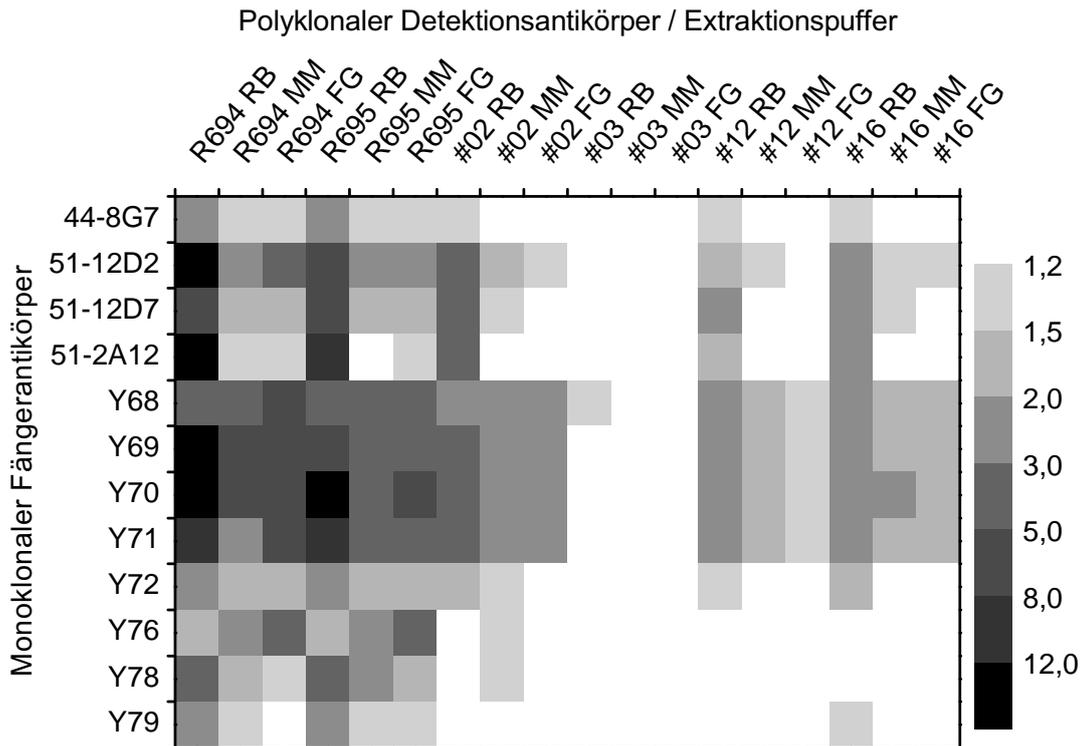


Abb. 3.40: Erdnuss in Eiscreme, Signal/Blank-Quotienten bei Messung von mit Erdnuss dotierter Eiscreme bei Verwendung verschiedener Extraktionspuffer und Antikörperkombinationen (RB, Ridascreen-Extraktionspuffer; MM, Magermilch-Extraktionspuffer; FG, Fischgelatine-Extraktionspuffer; Dotierung 1 mg/kg Erdnuss; Detektionsantikörper R694 und R695 von Kaninchen, #02 bis #16 von Huhn).

puffer abhängig. In nahezu allen Fällen war die Wiederfindung bei Extraktion mit Ridascreen-Extraktionspuffer am höchsten. Die Proteine bzw. Additive im Magermilch- bzw. Fischgelatine-Extraktionspuffer konnten offensichtlich die Matrixeffekte nicht komplett unterdrücken.

Die selbst hergestellten Zartbitterschokoladen wurden ebenfalls mit 1 mg/kg Erdnuss dotiert und mit Ridascreen-, Fischgelatine- und Magermilch-Extraktionspuffer extrahiert. Da laut Herstellerangaben bei Extraktion von dunklen Schokoladen Zugabe von Milchpulver zum Ridascreen-Extraktionspuffer notwendig ist, wurden diesem 10% Magermilchpulver zugesetzt. Bei Vergleich der erhaltenen Signal/Blank-Quotienten wurden erneut die besten Wiederfindungen bei Verwendung des Ridascreen-Extraktionspuffers beobachtet (Abb. 3.41). Die Wiederfindungen, insbesondere bei Extraktion mit Magermilch- bzw. Fischgelatine-Extraktionspuffer in Zartbitterschokolade waren signifikant niedriger als in Eiscreme. Dieser Befund steht in Einklang mit Ergebnissen aus der Literatur, die häufig schlechte Wiederfindungen in Schokoladen, besonders in Schokoladen mit hohem Kakaoanteil, dokumentieren [8].

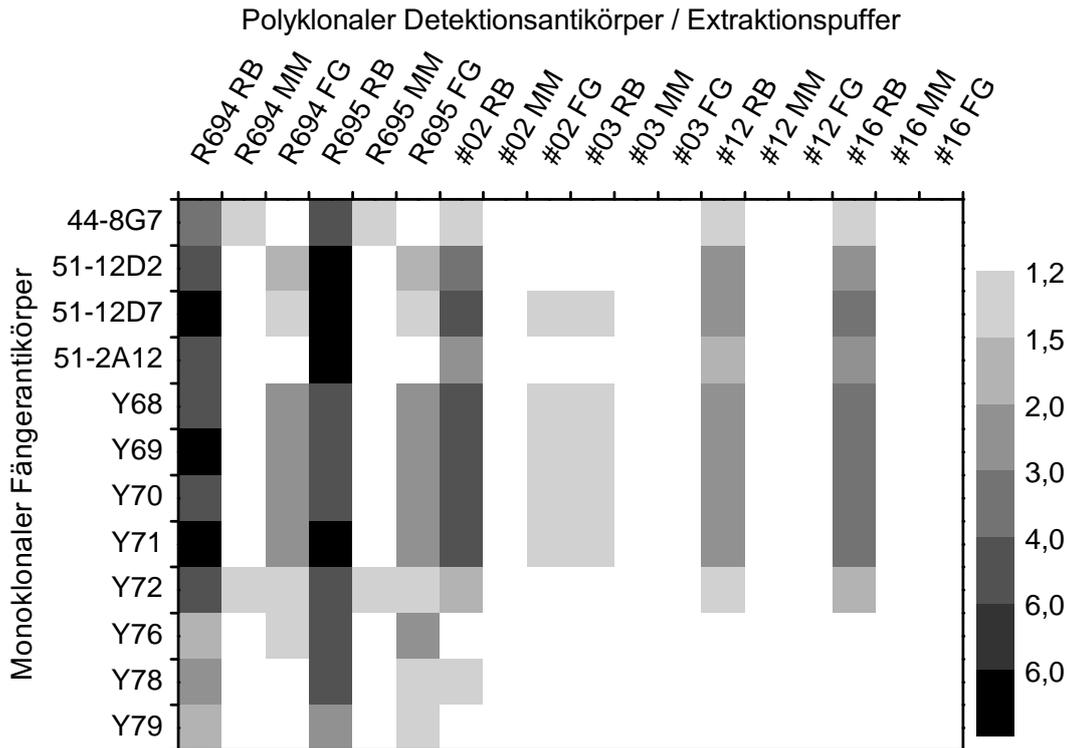


Abb. 3.41: Erdnuss in Zartbitterschokolade, ermittelte Signal/Blank-Quotienten bei Messung von mit Erdnuss dotierter Zartbitterschokolade bei Verwendung verschiedener Extraktionspuffer und Antikörperkombinationen (RB, Ridascreen-Extraktionspuffer; MM, Magermilch-Extraktionspuffer; FG, Fischgelatine-Extraktionspuffer; Dotierung 1 mg/kg Erdnuss; Detektionsantikörper R694 und R695 von Kaninchen, #02 bis #16 von Huhn).

Die Abhängigkeit der Wiederfindung vom verwendeten Extraktionspuffer wurde auch bei Kombinationen von polyklonalen Fängerantikörpern und monoklonalen Detektionsantikörpern untersucht. Die dabei erhaltenen Muster ähneln im wesentlichen den in Abb. 3.40 und 3.41 dargestellten. Die Signal/Blank-Quotienten bzw. die Empfindlichkeiten sind indes deutlich geringer, wie bereits in Kap. 3.6.3 diskutiert. Bei Verwendung von Ridascreen-Extraktionspuffer lagen die maximalen Signal/Blank-Quotienten bei  $\approx 5$ , bei den Magermilch- und Fischgelatine-Extrakten wurden maximale Signal/Blank-Quotienten von  $\approx 2,5$  ermittelt.

Wiederfindungen wurden auch bei mit Haselnuss dotierten Lebensmitteln studiert. Bei Verwendung von monoklonalen Fängerantikörpern und polyklonalen Detektionsantikörpern wurden bei der Analyse von dotierter Vanille-Eiscreme (1 mg/kg Haselnuss) die in Abb. 3.42 gezeigten Signal/Blank-Quotienten ermittelt. Wie bei den mit Erdnuss dotierten Proben wurden auch hier höhere Signal/Blank-Quotienten bei Verwendung von Kaninchen-Antikörpern als bei Verwendung von

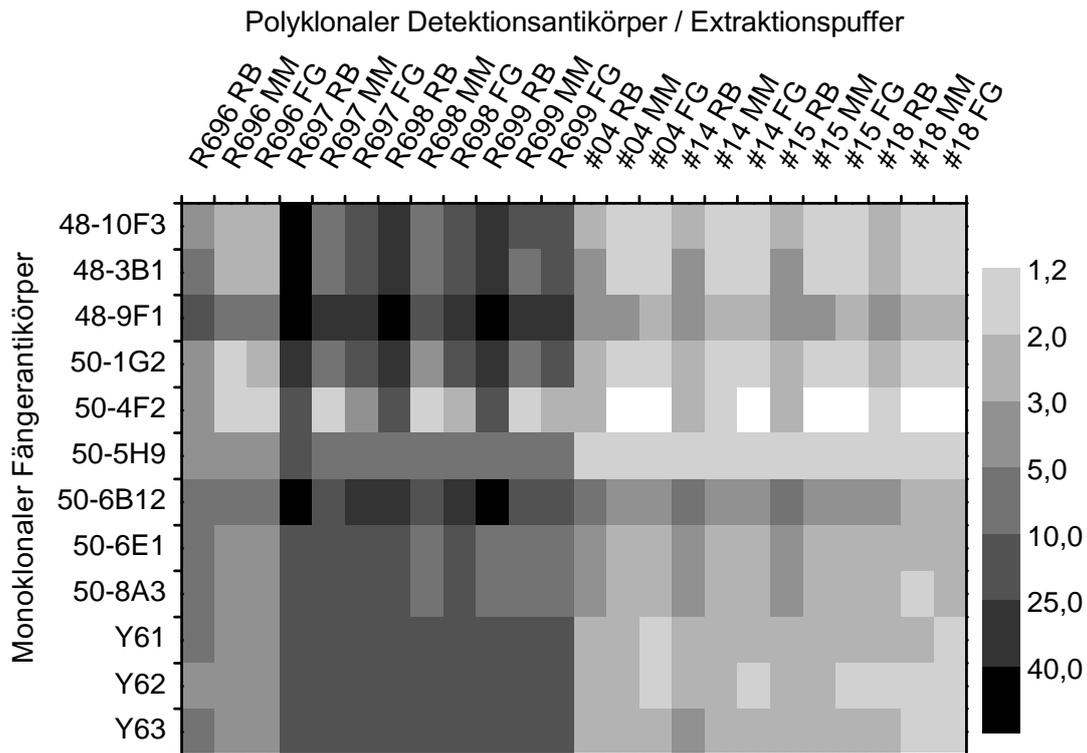


Abb. 3.42: Haselnuss in Eiscreme, Signal/Blank-Quotienten bei Messung von mit Haselnuss dotierter Eiscreme bei Verwendung verschiedener Extraktionspuffer und Antikörperkombinationen (RB, Ridascreen-Extraktionspuffer; MM, Magermilch-Extraktionspuffer; FG, Fischgelatine-Extraktionspuffer; Dotierung 1 mg/kg Haselnuss; Detektionsantikörper R696 bis R699 von Kaninchen, #04 bis #18 von Huhn).

Huhn-Antikörpern beobachtet. Die Kombinationen mit den höchsten Sensitivitäten enthielten die monoklonalen Antikörper 48-9F1 und 50-6B12. Sowohl bei dotierter Eiscreme als auch bei dotierter Zartbitterschokolade (Abb. 3.43) wurden bei Extraktion mit Ridascreen-Extraktionspuffer die höchsten Signal/Blank-Quotienten ermittelt.

Auch bei Verwendung von polyklonalen Fängerantikörpern und monoklonalen Detektionsantikörpern wurden die höchsten Wiederfindungen von Haselnuss bei Extraktion der dotierten Probe mit Ridascreen-Extraktionspuffer erhalten (Ergebnisse nicht gezeigt). Es zeigte sich auch hier, dass die Auswahl der Antikörperkombination und die Festlegung von Fänger- und Detektionsantikörper keinen signifikanten Einfluss auf die vom Extraktionspuffer verursachte Diskriminierung haben.

Zusammengefasst lässt sich also festhalten, dass bei der Extraktion von Erdnuss- bzw. Haselnussprotein aus komplexen Matrices, wie Eiscreme oder Schokoladen, der Extraktionspuffer einen wesentlichen Einfluss auf die Wiederfindung hat. Da-

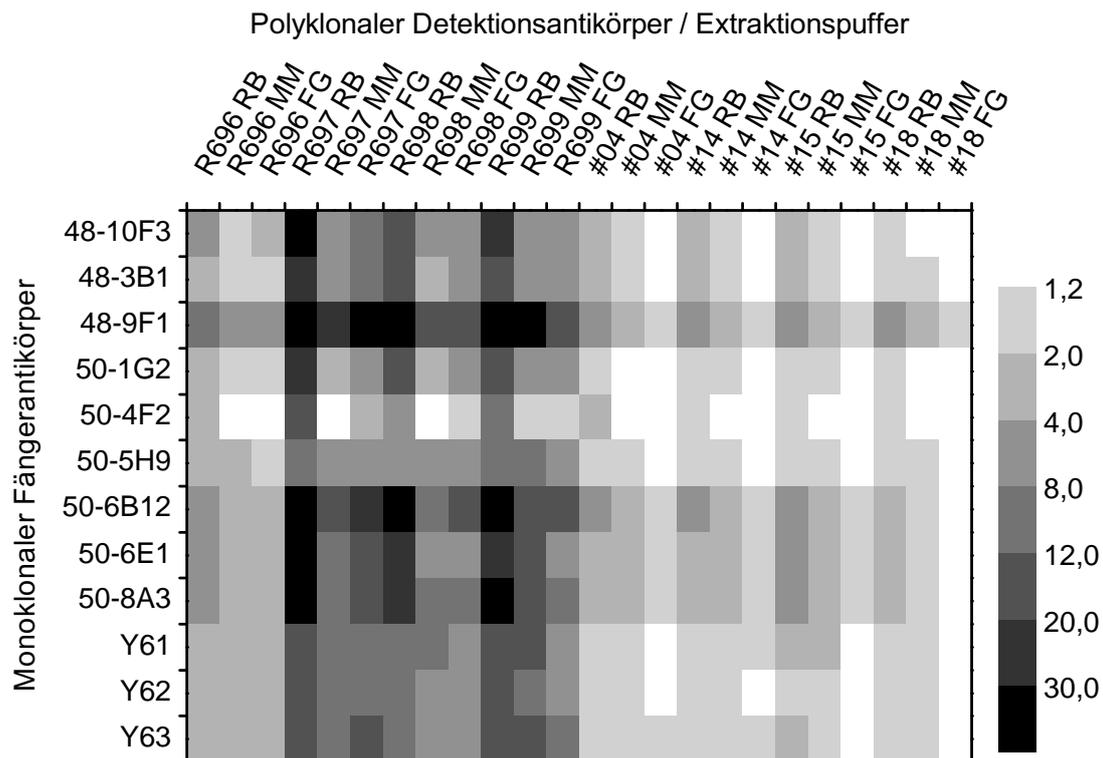


Abb. 3.43: Haselnuss in Zartbitterschokolade, Abhängigkeit der Signal/Blank-Quotienten bei mit Haselnuss dotierter Zartbitterschokolade von Extraktionspuffer und Antikörperkombination im Sandwich-Immunoassay (RB, Ridascreen-Extraktionspuffer; MM, Magermilch-Extraktionspuffer; FG, Fischgelatine-Extraktionspuffer; Dotierung 1 mg/kg Haselnuss; Detektionsantikörper R696 bis R699 von Kaninchen, #04 bis #18 von Huhn).

gegen wurde festgestellt, dass die gewählte Antikörperkombination und dessen Orientierung (Festlegung des Fänger- bzw. Detektionsantikörpers) die Wiederfindung nicht signifikant beeinflusst.

Um matrixunabhängige Extraktionsausbeuten von Fischgelatine-, Magermilch- und Ridascreen-Extraktionspuffer zu ermitteln, wurden rohe und geröstete Erdnüsse bzw. Haselnüsse mit den Puffern extrahiert und die Kreuzreaktivität der Extrakte mittels indirekt-kompetitiven Immunoassays unter Verwendung verschiedener Antikörper bestimmt. Die Kreuzreaktivitäten der Erdnussextrakte sind in Abb. 3.44, die der Haselnussextrakte in Abb. 3.45 dargestellt. Die Kreuzreaktivitäten sind dabei jeweils bezogen auf den Extrakt von roher Erdnuss bzw. Haselnuss mit Fischgelatine-Extraktionspuffer (100 %).

Bei den Testmittelpunkten wurde zwischen den mit Fischgelatine- und Magermilch-Extraktionspuffer hergestellten Extrakten keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Überraschenderweise lagen die Testmittelpunkte bei Verwendung von

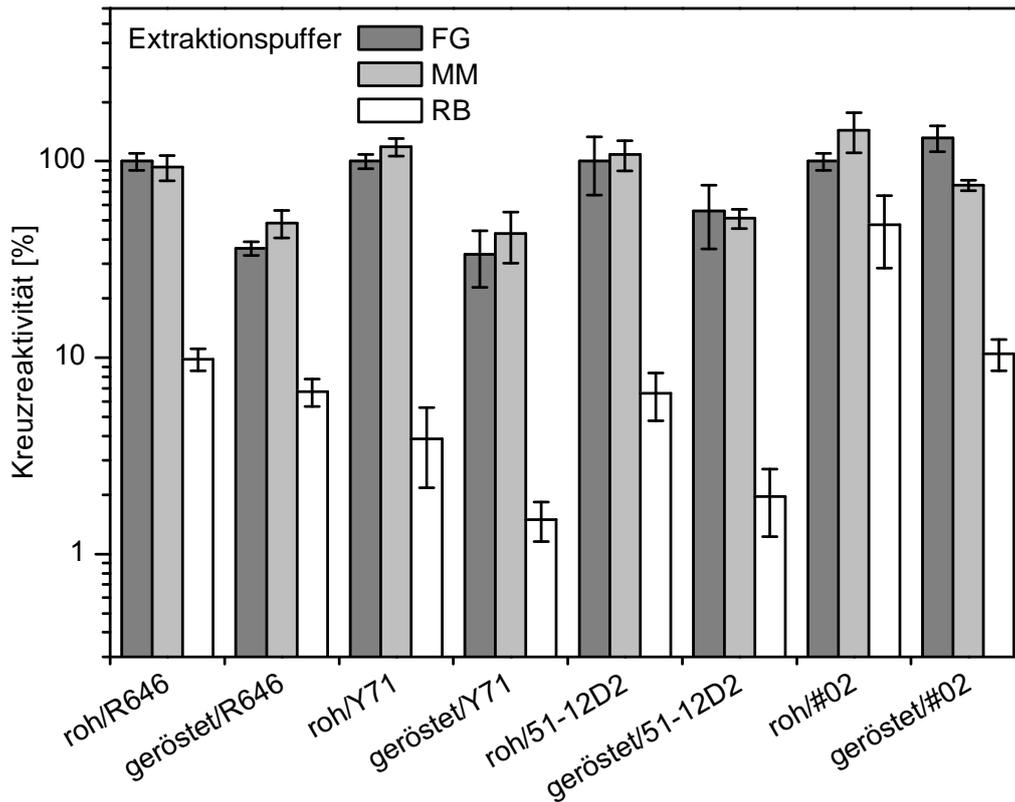


Abb. 3.44: Erdnuss, Kreuzreaktivitäten von mit verschiedenen Extraktionspuffern erhaltenen Extrakten von roher/gerösteter Erdnuss, bezogen auf Fischgelatine-Extrakt von roher Erdnuss (100%), gemessen in indirekt-kompetitiven Immunoassays (FG: Fischgelatine-Extraktionspuffer; MM: Magermilch-Extraktionspuffer; RB: Ridascreen-Extraktionspuffer; Antikörper R646 von Kaninchen, Y71 und 51-12D2 monoklonal von Maus, #02 von Huhn).

Ridascreen-Extraktionspuffer stets höher, im Falle von Erdnuss um einen Faktor von  $\approx 10$ , im Falle von Haselnuss um einen Faktor von  $\approx 2$ . Offensichtlich ist die Extraktionsausbeute entsprechender Proteine bei Verwendung von Ridascreen-Extraktionspuffer niedriger, oder der Puffer enthält Additive, durch welche z. B. Epitop-Paratop-Wechselwirkungen beeinflusst werden bzw. welche möglicherweise proteolytische Eigenschaften haben. In weiteren Versuchen wurden Extraktionspuffer mit enzymatischen Zusätzen untersucht. Es zeigte sich, dass durch Zugabe von jeweils 2,5 g/L Amylase und Pullulanase zu Tris-Extraktionspuffer die Extraktionsausbeute von gerösteter Erdnuss auf etwa das Doppelte erhöht werden kann.

Die Wiederfindung von Erdnuss- bzw. Haselnussprotein in schokoladehaltigen Lebensmitteln wird durch in Kakao vorkommende Polyphenole beeinträchtigt. Mittels proteinhaltigen Zusätzen wie Magermilchpulver bei der Extraktion von

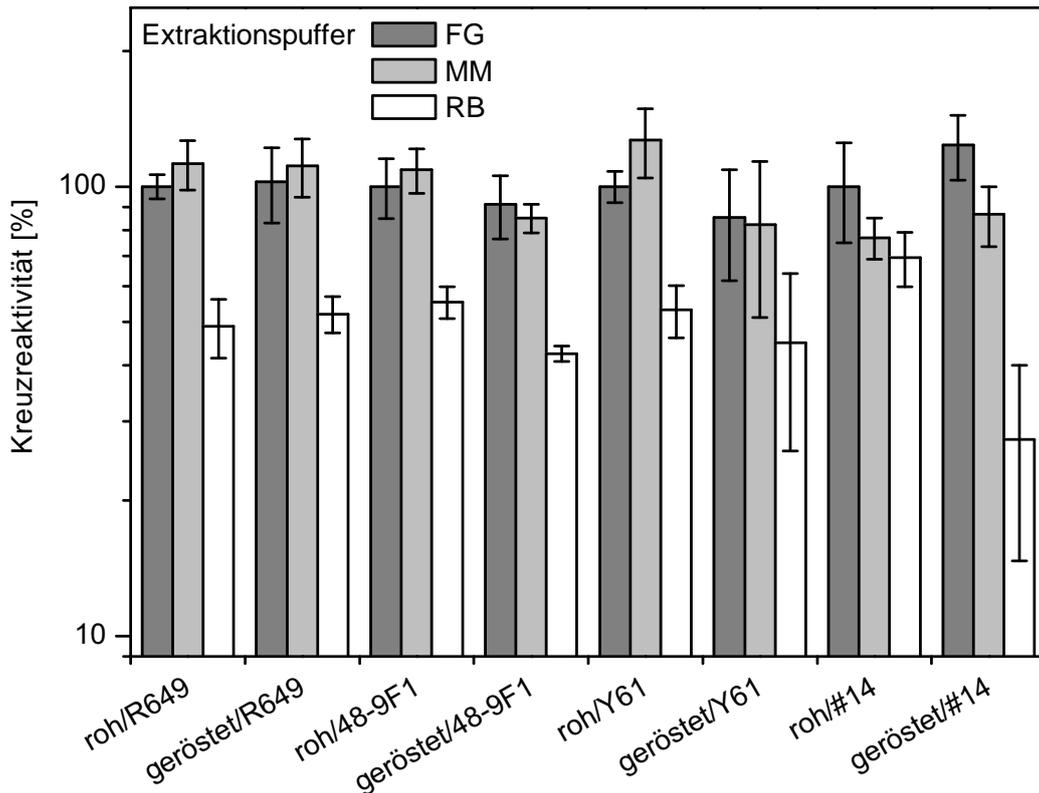


Abb. 3.45: Haselnuss, Kreuzreaktivitäten von mit verschiedenen Extraktionspuffern erhaltenen Extrakten von roher/gerösteter Haselnuss, bezogen auf Fischgelatine-Extrakt von roher Haselnuss (100 %), gemessen in indirekt-kompetitiven Immunoassays (FG: Fischgelatine-Extraktionspuffer; MM: Magermilch-Extraktionspuffer; RB: Ridascreen-Extraktionspuffer; Antikörper R649 von Kaninchen, 48-9F1 und Y61 monoklonal von Maus, #14 von Huhn).

kakaohaltigen Proben können die Analyten von den Polyphenolen demaskiert werden. Da bei zu großen Mengen an zugegebenem Protein im Extraktionspuffer aufgrund von Blocking-Effekten die Wiederfindungen verringert werden können, musste eine Optimierung der Menge an zuzugebendem Magermilchpulver erfolgen. Dazu wurden Milch- und Zartbitterschokoladen mit 10 mg/kg Erdnuss bzw. Haselnuss dotiert und nach Zugabe von verschiedenen Mengen Magermilchpulver mit Ridascreen-Extraktionspuffer extrahiert. Die ermittelten relativen Wiederfindungen sind in 3.46 zusammengestellt. Eine Zugabe von 1 g Magermilchpulver zu 1 g Schokolade vor der Extraktion mit 20 mL Ridascreen-Extraktionspuffer erwies sich als optimal. Besonders bei Zartbitterschokoladen zeigte sich, dass ohne ausreichende Zugabe von Magermilchpulver die Wiederfindung signifikant reduziert ist. Bei Milkschokoladen, welche bereits Milchpulver enthalten, war die Verringerung

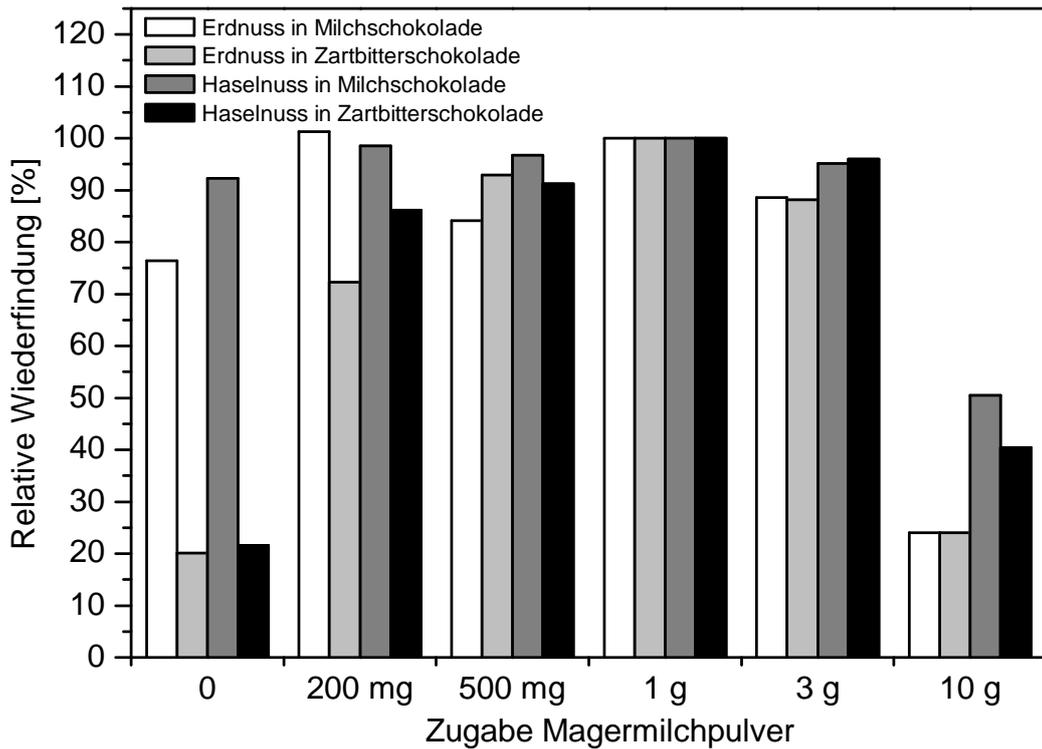


Abb. 3.46: Relative Wiederfindungen bei Zugabe von Magermilchpulver zu 1 g Zartbitter- bzw. Milchsokolade (Dotierung 10 mg/kg Erdnuss oder Haselnuss, Extraktion mit 20 mL Ridascreen-Extraktionspuffer).

der Wiederfindungen bei geringen Mengen an zugegebenem Magermilchpulver erwartungsgemäß schwächer ausgeprägt.

## 3.8.2 Kreuzreaktivitäten

### 3.8.2.1 Erdnuss-Immunoassay

In Tab. 3.8 sind Kreuzreaktivitäten einiger Antikörperkombinationen in Sandwich-Immunoassays exemplarisch zusammengefasst. Im Unterschied zu den Kreuzreaktivitäten bei indirekt-kompetitiven Immunoassays wird hier nicht der Quotient aus den Testmittelpunkten (vgl. Gl. 2.5, S. 36) betrachtet. Vielmehr wird das vom Kreuzreaktanden generierte Signal registriert und auf eine fiktive Erdnusskonzentration zurückgerechnet. Beispielsweise sei das Extraktionsverhältnis 1 g Probe in 10 mL (100 g/L) und ein Kreuzreaktandenextrakt (100 g/L) generiert ein Signal entsprechend 1 mg/L Erdnuss. Es ergäbe sich dann eine Kreuzreaktivität von  $(1 \text{ mg/L}) / (100 \text{ g/L}) = 10^{-5} = 10 \text{ ppm}$ .

Die Standards und Kreuzreaktanden wurden in Fischgelatine-Extraktionspuffer verdünnt bzw. extrahiert. Die Inkubationsdauer der Proben betrug eine Stunde. Bei allen untersuchten Kombinationen von Erdnuss-Antikörpern wurden die

Tab. 3.8: Erdnuss, Kreuzreaktivitäten [ppm =  $10^{-4}$  %] verschiedener Kombinationen von Erdnuss-Antikörpern in Sandwich-Immunoassays (Y68 bis Y76: monoklonale Antikörper (Maus); R694 und R695: polyklonale Antikörper (Kaninchen); #02: polyklonaler Antikörper (Huhn)).

Fänger-antikörper	Detektions-antikörper	Soja	Macadamia	Paranuss	Mandel
Y68	R694	0,5	46	29	2,5
Y70	R694	0,5	14	19	4,4
Y71	#02	< 0,1	8,4	6,9	2,0
Y76	R695	8,1	19	8,0	2,8
R694	Y68	0,1	5,4	3,5	0,4
R694	Y70	0,1	4,5	3,0	0,4
#02	Y71	0,1	3,9	2,7	0,3
R695	Y76	0,1	9,3	2,3	1,1

höchsten Kreuzreaktivitäten bei Macadamia und Paranuss beobachtet. Die Kreuzreaktivitäten lagen bei Macadamia zwischen 3,9–46 ppm, bei Paranuss zwischen 2,3–29 ppm ( $= 10^{-4}$  %). Allgemein wurden bei Verwendung von monoklonalen Fängerantikörpern höhere Kreuzreaktivitäten mit Detektionsantikörpern von Kaninchen als mit Detektionsantikörpern von Huhn festgestellt. Allerdings waren die Nachweisgrenzen bei Assays mit Antikörpern von Huhn höher als mit Antikörpern von Kaninchen. Auch wurden niedrigere Kreuzreaktivitäten, jedoch geringere Sensitivitäten bei Kombinationen aus polyklonalen Fängerantikörpern und monoklonalen Detektionsantikörpern beobachtet als bei Kombinationen aus monoklonalen Fängerantikörpern und polyklonalen Detektionsantikörpern.

Da die gemessenen Kreuzreaktivitäten sich durch Austausch eines Antikörpers nicht signifikant änderten, handelt es sich hier offensichtlich um keine echte Kreuzreaktivität, sondern um unspezifische Bindung, die eventuell durch Optimierung der Assaybedingungen eliminierbar ist. Im Sandwich-Immunoassay wird ein Summenparameter aus echten Kreuzreaktivitäten und unspezifischen Bindungen gemessen. Im folgenden werden unter dem Begriff „Kreuzreaktivität“ vereinfachend beide Effekte bezeichnet. Um hohe Selektivitäten zu erreichen, müssen sowohl echte Kreuzreaktivitäten als auch die unspezifische Bindung minimiert werden. Oftmals sind bei Sandwich-Immunoassays zu hohe Antikörperkonzentrationen Ursache für unspezifische Bindung (hohe Hintergrundabsorptionen). Deshalb wurden Kreuzreaktivitäten in Abhängigkeit von Antikörperkonzentrationen gemessen. Die Ergebnisse bei Untersuchung von Verdünnungsreihen von Detektionsantikörpern sind in Tab. 3.9 zusammengefasst. Es zeigte sich, dass die Kreuzreaktivitäten nur bei wenigen Kreuzreaktanden wie Soja durch Verringerung der Konzentration des Detektionsantikörpers zu reduzieren waren. Bei Macadamia, Paranuss und Mandel dagegen wurde kein Einfluss der Konzentration des Detektionsantikörpers auf die Kreuzreaktivität beobachtet.

Tab. 3.9: Erdnuss, Einfluss der Konzentration der Detektionsantikörper auf die Kreuzreaktivitäten [ppm =  $10^{-4}$  %] in Sandwich-Immunoassays (monoklonale Fängerantikörper; polyklonaler Antikörper R694 aus Kaninchen, #02 aus Huhn).

Fänger- antikörper	Detektionsantikörper		Soja	Macadamia	Paranuss	Mandel
	Serum	Verdünnung				
Y68	R694	1 : 10.000	0,3	2,8	0,5	0,3
		1 : 100.000	0,2	2,5	0,5	0,4
		1 : 1.000.000	0,1	2,4	0,5	0,4
		1 : 10.000.000	< 0,1	2,7	0,6	0,5
Y69	#02	1 : 1.000	< 0,1	7,2	0,6	3,8
		1 : 3.000	< 0,1	5,9	0,5	3,1
		1 : 10.000	< 0,1	5,7	0,6	2,7
		1 : 30.000	< 0,1	5,7	0,6	2,4
Y70	R694	1 : 1.000	0,4	2,6	0,5	2,9
		1 : 10.000	0,1	5,1	0,5	2,8
		1 : 100.000	< 0,1	5,0	0,6	2,5
		1 : 1.000.000	< 0,1	5,8	0,7	2,3

Es wurde des weiteren versucht, die Kreuzreaktivitäten durch Verdünnung der polyklonalen Detektionsantikörper in Kreuzreaktand enthaltende Puffer zu verringern. Klone, die Kreuzreaktivität aufweisen, werden dadurch inaktiviert und die entsprechende Kreuzreaktivität wird vermindert. Bei Verdünnung des Antikörpers R694 (polyklonal aus Kaninchen) in z. B. Macadamiaextrakt (100 g/L) war in der Tat keine Kreuzreaktivität gegenüber Macadamia mehr messbar. Allerdings war gleichzeitig die Empfindlichkeit des Sandwich-Immunoassays signifikant verringert. Die Blankabsorptionen stiegen von  $\approx 30$  mAU auf  $\approx 200$  mAU und die maximalen Absorptionen sanken von  $\approx 1$  AU auf  $\approx 0,35$  AU. Bei Verdünnung des Detektionsantikörpers in geringer konzentriertem Macadamiaextrakt (10 g/L) wurde zwar wieder eine höhere Empfindlichkeit des Sandwich-Immunoassays beobachtet. Die entsprechenden Kreuzreaktivitäten stiegen dagegen nahezu auf den ohne Zugabe von Kreuzreaktanden gemessenen Wert.

Es wurden Kreuzreaktivitäten von weiteren 24 heterologen Kombinationen von Erdnuss-Antikörpern gegenüber Soja, Macadamia, Paranuss, Mandel, Walnuss, Kokosnuss, Pistazie und Kichererbse gemessen. Die weitgehende Unabhängigkeit der Kreuzreaktivitäten von der verwendeten Antikörperkombination wurde dabei bestätigt. Auch durch Verdünnung der Kreuzreaktandenextrakte oder durch Einführung eines zusätzlichen Blockingschrittes nach Immobilisierung der Antikörper konnten die Kreuzreaktivitäten (Soja, Walnuss, Paranuss, Mandel) hier nicht verringert werden.

Eine mögliche Signalgenerierung durch in Pflanzenmaterialien enthaltene Peroxidase kam ebenfalls als Ursache unspezifischer Kreuzreaktivitäten in Betracht.

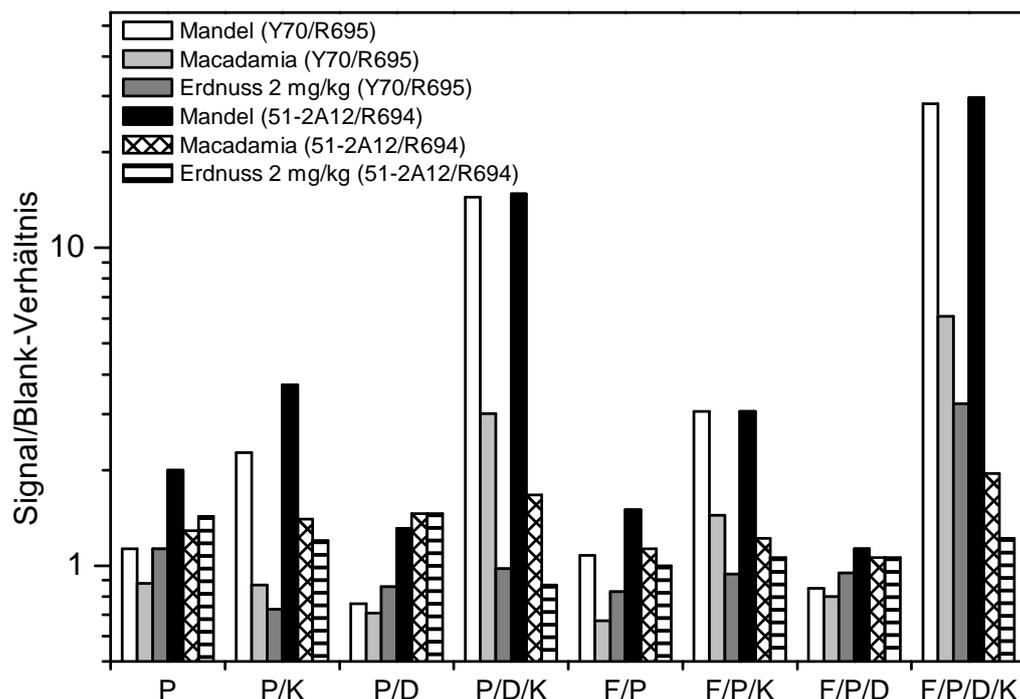


Abb. 3.47: Erdnuss-Antikörper, Signal/Blank-Quotienten von Macadamiaextrakt, Mandelextrakt bzw. Standard (2 mg/kg Erdnuss) und Extraktionspuffer (Blank) in verschiedenen Assayformaten (Inkubation in angegebener Reihenfolge; F: monoklonaler Fängerantikörper, P: Probe, D: polyklonaler Detektionsantikörper von Kaninchen, K: Peroxidase-Konjugat von anti-Kaninchen-Antikörper).

Extrakte von 16 Kreuzreaktanden in Fischgelatine-Extraktionspuffer wurden daher in Kavitäten einer Mikrotiterplatte pipettiert und die Platte zur Beschichtung von Proteinen inkubiert. Nach Waschen der Platte, Substratzugabe und 30-minütiger Farbentwicklung wurden maximale Absorptionen von  $\approx 70$  mAU bei Kürbiskernextrakt erhalten, bei allen anderen Extrakten lagen die Absorptionen zwischen 7–20 mAU und waren damit wesentlich niedriger als die in Sandwich-Immunoassays erhaltenen Signalintensitäten der Kreuzreaktanden. Die in den Nüssen und Saaten enthaltene Peroxidase ist also nicht für hohe Absorptionen in Sandwich-Immunoassays verantwortlich.

Durch Eliminierung einzelner Schritte im Sandwich-Immunoassay wurden die Kreuzreaktivitäten weiter untersucht. Dadurch ergaben sich verschiedene Assayformate. Exemplarisch wurden die Antikörperkombinationen Y70/R695 und 51-2A12/R694 mit Extrakten von Mandel, Macadamia, Standard (2 mg/kg Erdnuss) bzw. Extraktionspuffer als Blank untersucht. Als Fängerantikörper fungierte also jeweils ein monoklonaler Antikörper und die Detektion erfolgte mit einem

polyklonalen Antikörper aus Kaninchen. Mit derartigen Kombinationen wurden in den Screeningexperimenten die höchsten Sensitivitäten erhalten. Zur Auswertung erwies sich der Quotient aus den Absorptionen von Standard (2 mg/kg Erdnuss) bzw. Kreuzreaktand und Blank (Fischgelatine-Extraktionspuffer) als geeignet (Abb. 3.47). Bei Inkubation von lediglich Probe (P) bzw. Fängerantikörper und Probe (F/P) waren die Signal/Blank-Quotienten der Kreuzreaktanden nicht signifikant höher als die des Standards. Dieser Befund stützt die Vermutung, dass die Kreuzreaktivitäten offenbar nicht von pflanzeigenen Peroxidasen verursacht werden. Auch bei darauf folgender Inkubation von Erdnuss-Antikörper (P/D, F/P/D) waren die Signal/Blank-Quotienten der Kreuzreaktanden nicht signifikant höher als die des Standards. Bei den mit Peroxidase-Konjugat von anti-Kaninchen-Antikörper inkubierten Kavitäten (P/K, F/P/K) waren hingegen höhere Signal/Blank-Quotienten bei den Kreuzreaktanden Mandel und Macadamia zu beobachten. Der Signal/Blank-Quotient wurde zusätzlich bei Inkubation von polyklonalem Detektionsantikörper (P/D/K, F/P/D/K) weiter erhöht (Faktor  $\approx 10$ ). Die Befunde unterstreichen die Vermutung, dass sich die gemessenen Kreuzreaktivitäten aus echten Kreuzreaktivitäten und aus unspezifischer Bindung zusammensetzen.

Die Abhängigkeit der Kreuzreaktivitäten der Sandwich-Immunoassays vom Extraktionspuffer wurde ebenfalls untersucht. Erdnuss, Macadamia und Mandel wurden mit Ridascreen-, Magermilch- oder Fischgelatine-Extraktionspuffer extrahiert und die Kreuzreaktivitäten von Macadamia und Mandel unter Verwendung verschiedener Antikörperkombinationen gemessen (Tab. 3.10). Es zeigten sich signifikante Unterschiede, die geringsten Kreuzreaktivitäten wurden bei den mit Ridascreen-Extraktionspuffer hergestellten Extrakten beobachtet und lagen in allen untersuchten Fällen bei  $< 0,5 \text{ ppm} = 5 \cdot 10^{-5} \%$ .

Eine Implementierung zusätzlicher Blockingschritte (mit 1 % bzw. 10 % Magermilchpulver) in PBS im Sandwich-Immunoassay bei verschiedenen Verdünnungen der Detektionsantikörper bzw. der markierten anti-Kaninchen-Antikörper in Magermilch erwies sich als nicht als geeignet zur Verringerung der Kreuzreaktivitäten. Eine Erhöhung des pH-Wertes des Fischgelatine-Extraktionspuffers auf pH 8,5, entsprechend dem pH-Wert von Ridascreen-Extraktionspuffer, führte ebenso nicht zu verringerten Kreuzreaktivitäten. Die bei Verwendung von Ridascreen-Extraktionspuffer beobachteten niedrigen Kreuzreaktivitäten beruhen offensichtlich auf Art bzw. Konzentration der enthaltenen Puffersubstanzen oder auf nicht bekannten Zusätzen.

Bei Substitution der Detektion von sequentieller Inkubation mit Erdnuss-Antikörper und markiertem anti-Kaninchen-Antikörper durch Inkubation mit Peroxidase-markiertem Erdnuss-Antikörper verringerten sich die Kreuzreaktivitäten ebenso nicht signifikant. Auch erwies sich die Eliminierung der Vorbeschichtung mit anti-Maus-Antikörper, entsprechend einer direkten Beschichtung der monoklonalen Erdnuss-Antikörper auf den Mikrotiterplatten, als ungeeignet zur Verringerung der Kreuzreaktivitäten.

Bei Extraktion der Kreuzreaktanden mit kommerziell erhältlichem „Low-Cross-

Tab. 3.10: Erdnuss, Abhängigkeit der Kreuzreaktivitäten [ppm =  $10^{-4}$  %] vom Extraktionspuffer im Sandwich-Immunoassay (FG: Fischgelatine-Extraktionspuffer, MM: Magermilch-Extraktionspuffer, RB: Ridascreen-Extraktionspuffer; jeweils monoklonaler Fängerantikörper und polyklonaler Detektionsantikörper von Kaninchen).

Antikörperkombination	Extraktionspuffer	Mandel	Macadamia
Y70/R695	FG	0,3	13,5
	MM	4,8	10,2
	RB	0,2	0,3
51-12D2/R694	FG	0,3	12,6
	MM	3,0	6,7
	RB	0,2	0,3

Buffer“ wurden sogar erhöhte Kreuzreaktivitäten gemessen. Die Entfettung von Macadamia mit Aceton vor der Extraktion führte gleichsam nicht zu einer Verringerung der Kreuzreaktivität. Eine mögliche Bindung der Peroxidase von auf der Mikrotiterplatte gebundenen pflanzlichen Lectinen scheint ebenso nicht die Ursache für die beobachteten Kreuzreaktivitäten zu sein. Durch Zugabe von Zuckern wie Saccharose (5 % zur Lösung des Detektionsantikörpers) wurde jedenfalls keine Verringerung der Kreuzreaktivitäten beobachtet.

Enzymatische Zusätze von je 2,5 g/L Pullulanase, Amylase, Cellulase oder Pectinase zum Fischgelatine-Extraktionspuffer erwiesen sich nicht als geeignet zur Verringerung der Kreuzreaktivitäten von Macadamia. Allerdings wurde eine Verringerung der Kreuzreaktivität von Macadamia von 11 auf 0,8 ppm mit der Antikörperkombination Y71/R694 und von 15 auf 1,2 ppm mit der Antikörperkombination Y70/R695 beobachtet, wenn der Extraktionspuffer 2,5 g/L Lipase enthielt (jeweils monoklonaler Fängerantikörper, polyklonaler Detektionsantikörper aus Kaninchen). Möglicherweise werden unspezifische Bindungen teilweise durch lipidhaltige Aggregate verursacht, welche durch Zusatz von Lipase abgebaut werden und daher in geringerer Menge auf der Mikrotiterplatte adsorbiert werden. Offensichtlich ist also mittels enzymatischer Zusätze Potential zur Optimierung der Extraktionspuffer gegeben. Denkbar ist sogar eine Verringerung der Kreuzreaktivitäten durch proteolytische Additive, unter Berücksichtigung der Stabilität der Targetepitope.

### 3.8.2.2 Haselnuss-Immunoassay

Einige mit verschiedenen Kombinationen von Haselnuss-Antikörpern in Sandwich-Immunoassays gemessene Kreuzreaktivitäten sind in Tab. 3.11 exemplarisch zusammengestellt (jeweils monoklonaler Fängerantikörper und polyklonaler Detektionsantikörper). Die Extraktion der Saaten bzw. Nüsse erfolgte dabei mit Fisch-

Tab. 3.11: Haselnuss, Abhängigkeit der Kreuzreaktivitäten [ $\text{ppm} = 10^{-4} \%$ ] von der Konzentration der Detektionsantikörper (gemessen im Sandwich-Immunoassay mit verschiedenen Kombinationen von Haselnuss-Antikörpern; monoklonale Fängerantikörper; polyklonale Detektionsantikörper R697 und R699 aus Kaninchen, #14 aus Huhn).

Fänger- antikörper	Detektionsantikörper		Walnuss	Maca- damia	Para- nuss	Pekan- nuss	Cashew	Erdnuss
	Serum	Verdünnung						
48-9F1	R697	1: 10 <sup>3</sup>	2,5	0,6	0,3	0,7	1,0	3,0
		1: 10 <sup>4</sup>	1,7	0,6	0,1	0,4	0,5	3,3
		1: 10 <sup>5</sup>	1,6	0,6	0,2	0,5	0,6	3,4
		1: 10 <sup>6</sup>	3,5	1,3	2,1	2,0	2,5	3,6
50-6B12	R697	1: 10 <sup>3</sup>	1,4	0,6	0,1	0,6	0,7	4,1
		1: 10 <sup>4</sup>	1,9	0,8	0,1	0,7	0,5	4,5
		1: 10 <sup>5</sup>	1,7	0,9	0,3	0,9	0,7	4,7
		1: 10 <sup>6</sup>	3,0	0,8	1,9	1,6	2,7	4,8
48-9F1	R699	1: 10 <sup>3</sup>	8,8	0,4	1,1	1,7	1,1	3,1
		1: 10 <sup>4</sup>	3,0	0,5	0,4	0,6	0,4	3,5
		1: 10 <sup>5</sup>	3,1	0,5	0,4	0,6	0,4	3,6
		1: 10 <sup>6</sup>	3,8	0,5	1,1	1,0	1,3	3,4
50-6B12	#14	1: 10 <sup>3</sup>	3,7	0,5	0,1	1,5	1,5	3,5
		1: 10 <sup>4</sup>	2,8	0,5	0,1	0,9	0,7	3,6
		1: 10 <sup>5</sup>	2,3	0,4	0,1	0,2	0,4	3,8

gelatine-Extraktionspuffer.

Wie bereits bei den Erdnuss-Assays beobachtet, erwiesen sich auch hier die Kreuzreaktivitäten als nahezu unabhängig von den verwendeten Antikörpern und von den Konzentrationen des jeweiligen Detektionsantikörpers. Die durchschnittlichen Kreuzreaktivitäten waren bei Erdnuss mit 3,7 ppm und Walnuss mit 3,0 ppm am größten, bei den anderen untersuchten Extrakten betrug die Kreuzreaktivitäten meist  $< 2$  ppm.

Auch bei Verwendung von Haselnuss-Antikörpern konnten die Kreuzreaktivitäten der Sandwich-Immunoassays mittels Abreicherung des polyklonalen Serums nicht verringert werden. Dazu wurden die zur Detektion verwendeten Antikörper R697 von Kaninchen und #14 von Huhn in Extrakt des Kreuzreaktanden (Erdnuss, Walnuss, Cashew) verdünnt. Es stellte sich in Übereinstimmung zu den Befunden bei den Erdnuss-Antikörpern heraus, dass bei Verwendung von Kreuzreaktandenextrakten in hohen Konzentrationen (100 g/L) die Nachweisgrenze des Immunoassays signifikant steigt. Der Detektionsantikörper wird in diesem Falle also nicht nur in Bezug auf den Kreuzreaktanden, sondern auch auf den Analyten inhibiert. Andererseits stieg bei Verwendung verdünnter Kreuzreaktandenextrakte (10 g/L) zwar die Sensitivität, aber auch die Kreuzreaktivität an. Offensichtlich handelt es sich also bei den mittels Abreicherung entfernten Antikörpern um die im Serum dominanten Klone.

## 3.9 Optimierung der Immunoassays

### 3.9.1 Mikrotiterplattenbasierte Immunoassays

Da für die Akzeptanz von Immunoassays eine möglichst kurze Testdauer erforderlich ist, wurden die Inkubationszeiten der Sandwich-Immunoassays verringert. Die Inkubation der Proben bzw. der Detektionsantikörper wurden zunächst jeweils von einer Stunde auf 30 Minuten verkürzt. Die Empfindlichkeit verminderte sich erwartungsgemäß. Beispielsweise lag bei Verwendung der Antikörperkombination Y70/R694 (monoklonaler Fängerantikörper und polyklonaler Detektionsantikörper aus Kaninchen) der Wendepunkt der Kalibrierkurve bei jeweils einstündiger Inkubation typischerweise bei  $\approx 250 \mu\text{g/L}$  Erdnuss, bei 30-minütiger Inkubation lag er bei  $\approx 950 \mu\text{g/L}$  Erdnuss. Die Nachweisgrenze vervierfachte sich also in etwa durch Halbierung der Inkubationszeiten von zwei Assay-Schritten. Eine signifikante Änderung von Kreuzreaktivitäten durch Verkürzung der Inkubationszeiten wurde erwartungsgemäß nicht beobachtet. Die Kreuzreaktivitäten erwiesen sich auch unter diesen Bedingungen als unabhängig von den verwendeten Konzentrationen von Fänger- und Detektionsantikörpern.

Bei Verwendung von Haselnuss-Antikörpern wurden ebenfalls verringerte Empfindlichkeiten, aber gleich bleibende Kreuzreaktivitäten der Sandwich-Immunoassays beobachtet, wenn die Inkubationsdauer von Probe und Detektionsantikörper auf jeweils 30 min halbiert wurde.

Eine weitere Verringerung der Inkubationszeit von Probe und Detektionsantikörper auf jeweils 10 min und die zeitliche Verkürzung der Farbentwicklung von 30 min auf 10 min hatte eine weitere deutliche Abnahme der Empfindlichkeit zur Folge. In Abb. 3.48 sind zwei mit der Antikörperkombination Y70/R695 erhaltene Kalibrierungen bei Variation der Inkubationszeiten verglichen. Die Antikörperkombination Y70/R695 erwies sich als optimal für die Detektion von Erdnuss, im Falle Haselnuss wurden mit der Antikörperkombination 50-6B12/R698 die besten Ergebnisse erhalten. Dabei handelt es sich jeweils um Kombinationen aus monoklonalem Fängerantikörper (Maus) und polyklonalem Detektionsantikörper (Kaninchen).

Um die Sensitivität der Sandwich-Immunoassays bei jeweils 10-minütiger Inkubationsdauer zu erhöhen, mussten die Konzentrationen der Antikörper erhöht werden. Im Erdnuss-Immunoassay erwies sich schließlich eine Verdünnung des monoklonalen Fängerantikörpers Y70 von 1:200 in PBS, entsprechend einer IgG-Konzentration von 2,8 mg/L, als optimal. Die optimale Verdünnung des monoklonalen Antikörpers 50-6B12 im Haselnuss-Immunoassay betrug 1:500 in PBS, entsprechend einer IgG-Konzentration von 2,6 mg/L. Zudem wurde die Mikrotiterplatte mit 3% Magermilchpulver in PBS nach Beschichtung mit Fängerantikörper zur Minimierung von unspezifischen Bindungen geblockt. Die optimalen Verdünnungen der Peroxidase-markierten Detektionsantikörper R695 (Erdnuss) bzw. R698 (Haselnuss) betragen in beiden Assays 1:1.000 in einer 1%igen Lösung von Magermilchpulver in PBS, entsprechend einer Konzentration von 0,63 mg/L

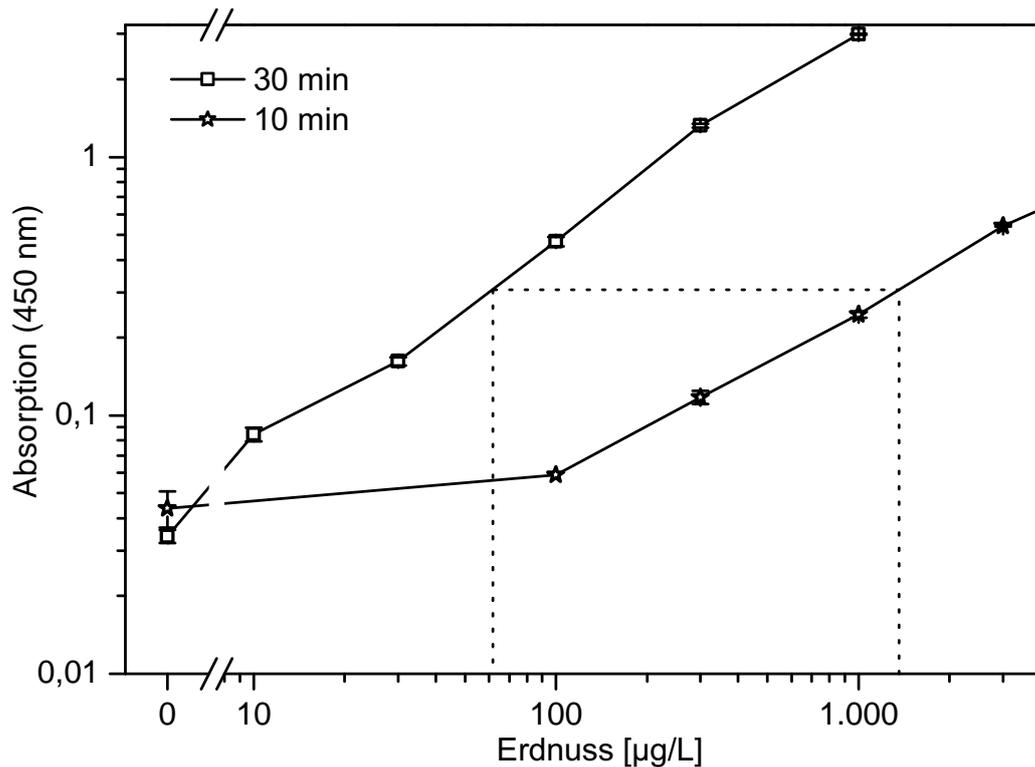


Abb. 3.48: Erdnuss, Kalibrierungen des Sandwich-Immunoassays bei Variation der Inkubationszeiten (monoklonaler Fängerantikörper Y70, polyklonaler Detektionsantikörper R695 aus Kaninchen).

IgG im Falle von Antikörper R695 und 0,83 mg/L IgG im Falle von Antikörper R698 [329].

### 3.9.2 Lateral-Flow-Schnelltests

Die verwendeten Lateral-Flow-Schnelltests („Lateral Flow Device“) wurden vom CSL (York, UK) hergestellt. Das CSL lieferte vier Chargen von Erdnuss-Schnelltests (A, B, C, G) und drei Chargen von Haselnuss-Schnelltests (D, E, F). Zum Vergleich der Leistungsfähigkeit der Lateral-Flow-Schnelltests wurden Lebensmittel mit Erdnuss bzw. Haselnuss dotiert, mit Ridascreen-Extraktionspuffer extrahiert (1 g Probe in 20 mL Extraktionspuffer) und die Extrakte gemessen. Bei der Lebensmittelmatrix Schokolade wurde vor der Extraktion Magermilchpulver (1 g) zugegeben.

Wie in Abb. 3.49 gezeigt, stellten sich die Ergebnisse bei allen nicht dotierten Proben als korrekt negativ heraus. Bei mit 10 mg/kg Haselnuss oder Erdnuss dotierten Butterkeksen bzw. Cerealien war in den meisten Fällen das Ergebnis richtig positiv oder es entwickelte sich zumindest ein schwaches Signal. Bei den dotierten Schokoladen und bei der Eiscreme wurden dagegen oft falsch negative

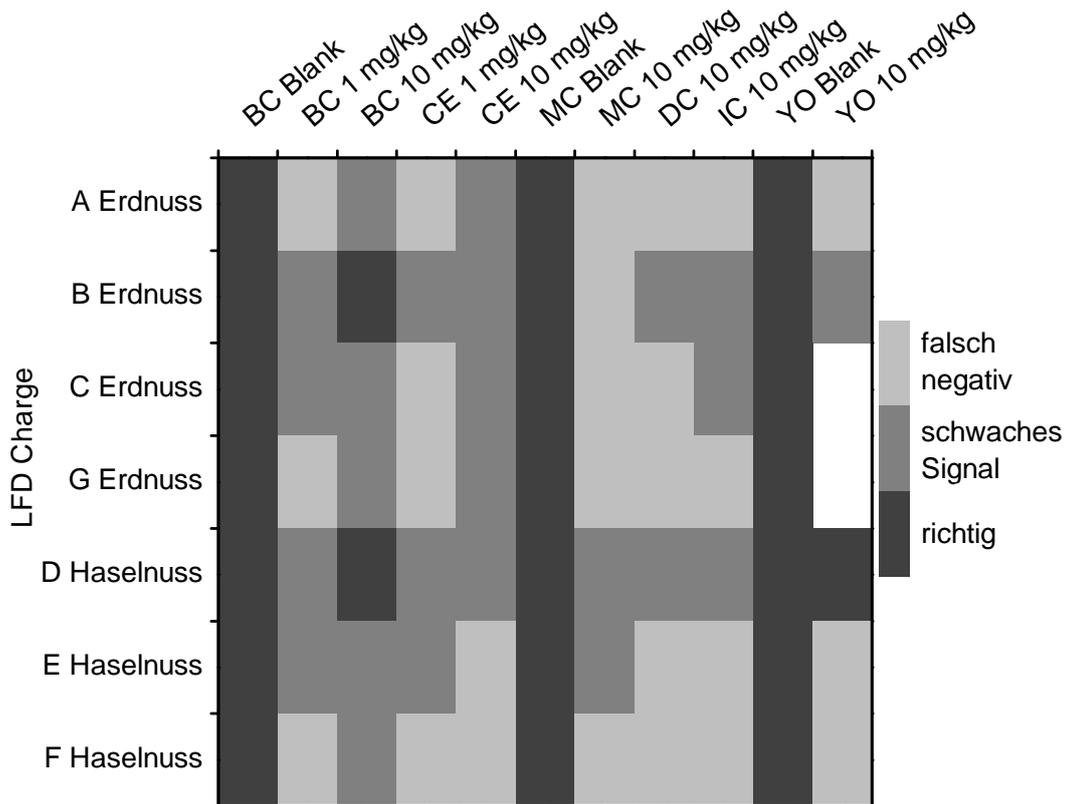


Abb. 3.49: Vergleich der Empfindlichkeit verschiedener Chargen von Lateral-Flow-Schnelltests in einigen Lebensmittelmatrices. BC: Butterkeks, CE: Cerealien, MC: Milkschokolade, DC: Zartbitterschokolade, IC: Vanille-Eiscreme, YO: Joghurt.

Ergebnisse erhalten. Unter den Erdnuss-Schnelltests erwies sich Charge B und unter den Haselnuss-Schnelltests Charge D als am empfindlichsten. Lateral-Flow-Schnelltests der genannten Chargen wurden daher für die Ringversuche und die Messung der Realproben verwendet.

### 3.10 Validierung der Immunoassays

Für die Validierung von Immunoassays ist es notwendig, standardisierte Referenzmaterialien zu verwenden und die Ergebnisse gründlich zu dokumentieren. Als die wichtigsten zu untersuchenden Parameter gelten Richtigkeit, Präzision, Empfindlichkeit, Selektivität, Robustheit und Limitierungen der Immunoassays [294]. Die Validierung wurde mit den Antikörperkombinationen Y70/R695 (Erdnuss) und 50-6B12/R698 (Haselnuss) unter optimierten Bedingungen durchgeführt. Diese Kombinationen aus monoklonalen Fängerantikörpern (Maus) und polyklonalen Detektionsantikörpern (Kaninchen) wiesen die höchsten Sensitivitäten und nied-

rigsten Kreuzreaktivitäten auf. Wie in Kap. 3.9.1 erläutert, betragen die Inkubationszeiten von Probe, markiertem Detektionsantikörper und Substratlösung jeweils 10 min. Die Extraktionen der Proben (1 g; Zugabe von 1 g Magermilchpulver bei schokoladehaltigen Proben) erfolgten unter Verwendung von Ridascreen-Extraktionspuffer (20 mL) gemäß Extraktionsprotokoll.

### 3.10.1 Präzision

Die Bestimmung der Varianzen der Sandwich-Immunoassays erfolgte durch Messung von jeweils sieben Replikaten von Standards und mit Erdnuss bzw. Haselnuss dotierten Proben (Tab. 3.12). Zur Ermittlung der Intra-Assay-Varianz wurden Standardabweichungen und Variationskoeffizienten der auf einer Mikrotiterplatte gemessenen Absorptionen berücksichtigt. Im Falle der Inter-Assay-Varianz wurden Standardabweichungen und Variationskoeffizienten basierend auf gemessenen Absorptionen von drei Mikrotiterplatten ermittelt. Bei den Erdnuss-Immunoassays lagen die Variationskoeffizienten aller Standards (außer dem Blank) und aller dotierten Proben unterhalb von 15 %.

Bei den Haselnuss-Immunoassays stellten sich noch geringere Variationskoeffizienten heraus. Die Intra-Assay-Varianzen lagen in allen Fällen außer dem Blank-Standard im Bereich bis 10 %, die Inter-Assay-Varianzen unter 11 %. Die höheren Schwankungen der Blanks resultieren aus den entsprechend niedrigen Absorptionen.

### 3.10.2 Wiederfindungen

Verschiedene Lebensmittelmatrices wurden mit Erdnuss bzw. Haselnuss dotiert, extrahiert und zur Bestimmung der Wiederfindung eine Zweifachbestimmung mittels entsprechender Sandwich-Immunoassays durchgeführt. Zur Berechnung der Wiederfindungen wurden jeweils die Quotienten aus gemessenem Erdnuss- bzw. Haselnuss-Gehalt und dem durch die Dotierung erwarteten Gehalt berechnet. Die Wiederfindungen sind in Tab. 3.13 zusammengefasst. Im Erdnuss-Immunoassay lagen die Wiederfindungen bei Butterkeks zwischen 92–107 %, bei Frühstückscerealien zwischen 105–117 % und bei Vanilleeis zwischen 94–110 %. Bei Milchsokolade betragen die Wiederfindungen zwischen 113–123 % und bei Zartbitterschokolade zwischen 87–100 %. Die ermittelten Variationskoeffizienten lagen dabei in fast allen Fällen bei < 10 %.

Im Falle Haselnuss wurden in Butterkeks 92–127 % wiedergefunden, in Cerealien 95–106 %, in Vanille-Eiscreme 93–111 %, in Milchsokolade 95–115 % und in Zartbitterschokolade 86–96 %. Die Variationskoeffizienten betragen hierbei in allen Fällen < 7 %.

Tab. 3.12: Intra- und Inter-Assay-Varianzen der Sandwich-Immunoassays (Erdnuss und Haselnuss; Intra-Assay: n = 7, Inter-Assay: n = 21; \*Entspricht Dotierung von Lebensmittel bei Extraktion von 1 g Probe mit 20 mL Extraktionspuffer, gemäß Extraktionsprotokoll).

Probe	Konz. Erdnuss/ Haselnuss	Erdnuss-Immunoassay		Haselnuss-Immunoassay	
		Intra-Assay CV [%]	Inter-Assay CV [%]	Intra-Assay CV [%]	Inter-Assay CV [%]
Standard	0 µg/L	8,7	21,7	10,8	14,6
		18,2		5,4	
		16,8		14,1	
Standard	100 µg/L	13,8	10,7	7,7	5,7
		5,5		4,8	
		3,6		4,4	
Standard	300 µg/L	2,9	12,8	6,7	7,3
		14,6		3,8	
		4,4		1,9	
Standard	1.000 µg/L	6,6	7,0	7,2	10,5
		7,6		3,4	
		3,6		1,3	
Standard	3.000 µg/L	2,6	4,3	5,2	10,4
		5,1		4,4	
		2,9		10,0	
Zartbitter- schokolade	250 µg/L (5 mg/kg)*	8,6	12,4	6,3	4,9
		10,2		5,9	
		8,0		2,1	
Zartbitter- schokolade	500 µg/L (10 mg/kg)*	6,4	11,5	4,7	5,1
		4,5		3,3	
		9,5		4,1	
Vanille- Eiscreme	250 µg/L (5 mg/kg)*	3,0	7,2	5,3	7,2
		3,6		3,4	
		7,8		1,2	
Vanille- Eiscreme	500 µg/L (10 mg/kg)*	5,3	7,5	4,5	10,3
		2,3		2,6	
		4,5		1,4	

Tab. 3.13: Wiederfindungen (WF) von Erdnuss und Haselnuss in dotierten Lebensmittelmatrices (n = 2).

Matrix	Dotierung [mg/kg]	Erdnuss		Haselnuss	
		WF [%]	CV [%]	WF [%]	CV [%]
Butterkeks	1	107	13,9	127	3,2
	1	106	11,1	118	1,7
	5	98	3,1	95	4,6
	5	99	0,6	102	3,7
	10	92	1,0	92	1,4
	10	93	1,1	100	6,4
	10	93	1,1	100	6,4
Frühstücks- cerealien	1	105	4,5	100	5,4
	1	105	1,8	106	4,2
	5	114	2,0	95	2,1
	5	117	1,0	101	1,1
	10	112	1,6	95	0,7
	10	112	2,0	99	2,0
Vanille- Eiscreme	1	110	8,7	108	2,3
	1	108	8,9	111	3,2
	5	94	2,3	93	3,0
	5	98	1,5	99	1,4
	10	97	1,6	95	0,9
	10	96	0,8	94	1,8
Milch- schokolade	1	113	3,0	< NWG	
	1	118	2,3	< NWG	
	5	123	2,7	109	2,6
	5	121	0,8	115	1,8
	10	114	2,0	95	2,6
	10	115	2,1	96	1,7
Zartbitter- schokolade	1	92	2,5	86	6,2
	1	100	1,8	94	3,8
	5	89	1,1	94	3,4
	5	92	1,0	96	2,6
	10	87	1,4	91	2,5
	10	89	1,2	94	2,8

### 3.10.3 Kreuzreaktivitäten

Die in den Sandwich-Immunoassays zur Bestimmung von Erdnuss gemessenen Kreuzreaktivitäten sind in Tab. 3.14 zusammengestellt.

Tab. 3.14: Erdnuss, Kreuzreaktivitäten (CR) [ppm =  $10^{-4}$  %] einiger Nüsse und Saaten im Sandwich-Immunoassay.

Probe	CR	Probe	CR
Bohne, rot	< 0,5	Mandel	1,5
Bohne, weiß	1,2	Mottenbohne	< 0,5
Cashew	< 0,5	Paranuss	0,8
Erbse, grün	0,8	Pekannuss	0,8
Haselnuss	5,5	Pinienkern	7,8
Kichererbse	0,8	Pistazie	1,8
Kokosnuss	1,1	Sesam	0,5
Kürbiskern	1,5	Soja	2,5
Linse	1,6	Sonnenblumenkern	1,3
Macadamia	7,1	Walnuss	< 0,5

Die Extrakte wurden gemäß Extraktionsvorschrift hergestellt und zur Messung der Kreuzreaktivitäten wurden jeweils Zweifachbestimmungen durchgeführt. Bei ermittelten Kreuzreaktivitäten von  $> 2 \cdot 10^{-4}$  % (2 ppm) wurden Messungen mit einem 1 : 500 verdünnten Extrakt, entsprechend einer Konzentration von 100 mg/L (ppm), wiederholt. Bei allen Extrakten außer Macadamia, Pinienkern, Soja und Haselnuss wurde eine Kreuzreaktivität von  $< 2 \cdot 10^{-4}$  % (2 ppm) gemessen. Die Kreuzreaktivitäten der auf 100 mg/L verdünnten Extrakte betragen 0,7 ppm bei Macadamia und  $< 0,5$  ppm bei Pinienkern, Soja und Haselnuss.

Tab. 3.15: Haselnuss, Kreuzreaktivitäten (CR) [ppm =  $10^{-4}$  %] einiger Nüsse und Saaten im Sandwich-Immunoassay.

Probe	CR	Probe	CR
Bohne, rot	< 0,5	Mandel	1,2
Bohne, weiß	< 0,5	Mottenbohne	< 0,5
Cashew	1,2	Paranuss	< 0,5
Erbse, grün	< 0,5	Pekannuss	< 0,5
Erdnuss	< 0,5	Pinienkern	< 0,5
Kichererbse	< 0,5	Pistazie	< 0,5
Kokosnuss	< 0,5	Sesam	< 0,5
Kürbiskern	< 0,5	Soja	0,7
Linse	< 0,5	Sonnenblumenkern	< 0,5
Macadamia	1,1	Walnuss	12

Die Kreuzreaktivitäten des Sandwich-Immunoassays zur Bestimmung von Haselnuss sind in Tab. 3.15 aufgeführt. Verglichen mit dem Erdnuss-Immunoassay erwies sich der Haselnuss-Immunoassay als weniger kreuzreaktiv. In den meisten Fällen lag die Kreuzreaktivität unter der Nachweisgrenze ( $< 0,5 \cdot 10^{-4} \% = 0,5 \text{ ppm}$ ). Nur bei Cashew, Macadamia, Mandel, Soja und Walnuss wurden Kreuzreaktivitäten ( $> 0,5 \cdot 10^{-4} \% = 0,5 \text{ ppm}$ ) ermittelt. Dabei betrug lediglich bei Walnuss die Kreuzreaktivität  $> 2 \cdot 10^{-4} \% = 2 \text{ ppm}$ . Mit verdünntem Extrakt von  $100 \text{ mg/L}$  Walnuss wurde eine Kreuzreaktivität von  $0,7 \cdot 10^{-4} \% = 0,7 \text{ ppm}$  gemessen.

### 3.10.4 Nachweisgrenzen

Die Bestimmung der Nachweisgrenzen erfolgte durch Addition der dreifachen Standardabweichung zum Mittelwert der Blankabsorption und durch Extrapolation der entsprechenden Analytkonzentration.

Von jeder Lebensmittelmatrix wurden zehn Negativproben extrahiert und von jedem Extrakt eine Vierfachbestimmung durchgeführt. Die ermittelten Nachweisgrenzen von Erdnuss betragen in Keksen  $0,24 \text{ mg/kg}$ , in Milkschokolade  $0,77 \text{ mg/kg}$ , in Zartbitterschokolade  $0,23 \text{ mg/kg}$ , in Frühstückscerealien  $0,42 \text{ mg/kg}$  und in Vanille-Eiscreme  $0,37 \text{ mg/kg}$ . Die matrixfreie Nachweisgrenze lag bei  $6,9 \mu\text{g/L}$  Erdnuss, bei einer inerten Matrix entspricht dies  $0,14 \text{ mg/kg}$  ( $140 \text{ ppb}$ ) Erdnuss.

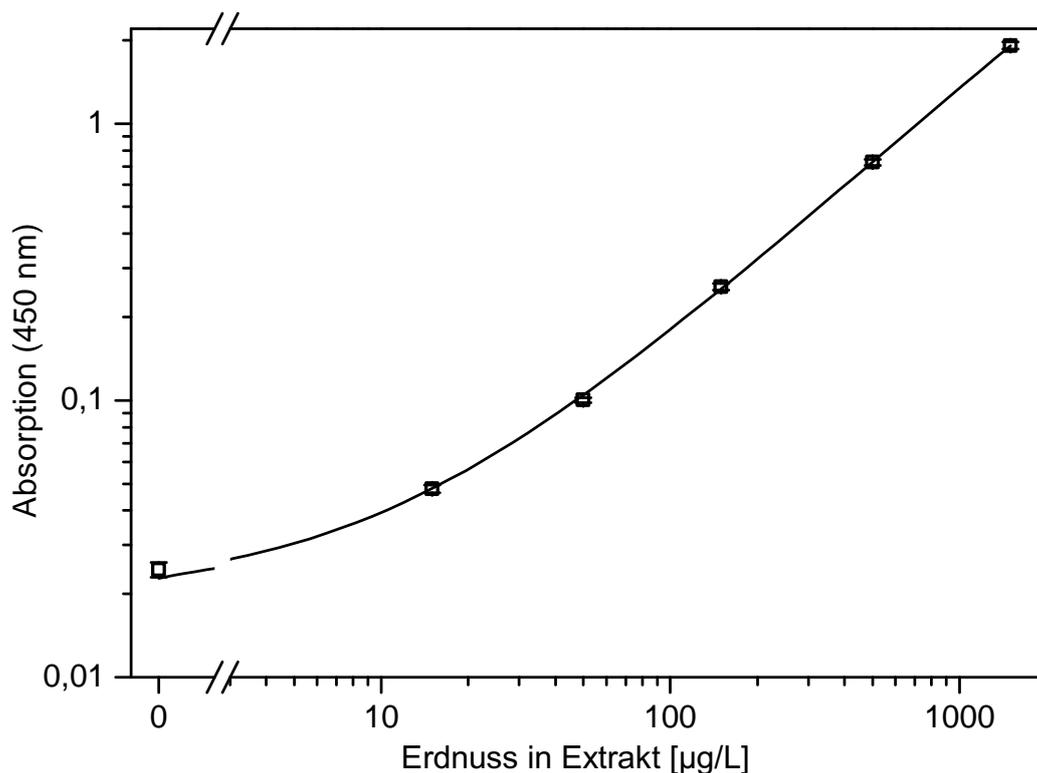


Abb. 3.50: Erdnuss, charakteristische Kalibrierkurve des Sandwich-Immunoassays (Mittelwerte und Standardabweichungen,  $n = 8$ ).

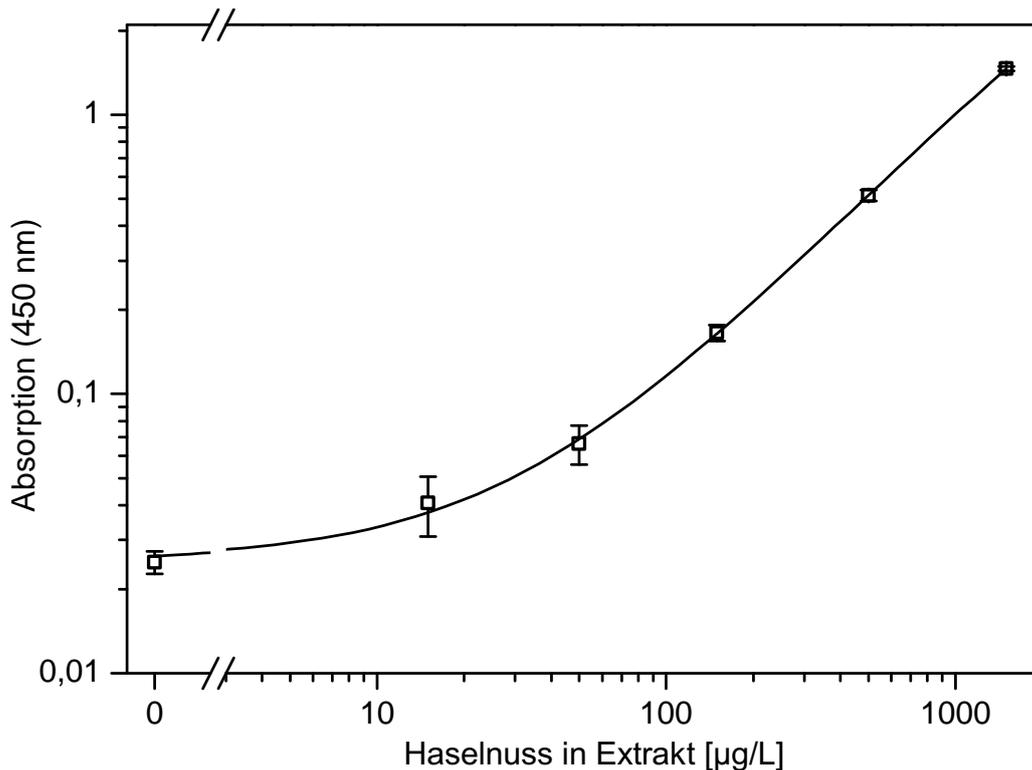


Abb. 3.51: Haselnuss, charakteristische Kalibrierkurve des Sandwich-Immunoassays (Mittelwerte und Standardabweichungen,  $n = 8$ ).

Die gemessenen Nachweisgrenzen von Haselnuss waren 0,64 mg/kg in Cerealien, 0,22 mg/kg in Eiscreme, 0,36 mg/kg in Butterkeks, 1,19 mg/kg in Milkschokolade und 0,78 mg/kg in Zartbitterschokolade. Die matrixfreie Nachweisgrenze betrug 6,0 µg/L Haselnuss, entsprechend 0,12 mg/kg (120 ppb) Haselnuss in inerte Matrix.

Charakteristische Kalibrierkurven des Erdnuss- bzw. Haselnuss-Immunoassays sind in Abb. 3.50 bzw. Abb. 3.51 dargestellt. Jeweils gezeigt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen einer Achtfachbestimmung. Die Kurven erwiesen sich als an verschiedenen Tagen gut reproduzierbar.

### 3.10.5 Ringversuche

Mit von R-Biopharm hergestellten Sandwich-Immunoassay-Testkits und den bei CSL hergestellten Lateral-Flow-Schnelltests wurden Ringversuche innerhalb des Projektkonsortiums durchgeführt. Bei den gewählten Lebensmittelmatrices handelte es sich um Milkschokolade, Zartbitterschokolade, Butterkeks, Eiscreme, Salami, Salatdressing, Instantensuppe, Cornflakes und Joghurt. Die Dotierung mit Erdnuss bzw. Haselnuss erfolgte mit der CMC-Methode (siehe Kap. 5.3.1, S. 156). Sowohl die Herstellung der Schokoladen als auch die Dotierung aller Proben wurde vom IFA Tulln übernommen. Die Durchführung der Sandwich-Immunoassays

erfolgte nach den Anleitungen, die den Testkits beilagen [337; 338].

In Tab. 3.16 sind die am Institut für Wasserchemie erzielten Ergebnisse respektive nachträglich erhaltener Informationen zu den Matrices und Dotierungen zusammengefasst. Die Ergebnisse aller am Konsortium beteiligten Institute wurden ausgewertet und von FÜRTLER-LEITZENBERGER et al. zusammengefasst [339]. Die Wiederfindungen von Erdnuss am Institut für Wasserchemie lagen zwischen 59–174 %, bei Salatdressing wurden nur 37 % wiedergefunden. Offensichtlich ist der niedrige pH-Wert in Salatdressing die Ursache für die geringe Stabilität der Erdnussproteine. Die Wiederfindungen in den Schokoladen mit 160–174 % sind zu hoch und vermutlich auf einen zu hoch konzentrierten Dotierstandard zurückzuführen. Dafür spricht, dass die Wiederfindungen in allen Schokoladenproben gut übereinstimmten. Außerdem wurden auch von den anderen Instituten vergleichbare Werte gemeldet. Bei den Matrices Butterkeks, Eiscreme, Salami, Instantsuppe, Cornflakes und Joghurt lagen die Wiederfindungen zwischen 59–88 %. Die relativ niedrigen Wiederfindungen sind teils auf Matrixeffekte zurückzuführen. Zum größeren Teil sind aber für die niedrigen Wiederfindungen vermutlich Instabilitäten der CMC-Stammlösungen verantwortlich, von denen das IFA Tulln berichtete. Falsch positive Ergebnisse im Erdnuss-Immunoassay wurden bei mit Haselnuss dotierter Zartbitterschokolade erhalten. Offenbar handelt es sich dabei um Kontaminationen der hierbei verwendeten Lebensmittelmatrix oder des Dotierstandards.

Die Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der Sandwich-Immunoassays und der Lateral-Flow-Schnelltests ist bei einer unterstellten Nachweisgrenze der Lateral-Flow-Schnelltests von 5 mg/kg Erdnuss als gut zu beurteilen.

Bei der Auswertung der mit Haselnuss dotierten Proben wurden in den meisten Matrices Wiederfindungen von 46–153 % erhalten. Das falsch negative Ergebnis bei dotiertem Salatdressing ist wie im Falle Erdnuss auf den niedrigen pH-Wert der Matrix und die daraus resultierende geringe Stabilität der Haselnussproteine zurückzuführen. Bei den Schokoladen wurden höhere Wiederfindungen bzw. falsch positive Ergebnisse erhalten. Als Ursache hierfür stellte sich bei den Schokoladen eine Kontamination mit Haselnuss heraus. Eine gute Übereinstimmung zwischen den Resultaten der Sandwich-Immunoassays und der Lateral-Flow-Schnelltests wurde beobachtet, bei einer mutmaßlichen Nachweisgrenze der Lateral-Flow-Schnelltests zwischen 6–9 mg/kg Haselnuss.

Die Präzision des Ringversuchs ist als hoch zu beurteilen. Die Variationskoeffizienten der Ergebnisse von acht beteiligten Instituten betragen bei den mit Erdnuss dotierten Proben bei Milkschokolade (10 bzw. 40 mg/kg) 6,9 % bzw. 8,9 %, bei Zartbitterschokolade (10 bzw. 40 mg/kg) 30,1 % bzw. 12,9 %, bei Eiscreme (20 mg/kg) 8,6 %, bei Salami (8 mg/kg) 16,2 %, bei Instantsuppe (15 mg/kg) 51,7 %, bei Cornflakes (35 mg/kg) 36,5 % und bei Joghurt (6 mg/kg) 23,9 %. Bei den mit Haselnuss dotierten Proben wurden relative Standardabweichungen von 28,6 % bzw. 12,3 % bei Zartbitterschokolade (2,5 bzw. 10 mg/kg), von 23,7 % bei Eiscreme (20 mg/kg), von 24,2 % bei Salami (8 mg/kg), von 27,7 % bei Instantsuppe (15 mg/kg), von 49,7 % bei Cornflakes (35 mg/kg) und von 58,3 % bei Joghurt (6 mg/kg) ermittelt.

Tab. 3.16: Ergebnisse im Ringversuch mit Sandwich-Immunoassay-Testkits und Lateral-Flow-Schnelltests (n = 4, jeweils Doppelbestimmung und Zweifachextraktion; WF: Wiederfindung; LFD: +: positiv bei allen Bestimmungen, ±: bei 1–3 Bestimmungen positiv oder schwaches Signal bei Testlinie, -: negativ bei allen Bestimmungen).

Probe	Matrix	Erdrnuss				Haselnuss			
		dotiert [mg/kg]	gemessen [mg/kg]	WF [%]	LFD	dotiert [mg/kg]	gemessen [mg/kg]	WF [%]	LFD
1	Milchschokolade	0	<NWG	–	–	0	5,4	–	–
2	Milchschokolade	10	17,4	174	+	0	4,8	–	–
3	Milchschokolade	40	65,4	164	+	0	6,7	±	±
4	Zartbitterschokolade	0	<NWG	–	–	0	7,7	±	±
5	Zartbitterschokolade	10	17,3	173	+	0	4,7	–	–
6	Zartbitterschokolade	40	63,8	160	+	0	5,9	±	±
7	Zartbitterschokolade	0	<NWG	–	–	0	2,1	–	–
8	Zartbitterschokolade	0	5,0	±	±	2,5	6,7	268	±
9	Zartbitterschokolade	0	12,8	±	+	10	12,3	123	+
10	Butterkeks	0	<NWG	–	–	0	<NWG	–	–
11	Butterkeks	5	3,5	70	±	0	<NWG	–	–
12	Butterkeks	0	<NWG	–	–	5	6,9	138	+
13	Eiscreme	0	<NWG	–	–	0	<NWG	–	–
14	Eiscreme	20	17,6	88	+	0	<NWG	–	–
15	Eiscreme	0	<NWG	–	–	20	21,5	108	+
16	Salami	8	5,5	69	±	0	<NWG	–	–
17	Salami	0	1,0	–	–	8	9,0	113	±
18	Salatdressing	4	1,5	37	–	0	<NWG	–	–
19	Salatdressing	0	<NWG	–	–	4	<NWG	–	–
20	Instantensuppe	15	11,5	77	±	0	<NWG	–	–
21	Instantensuppe	0	1,1	–	–	15	23,0	153	+
22	Cornflakes	35	20,8	59	+	0	<NWG	–	–
23	Cornflakes	0	<NWG	–	–	35	48,5	139	+
24	Joghurt	6	3,7	61	±	0	<NWG	–	–
25	Joghurt	0	<NWG	–	–	6	2,8	46	–

## 3.11 Messung von Realproben

Verschiedene Lebensmittelproben, wie Schokoladen, Kekse, Frühstückscerealien und Müsli aus dem lokalen Handel, wurden auf die Anwesenheit von Erdnuss bzw. Haselnuss hin untersucht. Dafür wurden  $> 5$  g jeder Probe in der zuvor gründlich gereinigten Labormühle homogenisiert und jeweils 1 g entsprechend dem Extraktionsprotokoll extrahiert. Um die Zuverlässigkeit zu kontrollieren, wurden von jedem Lebensmittel jeweils zwei Proben extrahiert und Doppelbestimmungen jedes Extrakts in Sandwich-Immunoassays durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch Mittelwertbildung der Doppelbestimmungen und Berechnung der Analytkonzentrationen mittels Kalibrierkurven. Bei Abweichungen der beiden Mittelwerte zueinander von  $CV > 15\%$  wurden die Extraktionen und Messungen wiederholt.

Die Ergebnisse der Untersuchung von Realproben sind in Tab. 3.17 zusammengefasst. In 4 der 32 Lebensmittelproben wurde Erdnuss nachgewiesen, wobei es sich in drei Fällen offensichtlich um Kontamination handelt und in einem Fall Erdnuss eine Zutat ist. Interessanterweise konnte in keiner Schokolade, die laut Deklaration potentiell Erdnuss enthält, Erdnuss gefunden werden. Dagegen wurde in beiden nicht deklarierten Schokoladen Erdnuss nachgewiesen.

Haselnuss wurde dagegen in den meisten untersuchten Lebensmitteln gefunden. In allen Produkten, bei denen Haselnuss als Zutat angegeben war, konnte Haselnuss nachgewiesen werden. Bei den Produkten, die laut Kennzeichnung Spuren von Haselnuss enthalten können, wurde in den meisten Fällen Haselnuss gefunden; lediglich bei zwei Produkten (mit Milkschokolade umhüllte Keks-Sticks und Milchcremewaffel) lagen die Werte unterhalb der Nachweisgrenze. Bedenklicherweise wurden auch in Lebensmittelproben, bei denen keine Deklaration bezüglich Haselnuss vorhanden ist, teils hohe Haselnusskonzentrationen gefunden. Bei der Milkschokolade III ergab die Messung einen Haselnussgehalt von  $5,8$  g/kg ( $0,58\%$ ).

Innerhalb des Projekts erfolgten weitere Messungen von Erdnuss und Haselnuss in kommerziell verfügbaren Lebensmitteln. Dazu wurden europaweit von Verbraucherschutzorganisationen stichprobenartig Produkte im Einzelhandel gekauft und an die im Projekt beteiligten Institute verschickt. Am Institut für Wasserchemie wurden Proben aus Griechenland und Slowenien untersucht. Bei allen Proben erfolgten die Messungen jeweils sowohl mit den Sandwich-Immunoassay-Testkits als auch mit den Lateral-Flow-Schnelltests. Die Lateral-Flow-Schnelltests wurden sowohl visuell beurteilt als auch mit einem tragbaren Reflektometer ausgelesen. Das IFA Tulln stellte positive und negative Referenzproben bereit. Dabei handelte es sich um Butterkeks-Extrakt als Blank und um Extrakt von mit  $6$  ppm Erdnuss bzw.  $10$  ppm Haselnuss dotierter Vanille-Eiscreme. Sowohl Positiv- als auch Negativproben wurden auf jeder Mikrotiterplatte zur Kontrolle mitgeführt. Um die Funktion der Lateral-Flow-Schnelltests zu verifizieren, erfolgte jeweils nach etwa 20 Tests eine Kontrollmessung mit Positiv- und Negativproben. Bei allen Analysen wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Auswertung der Sandwich-Immunoassays erfolgte durch Berechnung der Mittelwerte, wobei im Falle von

Tab. 3.17: Messung des Erdnuss- und Haselnussgehalts einiger Lebensmittelproben aus dem lokalen Handel (\*Deklaration: +, Erdnuss in Zutatenliste;  $\pm$ , Produkt kann laut Kennzeichnung Erdnuss enthalten; –, keine Deklaration).

Probe	Erdnuss			Haselnuss		
	Dekl.*	gefunden [mg/kg]	CV [%]	Dekl.*	gefunden [mg/kg]	CV [%]
Milchschokolade I	$\pm$	< NWG		$\pm$	1,5	6,8
Milchschokolade II	$\pm$	< NWG		$\pm$	1.100	6,3
Milchschokolade III	–	1,1	1,9	–	5.800	1,7
Milchschokolade IV	$\pm$	< NWG		+	7.100	0,8
Zartbitterschokolade I	$\pm$	< NWG		$\pm$	50	8,5
Zartbitterschokolade II	$\pm$	< NWG		$\pm$	1.200	7,5
Zartbitterschokolade III	–	5,9	0,6	–	630	3,0
Butterkeks	–	< NWG		–	< NWG	
Cerealien, Getreideringe	$\pm$	< NWG		–	< NWG	
Kokos-Mandel-Praline	–	< NWG		–	< NWG	
Fruchtmüsli	$\pm$	< NWG		$\pm$	0,8	8,6
Schokoladenriegel, Karamell	$\pm$	< NWG		–	< NWG	
Schokoladenriegel, Milchcreme	$\pm$	< NWG		–	< NWG	
Keks, Milchcremefüllung	–	0,8	6,3	–	87	2,2
Zitronencreme-Waffel	–	< NWG		–	< NWG	
Milchcremewaffel, Haselnuss	–	< NWG		+	59.000	2,2
Keks, Schokoladenfüllung	–	< NWG		+	550	0,6
Milch-Haselnuss-Praline	–	< NWG		+	150.000	1,2
Keks, Schokoladenstücke	$\pm$	< NWG		$\pm$	5,0	2,1
Toffee	–	< NWG		–	< NWG	
Keksstange, Schokoladenüberzug	$\pm$	< NWG		$\pm$	< NWG	
Schokoladen-Nougatcreme	–	< NWG		+	66.000	3,7
Schokolade, Milchcremefüllung	–	< NWG		–	< NWG	
Marzipan, Schokoladenüberzug	–	< NWG		–	59	1,5
Nougatrolle	–	< NWG		+	210.000	1,4
Milchcremewaffel	$\pm$	< NWG		$\pm$	< NWG	
Schokoladenriegel, Cerealien	–	< NWG		–	< NWG	
Schokoladenriegel, Nougat	–	< NWG		+	29.000	0,8
Keks, Schokoladenüberzug	$\pm$	< NWG		$\pm$	1,7	1,3
Schokoladenriegel, Erdnuss	+	68.000	1,4	–	< NWG	
Waffel, Schokolade & Haselnuss	$\pm$	< NWG		+	53.000	1,6
Schokoladenriegel, Joghurt & Beere	$\pm$	< NWG		$\pm$	1,0	5,8

hohen Abweichungen ( $CV > 15\%$ ) die Analyse nebst Extraktion wiederholt wurde. Bei Diskrepanz der beiden Ergebnisse der Lateral-Flow-Schnelltests schien eine Wiederholung von beiden Bestimmungen als angebracht.

In Tab. 3.18 sind die bei der Untersuchung der Lebensmittelproben erhaltenen Ergebnisse zusammengefasst. In der Regel stimmten die Einzelwerte qualitativ (Lateral-Flow-Schnelltests) bzw. quantitativ ( $CV < 15\%$  bei den Sandwich-Immunoassays) überein. Erwartungsgemäß erwies sich die reflektometrische Auswertung bei den Lateral-Flow-Schnelltests als empfindlicher als die visuelle. Es wurde gefunden, dass ab einer reflektometrisch gemessenen relativen Signalintensität der Test-Linie von etwa 10% zur Signalintensität der Kontroll-Linie der Test visuell als positiv gewertet wurde. Problematisch in Hinsicht auf die visuelle Auswertung war die in vielen Fällen vorhandene Färbung der Probenextrakte. Wie bereits bei den in Deutschland erworbenen Lebensmittelproben beobachtet, wurde Haselnuss in deutlich mehr Proben als Erdnuss gefunden. Erdnuss wurde übereinstimmend mittels Sandwich-Immunoassay und Lateral-Flow-Schnelltest in fünf Proben aus Griechenland (14% der Proben) nachgewiesen. Dabei handelte es sich um eine Kekssorte mit Kokosraspeln und jeweils zwei Milch- bzw. Zartbitterschokoladen. In allen Fällen war keine Deklaration bzw. Hinweis auf potentiellen Gehalt von Erdnuss vorhanden. Bei den Proben aus Slowenien wurden in zwei Fällen (5% der Proben) übereinstimmend mit Lateral-Flow-Schnelltest und Sandwich-Immunoassay Spuren von Erdnuss nachgewiesen, ohne dass eine Deklaration vorhanden war. Es handelte sich dabei um eine Schokoladewaffel mit Kakaofüllung und eine Milkschokolade mit Zimtgeschmack. Bei einer Milkschokolade, die laut Kennzeichnung Erdnuss enthalten konnte, wurden 890 mg/kg Erdnuss nachgewiesen. In keiner der untersuchten Probe aus Slowenien war Erdnuss als Zutat angegeben.

Haselnuss wurde in vielen Proben gefunden. Bei den Proben aus Griechenland wurde in zwölf Fällen (34% der Proben) Haselnuss übereinstimmend mit Sandwich-Immunoassays und Lateral-Flow-Schnelltests nachgewiesen, ohne dass ein entsprechender Hinweis vorhanden war. Dabei handelte es sich um Kekse und verschiedene Milch- und Zartbitterschokoladen. Der höchste undeklarierte Haselnussgehalt wurde in einer Milkschokolade mit 6.200 mg/kg (= 0,62% Haselnuss) ermittelt. Bei keiner aus Griechenland erhaltenen Probe war ein Hinweis auf potentiellen Gehalt von Haselnuss vorhanden, bei zwei Proben (Milkschokoladen) war Haselnuss als Zutat angegeben, was sich bei den Messungen bestätigte. Bei 20 der Proben aus Slowenien (47% der Proben) wurde Haselnuss gefunden, ohne dass eine entsprechende Deklaration vorhanden war. Darunter befanden sich Lebkuchen, in denen 31.000 mg/kg (= 3,1%) Haselnuss gemessen wurden. In sieben Proben aus Slowenien, welche laut Deklaration potentiell Haselnuss enthalten, wurde Haselnuss nachgewiesen. Zwei Lebensmittel enthielten laut Zutatenverzeichnis Haselnuss, was durch die Messungen bestätigt werden konnte.

Tab. 3.18: Messergebnisse von in Griechenland (GR01–35) und in Slowenien (SL01–43) erworbenen Lebensmittelproben (n=2; <sup>1</sup>Deklaration: +, Erdnuss/Haselnuss in Zutatenliste; ±, Produkt kann Erdnuss/Haselnuss enthalten; –, keine Deklaration; <sup>2</sup>Lateral-Flow-Schnelltests: +, visuell und reflektometrisch positiv; ±, visuell negativ, reflektometrisch positiv; –, visuell und reflektometrisch negativ; <sup>3</sup>Gehalt > 20 mg/kg, nicht quantifiziert, da als Zutat deklariert).

Probe	Lebensmittel	Erdnuss			Haselnuss		
		Deklaration <sup>1</sup>	ELISA [mg/kg]	LFD <sup>2</sup>	Deklaration <sup>1</sup>	ELISA [mg/kg]	LFD <sup>2</sup>
GR01	Kekse, Schokolade und Milchfüllung	–	<NWG	–	–	76	+
GR02	Kekse, Erdbeerfüllung	–	<NWG	–	–	<NWG	–
GR03	Kekse, Aprikosenkonfitüre	–	<NWG	–	–	<NWG	–
GR04	Spritzgebäck	–	<NWG	–	–	<NWG	–
GR05	Butterkekse	–	<NWG	–	–	<NWG	–
GR06	Kekse, Schokoladenstücke	–	<NWG	–	–	<NWG	–
GR07	Kekse, Zimtgeschmack	–	<NWG	–	–	<NWG	–
GR08	Butterkekse, Milch	–	<NWG	–	–	<NWG	–
GR09	Vollkornkekse	–	<NWG	–	–	<NWG	–
GR10	Kekse, Kokosraspel	–	590	+	–	11	+
GR11	Kekse, Milchsokolade-Überzug	–	<NWG	–	–	1,1	–
GR12	Milchsokolade	–	<NWG	–	–	410	+
GR13	Milchsokolade	–	<NWG	–	–	1.700	+
GR14	Schokolade, Milchcremefüllung	–	<NWG	–	–	2.800	+
GR15	Milchsokolade	–	6,9	+	+	> <sup>3</sup>	+
GR16	Milchsokolade	–	<NWG	–	–	3.700	+
GR17	Schokolade, Milchcremefüllung	–	<NWG	–	–	<NWG	–
GR18	Milchsokolade	–	57	+	+	> <sup>3</sup>	+
GR19	Milchsokolade	–	<NWG	–	–	6.200	+
GR20	Zartbitterschokolade	–	<NWG	–	–	380	+
GR21	Zartbitterschokolade	–	<NWG	–	–	370	+
GR22	Zartbitterschokolade	–	<NWG	–	–	180	+
GR23	Zartbitterschokolade, Diabetiker	±	<NWG	–	–	35	+
GR24	Zartbitterschokolade	–	7,7	+	–	590	+

Fortsetzung Tab. 3.18

Probe	Lebensmittel	Erdnuss			Haselnuss		
		Deklaration <sup>1</sup>	ELISA [mg/kg]	LFDD <sup>2</sup>	Deklaration <sup>1</sup>	ELISA [mg/kg]	LFDD <sup>2</sup>
GR25	Zartbitterschokolade, Bio-	-	1,8	±	-	3,3	-
GR26	Cornflakes, Bio-	-	<NWG	-	-	<NWG	-
GR27	Cornflakes	-	<NWG	-	-	<NWG	-
GR28	Weizencerealien, Honig	-	<NWG	-	-	<NWG	-
GR29	Reiscerealien, Kakao	-	<NWG	-	-	<NWG	-
GR30	Cornflakes	-	<NWG	-	-	<NWG	-
GR31	Cerealien, Kakao	-	<NWG	±	-	<NWG	-
GR32	Cornflakes	-	<NWG	-	-	<NWG	-
GR33	Cornflakes	-	<NWG	-	-	<NWG	-
GR34	Cerealien, ballaststoffreich	-	<NWG	-	-	<NWG	-
GR35	Cerealien, ballaststoffreich	-	<NWG	-	-	<NWG	-
SL01	Waffel, Kakaocremefüllung	-	<NWG	-	-	680	+
SL02	Kekse, Milchschokolade-Überzug	-	<NWG	-	-	11	+
SL03	Haferkekse	-	<NWG	-	-	<NWG	-
SL04	Kekse, Schokoladenstücke	-	<NWG	-	-	2.000	+
SL05	Gebäck, Mohnfüllung	-	<NWG	-	-	3.500	+
SL06	Kekse, Schokoladenstücke	-	<NWG	-	-	<NWG	-
SL07	Lebkuchen	-	<NWG	-	-	31.000	+
SL08	Kekse, Kakaofüllung	-	<NWG	-	-	2,8	±
SL09	Schokolade, Waffel & Kakaofüllung	-	6,3	+	-	550	+
SL10	Kekse, Kakaofüllung	-	<NWG	-	-	<NWG	-
SL11	Waffel, Kaffeeccremefüllung	-	<NWG	-	-	430	+
SL12	Schokolade, Waffel & Cremefüllung	-	<NWG	-	-	850	+
SL13	Puffreis, Schokolade	-	<NWG	-	-	590	+
SL14	Waffel, Kaffeeccremefüllung	-	<NWG	-	-	240	+
SL15	Waffel, Kakaocremefüllung	-	1,6	-	-	2.400	+
SL16	Zartbitterschokolade	-	<NWG	-	-	690	+
SL17	Zartbitterschokolade	±	<NWG	-	±	1.600	+

Fortsetzung Tab. 3.18

Probe	Lebensmittel	Erdnuss			Haselnuss		
		Deklaration <sup>1</sup>	ELISA [mg/kg]	LFD <sup>2</sup>	Deklaration <sup>1</sup>	ELISA [mg/kg]	LFD <sup>2</sup>
SL18	Milchschokolade, Zimtgeschmack	-	1,4	±	-	32	+
SL19	Milchschokolade	±	<NWG	-	±	540	+
SL20	Milchschokolade, Keksfüllung	-	<NWG	-	+	> <sup>3</sup>	+
SL21	Milchschokolade	±	<NWG	-	±	32	+
SL22	Milchschokolade	-	<NWG	-	±	230	+
SL23	Milchschokolade, Apfel und Mandel	±	<NWG	-	+	> <sup>3</sup>	+
SL24	Milchschokolade, Mandel	±	<NWG	-	±	1.100	+
SL25	Milchschokolade, Crisps	-	<NWG	-	-	3.800	+
SL26	Milchschokolade, Amarettogeschmack	-	<NWG	-	-	290	+
SL27	Milchschokolade, Milchcremefüllung	±	890	+	±	2.900	+
SL28	Milchschokolade	±	<NWG	-	±	3.300	+
SL29	Cerealien, Mischung	-	<NWG	±	-	<NWG	-
SL30	Cerealien, Kakao	-	<NWG	-	-	<NWG	-
SL31	Reis-, Maiscerealien, Kakao	-	<NWG	-	-	5,2	+
SL32	Weizencerealien, Kakao	±	<NWG	-	±	<NWG	-
SL33	Reiscerealien, Kakao	-	<NWG	-	-	<NWG	-
SL34	Schokoladenbreipulver	-	<NWG	-	-	27	+
SL35	Müсли, Schokolade	-	<NWG	-	-	3	+
SL36	Müсли, Schokolade	-	<NWG	-	-	<NWG	-
SL37	Weizencerealien, Kakao	-	<NWG	-	-	17	+
SL38	Cerealien, Kakao	-	<NWG	-	-	<NWG	-
SL39	Reis-, Maiscerealien, Kakao	-	<NWG	±	-	<NWG	-
SL40	Joghurt, Cerealien	±	<NWG	-	-	<NWG	-
SL41 a	Joghurt, Cerealien	±	<NWG	-	±	<NWG	-
SL41 b	Reis-, Maiscerealien, Kakao	±	<NWG	-	±	<NWG	-
SL42	Schokoladendessert	±	<NWG	-	±	<NWG	-
SL43	Cremedessert, Pistazie	-	<NWG	-	-	<NWG	-

## 4 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wird die Entwicklung von Immunoassays zum Nachweis von Erdnuss- und Haselnussproteinen vorgestellt. Lebensmittelallergiker sind auf zuverlässige Informationen über allergene Bestandteile in Lebensmitteln angewiesen. Bereits nach Inkorporation von geringen Mengen allergener Proteine im Submilligrammbereich können bei Allergikern Reaktionen ausgelöst werden. In den meisten Fällen sind allergische Symptome zwar unangenehm, aber zunächst wenig bedenklich. Bei hoch sensibilisierten Allergikern oder bei Inkorporation von großen Mengen von Allergenen können allerdings mitunter anaphylaktische Schockzustände ausgelöst werden, welche zu Atemnot bzw. Kreislaufkollaps führen und bei nicht unmittelbar durchgeführter Medikation letal verlaufen können. Es wird davon ausgegangen, dass Lebensmittelallergien alleine in den Vereinigten Staaten jährlich etwa 30.000 Fälle von anaphylaktischem Schock und etwa 125 Todesfälle verursachen. Zu den potenten Lebensmittelallergenen gehören Proteine aus Erdnuss und Baumnüssen, insbesondere aus Haselnuss. Aufgrund des weitverbreiteten Einsatzes in industriellen und Gastronomieprodukten können Erdnüsse und Haselnüsse in vielen Lebensmitteln enthalten sein, ohne dass dies in allen Fällen ersichtlich ist. Allergiker müssen zum Schutz vor „versteckten Allergenen“ also entsprechend informiert sein, insbesondere bei industriell hergestellten Lebensmitteln und bei Speisen in Restaurants und in Kantinen. Neben PCR-basierten Techniken sind immunanalytische Verfahren die Methoden der Wahl zum Speziesnachweis und damit zur Detektion von versteckten Allergenen in Endprodukten oder während der Produktion.

Für die Entwicklung von Immunoassays stand eine Vielzahl von Antikörpern verschiedener Tierspezies zur Verfügung. Innerhalb der in Betracht kommenden Immunoassays erwiesen sich Sandwich-Immunoassays als die empfindlichste und selektivste Option. Zur Selektion der Antikörper wurden diese zunächst einzeln und im weiteren Verlauf paarweise untersucht. Um maximale Empfindlichkeit der finalen Tests zu erhalten, lag der Schwerpunkt dabei auf der Ermittlung der Antikörperaffinitäten. Der entscheidende Schritt bei der Entwicklung von Sandwich-Immunoassays ist die Identifizierung von Antikörpern, die hochaffin sind und paarweise das gleiche Antigen erkennen. Zudem müssen die beiden erkannten Epitope ausreichende Distanz zueinander aufweisen, um sterische Hinderung auszuschließen. Da zu den Antikörpern keine Informationen bezüglich der Epitopbindung verfügbar waren, wurden Screeningexperimente durchgeführt.

Die Messung des gebundenen Detektionsantikörpers ist im Falle von homologen

Antikörperpaaren (gleiche Tierspezies) nicht trivial. Im Gegensatz zu heterologen Antikörperpaaren kann nicht mit markiertem anti-Spezies-Antikörper detektiert werden, d. h. vor Durchführung des Screenings muss eine Markierung eingeführt werden. Da monoklonale Antikörper in der Regel zunächst als Zellkulturüberstand verfügbar sind, ist zusätzlich ein aufwändiger Reinigungsschritt notwendig. Daher wurden Methoden zur *in-situ*-Markierung von monoklonalen Antikörpern entwickelt. Als Reagenz erwiesen sich markierte anti-Maus-Antikörper in ganzer Form oder als Fab-Fragmente als geeignet. Es stellte sich heraus, dass sensitive Antikörperkombinationen aus hochaffinen Antikörpern bestehen. Andererseits ergaben zwei willkürlich gewählte hochaffine Antikörper erwartungsgemäß nicht notwendigerweise eine Antikörperkombination mit hoher Sensitivität.

Aus den Ergebnissen ließen sich Konzepte für die Entwicklung von Sandwich-Immunoassays aus monoklonalen Antikörpern ableiten. Entscheidend ist, relevante Antikörperpaare möglichst schnell zu identifizieren, da während der frühen Screeningschritte nur ein kurzes Zeitfenster zur Verfügung steht. Empfehlenswert ist vor allem eine frühzeitige Festlegung auf einen Analyten, um möglichst Mischimmunisierungen (z. B. mit Erdnussextrakt) zu vermeiden bzw. das Screening auf ein Target auszurichten und somit die weitere Vorgehensweise zu vereinfachen.

Das Screening von Antikörperpaaren mit angemessenem Aufwand soll nur mit Kombinationen durchgeführt werden, welche die affinsten Antikörper enthalten, und nicht mit allen möglichen Kombinationen ( $n^2$ ). Beim Screening ist das Mitführen von Positiv- und Negativkontrollen zur Kontrolle empfehlenswert, zudem können mit Hilfe von Überlappungen Variationen zwischen verschiedenen Platten korrigiert werden. Empfehlenswert beim Screening ist darüberhinaus, eine Standardkonzentration entsprechend der gewünschten Empfindlichkeit des finalen Tests zu wählen.

Sowohl zum Nachweis von Erdnuss- als auch von Haselnussprotein erwiesen sich schließlich Kombinationen von monoklonalen Fängerantikörpern (Maus) und polyklonalen Detektionsantikörpern (Kaninchen) als besonders günstig, besonders in Hinblick auf die Sensitivität. Selbst bei Verkürzung der Assaydauer auf  $3 \cdot 10$  min konnte in den meisten Lebensmittelmatrices Erdnuss bzw. Haselnuss mit hoher Sensitivität nachgewiesen werden. Für ganze Erdnuss lagen die Nachweisgrenzen zwischen 0,2–0,8 mg/kg in Cerealien, Eiscreme, Keksen und Schokoladen. In den gleichen Lebensmittelmatrices konnten 0,2–1,2 mg/kg ganze Haselnuss detektiert werden. Sowohl die Präzision als auch die Richtigkeit der Sandwich-Immunoassays erwiesen sich als hoch.

Bei der Untersuchung verschiedener Extraktionspuffer wurden in geringem Maß Kreuzreaktivitäten festgestellt, die teils unspezifischer Art waren. Durch Zusätze wie Fischgelatine oder Verwendung des kommerziellen Ridascreen-Extraktionspuffers konnte eine signifikante Verringerung der Kreuzreaktivitäten beobachtet werden. In den meisten Fällen war das durch Kreuzreaktivität generierte Signal geringer als die des Standards 100 µg/L Erdnuss bzw. Haselnuss (entspricht Extrakt von Lebensmittel mit 2 mg/kg Erdnuss bzw. Haselnuss). Es sollte auch berücksichtigt werden, dass die Anwendung der Immunoassays in der Regel auf zusam-

---

mengesetzte Lebensmittel beschränkt sein wird, was das Ausmaß der Kreuzreaktivitäten relativiert. Der Nachweis von z. B. 1 mg/kg Erdnuss in Soja ist aufgrund der Kreuzreaktivität nicht möglich, aber abgesehen von Wareneingangskontrollen wohl auch wenig praxisrelevant. Allerdings sollte ein Spurennachweis des Analyten in Kreuzreaktand mittels Matrixkalibrierungen dennoch möglich sein, wohl aber mit etwas höheren Nachweisgrenzen. Bei vielen Kreuzreaktanden waren die generierten Signale allerdings unterhalb der Nachweisgrenze, was insgesamt eine hohe Selektivität der Sandwich-Immunoassays dokumentiert. Mit Hilfe von enzymatischen Zusätzen ist vermutlich eine weitere Optimierung der entwickelten Extraktionspuffer möglich.

Die Sensitivitäten der Enzyme-Channeling-Assays, besonders im homogenen Format, waren gering und damit nicht für die Spurenanalytik geeignet. Vermutlich ist der Abstand der beiden verwendeten Enzyme zueinander zu groß. Weitere Experimente unter Verwendung von markierten Fab-Fragmenten anstelle der ganzen Antikörper wären hierzu empfehlenswert.

Zahlreiche kommerzielle Produkte, hauptsächlich Schokoladen, Cerealien und Kekse, wurden mit den entwickelten Sandwich-Immunoassays untersucht. Insbesondere im Falle Haselnuss wurden viele, teils stark kontaminierte Produkte gefunden, obwohl keine entsprechende Deklaration oder ein Warnhinweis auf der Verpackung vorhanden war. Mit den im Zuge der EU-Richtlinie 2003/89/EG veränderten Kennzeichnungsbestimmungen soll die Zusammensetzung von Lebensmitteln transparenter gemacht werden. Um Kontaminationen von industriell hergestellten Lebensmitteln ausschließen zu können, werden konsequent durchgeführte Wareneingangskontrollen und geeignete Maßnahmen zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen, wie z. B. durch getrennte Räumlichkeiten, erforderlich sein.

Mit immunchemischen und molekularbiologischen Methoden stehen zwei sich ergänzende Methoden zum Speziesnachweis zur Verfügung, mit denen eine gegenseitige Absicherung möglich ist. Weitere Fortschritte bei der Detektion von Allergenen werden Bemühungen zum Multianalytnachweis bringen. Hier bietet sich die Entwicklung von immunchemischen, auf Microarrays basierenden Methoden an, um alle relevanten Allergene in einem Schritt nachweisen zu können. Schließlich werden Arbeiten, die auf die Entwicklung von standardisierten Referenzmaterialien abzielen, die Vergleichbarkeit von Methoden für den Allergennachweis erleichtern und damit die Zuverlässigkeit erhöhen.



# 5 Experimenteller Teil

## 5.1 Verwendete Geräte

FPLC Chromatographiesystem (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg), bestehend aus:

FPLC-Fraktionssammler Frac-950

FPLC-Pumpe ÄKTA P-920

FPLC-Monitor UPC-900

FPLC-Ventil INV-907

FPLC-Software Unicorn 4.0

Achtkanalphotometer für Mikrotiterplatten (340 ATTC, SLT, Crailsheim)

Achtkanalpipette Transferpette 20–200 µL (Brand, Wertheim)

Achtkanalpipette Transferpette 30–300 µL (Brand, Wertheim)

Achtkanalwaschgerät (Typ Columbus) für Mikrotiterplatten (SLT, Crailsheim)

Gelchromatographie-Säulen PD-10, Sephadex G 25 (Amersham Biosciences, Freiburg)

Glassäule Omni 9, 7 mL Füllvolumen (Omnifit Ltd., Cambridge, UK)

Labormühle IKA A10 (IKA Werke, Staufen)

Leerteststäbchen Merckoquant (1.11860, Merck, Darmstadt)

Mikrotiterplatten, 96 Kavitäten, Flachboden, hohe Bindungskapazität (655061, Greiner, Frickenhausen)

Origin 7.0 Software (Microcal Software Inc., Northhampton, USA)

Parafilm M, 4 · 250 ft. (American National Can, Chicago, IL, USA)

Polypropylen-Röhrchen, 50 mL (62.548.004, Sarstedt, Nürnbergrecht)

Reaktionsgefäße, 1,7 mL (7080.1, Roth, Karlsruhe)

Reflektometer tragbar, Chromatoreader Type 3 (Otsuka Electronics Co., Osaka, Japan)

Reinstwasseranlage Milli-Q plus 185 (Millipore, Schwalbach)

Säulenmaterial Superdex 200 prep grade (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Schweden)

Schüttler für Mikrotiterplatten (Easysshaker EAS 2/4, SLT, Crailsheim)

Spritzenfilter 0,45 µm (512.2111, Merck, Darmstadt)

Ultraschallbad Sonorex Super RK106 (Bandelin, Berlin)

Waage Mettler AT261 Delta Range (Mettler-Toledo GmbH, Giessen)

Zentrifuge Biofuge 17RS (Heraeus, Hanau)

Zentrifuge Biofuge 28RS (Heraeus, Hanau)

Zentrifuge Universal 30F (Hettich, Tuttlingen)

Zentrifugenfilter Microsep 3K Omega (Pall Life Sciences, Ann Arbor, MI, USA)

## 5.2 Chemikalien und Reagenzien

### 5.2.1 Chemikalien

Aceton, Chromasolv (34850, Riedel-de Haën, Seelze)

Albumin aus Hühnerei (Grade II, A5253, Sigma, Steinheim)

Albumin aus Rinderserum (Fraktion V, A3059, Sigma, Steinheim)

Alkoholdehydrogenase aus Hefe (A8656, Sigma, Steinheim)

Amylase aus *Aspergillus oryzae* (10065, Fluka, Buchs, Schweiz)

Avidin-Glucoseoxidase-Konjugat (A-2200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)

Biotin-NHS-Ester (203112, Calbiochem, La Jolla, CA, USA)

Carboanhydrase aus Rinder-Erythrocyten (C7025, Sigma, Steinheim)

Casein (C3400, Sigma, Steinheim)

Cellulase aus *Aspergillus niger* (22178, Fluka, Buchs, Schweiz)

Cytochrom c aus Pferde-Herz (C7150, Sigma, Steinheim)

Dextranblau 2000 (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Schweden)

Dikaliumhydrogenphosphat (1.05104, Merck, Darmstadt)

N,N-Dimethylformamid (DMF, 1.03053, Merck, Darmstadt)

Dimethylsulfoxid (1.16743, Merck, Darmstadt)

Erdnuss geröstet (Knabsi, Rewe Handelsgruppe, Köln)

Erdnuss-Standard, Erdnussbutter mit > 90 % Erdnussanteil, SRM 2387 (National Institute of Standards and Technology, NIST, Gaithersburg, MD, USA)

Erdnussallergene Ara h1 und Ara h2 (Dr. Philip Wilson, Central Manchester and Manchester Children's University Hospitals, Manchester, UK)

Fischhaut-Gelatine (G7041, Sigma, Steinheim)

Glucose (G8270, Sigma, Steinheim)

Glucoseoxidase (G7141, Sigma, Steinheim)

Glycerin (032450, Alfa Aesar, Karlsruhe)

Haselnusskerne (Runde Römer, Vitalia Reformhaus GmbH, Sauerlach)

Haselnusskerne geröstet (Dr. Rudolf Fila, Masterfoods, Breitenbrunn, Österreich)

Kakaobutter (Spinnrad, Certus Handels GmbH, Norderstedt)

Kakaopulver, entölt (Bensdorp, Barry Callebaut, Norderstedt)

Kaliumdihydrogencitrat (60214, Fluka, Buchs, Schweiz)

Kaliumdihydrogenphosphat (1.12034, Merck, Darmstadt)

Kaliumsorbat (S1751, Sigma, Steinheim)

Katalase aus *Aspergillus niger* (219261, Calbiochem, La Jolla, CA, USA)

Lipase aus Schweinepankreas (L3126, Sigma, Steinheim)

LowCross-Buffer (Institut für Chemo- und Biosensorik GmbH, ICB, Münster)

Magermilchpulver (70166, Fluka, Buchs, Schweiz)  
 Meerrettich-Peroxidase (EIA grade, 814393, Roche, Basel, Schweiz)  
 Myoglobin aus Pferde-Herz (M1882, Sigma, Steinheim)  
 Natriumazid (S2002, Sigma, Steinheim)  
 Natriumcarboxymethylcellulose (mittlere Viskosität, 21902, Fluka, Buchs, Schweiz)  
 Natriumchlorid (1.06404, Merck, Darmstadt)  
 Natriumcyanoborhydrid (71435, Fluka, Buchs, Schweiz)  
 Natriumhydrogencarbonat (1.06329, Merck, Darmstadt)  
 Natriumhydroxid (1.06498, Merck, Darmstadt)  
 Natriumperiodat (1.06597, Merck, Darmstadt)  
 Protein-G-alkalische-Phosphatase-Konjugat (539305, Calbiochem, La Jolla, CA, USA)  
 Pullulanase von *Bacillus acidopullulyticus* (P2986, Sigma, Steinheim)  
 Ridascreen Allergen Extraktionspuffer (R-Biopharm AG, Darmstadt)  
 Saccharose (Raffinade, Südzucker, Mannheim)  
 Salzsäure, rauchend, 37%ig (84422, Fluka, Neu-Ulm)  
 Schwefelsäure (1.00731, Merck, Darmstadt)  
 SeaBlock Blockingreagenz (37527, Pierce, Rockford, IL, USA)  
 Sojalecithin (Spinnrad, Certus Handels GmbH, Norderstedt)  
 Testkit zur Proteinquantifizierung, Uptima MicroBC (UP75860C, Interchim, Montluçon Cedex, Frankreich)  
 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB, 1.08622, Merck, Darmstadt)  
 Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris, 154563, Aldrich, Steinheim)  
 Trypsinogen aus Rinder-Pankreas (T1143, Sigma, Steinheim)  
 Tween 20 (8.17072, Merck, Darmstadt)  
 Wasserstoffperoxid, reinst 30%ig (1.08597, Merck, Darmstadt)

### 5.2.2 Verfügbare Antikörper

Die Generierung der Antikörper innerhalb des Projekts „AllergenTest“ erfolgte durch CSL (York, UK), RIKILT-Institute of Food Safety (Wageningen, Niederlande) und IFA Tulln (Österreich). Die vorhandenen Erdnuss-Antikörper sind in Tab. 5.1 zusammengestellt, die Haselnuss-Antikörper in Tab. 5.2.

Tab. 5.1: Vorhandene Erdnuss-Antikörper (Maus: monoklonal; Kaninchen, Huhn, Schaf: polyklonal; \*Antikörper Protein-G-gereinigt).

Antikörper	Spezies	Lieferant	Antikörper	Spezies	Lieferant
#01	Huhn	IFA Tulln	51-12E3	Maus	RIKILT
#02	Huhn	IFA Tulln	51-1B6	Maus	RIKILT
#03	Huhn	IFA Tulln	51-2A12*	Maus	RIKILT
#11	Huhn	IFA Tulln	51-2H5	Maus	RIKILT

Fortsetzung Tab. 5.1

Antikörper	Spezies	Lieferant	Antikörper	Spezies	Lieferant
#12	Huhn	IFA Tulln	51-3D12	Maus	RIKILT
#16	Huhn	IFA Tulln	51-3G7	Maus	RIKILT
#17	Huhn	IFA Tulln	51-4E10	Maus	RIKILT
R646	Kaninchen	CSL	51-5D3	Maus	RIKILT
R694	Kaninchen	CSL	51-5G9	Maus	RIKILT
R695	Kaninchen	CSL	51-6F6	Maus	RIKILT
44-10D10	Maus	RIKILT	51-7C1	Maus	RIKILT
44-10H8	Maus	RIKILT	51-7G8	Maus	RIKILT
44-1B11	Maus	RIKILT	51-9F1	Maus	RIKILT
44-1C12	Maus	RIKILT	51-9G2	Maus	RIKILT
44-4G2	Maus	RIKILT	51-9H10	Maus	RIKILT
44-7A7	Maus	RIKILT	Y68*	Maus	CSL
44-8B1	Maus	RIKILT	Y69*	Maus	CSL
44-8G7*	Maus	RIKILT	Y70*	Maus	CSL
44-8H7	Maus	RIKILT	Y71*	Maus	CSL
49-2D11	Maus	RIKILT	Y72*	Maus	CSL
49-4D4	Maus	RIKILT	Y76*	Maus	CSL
51-10C5	Maus	RIKILT	Y77*	Maus	CSL
51-10F5	Maus	RIKILT	Y78*	Maus	CSL
51-10G5	Maus	RIKILT	Y79*	Maus	CSL
51-12D2*	Maus	RIKILT	PN MF	Schaf	RIKILT
51-12D7	Maus	RIKILT	PN RB	Schaf	RIKILT

Tab. 5.2: Vorhandene Haselnuss-Antikörper (Maus: monoklonal; Huhn, Kaninchen, Schaf: polyklonal; \*Antikörper Protein-G-gereinigt).

Antikörper	Spezies	Lieferant	Antikörper	Spezies	Lieferant
#04	Huhn	IFA Tulln	48-8G1	Maus	RIKILT
#05	Huhn	IFA Tulln	48-9F1	Maus	RIKILT
#13	Huhn	IFA Tulln	50-1G10	Maus	RIKILT
#14	Huhn	IFA Tulln	50-1G2*	Maus	RIKILT
#15	Huhn	IFA Tulln	50-2D9	Maus	RIKILT
#18	Huhn	IFA Tulln	50-3A11	Maus	RIKILT
#41	Huhn	IFA Tulln	50-4F2*	Maus	RIKILT
R648	Kaninchen	CSL	50-5H9*	Maus	RIKILT
R649	Kaninchen	CSL	50-6B12*	Maus	RIKILT
R650	Kaninchen	CSL	50-6B3	Maus	RIKILT
R651	Kaninchen	CSL	50-6E1*	Maus	RIKILT
R696	Kaninchen	CSL	50-6G7	Maus	RIKILT
R697	Kaninchen	CSL	50-7B8	Maus	RIKILT

Fortsetzung Tab. 5.2

Antikörper	Spezies	Lieferant	Antikörper	Spezies	Lieferant
R698	Kaninchen	CSL	50-8A3*	Maus	RIKILT
R699	Kaninchen	CSL	50-8B11	Maus	RIKILT
45-2E11	Maus	RIKILT	Y61*	Maus	CSL
45-4G2	Maus	RIKILT	Y62*	Maus	CSL
45-6G4	Maus	RIKILT	Y63*	Maus	CSL
45-7B3	Maus	RIKILT	HN RB	Schaf	RIKILT
48-10F3*	Maus	RIKILT	HN MF	Schaf	RIKILT
48-3B1*	Maus	RIKILT			

### 5.2.3 Immunchemische Reagenzien

- Anti-Erdnuss-Serum (Kaninchen, AbKem Iberia, Vigo, Spanien)
- Anti-Huhn-IgG (Kaninchen), Peroxidase-markiert (A9046, Sigma, Steinheim)
- Anti-Huhn-IgG (Kaninchen), Peroxidase-markiert (303-035-003, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA)
- Anti-Huhn-IgG (Schaf), Peroxidase-markiert (401520, Calbiochem, La Jolla, CA, USA)
- Anti-Kaninchen-IgG (Ziege), Peroxidase-markiert (PI-1000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)
- Anti-Maus-IgG-Fc (Ziege), unmarkiert (ICN 670291, MP Biomedicals, Irvine, CA, USA)
- Anti-Maus-IgG-H+L (Pferd), Peroxidase-markiert (PI-2000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)
- Anti-Maus-IgG<sub>1</sub>, alkalische-Phosphatase-markierte Fab-Fragmente (Zenon Labeling Kit, Z-25050, Molecular Probes, Eugene, OR, USA)
- Anti-Schaf-IgG (Esel), Peroxidase-markiert (A3415, Sigma, Steinheim)
- Anti-Schaf-IgG (Kaninchen), Peroxidase-markiert (402100, Calbiochem, La Jolla, CA, USA)
- IgG aus Maus, als Standard (I5381, Sigma, Steinheim)
- Mäuseserum unspezifisch (566442, Calbiochem, La Jolla, CA, USA)
- Mäuseserum unspezifisch (C37730, Promocell, Heidelberg)

### 5.2.4 Puffer

#### Carbonatpuffer (pH 9,6)

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1,59 g

NaHCO<sub>3</sub>, 2,93 g

NaN<sub>3</sub>, 0,2 g

Reinstwasser, ad 1000 mL

**Fischgelatine-Extraktionspuffer**

Tris, 1,21 g  
NaCl, 5,84 g  
Tween 20 10%ig, 10 mL  
Fischhaut-Gelatine, 5 g  
Reinstwasser, 70 mL  
2 M HCl, pH 8,2 einstellen  
Reinstwasser, ad 100 mL

**Inkubationspuffer**

BSA, 500 mg  
Tween 20 10%ig, 5 mL  
PBS, ad 100 mL

**Magermilch-Extraktionspuffer**

Tris, 1,21 g  
NaCl, 5,84 g  
Tween 20 10%ig, 10 mL  
Magermilchpulver, 10 g  
Reinstwasser, 80 mL  
2 M HCl, pH 8,2 einstellen  
Reinstwasser, ad 100 mL

**Phosphat-Kochsalz-Puffer (PBS, pH 7,6)**

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,36 g  
 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 12,2 g  
NaCl, 8,5 g  
Reinstwasser, ad 1000 mL

**Ridascreen-Extraktionspuffer**

Ridascreen-Extraktionspufferkonzentrat, 50 mL  
Reinstwasser, ad 1000 mL

**Substratpuffer (alkalische Phosphatase, 1 M, pH 9,8)**

Tris, 12,11 g  
Reinstwasser, 80 mL  
1 M  $\text{MgCl}_2$ , 50  $\mu\text{L}$   
2 M HCl, pH 9.8  
Reinstwasser, ad 100 mL

**Substratpuffer (Peroxidase, pH 3,8)**

KH<sub>2</sub>-Citrat, 46,04 g  
Kaliumsorbat, 0,1 g  
Reinstwasser, ad 1000 mL

**Waschpufferkonzentrat**

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,17 g  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 73,16 g  
NaCl, 52,6 g  
Tween 20, 30 mL  
Reinstwasser, ad 1000 mL

**Waschpuffer**

Waschpufferkonzentrat, 42 mL  
Reinstwasser, ad 2500 mL

**5.2.5 Spezialreagenzien**

**4-Nitrophenylphosphat-Lösung (0,67 M)**

4-Nitrophenylphosphat, Natriumsalz · 6 H<sub>2</sub>O, 250 mg  
Reinstwasser, 1,0 mL

**Substratlösung (alkalische Phosphatase)**

Substratpuffer (alkalische Phosphatase), 25 mL  
4-Nitrophenylphosphat-Lösung, 430 µL

**Substratlösung (Peroxidase)**

Substratpuffer (Peroxidase), 25 mL  
TMB-Stammlösung, 300 µL  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1%ig, 100 µL

**Stopp-Lösung**

Schwefelsäure 98%ig, 50 mL  
Reinstwasser, ad 1000 mL

**TMB-Stammlösung**

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), 50 mg  
DMSO, 4 mL

## 5.3 Standardprozeduren

### 5.3.1 Herstellung von Standards und Probenextrakten

#### Homogenat aus Erdnuss/Haselnuss und Saccharose

Eine Mischung von 2 g Erdnuss-Standard (90 % Erdnuss) oder 2 g Haselnuss und 18 g Saccharose wird in der Labormühle homogenisiert. Die 1 : 10-Homogenate sind bei -18 °C mehrere Monate stabil.

#### CMC-Standardlösung

12 g Carboxymethylcellulose werden in 600 mL Reinstwasser gelöst. Als Stabilisatoren werden 6 g Natriumazid und 1,5 g Rinderserumalbumin zugegeben. Zu 70 mL Carboxymethylcellulose-Lösung werden 778 mg Erdnuss-Homogenat bzw. 700 mg Haselnuss-Homogenat gegeben und gründlich durchgeschüttelt. Die Standardlösungen (1 g/L Erdnuss bzw. Haselnuss) sind bei Raumtemperatur mehrere Wochen stabil.

#### Dotierung der Lebensmittel

In ein Polypropylen-Röhrchen wird 1 g einer Lebensmittelmatrix eingewogen, die zuvor auf Kontaminationsfreiheit überprüft wurde. CMC-Standardlösung wird 1 : 10 mit PBS verdünnt und eine der Dotierung entsprechenden Menge zupipettiert. Schokoladen und Eiscreme werden vor der Dotierung bei 40–50 °C geschmolzen.

#### Extraktion der Proben

Um Verschleppungen zu vermeiden, wird vor jedem Mahlvorgang der Mahlbehälter der Labormühle in seine Einzelteile zerlegt und diese unter Verwendung von Spülmittel, heißem Wasser und Reagenzglasbüsten sorgfältig gereinigt. In der Labormühle werden > 5 g Probe homogenisiert und 1,00 g in ein Polypropylen-Röhrchen eingewogen. Bei schokoladehaltigen Proben wird 1 g Magermilchpulver zugegeben. 20 mL Extraktionspuffer werden zupipettiert und die 20-minütige Extraktion bei 60 °C durch mehrfaches starkes Schütteln unterstützt. Die Extrakte werden in Reaktionsgefäße (1,7 mL) überführt und in der Biofuge 28RS bei 17.000 rpm und 20 °C 30 min zentrifugiert. Die Entfernung von verbliebenen Partikeln erfolgt mittels Spritzenfiltern mit einer Porenweite von 0,45 µm.

#### Herstellung der Standards

Von dem Erdnuss- bzw. Haselnuss-Saccharose-Homogenat werden 2,000 g in ein Polypropylen-Röhrchen eingewogen und in identischer Weise wie die Proben extrahiert. Dabei werden Standards mit den Konzentrationen 9 g/L ganze Erdnuss bzw. 10 g/L ganze Haselnuss erhalten. Die Standards werden aliquotiert und bei -18 °C gelagert. Zur Herstellung von Verdünnungsreihen wird frisch aufgetauter Standard mit Extraktionspuffer verdünnt.

### 5.3.2 Immunoassay mit immobilisiertem Antigen

**Beschichtung:** In die Kavitäten einer Mikrotiterplatte werden jeweils 240  $\mu\text{L}$  Carbonatpuffer (Blank) bzw. Erdnuss/Haselnuss-Standards in Carbonatpuffer pipettiert. Die Platte wird mit Parafilm verschlossen, über Nacht auf dem Schüttler inkubiert und mit dem Waschgerät dreimal mit je 400  $\mu\text{L}$  Waschlösung im Overflow-Modus gewaschen.

**Blocking:** Zur Minimierung von unspezifischen Bindungen werden die Kavitäten mit je 250  $\mu\text{L}$  einer 1,5%igen Lösung von BSA in PBS eine Stunde lang auf dem Schüttler geblockt und im Anschluss gewaschen.

**Inkubation von Antikörper:** In die Kavitäten werden jeweils 200  $\mu\text{L}$  einer Verdünnung des Antikörpers in Inkubationspuffer pipettiert und eine Stunde lang unter Parafilm auf dem Schüttler inkubiert. Danach wird die Platte erneut gewaschen.

**Anti-Spezies-Antikörper:** Peroxidase-markierter anti-Spezies-Antikörper (anti-Kaninchen aus Ziege bzw. anti-Maus aus Pferd) wird 1 : 10.000 mit Inkubationspuffer verdünnt und je 150  $\mu\text{L}$  in die Kavitäten pipettiert. Die Platte wird erneut mit Parafilm verschlossen und für eine Stunde auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wird die Platte gewaschen.

**Farbreaktion:** Die Kavitäten der Mikrotiterplatte werden mit je 200  $\mu\text{L}$  einer frisch zubereiteten Substratlösung (Peroxidase) gefüllt und sofort mit Aluminiumfolie zum Schutz vor Lichteinwirkung abgedeckt. In regelmäßigen Abständen wird die Farbentwicklung beobachtet.

**Abstoppen:** Die Farbentwicklung wird mittels Zugabe von 100  $\mu\text{L}$  Schwefelsäure spätestens nach 30 min abgestoppt, wobei die Farbe von blau nach gelb umschlägt. Die Absorption sollte in der nachfolgenden Messung nicht wesentlich höher als eins sein.

**Messung und Auswertung:** Die Absorptionsmessung erfolgt mit einem Achtkanalphotometer bei einer Wellenlänge von 450 nm. Die Werte werden in einer ASCII-Datei gespeichert, die Auswertung erfolgt mit Hilfe der Software Origin 7.0. Es wird jeweils der gegen Ausreißer robuste Median berechnet und eine sigmoidale Kurve gefittet.

### 5.3.3 Immunoassay mit immobilisiertem Antikörper

**Vorbeschichtung:** In die Kavitäten einer Mikrotiterplatte werden 200  $\mu\text{L}$  von 1 : 3.000 mit Carbonatpuffer verdünntem anti-Maus-IgG-Fc (Ziege) pipettiert. Die Platte wird mit Parafilm verschlossen und bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Die Platte wird dreimal mit je 400  $\mu\text{L}$  Waschlösung im Overflow-Modus gewaschen.

**Beschichtung:** Zellkulturüberstände werden 1 : 100, gereinigte monoklonale Antikörper 1 : 1.000 in Inkubationspuffer verdünnt. Jeweils 200  $\mu\text{L}$  Antikörperlösung werden in die entsprechende Kavität pipettiert. Die Platte wird erneut mit Parafilm verschlossen, für drei Stunden inkubiert und danach gewaschen.

**Inkubation:** Die biotinylierten Erdnuss- bzw. Haselnuss-Extrakte werden in Magermilch + 0,5 % Tween 20 verdünnt. Von diesen Standards werden je 150  $\mu\text{L}$  in die entsprechende Kavität pipettiert und die Platte mit Parafilm verschlossen. Nach einstündiger Inkubation wird die Platte gewaschen.

**Zugabe Konjugat:** Das Konjugat aus Streptavidin und alkalischer Phosphatase wird 1 : 21.000 in Inkubationspuffer verdünnt und davon je 200  $\mu\text{L}$  in die Kavitäten pipettiert. Nach einstündiger Inkubation wird die Platte gewaschen.

**Farbreaktion:** 200  $\mu\text{L}$  Substratlösung (alkalische Phosphatase) werden in jede Kavität pipettiert und die Absorption bei 405 bzw. 450 nm nach einer Stunde bzw. nach Inkubation über Nacht gemessen.

### 5.3.4 Indirekt-kompetitiver Immunoassay

**Beschichtung:** In die Kavitäten einer Mikrotiterplatte werden 240  $\mu\text{L}$  in Carbonatpuffer verdünnter Erdnuss- bzw. Haselnuss-Standard pipettiert. Die Mikrotiterplatte wird mit Parafilm verschlossen, zur Beschichtung über Nacht auf den Schüttler gestellt und danach gewaschen.

**Blocking:** Zum Blocken der Mikrotiterplatte werden die Kavitäten mit je 250  $\mu\text{L}$  einer 1,5%igen Lösung von BSA in PBS befüllt, die Platte mit Parafilm verschlossen und eine Stunde auf dem Schüttler inkubiert. Danach wird die Platte erneut gewaschen.

**Kompetition:** In die Kavitäten werden zunächst jeweils 100  $\mu\text{L}$  Inkubationspuffer (blank) bzw. Erdnuss- bzw. Haselnuss-Standards in Inkubationspuffer pipettiert. Unmittelbar danach werden je 100  $\mu\text{L}$  einer in Inkubationspuffer verdünnten Antikörperlösung zupipettiert und die Platte mit Parafilm verschlossen. Nach einstündiger Inkubation auf dem Schüttler wird die Platte gewaschen.

Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgt wie in Kap. 5.3.2 beschrieben.

### 5.3.5 Messung von Erdnuss- bzw. Haselnussprotein

**Beschichtung:** In die Kavitäten einer Mikrotiterplatte werden jeweils 100  $\mu\text{L}$  einer Lösung von Fängerantikörper pipettiert. Zur Bestimmung von Erdnuss wird dazu monoklonaler Antikörper Y70 1 : 200 (2,8 mg/L IgG) in PBS und zur Bestimmung von Haselnuss wird monoklonaler Antikörper 50-6B12 1 : 500 (2,6 mg/L IgG) in PBS verwendet. Die Mikrotiterplatte wird mit Parafilm verschlossen und nach einstündiger Inkubation (Schüttler) gewaschen.

**Blocking:** Jeweils 200  $\mu\text{L}$  einer Lösung von 3 % Magermilchpulver in PBS werden in die Kavitäten transferiert. Nach einstündiger Inkubation wird die Mikrotiterplatte erneut gewaschen.

**Inkubation Probe:** Jeweils 100  $\mu\text{L}$  Probe bzw. Standard werden innerhalb einer Minute in die Kavitäten pipettiert und die Platte exakt für 10 min auf dem Schüttler inkubiert und unmittelbar danach gewaschen. Um alle Proben innerhalb von einer Minute pipettieren zu können, werden nur jeweils drei Streifen (Spalten) der Mikrotiterplatte für den Test verwendet. Für hohen Probendurchsatz werden

alternativ je 150  $\mu\text{L}$  Probe gemäß gewünschter Konstellation in eine nichtadsorbierende Platte (Glas) pipettiert und mittels Achtkanalpipette (100  $\mu\text{L}$ , jeweils frische Pipettenspitzen) innerhalb einer Minute in die vorbeschichtete Mikrotiterplatte transferiert.

**Detektionsantikörper:** Detektionsantikörper wird 1 : 1.000 in 1 % Magermilch enthaltenden PBS verdünnt. Zur Bestimmung von Erdnuss wird hierfür Peroxidase-Konjugat des polyklonalen Antikörpers R695 (nach Verdünnung 0,63 mg/L IgG) verwendet, zur Bestimmung von Haselnuss Peroxidase-Konjugat des polyklonalen Antikörpers R698 (nach Verdünnung 0,83 mg/L IgG). Jeweils 100  $\mu\text{L}$  Detektionsantikörper werden in jede Kavität pipettiert und nach exakt zehnmünütiger Inkubation auf dem Schüttler wird die Platte gewaschen.

**Farbreaktion:** Die Detektion der gebundenen Peroxidase erfolgt mittels Zugabe von jeweils 100  $\mu\text{L}$  frisch hergestellter Substratlösung. Nach exakt zehn Minuten werden die Farbentwicklung gestoppt und die Absorptionen bestimmt (siehe Kap. 5.3.2).

In der frühen Optimierungsphase der Sandwich-Immunoassays wurden die Beschichtungen der Mikrotiterplatten über Nacht durchgeführt. Die restlichen Inkubationszeiten betragen in der Regel jeweils eine Stunde, die Farbentwicklung 15–30 min.

### 5.3.6 Messung von Maus-IgG

**Beschichtung:** Zur Beschichtung der Mikrotiterplatten werden jeweils 300  $\mu\text{L}$  anti-Maus-Antikörper (Ziege, 1 : 3.000 in Carbonatpuffer) in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte pipettiert. Nach Inkubation über Nacht auf dem Schüttler wird die Platte gewaschen.

**Standards:** Jeweils 200  $\mu\text{L}$  der IgG-Standards (0,1, 0,3, 1, 3, ..., 1.000  $\mu\text{g/L}$  in PBS) bzw. Zellkulturüberstand oder Antikörperlösung (1 : 300–1 : 100.000 in PBS) werden in den Kavitäten pipettiert und über Nacht inkubiert.

**Blocking:** Nach Waschen der Platte werden 300  $\mu\text{L}$  einer durch Erhitzen hergestellten 1%igen Caseinlösung in PBS in jede Kavität pipettiert. Nach einstündiger Inkubation wird die Platte gewaschen.

**Detektionsantikörper:** Peroxidase-Konjugat von anti-Maus-Antikörper (Pferd) wird 1 : 50.000 in PBS verdünnt. Je 200  $\mu\text{L}$  werden in die Kavitäten pipettiert und die Platte nach dreistündiger Inkubation erneut gewaschen. Die Detektion der Menge an gebundenem Detektionsantikörper erfolgt wie in Kap. 5.3.2 beschrieben.

### 5.3.7 Screening von heterologen Antikörperpaaren

**Vorbeschichtung:** Die Kavitäten einer Mikrotiterplatte werden mit je 200  $\mu\text{L}$  einer Lösung des anti-Spezies-Antikörpers (entsprechend des gewünschten Fängerantikörpers) in Carbonatpuffer beschichtet. Die Mikrotiterplatte wird mit Parafilm verschlossen, über Nacht auf dem Schüttler inkubiert und gewaschen.

**Beschichtung:** 200  $\mu\text{L}$  des in Inkubationspuffer verdünnten Fängerantikörpers (1:1.000; gereinigte monoklonale Antikörper 1:2.000) werden in die Kavitäten pipettiert. Nach dreistündiger Inkubation wird die Platte erneut gewaschen.

**Standards:** 150  $\mu\text{L}$  Erdnuss- oder Haselnuss-Standard, verdünnt in Magermilch mit 0,5 % Tween 20, werden in die Kavitäten pipettiert, für eine Stunde inkubiert und die Platte danach gewaschen.

**Detektionsantikörper:** 200  $\mu\text{L}$  Detektionsantikörper, verdünnt in Inkubationspuffer (1:1.000, Kaninchen-Antikörper 1:5.000), werden in die Kavitäten pipettiert. Nach einstündiger Inkubation wird die Mikrotiterplatte gewaschen.

**Markierter anti-Spezies-Antikörper:** In Inkubationspuffer wird eine Verdünnung von Peroxidase-markiertem anti-Spezies-Antikörper hergestellt (anti-Huhn: 1:5.000; anti-Kaninchen: 1:6.000; anti-Schaf: 1:3.000; anti-Maus: 1:6.000) und jeweils 200  $\mu\text{L}$  in die entsprechenden Kavitäten pipettiert. Nach einstündiger Inkubation wird die Mikrotiterplatte gewaschen. Die Farbreaktion erfolgt wie in Kap. 5.3.2 beschrieben.

### 5.3.8 Proteinmessung mittels BCA-Assay

Als Proteinstandards werden Verdünnungsreihen von Rinderserumalbumin oder Ovalbumin (0,5–100 mg/L) hergestellt. Die Reagenzien A, B und C des MicroBC-Assay-Testkits werden im Verhältnis 25:25:1 (v/v/v) gemischt [323]. Jeweils 150  $\mu\text{L}$  Probe bzw. Standard werden in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte pipettiert und 150  $\mu\text{L}$  der Reagenzienmischung zugegeben. Die Mikrotiterplatte wird bei 37°C 60 min inkubiert und nach Abkühlung auf Raumtemperatur werden die Absorptionen bei 550 nm gemessen.

### 5.3.9 Konjugation von Antikörpern mit Peroxidase

**Aktivierung der Meerrettich-Peroxidase:** Etwa 1,5 mg Peroxidase aus Meerrettich werden in 100  $\mu\text{L}$  PBS gelöst. In einem Braunglasfläschchen werden 18,8 mg Natriumperiodat in 1 mL Reinstwasser gelöst (88 mM). Die Oxidation wird durch Zugabe von 10  $\mu\text{L}$  Periodat-Lösung zu je 100  $\mu\text{L}$  Peroxidase-Lösung gestartet. Nach 20-minütiger Reaktion im Dunklen, wobei die Farbe von braun nach grün umschlägt, wird die oxidierte Peroxidase von den niedermolekularen Reagenzien mittels einer mit PBS equilibrierten PD-10 Säule abgetrennt. Die farbige Bande (oxidierte Peroxidase) wird dabei visuell möglichst knapp geschnitten.

**Präparation des IgG:** Niedermolekulare Bestandteile der Antikörperlösung werden mit Hilfe einer PD-10-Säule nach Herstellerangaben abgetrennt. Je Ansatz werden 0,1–0,5 mg IgG eingesetzt, PBS dient als Chromatographiepuffer. Mittels Zentrifugenfiltern (Cutoff 3 kDa) wird anschließend auf  $\approx 1$  g/L IgG aufkonzentriert.

**Konjugation:** Aktivierte Peroxidase wird zur IgG-Lösung gegeben, sodass ein äquivalentes Massenverhältnis von Peroxidase und IgG erreicht wird, entsprechend einem molaren Überschuss der Peroxidase von 3,75:1. Zur weiteren Auf-

konzentrierung während der Reaktion wird der Ansatz im Zentrifugenfilter jeweils eine Stunde lang zunächst bei 1000 rpm, dann bei 2000 rpm zentrifugiert. Eine 5 M Natriumcyanoborhydrid-Lösung wird durch Zugabe von 75 mg Natriumcyanoborhydrid zu 240  $\mu$ L einer 1 M Natronlauge hergestellt. Zu je 1 mL Peroxidase/IgG-Ansatz werden 10  $\mu$ L Natriumcyanoborhydrid-Lösung gegeben und der Ansatz anschließend 30 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Tris-Lösung (1 M) wird durch Auflösen von 121 mg Tris in 1 mL Reinstwasser hergestellt und 50  $\mu$ L Tris-Lösung zu je 1 mL Peroxidase/IgG-Ansatz gegeben. Der Ansatz wird erneut 30 min lang bei 1000 rpm zentrifugiert und schließlich werden die niedermolekularen Bestandteile mittels PD-10-Säule unter Verwendung von PBS als Chromatographiepuffer abgetrennt.

**Lagerung:** Zur Aufbewahrung werden 10 mg BSA und 1 mL Glycerin je mL Konjugat zugegeben. Die homogenisierte Lösung wird aliquotiert und bei  $-18^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 5.3.10 *In-situ*-Markierung von Antikörpern

### 5.3.10.1 Markierung mittels Fab-Fragmenten

Zellkulturüberstände bzw. gereinigte Antikörper werden mit PBS auf eine Konzentration von 400  $\mu\text{g/L}$  IgG verdünnt. Zu je 4 mL Antikörperlösung werden 5  $\mu$ L Fab-Reagenz (Zenon A) pipettiert, wodurch eine finale Konzentration von 250  $\mu\text{g/L}$  markierter Fab-Fragmente erhalten wird. Überschüssige Fab-Fragmente werden nach 30 min durch Zugabe von 2 mL Mäuseserum (1:250 in PBS) je mL Antikörper-Fab-Mischung geblockt. Nach weiteren 10 min werden jeweils 150  $\mu$ L der Mischung in eine Mikrotiterplatte überführt, welche mit Antigen oder mit Fängerantikörper und Antigen vorbeschichtet wurde und 50  $\mu$ L Mäuseserum (1:500 in PBS) enthält. Die Menge an gebundener alkalischer Phosphatase wird detektiert wie unter Kap. 5.3.3 beschrieben.

### 5.3.10.2 Markierung mittels Protein G

Zu einer verdünnten Lösung von Konjugat aus Protein G und alkalischer Phosphatase (1:200–10.000 in PBS) wird Zellkulturüberstand bzw. Lösung von gereinigtem monoklonalen Antikörper pipettiert. Jeweils 150  $\mu$ L der vorinkubierten Mischung und einer Blocking-Lösung (Magermilch, Pferdeserum oder Mäuseserum) werden in eine Mikrotiterplatte aus Glas pipettiert. Nach einer bestimmten Inkubationsdauer werden 200  $\mu$ L der Mischung in eine mit Antigen bzw. mit Fängerantikörper und Antigen vorbeschichtete Mikrotiterplatte überführt. Nach einstündiger Inkubation wird die Mikrotiterplatte gewaschen und die Menge an gebundener alkalischer Phosphatase detektiert wie unter Kap. 5.3.3 beschrieben.

### 5.3.10.3 Markierung mittels anti-Maus-Antikörper

Konjugat aus POD und anti-Maus-Antikörper (Pferd) wird 1 : 5.000 in PBS verdünnt. Zellkulturüberstand bzw. Lösung von gereinigtem monoklonalen Antikörper wird zugegeben, sodass eine Konzentration von 200 µg/L IgG erhalten wird. Nach 30-minütiger Inkubation wird zu jeweils 2 mL Antikörper-Mischung 1 mL Mäuseserum (1 : 170 in PBS) gegeben. Jeweils 150 µL dieser Mischung werden nach 15-minütiger Inkubation in eine Mikrotiterplatte transferiert, welche mit Antigen bzw. mit Antikörper und Antigen vorbeschichtet und gewaschen ist und mit jeweils 50 µL Mäuseserum (1 : 500 in PBS) beschickt ist. Die Platte wird mit Parafilm verschlossen und für eine Stunde auf dem Schüttler inkubiert. Die Detektion der gebundenen Peroxidase erfolgt wie unter Kap. 5.3.2 beschrieben.

### 5.3.11 Biotinylierung von Antikörpern

Eine Lösung von 10 g/L NHS-Biotin in DMF wird hergestellt und zu Zellkulturüberstand bzw. zu Lösung von gereinigtem Antikörper (Verdünnungen bis 1 : 50.000 in 0,1 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,4) pipettiert (10–400 µg NHS-Biotin pro mg IgG). Nach vierstündiger Reaktion werden je 200 µL der Lösung in verschiedenen Verdünnungen in die Kavitäten einer vorbereiteten Mikrotiterplatte überführt. Die Mikrotiterplatte wurde zuvor sukzessive mit anti-Maus-Antikörper und Fängerantikörper vorbeschichtet, mit Mäuseserum (1 : 1.000 in Inkubationspuffer, 1 h) geblockt und schließlich mit 150 µL Standards (1 mg/L Erdnuss in Magermilch + 0,5 % Tween 20) eine Stunde lang inkubiert und gewaschen. Nach einstündiger Inkubation der biotinylierten Antikörper wird die Platte gewaschen und 200 µL Konjugat aus Streptavidin und alkalischer Phosphatase (1 : 21.000 in Inkubationspuffer) zugegeben. Nach einer weiteren einstündigen Inkubation wird die Menge an gebundener alkalischer Phosphatase detektiert wie in Kap. 5.3.3 beschrieben.

### 5.3.12 Biotinylierung von Proteinextrakten

Mit Hilfe einer PD-10-Gelchromatographiesäule wird Erdnuss- bzw. Haselnuss-Extrakt (2,5 mL) unter Verwendung von 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> als Eluent umgepuffert. Das Eluat enthält  $\approx$  0,6 g/L Protein bzw.  $\approx$  0,19 mM Lysin. Eine Lösung von 10 mg NHS-Biotin in 1 mL DMSO wird hergestellt und 10–320 µL (0,3–9,4 µmol) dieser Lösung werden zu 10 mL Eluat pipettiert. Nach einstündiger Reaktion bei Raumtemperatur werden die Proteine von niedermolekularen Komponenten mittels PD-10-Säule und Verwendung von PBS als Chromatographiepuffer abgetrennt.

### 5.3.13 Herstellung von Schokoladen

Zartbitterschokolade mit einem Kakaoanteil von 50 % und Milkschokolade mit einem Kakaoanteil von 30 % werden simuliert. Statt Kakaomasse wird Kakaopulver

verwendet und eine Berechnung der Zutaten basierend auf einem Kakaobuttergehalt von 55 % in Kakaomasse und von 20 % in entöltem Kakaopulver durchgeführt. Zartbitterschokolade mit einem Kakaoanteil von 50 % besteht aus 50 % Kakaomasse, 45 % Zucker, 4,5 % Kakaobutter und 0,5 % Lecithin. Als Rezeptur (40 g) ergibt sich damit 11,25 g Kakaopulver, 18 g Zucker, 10,55 g Kakaobutter und 0,2 g Lecithin. Milkschokolade mit einem Kakaoanteil von 30 % besteht in der Regel aus 30 % Kakaomasse, 35 % Zucker, 14,5 % Kakaobutter, 20 % Magermilchpulver und 0,5 % Lecithin. Die Milkschokolade wird damit aus 6,75 g Kakaopulver, 14 g Zucker, 11,05 g Kakaobutter, 8 g Magermilchpulver und 0,2 g Lecithin hergestellt. Zur Erreichung einer geeigneten Konsistenz erwies es sich als günstig, zunächst den Zucker in der Labormühle zu vermahlen und sukzessive Kakaopulver, Lecithin, Magermilchpulver (für Milkschokolade) und zuletzt Kakaobutter zuzugeben. Die homogene Mischung wird unter mehrmaligem Rühren 24 Stunden lang bei  $\approx 50^\circ\text{C}$  im Trockenschrank belassen. Die Lagerung der Schokoladen erfolgt an einem kühlen und dunklen Ort. Um Kontaminationen weitgehend auszuschließen, werden alle verwendeten Zutaten zuvor mittels Sandwich-Immunoassays kontrolliert.

### 5.3.14 Lateral-Flow-Schnelltests

80  $\mu\text{L}$  Standard bzw. Lebensmittelextrakt (siehe Kap. 5.3.1) werden in das Probenaufgabefenster des Lateral-Flow-Schnelltests getropft. Nach 10 Minuten wird die Signalentwicklung visuell beobachtet und anschließend mittels Densitometer gemessen. Wenn bei der Kontrolllinie (C) keine Signalentwicklung beobachtet werden kann, ist der Test fehlerhaft und wird wiederholt. Der Test ist positiv bei Signalentwicklung an der Testlinie (T), ansonsten negativ.

## 5.4 Gelchromatographie

Eine Glassäule (Länge 22 cm, Innendurchmesser 0,66 cm, Volumen  $\approx 6,9$  mL) wird mit Superdex 200 prep grade nach Herstellerangaben gepackt [340]. Der Acetontest dient zur Überprüfung der Qualität der Säulenpackung. Dazu wird eine Lösung von 10 g/L Aceton in Wasser injiziert und die Anzahl der theoretischen Böden aus den ermittelten Werten von Elutionsvolumen und Halbwertsbreite des Peaks berechnet [340].

Die Gelchromatographie wird durchgeführt am FPLC-System, bestehend aus Pumpen, Probenaufgabeventil, Gelchromatographiesäule, UV-Zelle und Fraktioniereinheit. Die Absorptionen werden bei 280 nm gemessen und die Datenaufzeichnung erfolgt mit der Software Unicorn 4.0.

Als Laufmittel wird entgaster PBS bei einer Flussrate von 0,2 mL/min verwendet. Das Volumen der Probenaufgabenschleife beträgt 100  $\mu\text{L}$  und 300  $\mu\text{L}$  Probe werden injiziert (Overflow-Injektion). Es werden jeweils 100- $\mu\text{L}$ -Fraktionen in Mikrotiterplatten gesammelt, um diese mittels Immunoassays oder BCA-Test weiter untersuchen zu können.



## 6 Abkürzungen

<b>ABTS</b>	2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazolinsulfonat(6)]
<b>ADI</b>	akzeptable tägliche Aufnahmemenge (Acceptable Daily Intake)
<b>ARIS</b>	Apoenzym-Reaktivierungsimmoassay-System
<b>AU</b>	willkürliche Einheiten (Arbitraty Units)
<b>BCA</b>	Bicinchoninsäure
<b>BSA</b>	Rinderserumalbumin
<b>cDNA</b>	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (Complementary DNA)
<b>CMC</b>	Carboxymethylcellulose
<b>CV</b>	Variationskoeffizient
<b>DBPCFC</b>	Double-Blind Placebo-Controlled Food Challenge
<b>DMF</b>	Dimethylformamid
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>EAST</b>	Enzymallergosorbent-Test
<b>EIA</b>	Enzymimmunoassay
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
<b>FG</b>	Fischgelatine-Extraktionspuffer
<b>FPLC</b>	Fast Protein Liquid Chromatography
<b>GOD</b>	Glucoseoxidase
<b>HACCP</b>	Hazard Analysis and Critical Control Points
<b>IC<sub>50</sub></b>	Testmittelpunkt der sigmoidalen Kalibrierkurve
<b>IEF</b>	isoelektrische Fokussierung
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>LFD</b>	Lateral-Flow-Schnelltest (Lateral Flow Device)
<b>LMKV</b>	Lebensmittel-Kennzeichnungsverordnung
<b>MHC</b>	Haupthistokompatibilitätskomplex
<b>MM</b>	Magermilch-Extraktionspuffer
<b>MTP</b>	Mikrotiterplatte
<b>MW</b>	Molekulargewicht
<b>NHS</b>	N-Hydroxysuccinimid
<b>NWG</b>	Nachweisgrenze
<b>oNPG</b>	o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
<b>OVA</b>	Ovalbumin
<b>PAGE</b>	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>PBS</b>	Phosphat-Kochsalz-Puffer

<b>PBST</b>	Phosphat-Kochsalz-Puffer mit Zusatz von Tween 20
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion
<b>pNPP</b>	p-Nitrophenylphosphat
<b>POD</b>	Peroxidase
<b>PRIST</b>	Papier-Radioimmunosorbent-Test
<b>RAST</b>	Radioallergosorbent-Test
<b>RB</b>	Ridascreen-Extraktionspuffer
<b>RIA</b>	Radioimmunoassay
<b>RIE</b>	Rocket-Immunelektrophorese
<b>RISA</b>	Radioimmunosorbent-Assay
<b>RIST</b>	Radioimmunosorbent-Test
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>RT</b>	Zimmertemperatur
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>TBS</b>	Tris-Kochsalz-Puffer
<b>TMB</b>	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>WF</b>	Wiederfindung

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] R. Wahl. *Allergie ganz einfach*. Dustri-Verlag Dr. Karl Feistle, München-Deisenhofen, **1995**.
- [2] H. J. Gould, B. J. Sutton, A. J. Beavil, R. L. Beavil, N. McCloskey, H. A. Coker, D. Fear, L. Smurthwaite. The Biology of IgE and the Basis of Allergic Disease. *Annual Review of Immunology* **21** (2003) 579–628.
- [3] J. Ring, U. Kramer, T. Schäfer, H. Behrendt. Why are Allergies Increasing? *Current Opinion in Immunology* **13** (2001) 701–708.
- [4] J. L. Huggins, R. J. Looney. Allergen Immunotherapy. *American Family Physician* **70** (2004) 689–696.
- [5] G. F. Schäppi, V. Konrad, D. Imhof, R. Etter, B. Wüthrich. Hidden Peanut Allergens Detected in Various Foods: Findings and Legal Measures. *Allergy* **56** (2001) 1216–1220.
- [6] Richtlinie 2003/89/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 10. November 2003. *Amtsblatt der Europäischen Union* **308** (2003) 15–18.
- [7] M. Besler. Determination of Allergens in Foods. *Trac – Trends in Analytical Chemistry* **20** (2001) 662–672.
- [8] R. E. Poms, C. L. Klein, E. Anklam. Methods for Allergen Analysis in Food: A Review. *Food Additives and Contaminants* **21** (2004) 1–31.
- [9] C. Bindslev-Jensen, D. Briggs, M. Osterballe. Can We Determine a Threshold Level for Allergenic Foods by Statistical Analysis of Published Data in the Literature? *Allergy* **57** (2002) 741–746.
- [10] S. L. Taylor, S. L. Hefle, C. Bindslev-Jensen, S. A. Bock, A. W. Burks, L. Christie, D. J. Hill, A. Host, J. O. B. Hourihane, G. Lack, D. D. Metcalfe, D. A. Moneret-Vautrin, P. A. Vadas, F. Rance, D. J. Skrypec, T. A. Trautman, I. Malmheden-Yman, R. S. Zeiger. Factors Affecting the Determination of Threshold Doses for Allergenic Foods: How Much is Too Much? *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **109** (2002) 24–30.
- [11] R. Krska, E. Welzig, S. Baumgartner. Immunoanalytical Detection of Allergenic Proteins in Food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **378** (2004) 63–65.

- [12] H. A. Sampson. Food Allergy. Part 1: Immunopathogenesis and Clinical Disorders. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **103** (1999) 717–728.
- [13] R. R. A. Coombs, P. G. H. Gell. Classification of Allergic Reactions Responsible for Clinical Hypersensitivity and Disease. In: P. G. H. Gell, R. R. A. Coombs (Hg.) *Clinical Aspects of Immunology*, Blackwell, Oxford, **1968**, S. 575–596.
- [14] E. N. C. Mills, C. Madsen, P. R. Shewry, H. J. Wicher. Food Allergens of Plant Origin – Their Molecular and Evolutionary Relationships. *Trends in Food Science and Technology* **14** (2003) 145–156.
- [15] J. P. Kinet. The High-Affinity IgE Receptor (Fc Epsilon RI): From Physiology to Pathology. *Annual Review of Immunology* **17** (1999) 931–972.
- [16] I. M. Roitt. *Leitfaden der Immunologie*. Blackwell Wissenschaft, Berlin, **1993**.
- [17] P. S. Norman. Immunotherapy: 1999–2004. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **113** (2004) 1013–1023.
- [18] R. Bredehorst, K. David. What Establishes a Protein as an Allergen? *Journal of Chromatography B* **756** (2001) 33–40.
- [19] E. N. C. Mills, J. A. Jenkins, M. J. C. Alcocer, P. R. Shewry. Structural, Biological, and Evolutionary Relationships of Plant Food Allergens Sensitizing via the Gastrointestinal Tract. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **44** (2004) 379–407.
- [20] A. de Weck. Immunologische Grundlagen und funktionelle Pathologie der allergischen Hautreaktionen. In: M. Werner, V. Ruppert (Hg.) *Praktische Allergiediagnostik*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1985**, S. 29–40.
- [21] S. H. Sicherer, T. J. Furlong, H. H. Maes, R. J. Desnick, H. A. Sampson, B. D. Gelb. Genetics of Peanut Allergy: A Twin Study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **106** (2000) 53–56.
- [22] C. P. Simon. Was die Welt isst. *GEO Magazin* **4** (2005) 16–48.
- [23] J. Ring. Allergy and Modern Society: Does 'Western Life Style' Promote the Development of Allergies? *International Archives of Allergy and Immunology* **113** (1997) 7–10.
- [24] M. Jutel, T. Watanabe, S. Klunker, M. Akdis, O. A. R. Thomet, J. Malolepszy, T. Zak-Nejmark, R. Koga, T. Kobayashi, K. Blaser, C. A. Akdis. Histamine Regulates T-Cell and Antibody Responses by Differential Expression of H1 and H2 Receptors. *Nature* **413** (2001) 420–425.

- [25] V. Brusic, N. Petrovsky. Bioinformatics for Characterisation of Allergens, Allergenicity and Allergic Crossreactivity. *Trends in Immunology* **24** (2003) 225–228.
- [26] M. Werner. Einführung in die Allergiediagnostik. In: M. Werner, V. Ruppert (Hg.) *Praktische Allergiediagnostik*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1985**, S. 1–12.
- [27] H. Michel. Nutzen und Wert von diagnostischen Hauttestungen. In: M. Werner, V. Ruppert (Hg.) *Praktische Allergiediagnostik*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1985**, S. 41–51.
- [28] E. R. McFadden. A Century of Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **170** (2004) 215–221.
- [29] V. Ruppert. Pricktest – Besonderheiten der Allergendiagnostik in der ärztlichen Praxis. In: M. Werner, V. Ruppert (Hg.) *Praktische Allergiediagnostik*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1985**, S. 67–78.
- [30] T. Lewis, R. T. Grant. Vascular Reactions of the Skin to Injury: Part II. *Heart* **11** (1924) 209–265.
- [31] T. Lewis, R. T. Grant. Vascular Reactions of the Skin to Injury: Part VII. *Heart* **13** (1926) 219–225.
- [32] W. Gronemeyer. Intrakutaner Allergentest (Interkutanprobe). In: M. Werner, V. Ruppert (Hg.) *Praktische Allergiediagnostik*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1985**, S. 52–66.
- [33] W. Braun. Epikutantest. In: M. Werner, V. Ruppert (Hg.) *Praktische Allergiediagnostik*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1985**, S. 79–100.
- [34] S. Al-Muhsen, A. E. Clarke, R. S. Kagan. Peanut Allergy: An Overview. *Canadian Medical Association Journal* **168** (2003) 1279–1285.
- [35] K. Ishizaka, T. Ishizaka, M. M. Hornbrook. Physicochemical Properties of Reaginic Antibody – V. Correlation of Reaginic Activity with Gamma-E-Globulin Antibody. *Journal of Immunology* **97** (1966) 840–853.
- [36] K. Ishizaka, T. Ishizaka, M. M. Hornbrook. Physico-Chemical Properties of Human Reaginic Antibody – IV. Presence of a Unique Immunoglobulin as a Carrier of Reaginic Activity. *Journal of Immunology* **97** (1966) 75–85.
- [37] S. G. O. Johansson, H. Bennich. Immunological Studies of an Atypical (Myeloma) Immunoglobulin. *Immunology* **13** (1967) 381–394.

- [38] W. M. Becker, G. Reese. Immunological Identification and Characterization of Individual Food Allergens. *Journal of Chromatography B* **756** (2001) 131–140.
- [39] M. Debelic. Serum-Gesamt-IgE und spezifisches IgE in der praktischen Allergiediagnostik. In: M. Werner, V. Ruppert (Hg.) *Praktische Allergiediagnostik*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1985**, S. 108–120.
- [40] I. Szabo, P. A. Eigenmann. Allergenicity of Major Cow's Milk and Peanut Proteins Determined by IgE and IgG Immunoblotting. *Allergy* **55** (2000) 42–49.
- [41] B. I. Fall, B. Eberlein-König, H. Behrendt, R. Niessner, J. Ring, M. G. Weller. Microarrays for the Screening of Allergen-Specific IgE in Human Serum. *Analytical Chemistry* **75** (2003) 556–562.
- [42] H. A. Sampson, A. W. Burks. Mechanisms of Food Allergy. *Annual Review of Nutrition* **16** (1996) 161–177.
- [43] B. Wüthrich. Orale Provokationsproben bei Nahrungsmittel- und Begleitstoffallergien und Intoleranzen (Pseudo-allergischen Reaktionen). In: M. Werner, V. Ruppert (Hg.) *Praktische Allergiediagnostik*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1985**, S. 150–164.
- [44] H. A. Sampson, D. G. Ho. Relationship Between Food-Specific IgE Concentrations and the Risk of Positive Food Challenges in Children and Adolescents. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **100** (1997) 444–451.
- [45] C. Loza, J. Brostoff. Peanut Allergy. *Clinical and Experimental Allergy* **25** (1995) 493–502.
- [46] G. W. Canonica, G. Passalacqua. Noninjection Routes for Immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **111** (2003) 437–448.
- [47] H. Smith, P. White, L. Annala, J. Poole, C. Andre, A. Frew. Randomized Controlled Trial of High-Dose Sublingual Immunotherapy to Treat Seasonal Allergic Rhinitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **114** (2004) 831–837.
- [48] D. R. Wilson, M. T. Lima, S. R. Durham. Sublingual Immunotherapy for Allergic Rhinitis: Systematic Review and Meta-Analysis. *Allergy* **60** (2005) 4–12.
- [49] J. Bousquet, R. Lockey, H. J. Malling. Allergen Immunotherapy: Therapeutic Vaccines for Allergic Diseases – A WHO Position Paper. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **102** (1998) 558–562.

- [50] S. R. Durham, S. M. Walker, E. M. Varga, M. R. Jacobson, F. O'Brien, W. Noble, S. J. Till, Q. A. Hamid, K. T. Nouri-Aria. Long-Term Clinical Efficacy of Grass-Pollen Immunotherapy. *New England Journal of Medicine* **341** (1999) 468–475.
- [51] J. Just, E. Goudard, A. Grimfeld. Past and Advances in Allergen Immunotherapy. *Archives de Pediatrie* **11** (2004) 74S–79S.
- [52] R. Asero. Efficacy of Injection Immunotherapy with Ragweed and Birch Pollen in Elderly Patients. *International Archives of Allergy and Immunology* **135** (2004) 332–335.
- [53] G. B. Pajno. Allergen Immunotherapy in Early Childhood: Between Scylla and Charybdis! *Clinical and Experimental Allergy* **35** (2005) 551–553.
- [54] W. Burks, G. Bannon, S. B. Lehrer. Classic Specific Immunotherapy and New Perspectives in Specific Immunotherapy for Food Allergy. *Allergy* **56** (2001) 121–124.
- [55] J. Kleine-Tebbe, D. A. Herold, U. Lepp. Aktuelles zur Therapie von Nahrungsmittelallergenen. *Allergologie* **28** (2005) 66–74.
- [56] V. A. Varney, Q. A. Hamid, M. Gaga, S. Ying, M. Jacobson, A. J. Frew, A. B. Kay, S. R. Durham. Influence of Grass-Pollen Immunotherapy on Cellular Infiltration and Cytokine Messenger-RNA Expression During Allergen-Induced Late-Phase Cutaneous Responses. *Journal of Clinical Investigation* **92** (1993) 644–651.
- [57] A. R. Lorenz, S. Scheurer, D. Hausteiner, S. Vieths. Recombinant Food Allergens. *Journal of Chromatography B* **756** (2001) 255–279.
- [58] B. Bohle, S. Vieths. Improving Diagnostic Tests for Food Allergy with Recombinant Allergens. *Methods* **32** (2004) 292–299.
- [59] A. W. Burks, N. King, G. A. Bannon. Modification of a Major Peanut Allergen Leads to Loss of IgE Binding. *International Archives of Allergy and Immunology* **118** (1999) 313–314.
- [60] G. A. Bannon, G. Cockrell, C. Connaughton, C. M. West, R. Helm, J. S. Stanley, N. King, P. Rabjohn, H. A. Sampson, A. W. Burks. Engineering, Characterization and in vitro Efficacy of the Major Peanut Allergens for Use in Immunotherapy. *International Archives of Allergy and Immunology* **124** (2001) 70–72.
- [61] V. Niederberger, F. Horak, S. Vrtala, S. Spitzauer, M. T. Krauth, P. Valent, J. Reisinger, M. Pelzmann, B. Hayek, M. Kronqvist, G. Gafvelin, H. Gronlund, A. Purohit, R. Suck, H. Fiebig, O. Cromwell, G. Pauli, M. van Hage-Hamsten, R. Valenta. Vaccination with Genetically Engineered Allergens

- Prevents Progression of Allergic Disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101** (2004) 14677–14682.
- [62] H. A. Sampson. Update on Food Allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **113** (2004) 805–819.
- [63] R. S. Chu, O. S. Targoni, A. M. Krieg, P. V. Lehmann, C. V. Harding. CpG Oligodeoxynucleotides Act as Adjuvants that Switch on T Helper 1 (Th1) Immunity. *Journal of Experimental Medicine* **186** (1997) 1623–1631.
- [64] H. A. Sampson. Immunological Approaches to the Treatment of Food Allergy. *Pediatric Allergy and Immunology* **12** (2001) 91–96.
- [65] C. Ortolani, M. Ispano, J. Scibilia, E. A. Pastorello. Introducing Chemists to Food Allergy. *Allergy* **56** (2001) 5–8.
- [66] J. Ring, K. Brockow, H. Behrendt. Adverse Reactions to Foods. *Journal of Chromatography B* **756** (2001) 3–10.
- [67] G. B orries, V. Sch affler, U. Koller. Allergisch aufs Essen? – Nahrungsmittelunvertr aglichkeiten und -allergien (2004).  
URL <http://www.gsf.de/flugs/Nahrungsmittelallergien.pdf>
- [68] H. Breiteneder, C. Ebner. Molecular and Biochemical Classification of Plant-Derived Food Allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **106** (2000) 27–36.
- [69] S. Vieths. Allergenic Cross-Reactivity, Food Allergy and Pollen. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **4** (1997) 61–70.
- [70] H. Gall, K. J. Kalveram, G. Forck, W. Sterry. Kiwi Fruit Allergy – A New Birch Pollen-Associated Food Allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **94** (1994) 70–76.
- [71] W. Burks, G. A. Bannon, S. Sicherer, H. A. Sampson. Peanut-Induced Anaphylactic Reactions. *International Archives of Allergy and Immunology* **119** (1999) 165–172.
- [72] S. H. Sicherer, A. W. Burks, H. A. Sampson. Features of Acute Allergic Reactions to Peanut (PN) and Tree Nuts (TN) in Children. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **101** (1998) S104.
- [73] A. Long. The Nuts and Bolts of Peanut Allergy. *New England Journal of Medicine* **346** (2002) 1320–1322.
- [74] T. J. Furlong, J. de Simone, S. H. Sicherer. Peanut and Tree Nut Allergic Reactions in Restaurants and Other Food Establishments. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **108** (2001) 867–870.

- [75] Fries. Peanuts: Allergic and Other Untoward Reactions. *Annals of Allergy* **48** (1982) 220–226.
- [76] Test Lebkuchen – Gepfeffertes Kuchen. *ÖKO-Test Magazin* **13** (2004) 18–22.
- [77] BBC News: Eating out Poses Allergy Risk (2002).  
URL <http://news.bbc.co.uk/2/hi/health/2245860.stm>
- [78] S. H. Sicherer. Clinical Update on Peanut Allergy. *Annals of Allergy Asthma & Immunology* **88** (2002) 350–360.
- [79] P. W. Ewan, A. T. Clark. Long-Term Prospective Observational Study of Patients with Peanut and Nut Allergy After Participation in a Management Plan. *Lancet* **357** (2001) 111–115.
- [80] Asthma & Allergy, Information & Research: Nut Allergy – The Basics (2003).  
URL <http://www.users.globalnet.co.uk/~aair/nuts.htm>
- [81] S. L. Taylor, J. A. Nordlee. Detection of Food Allergens. *Food Technology* **50** (1996) 231–238.
- [82] J. W. Yunginger, M. B. Gauerke, R. T. Jones, M. J. E. Dahlberg, S. J. Ackerman. Use of Radioimmunoassay to Determine the Nature, Quantity and Source of Allergenic Contamination of Sunflower Butter. *Journal of Food Protection* **46** (1983) 625–628.
- [83] I. Malmheden-Yman, A. Eriksson, T. Karlsson, L. Yman. Adverse Reactions to Food - Analysis of Food Proteins for Verification of Contamination or Mislabeling. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **91** (1993) 345.
- [84] Nestlé Ernährungsstudio: Allergen- und Produktinformation (2005).  
URL [http://ernaehrungsstudio.nestle.de/ernaehrungsabc/Produktinfos/Data/Nestle\\_Allergen\\_Produktinfos.pdf](http://ernaehrungsstudio.nestle.de/ernaehrungsabc/Produktinfos/Data/Nestle_Allergen_Produktinfos.pdf)
- [85] R. Crevel. Industrial Dimensions of Food Allergy. *Biochemical Society Transactions* **30** (2002) 941–944.
- [86] S. A. Bock, A. Munoz-Furlong, H. A. Sampson. Fatalities Due to Anaphylactic Reactions to Foods. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **107** (2001) 191–193.
- [87] R. K. Woods, R. M. Stoney, J. Raven, E. H. Walters, M. Abramson, F. C. K. Thien. Reported Adverse Food Reactions Overestimate True Food Allergy in the Community. *European Journal of Clinical Nutrition* **56** (2002) 31–36.
- [88] H. A. Sampson. Clinical Practice – Peanut Allergy. *New England Journal of Medicine* **346** (2002) 1294–1299.

- [89] S. H. Sicherer, A. Munoz-Furlong, A. W. Burks, H. A. Sampson. Prevalence of Peanut and Tree Nut Allergy in the US Determined by a Random Digit Dial Telephone Survey. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **103** (1999) 559–562.
- [90] A. Munoz-Furlong, S. H. Sicherer, A. W. Burks, H. A. Sampson. Prevalence of Peanut and Tree Nut Allergy in the United States. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **101** (1998) S103.
- [91] S. H. Sicherer, A. Munoz-Furlong, H. A. Sampson. Prevalence of Peanut and Tree Nut Allergy in the United States Determined by Means of a Random Digit Dial Telephone Survey: A 5-Year Follow-Up Study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **112** (2003) 1203–1207.
- [92] J. Grundy, S. Matthews, B. Bateman, T. Dean, S. H. Arshad. Rising Prevalence of Allergy to Peanut in Children: Data from 2 Sequential Cohorts. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **110** (2002) 784–789.
- [93] S. E. Emmett, F. J. Angus, J. S. Fry, P. N. Lee. Perceived Prevalence of Peanut Allergy in Great Britain and Its Association with Other Atopic Conditions and with Peanut Allergy in Other Household Members. *Allergy* **54** (1999) 380–385.
- [94] S. H. Sicherer, T. J. Furlong, A. Munoz-Furlong, A. W. Burks, H. A. Sampson. A Voluntary Registry for Peanut and Tree Nut Allergy: Characteristics of the First 5149 Registrants. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **108** (2001) 128–132.
- [95] P. W. Ewan. Clinical Study of Peanut and Nut Allergy in 62 Consecutive Patients: New Features and Associations. *British Medical Journal* **312** (1996) 1074–1078.
- [96] P. S. Papageorgiou. Clinical Aspects of Food Allergy. *Biochemical Society Transactions* **30** (2002) 901–906.
- [97] S. A. Bock, F. M. Atkins. The Natural History of Peanut Allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **83** (1989) 900–904.
- [98] S. M. Tariq, M. Stevens, S. Matthews, S. Ridout, R. Twiselton, D. W. Hide. Cohort Study of Peanut and Tree Nut Sensitisation by Age of 4 Years. *British Medical Journal* **313** (1996) 514–517.
- [99] T. B. Osborne. *The Proteins of the Wheat Kernel*. Carnegie Institution of Washington, Washington D. C., **1907**.
- [100] L. C. van Loon, E. A. van Strien. The Families of Pathogenesis-Related Proteins, Their Activities, and Comparative Analysis of PR-1 Type Proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **55** (1999) 85–97.

- [101] P. R. Shewry, F. Beaudoin, J. Jenkins, S. Griffiths-Jones, E. N. C. Mills. Plant Protein Families and Their Relationships to Food Allergy. *Biochemical Society Transactions* **30** (2002) 906–910.
- [102] E. Derbyshire, D. J. Wright, D. Boulter. Legumin and Vicilin, Storage Proteins of Legume Seeds. *Phytochemistry* **15** (1976) 3–24.
- [103] E. N. C. Mills, J. Jenkins, N. Marigheto, P. S. Belton, A. P. Gunning, V. J. Morris. Allergens of the Cupin Superfamily. *Biochemical Society Transactions* **30** (2002) 925–929.
- [104] E. A. Pastorello, L. Farioli, V. Pravettoni, M. Ispano, A. Conti, R. Ansaloni, F. Rotondo, C. Incorvaia, A. Bengtsson, F. Rivolta, C. Trambaioli, M. Previdi, C. Ortolani. Sensitization to the Major Allergen of Brazil Nut is Correlated with the Clinical Expression of Allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **102** (1998) 1021–1027.
- [105] S. S. M. Sun, F. W. Leung, J. C. Tomic. Brazil Nut (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) Proteins – Fractionation, Composition, and Identification of a Sulfur-Rich Protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **35** (1987) 232–235.
- [106] K. B. Beyer, E. Morrow, X. M. Li, L. Bardina, G. A. Bannon, A. W. Burks, H. A. Sampson. Effects of Cooking Methods on Peanut Allergenicity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **107** (2001) 1077–1081.
- [107] R. A. Kopper, N. J. Odum, M. Sen, R. M. Helm, J. S. Stanley, A. W. Burks. Peanut Protein Allergens: The Effect of Roasting on Solubility and Allergenicity. *International Archives of Allergy and Immunology* **136** (2005) 16–22.
- [108] L. Mondoulet, E. Paty, M. F. Drumare, S. Ah-Leung, P. Scheinmann, R. M. Willemot, J. M. Wal, H. Bernard. Influence of Thermal Processing on the Allergenicity of Peanut Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53** (2005) 4547–4553.
- [109] R. E. Poms, E. Anklam. Effects of Chemical, Physical, and Technological Processes on the Nature of Food Allergens. *Journal of AOAC International* **87** (2004) 1466–1474.
- [110] J. Yu, M. Ahmedna, C. Stowe, I. Goktepe. Reduction of Allergenicity of Peanuts by Select Food Processing Methods, Abstract at the 105th General Meeting of the American Society for Microbiology, Atlanta, GA, USA (2005).
- [111] O. Brenna, C. Pompei, C. Ortolani, V. Pravettoni, L. Farioli, E. A. Pastorello. Technological Processes to Decrease the Allergenicity of Peach Juice and Nectar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48** (2000) 493–497.

- [112] R. W. R. Crevel, M. A. T. Kerkhoff, M. M. G. Koning. Allergenicity of Refined Vegetable Oils. *Food and Chemical Toxicology* **38** (2000) 385–393.
- [113] T. Kato, E. Katayama, S. Matsubara, Y. Omi, T. Matsuda. Release of Allergenic Proteins from Rice Grains Induced by High Hydrostatic Pressure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48** (2000) 3124–3129.
- [114] K. E. C. Grimshaw, R. M. King, J. A. Nordlee, S. L. Hefle, J. O. Warner, J. O. B. Hourihane. Presentation of Allergen in Different Food Preparations Affects the Nature of the Allergic Reaction – A Case Series. *Clinical and Experimental Allergy* **33** (2003) 1581–1585.
- [115] C. P. Frossard, C. Hauser, P. A. Eigenmann. Oral Carrageenan Induces Antigen-Dependent Oral Tolerance: Prevention of Anaphylaxis and Induction of Lymphocyte Anergy in a Murine Model of Food Allergy. *Pediatric Research* **49** (2001) 417–422.
- [116] E. A. Pastorello, V. Pravettoni, A. M. Calamari, E. Banfi, A. M. Robino. New Plant-Origin Food Allergens. *Allergy* **57** (2002) 106–110.
- [117] W. Franke. *Nutzpflanzenkunde - Nutzbare Gewächse der gemäßigten Breiten, Subtropen und Tropen*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1997**.
- [118] German Nut Council: Was Sie schon immer über Erdnüsse wissen wollten (**2005**).  
URL <http://www.erdnuss-info.de/Wirtschaft/generell.html>
- [119] H. Scherz, G. Kloos. *Die Zusammensetzung der Lebensmittel. Nährwert-Tabellen 1981/82. Souci/Fachmann/Kraut*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, **1981**.
- [120] R. Weeks. Peanut Oil in Medications. *Lancet* **348** (1996) 759–760.
- [121] T. P. Dean. Immunological Responses in Peanut Allergy. *Clinical and Experimental Allergy* **28** (1998) 7–9.
- [122] The Peanut Institute – The Peanut Institute and Planters Celebrate Peanuts (**2005**).  
URL <http://www.peanut-institute.org>
- [123] American Peanut Council (**2005**).  
URL <http://www.peanutsusa.com>
- [124] H. Ritthausen. Ueber die Eiweisskörper verschiedener Oelsamen. *Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere* **21** (1880) 81–104.
- [125] C. O. Johns, D. B. Jones. The Proteins of the Peanut, *Arachis hypogaea*. *Journal of Biological Chemistry* **28** (1916) 77–87.

- [126] K. J. Shetty, M. S. N. Rao. Studies on Groundnut Proteins – 3. Physicochemical Properties of Arachin Prepared by Different Methods. *Analytical Biochemistry* **62** (1974) 108–120.
- [127] V. Prakash, M. S. N. Rao. Physicochemical Properties of Oilseed Proteins. *CRC Critical Reviews in Biochemistry* **20** (1986) 265–363.
- [128] D. B. Jones, M. J. Horn. The Properties of Arachin and Conarachin and the Proportionate Occurrence of these Proteins in the Peanut. *Journal of Agricultural Research* **40** (1930) 673–682.
- [129] J. Daussant, N. J. Neucere, L. Y. Yatsu. Immunochemical Studies on Arachis hypogaea Proteins with Particular Reference to Reserve Proteins – I. Characterization, Distribution and Properties of Alpha-Arachin and Alpha-Conarachin. *Plant Physiology* **44** (1969) 471–479.
- [130] P. R. Shewry, R. Casey. *Seed Proteins*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, **1999**.
- [131] P. V. Monteiro, V. Prakash. Effect of Proteases on Arachin, Conarachin-I, and Conarachin-II from Peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **42** (1994) 268–273.
- [132] N. J. Neucere. Isolation of Alpha-Arachin, the Major Peanut Globulin. *Analytical Biochemistry* **27** (1969) 15–24.
- [133] T. Holzhauser, S. Vieths. Indirect Competitive ELISA for Determination of Traces of Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Protein in Complex Food Matrices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47** (1999) 603–611.
- [134] R. E. Poms, E. Anklam. Detection of Peanut Allergens in Food Products: Effect of Processing on Protein Extraction Efficiency. *Lebensmittelchemie* **57** (2003) 153.
- [135] H. A. Sampson, N. Buckley, S. K. Huang, A. W. Burks, G. A. Bannon. Characterization of Major Peanut Allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **101** (1998) S240.
- [136] S. Meier-Davis, S. L. Taylor, J. Nordlee, R. Bush. Identification of Peanut Allergens by Immunoblotting. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **79** (1987) 218.
- [137] S. J. Koppelman, R. A. A. Vlooswijk, L. M. J. Knippels, M. Hessing, E. F. Knol, F. C. van Reijssen, C. Bruijnzeel-Koomen. Quantification of Major Peanut Allergens Ara h1 and Ara h2 in the Peanut Varieties Runner, Spanish, Virginia, and Valencia, Bred in Different Parts of the World. *Allergy* **56** (2001) 132–137.

- [138] C. E. Danielsson. Seed Globulins of the Gramineae and Leguminosae. *Biochemical Journal* **44** (1949) 387–400.
- [139] A. W. Burks, G. Cockrell, C. Connaughton, R. M. Helm. Epitope Specificity and Immunoaffinity Purification of the Major Peanut Allergen, Ara h1. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **93** (1994) 743–750.
- [140] D. Shin, H. Sampson, R. Helm, S. K. Huang, A. W. Burks, G. A. Bannon. Tertiary Structure of the Major Peanut Allergen Ara h1: Implications for the Bioengineering of a Hypoallergenic Protein. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **101** (1998) S90.
- [141] A. W. Burks, G. Cockrell, J. S. Stanley, R. M. Helm, G. A. Bannon. Recombinant Peanut Allergen Ara h1 – Expression and IgE Binding in Patients with Peanut Hypersensitivity. *Journal of Clinical Investigation* **96** (1995) 1715–1721.
- [142] W. M. Becker, T. Kleber-Janke, U. Lepp. Four Novel Recombinant Peanut Allergens: More Information, More Problems. *International Archives of Allergy and Immunology* **124** (2001) 100–102.
- [143] T. Kleber-Janke, R. Cramer, U. Appenzeller, M. Schlaak, W. M. Becker. Selective Cloning of Peanut Allergens, Including Profilin and 2S Albumins, by Phage Display Technology. *International Archives of Allergy and Immunology* **119** (1999) 265–274.
- [144] S. Maleki, S. Y. Chung, E. Champagne. The Effects of Structural Modifications on the Allergenic Properties of Ara h1 and Ara h2. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **105** (2000) 416.
- [145] D. S. Shin, C. M. Compadre, S. J. Maleki, R. A. Kopper, H. Sampson, S. K. Huang, A. W. Burks, G. A. Bannon. Biochemical and Structural Analysis of the IgE Binding Sites on Ara h1, an Abundant and Highly Allergenic Peanut Protein. *Journal of Biological Chemistry* **273** (1998) 13753–13759.
- [146] R. Kopper, S. Maleki, R. Helm, H. Sampson, S. K. Huang, G. Cockrell, A. W. Burks, G. A. Bannon. Rapid Isolation of Peanut Allergens and Their Physical Chemical and Biological Characterization. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **101** (1998) S240.
- [147] J. S. Stanley, A. W. Burks, R. M. Helm, G. Cockrell, G. A. Bannon. Ara h1, a Major Allergen Involved in Peanut Hypersensitivity, Has Multiple IgE Binding Domains. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **95** (1995) 333.

- [148] S. J. Maleki, R. A. Kopper, D. S. Shin, C. W. Park, C. M. Compadre, H. Sampson, A. W. Burks, G. A. Bannon. Structure of the Major Peanut Allergen Ara h1 May Protect IgE-Binding Epitopes from Degradation. *Journal of Immunology* **164** (2000) 5844–5849.
- [149] W. M. Becker. Characterization of Ara h1 by Two-Dimensional Electrophoresis Immunoblot and Recombinant Techniques: New Digestion Experiments with Peanuts Imitating the Gastrointestinal Tract. *International Archives of Allergy and Immunology* **113** (1997) 118–121.
- [150] A. W. Burks, L. W. Williams, R. M. Helm, C. Connaughton, G. Cockrell, T. O'Brien. Identification of a Major Peanut Allergen, Ara h1, in Patients with Atopic Dermatitis and Positive Peanut Challenges. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **88** (1991) 172–179.
- [151] E. N. C. Mills, A. Potts, G. W. Plumb, N. Lambert, M. R. A. Morgan. Development of a Rapid Dipstick Immunoassay for the Detection of Peanut Contamination of Food. *Food and Agricultural Immunology* **9** (1997) 37–50.
- [152] S. J. Koppelman, C. Bruijnzeel-Koomen, M. Helsing, H. H. J. de Jongh. Heat-Induced Conformational Changes of Ara h1, a Major Peanut Allergen, Do Not Affect its Allergenic Properties. *Journal of Biological Chemistry* **274** (1999) 4770–4777.
- [153] E. C. de Jong, M. V. Zijverden, S. Spanhaak, S. J. Koppelman, H. Pellegrom, A. H. Penninks. Identification and Partial Characterization of Multiple Major Allergens in Peanut Proteins. *Clinical and Experimental Allergy* **28** (1998) 743–751.
- [154] N. King, S. J. Maleki, H. Sampson, A. W. Burks, G. A. Bannon. Modulation of the Allergenicity of a Major Peanut Allergen, Ara h2 by Mutagenesis of its Immunodominant IgE Binding Epitopes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **103** (1999) 258.
- [155] J. S. Stanley, N. King, A. W. Burks, S. K. Huang, H. Sampson, G. Cockrell, R. M. Helm, C. M. West, G. A. Bannon. Identification and Mutational Analysis of the Immunodominant IgE Binding Epitopes of the Major Peanut Allergen Ara h2. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **342** (1997) 244–253.
- [156] A. W. Burks, L. W. Williams, C. Connaughton, G. Cockrell, T. J. O'Brien, R. M. Helm. Identification and Characterization of a Second Major Peanut Allergen, Ara h II, with Use of the Sera of Patients with Atopic Dermatitis and Positive Peanut Challenge. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **90** (1992) 962–969.

- [157] P. Rabjohn, E. M. Helm, J. S. Stanley, C. M. West, H. A. Sampson, A. W. Burks, G. A. Bannon. Molecular Cloning and Epitope Analysis of the Peanut Allergen Ara h3. *Journal of Clinical Investigation* **103** (1999) 535–542.
- [158] P. Rabjohn, C. M. West, E. Helm, R. Helm, J. S. Stanley, S. K. Huang, H. Sampson, A. W. Burks, G. A. Bannon. Glycinin, a Third Major Peanut Allergen Identified by Soy-Adsorbed Serum IgE from Peanut Sensitive Individuals. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **101** (1998) S240.
- [159] W. Burks, H. A. Sampson, G. Bannon. Peanut Allergens. *Allergy* **53** (1998) 725–730.
- [160] S. J. Koppelman, E. F. Knol, R. A. A. Vlooswijk, M. Wensing, A. C. Knulst, S. L. Hefle, H. Gruppen, S. Piersma. Peanut Allergen Ara h3: Isolation from Peanuts and Biochemical Characterization. *Allergy* **58** (2003) 1144–1151.
- [161] S. K. Sathe, H. H. Kshirsagar, K. H. Roux. Advances in Seed Protein Research: A Perspective on Seed Allergens. *Journal of Food Science* **70** (2005) R93–R120.
- [162] C. Magni, C. Ballabio, P. Restani, E. Sironi, A. Scarafoni, C. Poiesi, M. Duranti. Two-Dimensional Electrophoresis and Western-Blotting Analyses with anti Ara h3 Basic Subunit IgG Evidence the Cross-Reacting Polypeptides of *Arachis hypogaea*, *Glycine max*, and *Lupinus albus* Seed Proteomes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53** (2005) 2275–2281.
- [163] M. Adachi, Y. Takenaka, A. B. Gidamis, B. Mikami, S. Utsumi. Crystal Structure of Soybean Proglycinin A1aB1b Homotrimer. *Journal of Molecular Biology* **305** (2001) 291–305.
- [164] K. A. Barton, J. F. Thompson, J. T. Madison, R. Rosenthal, N. P. Jarvis, R. N. Beachy. The Biosynthesis and Processing of High Molecular-Weight Precursors of Soybean Glycinin Subunits. *Journal of Biological Chemistry* **257** (1982) 6089–6095.
- [165] P. Rabjohn, A. W. Burks, H. A. Sampson, G. A. Bannon. Mutational Analysis of the IgE-Binding Epitopes of the Peanut Allergen, Ara h3: A Member of the Glycinin Family of Seed-Storage Proteins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **103** (1999) S387.
- [166] M. Suhr, D. Wicklein, U. Lepp, W. M. Becker. Isolation and Characterization of Natural Ara h6: Evidence for a Further Peanut Allergen with Putative Clinical Relevance Based on Resistance to Pepsin Digestion and Heat. *Molecular Nutrition & Food Research* **48** (2004) 390–399.
- [167] D. Mittag, J. Akkerdaas, B. K. Ballmer-Weber, L. Vogel, M. Wensing, W. M. Becker, S. J. Koppelman, A. C. Knulst, A. Helbling, S. L. Hefle, R. van

- Ree, S. Vieths. Ara h8, a Bet v1-Homologous Allergen from Peanut, Is a Major Allergen in Patients with Combined Birch Pollen and Peanut Allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **114** (2004) 1410–1417.
- [168] A. W. Burks, C. A. Connaughton, G. E. Cockrell, R. M. Helm. The Identification of Peanut Agglutinin as a Peanut Allergen in Patients with Atopic Dermatitis and Peanut Hypersensitivity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **89** (1992) 298.
- [169] D. Barnett, B. A. Baldo, M. E. H. Howden. Multiplicity of Allergens in Peanuts. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **72** (1983) 61–68.
- [170] S. J. Koppelman, M. Wensing, M. Ertmann, A. C. Knulst, E. F. Knol. Relevance of Ara h1, Ara h2 and Ara h3 in Peanut-Allergic Patients, as Determined by Immunoglobulin E Western Blotting, Basophil-Histamine Release and Intracutaneous Testing: Ara h2 is the Most Important Peanut Allergen. *Clinical and Experimental Allergy* **34** (2004) 583–590.
- [171] P. Restani, C. Ballabio, E. Corsini, A. Fiocchi, P. Isoardi, C. Magni, C. Poiesi, L. Terracciano, M. Duranti. Identification of the Basic Subunit of Ara h3 as the Major Allergen in a Group of Children Allergic to Peanuts. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* **94** (2005) 262–266.
- [172] S. J. Maleki, S. Y. Chung, E. T. Champagne, J. P. Raufman. The Effects of Roasting on the Allergenic Properties of Peanut Proteins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **106** (2000) 763–768.
- [173] P. Gruber, W. M. Becker, T. Hofmann. Influence of the Maillard Reaction on the Allergenicity of rAra h2, a Recombinant Major Allergen from Peanut (*Arachis hypogaea*), its Major Epitopes, and Peanut Agglutinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53** (2005) 2289–2296.
- [174] L. Mondoulet, M. F. Drumare, S. Ah-Leung, E. Paty, P. Scheinmann, J. M. Wal, H. Bernard. Influence of Thermal Processing on the IgE Binding Capacity of Peanut Allergens. *Revue Francaise d'Allergologie et d'Immunologie Clinique* **43** (2003) 486–491.
- [175] R. M. Helm, G. Cockrell, S. J. Stanley, H. A. Sampson, G. A. Bannon, A. W. Burks. IgE-Binding of Homologous Legume Vicilins and Glycinins of Soybean and Peanut Allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **101** (1998) S240.
- [176] S. L. Hefle. Monoclonal Antibodies Against Selected Peanut Allergens. *Food and Agricultural Immunology* **6** (1994) 197–208.
- [177] G. A. Bannon, D. Shin, S. Maleki, R. Kopper, A. W. Burks. Tertiary Structure and Biophysical Properties of a Major Peanut Allergen, Implications

- for the Production of a Hypoallergenic Protein. *International Archives of Allergy and Immunology* **118** (1999) 315–316.
- [178] G. A. Bannon, R. A. Kopper, S. M. Maleki, D. S. Shin, H. A. Sampson, A. W. Burks. Structure Plays a Critical Role in the Allergenicity of Food Proteins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **105** (2000) 554.
- [179] S. Pasteau, G. Bannon, J. Astwood, R. Goodman, A. Cockburn. Evaluation of Potential Allergenicity of Genetically Modified Plants. *Revue Francaise d'Allergologie et d'Immunologie Clinique* **43** (2003) 24–30.
- [180] K. N. Konan, O. M. Viquez, H. W. Dodo. Silencing the Three Major Allergens for the Production of Hypoallergenic Peanut. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **111** (2003) 909.
- [181] K. N. Konan, O. M. Viquez, H. W. Dodo. Downregulation of Ara h2, a Major Peanut Allergen in Transgenic Peanut Plants. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **109** (2002) S163.
- [182] Netzeitung: Erdnuss-Pflanzen ohne Allergie-Risiko (**2003**).  
URL <http://www.netzeitung.de/genundmensch/230205.html>
- [183] J. O. B. Hourihane, S. A. Kilburn, J. A. Nordlee, S. L. Hefle, S. L. Taylor, J. O. Warner. An Evaluation of the Sensitivity of Subjects with Peanut Allergy to Very Low Doses of Peanut Protein: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Food Challenge Study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **100** (1997) 596–600.
- [184] J. O. B. Hourihane, S. J. Bedwani, T. P. Dean, J. O. Warner. Randomised, Double Blind, Crossover Challenge Study of Allergenicity of Peanut Oils in Subjects Allergic to Peanuts. *British Medical Journal* **314** (1997) 1084–1088.
- [185] S. Y. Chung, S. J. Maleki, E. T. Champagne, K. L. Buhr, D. W. Gorbet. High-Oleic Peanuts Are Not Different from Normal Peanuts in Allergenicity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **105** (2000) 395.
- [186] S. H. Sicherer, A. W. Burks, H. A. Sampson. Clinical Features of Acute Allergic Reactions to Peanut and Tree Nuts in Children. *Pediatrics* **102** (1998) E61–E66.
- [187] P. Vadas, Y. Wai, W. Burks, B. Perelman. Detection of Peanut Allergens in Breast Milk of Lactating Women. *JAMA - Journal of the American Medical Association* **285** (2001) 1746–1748.
- [188] S. H. Sicherer, T. J. Furlong, J. de Simone, H. A. Sampson. Self-Reported Allergic Reactions to Peanut on Commercial Airlines. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **104** (1999) 186–189.

- [189] Spiegel Online: Nuss als Waffe (2004).  
URL <http://www.spiegel.de/unispiegel/wunderbar/0,1518,296639,00.html>
- [190] Netzeitung: Russischer Enthüllungsjournalist tot (2003).  
URL <http://www.netzeitung.de/medien/246283.html>
- [191] T. Holzhauser, S. Vieths. Quantitative Sandwich ELISA for Determination of Traces of Hazelnut (*Corylus avellana*) Protein in Complex Food Matrixes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47** (1999) 4209–4218.
- [192] E. A. Pastorello, S. Vieths, V. Pravettoni, L. Farioli, C. Trambaioli, D. Fortunato, D. Lüttkopf, M. Calamari, R. Ansaloni, J. Scibilia, B. K. Ballmer-Weber, L. K. Poulsen, B. Wüthrich, K. S. Hansen, A. M. Robino, C. Ortolani, A. Conti. Identification of Hazelnut Major Allergens in Sensitive Patients with Positive Double-Blind, Placebo-Controlled Food Challenge Results. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **109** (2002) 563–570.
- [193] D. Lüttkopf, U. Müller, P. S. Skov, B. K. Ballmer-Weber, B. Wüthrich, K. S. Hansen, L. K. Poulsen, M. Kästner, D. Haustein, S. Vieths. Comparison of Four Variants of a Major Allergen in Hazelnut (*Corylus avellana*) Cor a1.04 with the Major Hazel Pollen Allergen Cor a1.01. *Molecular Immunology* **38** (2002) 515–525.
- [194] K. Beyer, G. Grishina, L. Bardina, A. Grishin, H. A. Sampson. Identification of an 11S Globulin as a Major Hazelnut Food Allergen in Hazelnut-Induced Systemic Reactions. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **110** (2002) 517–523.
- [195] R. Hirschwehr, R. Valenta, C. Ebner, F. Ferreira, W. R. Sperr, P. Valent, M. Rohac, H. Rumpold, O. Scheiner, D. Kraft. Identification of Common Allergenic Structures in Hazel Pollen and Hazelnuts – A Possible Explanation for Sensitivity to Hazelnuts in Patients Allergic to Tree Pollen. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **90** (1992) 927–936.
- [196] F. Schocker, D. Lüttkopf, U. Müller, P. Thomas, S. Vieths, W. M. Becker. IgE Binding to Unique Hazelnut Allergens: Identification of Non Pollen-Related and Heat-Stable Hazelnut Allergens Eliciting Severe Allergic Reactions. *European Journal of Nutrition* **39** (2000) 172–180.
- [197] F. Schocker, U. Lepp, M. Thomas, M. Schlaak, W. M. Becker. Identifizierung und Charakterisierung nicht-pollenassoziierter Allergene der Haselnuss. *Allergo Journal* **8** (1999) 32.
- [198] M. Wensing, A. H. Penninks, S. L. Hefle, J. H. Akkerdaas, R. van Ree, S. J. Koppelman, C. Bruijnzeel-Koomen, A. C. Knulst. The Range of Minimum

- Provoking Doses in Hazelnut-Allergic Patients as Determined by Double-Blind, Placebo-Controlled Food Challenges. *Clinical and Experimental Allergy* **32** (2002) 1757–1762.
- [199] I. Malmheden-Yman, A. Eriksson, G. Everitt, L. Yman, T. Karlsson. Analysis of Food Proteins for Verification of Contamination or Mislabelling. *Food and Agricultural Immunology* **6** (1994) 167–172.
- [200] M. Wigotzki, H. Steinhart, A. Paschke. Determination of the Allergenicity of Various Hazelnut Products by Immunoblotting and Enzyme Allergosorbent Test Inhibition. *Journal of Chromatography B* **756** (2001) 239–248.
- [201] S. Vieths, J. Reindl, U. Müller, A. Hoffmann, D. Hausteil. Digestibility of Peanut and Hazelnut Allergens Investigated by a Simple in vitro Procedure. *European Food Research and Technology* **209** (1999) 379–388.
- [202] Verordnung über die Kennzeichnung von Lebensmitteln (Lebensmittel-Kennzeichnungsverordnung – LMKV) in der Fassung der Bekanntmachung vom 15. Dezember 1999, zuletzt geändert durch § 3 Abs. 14 G über den Übergang auf das neue Lebensmittel- und FuttermittelR v. 1. September 2005. *Bundesgesetzblatt Teil I* **56** (1999) 2464–2473.
- [203] S. Vieths, A. H. Meyer, I. Ehlers, T. Fuchs, J. Kleine-Tebbe, U. Lepp, B. Niggemann, J. Saloga, J. Sennekamp, I. Vieluf, T. Werfel, T. Zuberbier, L. Jäger. Zur Deklaration versteckter Allergene in Lebensmitteln. *Allergologie* **24** (2001) 316–319.
- [204] R. Kjelkevik, U. Edberg, I. Malmheden-Yman. Labelling of Potential Allergens in Food. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **4** (1997) 157–162.
- [205] Richtlinie 2000/13/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 20. März 2000. *Amtsblatt der Europäischen Union* **109** (2000) 29–42.
- [206] Stellungnahme AG Biochemische und molekularbiologische Analytik der GdCh: Nachweisverfahren für Nahrungsmittelallergene. *Lebensmittelchemie* **58** (2004) 116–119.
- [207] G. H. Hey, G. B. Luedemann. Food Legislation and the Protection of Allergic and Hypersensitive Persons: An Overview. *Journal of Chromatography B* **756** (2001) 337–342.
- [208] S. L. Taylor, S. L. Hefle, C. Bindslev-Jensen, F. M. Atkins, C. Andre, C. Bruijnzeel-Koomen, A. W. Burks, R. K. Bush, M. Ebisawa, P. A. Eigenmann, A. Host, J. O. B. Hourihane, E. Isolauri, D. J. Hill, A. Knulst, G. Lack, H. A. Sampson, D. A. Moneret-Vautrin, F. Rance, P. A. Vadas, J. W. Yunginger, R. S. Zeiger, J. W. Salminen, C. Madsen, P. Abbott. A

- Consensus Protocol for the Determination of the Threshold Doses for Allergenic Foods: How Much is Too Much? *Clinical and Experimental Allergy* **34** (2004) 689–695.
- [209] E. A. Pastorello, C. Trambaioli. Isolation of Food Allergens. *Journal of Chromatography B* **756** (2001) 71–84.
- [210] H. Hird, R. Pumphrey, P. Wilson, J. Sunderland, P. Reece. Identification of Peanut and Hazelnut Allergens by Native Two-Dimensional Gel Electrophoresis. *Electrophoresis* **21** (2000) 2678–2683.
- [211] H. W. Wen, W. Borejsza-Wysocki, T. R. de Cory, R. A. Durst. Development of a Competitive Liposome-Based Lateral Flow Assay for the Rapid Detection of the Allergenic Peanut Protein Ara h1. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **382** (2005) 1217–1226.
- [212] G. A. Bonwick, C. J. Smith. Immunoassays: Their History, Development and Current Place in Food Science and Technology. *International Journal of Food Science and Technology* **39** (2004) 817–827.
- [213] C. J. Smith. Evolution of the Immunoassay. In: J. H. Rittenburg (Hg.) *Development and Application of Immunoassay for Food Analysis*, Elsevier Applied Science, London, **1990**.
- [214] M. Oellerich. Enzyme-Immunoassay – A Review. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* **22** (1984) 895–904.
- [215] B. de Meulenaer, A. Huyghebaert. Isolation and Purification of Chicken Egg Yolk Immunoglobulins: A Review. *Food and Agricultural Immunology* **13** (2001) 275–288.
- [216] S. Baumgartner, C. Hemetsberger, E. Drs, H. Pichler, R. Krska. Purification of Peanut Proteins for Further Use in Affinity Chromatography and as Immunogens. *Journal of Separation Science* **26** (2003) 1284–1286.
- [217] P. A. Eigenmann, A. W. Burks, G. A. Bannon, H. A. Sampson. Identification of Unique Peanut and Soy Allergens in Sera Adsorbed with Cross-Reacting Antibodies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **98** (1996) 969–978.
- [218] G. Köhler, C. Milstein. Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity. *Nature* **256** (1975) 495–497.
- [219] C. Milstein. The Hybridoma Revolution: An Offshoot of Basic Research. *BioEssays* **21** (1999) 966–973.
- [220] C. A. K. Borrebaeck. Antibodies in Diagnostics – From Immunoassays to Protein Chips. *Immunology Today* **21** (2000) 379–382.

- [221] B. A. Maher. Toward a Global Proteome. *Scientist* **16** (2002) 21.
- [222] J. Klose, H. E. Meyer, M. Hamacher, A. V. Hall, K. Marcus. Human Brain Proteome Project. *BIOforum Europe* **4** (2004) 28–29.
- [223] R. F. Service. Public Projects Gear Up to Chart the Protein Landscape. *Science* **302** (2003) 1316–1318.
- [224] R. F. Service. High-Speed Biologists Search for Gold in Proteins. *Science* **294** (2001) 2074–2077.
- [225] K. Sasaki, T. R. Glass, N. Ohmura. Validation of Accuracy of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in Hybridoma Screening and Proposal of an Improved Screening Method. *Analytical Chemistry* **77** (2005) 1933–1939.
- [226] N. Zilka, L. Vechterova, E. Kontsekova, M. Novak. A Rapid Immunohistochemical Primary Screening Assay for Hybridomas. *Journal of Immunological Methods* **272** (2003) 49–53.
- [227] M. L. Phelan, S. Nock. Generation of Bioreagents for Protein Chips. *Proteomics* **3** (2003) 2123–2134.
- [228] L. J. Holt, K. Büssov, G. Walter, I. M. Tomlinson. By-Passing Selection: Direct Screening for Antibody-Antigen Interactions Using Protein Arrays. *Nucleic Acids Research* **28** (2000) E72.
- [229] U. B. Nielsen, B. H. Geierstanger. Multiplexed Sandwich Assays in Microarray Format. *Journal of Immunological Methods* **290** (2004) 107–120.
- [230] H. R. Hoogenboom. Selecting and Screening Recombinant Antibody Libraries. *Nature Biotechnology* **23** (2005) 1105–1116.
- [231] J. F. Smothers, S. Henikoff, P. Carter. Affinity Selection from Biological Libraries. *Science* **298** (2002) 621–622.
- [232] E. Liddell, I. Weeks. *Antikörpertechniken*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, **1996**.
- [233] A. Dove. Uncorking the Biomanufacturing Bottleneck. *Nature Biotechnology* **20** (2002) 777–779.
- [234] T. Porstmann, S. T. Kiessig. Enzyme-Immunoassay Techniques – An Overview. *Journal of Immunological Methods* **150** (1992) 5–21.
- [235] J. E. Butler. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Immunoassay* **21** (2000) 165–209.
- [236] G. T. Hermanson. *Bioconjugate Techniques*. Academic Press, San Diego, California, **1996**.

- [237] M. W. Steward, A. M. Lew. The Importance of Antibody Affinity in the Performance of Immunoassays for Antibody. *Journal of Immunological Methods* **78** (1985) 173–190.
- [238] V. van Heyningen. A Simple Method for Ranking the Affinities of Monoclonal Antibodies. *Methods in Enzymology* **121** (1986) 472–481.
- [239] M. G. Weller. Immunochromatographic Techniques – A Critical Review. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **366** (2000) 635–645.
- [240] M. H. V. van Regenmortel, A. Azimzadeh. Determination of Antibody Affinity. *Journal of Immunoassay* **21** (2000) 211–234.
- [241] S. A. Bobrovnik. Determination of Antibody Affinity by ELISA. Theory. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **57** (2003) 213–236.
- [242] V. van Heyningen, D. J. H. Brock, S. van Heyningen. A Simple Method for Ranking the Affinities of Monoclonal Antibodies. *Journal of Immunological Methods* **62** (1983) 147–153.
- [243] M. G. Weller. Strukturelle und kinetische Untersuchungen zur Entwicklung und Optimierung von Hapten-Enzymimmunoassays (ELISAs) am Beispiel der Bestimmung von Triazinherbiziden: Dissertation an der Fakultät Chemie, Biologie und Geowissenschaften, Technische Universität München (1992).
- [244] M. Winklmaier, M. G. Weller, J. Mangler, B. Schlosshauer, R. Niessner. Development of a Highly Sensitive Enzyme-Immunoassay for the Determination of Triazine Herbicides. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **358** (1997) 614–622.
- [245] E. C. Alocilja, S. M. Radke. Market Analysis of Biosensors for Food Safety. *Biosensors and Bioelectronics* **18** (2003) 841–846.
- [246] R. L. Rich, D. G. Myszka. A Survey of the Year 2002 Commercial Optical Biosensor Literature. *Journal of Molecular Recognition* **16** (2003) 351–382.
- [247] A. Lueking, A. Possling, O. Huber, A. Beveridge, M. Horn, H. Eickhoff, J. Schuchardt, H. Lehrach, D. J. Cahill. A Nonredundant Human Protein Chip for Antibody Screening and Serum Profiling. *Molecular & Cellular Proteomics* **2** (2003) 1342–1349.
- [248] R. Ekins. Principles of Non-Competitive Methods. In: R. F. Masseyeff (Hg.) *Methods of Immunological Analysis Vol. 1, Fundamentals*, VCH, Weinheim, **1993**, S. 227–257.

- [249] B. G. Knecht, A. Strasser, R. Dietrich, E. Märtlbauer, R. Niessner, M. G. Weller. Automated Microarray System for the Simultaneous Detection of Antibiotics in Milk. *Analytical Chemistry* **76** (2004) 646–654.
- [250] R. I. Stefan, J. F. van Staden, H. Y. Aboul-Enein. Immunosensors in Clinical Analysis. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **366** (2000) 659–668.
- [251] H. J. Cruz, C. C. Rosa, A. G. Oliva. Immunosensors for Diagnostic Applications. *Parasitology Research* **88** (2002) S4–S7.
- [252] R. Karlsson. SPR for Molecular Interaction Analysis: A Review of Emerging Application Areas. *Journal of Molecular Recognition* **17** (2004) 151–161.
- [253] G. A. Canziani, S. Klakamp, D. G. Myszka. Kinetic Screening of Antibodies from Crude Hybridoma Samples Using Biacore. *Analytical Biochemistry* **325** (2004) 301–307.
- [254] O. Poetz, R. Ostendorp, B. Brocks, J. M. Schwenk, D. Stoll, T. O. Joos, M. F. Templin. Protein Microarrays for Antibody Profiling: Specificity and Affinity Determination on a Chip. *Proteomics* **5** (2005) 2402–2411.
- [255] J. A. Berzofsky, A. N. Schechter. The Concepts of Crossreactivity and Specificity in Immunology. *Molecular Immunology* **18** (1981) 751–763.
- [256] G. Reese, D. Schmechel, R. Ayuso, S. B. Lehrer. Grid-Immunoblotting: A Fast and Simple Technique to Test Multiple Allergens with Small Amounts of Antibody for Cross-Reactivity. *Journal of Chromatography B* **756** (2001) 151–156.
- [257] R. S. Yalow, S. A. Berson. Immunoassay of Endogenous Plasma Insulin in Man. *Journal of Clinical Investigation* **39** (1960) 1157–1175.
- [258] G. E. Abraham. Solid-Phase Radioimmunoassay of Estradiol-17 $\beta$ . *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **29** (1969) 866–870.
- [259] M. G. Weller, M. Diemer, C. Wersching, R. Niessner, H. Sochor. Development of Antibodies for the Detection of N-Acetyl-Glufosinate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51** (2003) 6668–6675.
- [260] A. Zeck, M. G. Weller, D. Bursill, R. Niessner. Generic Microcystin Immunoassay Based on Monoclonal Antibodies Against Adda. *Analyst* **126** (2001) 2002–2007.
- [261] P. Ulrich, M. G. Weller, R. Niessner. Immunological Determination of Triazine Pesticides Bound to Soil Humic Acids (Bound Residues). *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **354** (1996) 352–358.

- [262] T. Giersch. A New Monoclonal Antibody for the Sensitive Detection of Atrazine with Immunoassay in Microtiter Plate and Dipstick Format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **41** (1993) 1006–1011.
- [263] R. Niessner. Immunoassays in Environmental Analytical Chemistry: Some Thoughts on Trends and Status. *Analytical Methods and Instrumentation* **1** (1993) 134–144.
- [264] R. Niessner, D. Knopp. Immunoassays in Analytical Chemistry. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* **12** (2002) 39–54.
- [265] J. P. Gosling. À la Carte Immunoassays. *Biochemical Education* **22** (1994) 176–191.
- [266] C. H. Self, D. B. Cook. Advances in Immunoassay Technology. *Current Opinion in Biotechnology* **7** (1996) 60–65.
- [267] D. Rodbard. Mathematics and Statistics of Ligand Assays. *In: Ligand Assay*, Masson Publishing USA Inc., New York, **1981**, S. 45–101.
- [268] Y. Hayashi, R. Matsuda, T. Maitani, K. Ito, W. Nishimura, K. Imai, M. Maeda. An Expression of Within-Plate Uncertainty in Sandwich ELISA. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **36** (2004) 225–229.
- [269] R. Boga. Antibody Pair Screening Methods, United States Patent Application 20040048323 (**2004**).
- [270] S. Wilson, S. Howell. High-Throughput Screening in the Diagnostics Industry. *Biochemical Society Transactions* **30** (2002) 794–797.
- [271] Biogenes: mAb-Services (**2005**).  
URL <http://www.biogenes.de/content/customise/mab.html>
- [272] J. M. Singer, C. M. Plotz. The Latex Fixation Test – 1. Application to the Serologic Diagnosis of Rheumatoid Arthritis. *American Journal of Medicine* **21** (1956) 888–892.
- [273] C. M. Plotz, J. M. Singer. The Latex Fixation Test – 2. Results in Rheumatoid Arthritis. *American Journal of Medicine* **21** (1956) 893–896.
- [274] D. L. Morris, P. B. Ellis, R. J. Carrico, F. M. Yeager, H. R. Schroeder, J. P. Albarella, R. C. Boguslaski, W. E. Hornby, D. Rawson. Flavin Adenine-Dinucleotide as a Label in Homogeneous Colorimetric Immunoassays. *Analytical Chemistry* **53** (1981) 658–665.
- [275] M. Dosch, M. G. Weller, A. F. Bückmann, R. Niessner. Homogeneous Immunoassay for the Detection of Trinitrotoluene (TNT) Based on the Reactivation of Apoglucose Oxidase Using a Novel FAD-Trinitrotoluene Conjugate. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **361** (1998) 174–178.

- [276] C. Heiss, M. G. Weller, R. Niessner. Dip-and-Read Test Strips for the Determination of Trinitrotoluene (TNT) in Drinking Water. *Analytica Chimica Acta* **396** (1999) 309–316.
- [277] J. Rishpon, D. Ivnitski. An Amperometric Enzyme-Channeling Immunosensor. *Biosensors and Bioelectronics* **12** (1997) 195–204.
- [278] J. D. Wright, K. M. Rawson, W. O. Ho, D. Athey, C. J. McNeil. Specific Binding Assay for Biotin Based on Enzyme Channeling with Direct Electron-Transfer Electrochemical Detection Using Horseradish-Peroxidase. *Biosensors and Bioelectronics* **10** (1995) 495–500.
- [279] J. Zeravik, T. Ruzgas, M. Franek. A Highly Sensitive Flow-Through Amperometric Immunosensor Based on the Peroxidase Chip and Enzyme-Channeling Principle. *Biosensors and Bioelectronics* **18** (2003) 1321–1327.
- [280] M. R. Acosta, K. H. Roux, S. S. Teuber, S. K. Sathe. Production and Characterization of Rabbit Polyclonal Antibodies to Almond (*Prunus dulcis* L.) Major Storage Protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47** (1999) 4053–4059.
- [281] J. J. Hlywka, S. L. Hefle, S. L. Taylor. A Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Almonds in Foods. *Journal of Food Protection* **63** (2000) 252–257.
- [282] Y. H. Wei, S. K. Sathe, S. S. Teuber, K. H. Roux. A Sensitive Sandwich ELISA for the Detection of Trace Amounts of Cashew (*Anacardium occidentale* L.) Nut in Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51** (2003) 3215–3221.
- [283] M. U. Keating, R. T. Jones, N. J. Worley, C. A. Shively, J. W. Yunginger. Immunoassay of Peanut Allergens in Food-Processing Materials and Finished Foods. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **86** (1990) 41–44.
- [284] J. M. Yeung, P. G. Collins. Enzyme Immunoassay for Determination of Peanut Proteins in Food Products. *Journal of AOAC International* **79** (1996) 1411–1416.
- [285] S. L. Hefle, R. K. Bush, J. W. Yunginger, F. S. Chu. A Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Quantitation of Selected Peanut Proteins in Foods. *Journal of Food Protection* **57** (1994) 419–423.
- [286] A. Pomes, R. M. Helm, G. A. Bannon, A. W. Burks, A. Tsay, M. D. Chapman. Monitoring Peanut Allergen in Food Products by Measuring Ara h1. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **111** (2003) 640–645.

- [287] O. Stephan, S. Vieths. Development of a Real-Time PCR and a Sandwich ELISA for Detection of Potentially Allergenic Trace Amounts of Peanut (*Arachis hypogaea*) in Processed Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52** (2004) 3754–3760.
- [288] A. Eriksson, B. Kruse, L. Strömbeck, I. Malmheden-Yman. Immunoassays for Peanut Detection in Food Samples, Poster at the Agri-Food Antibodies Conference, Uppsala, Schweden (2003).
- [289] B. Keck-Gassenmeier, S. Benet, C. Rosa, C. Hischenhuber. Determination of Peanut Traces in Food by a Commercially Available ELISA Test. *Food and Agricultural Immunology* **11** (1999) 243–250.
- [290] W. H. Newsome, M. Abbott. An Immunoaffinity Column for the Determination of Peanut Protein in Chocolate. *Journal of AOAC International* **82** (1999) 666–668.
- [291] W. J. Hurst, E. R. Krout, W. R. Burks. A Comparison of Commercially Available Peanut ELISA Test Kits on the Analysis of Samples of Dark and Milk Chocolate. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry* **23** (2002) 451–459.
- [292] R. E. Poms, M. E. Agazzi, A. Bau, M. Brohee, C. Capelletti, J. V. Norgaard, E. Anklam. Inter-Laboratory Validation Study of Five Commercial ELISA Test Kits for the Determination of Peanut Proteins in Biscuits and Dark Chocolate. *Food Additives and Contaminants* **22** (2005) 104–112.
- [293] P. Koch, G. F. Schächli, R. E. Poms, B. Wüthrich, E. Anklam, R. Battaglia. Comparison of Commercially Available ELISA Kits with Human Sera-Based Detection Methods for Peanut Allergens in Foods. *Food Additives and Contaminants* **20** (2003) 797–803.
- [294] M. W. Trucksess, T. B. Whitaker, A. B. Slate, K. M. Williams, V. A. Brewer, P. Whittaker, J. T. Heeres. Variation of Analytical Results for Peanuts in Energy Bars and Milk Chocolate. *Journal of AOAC International* **87** (2004) 943–949.
- [295] U. Immer, B. Reck, S. Lindeke, S. Koppelman. Ridascreen Fast Peanut, a Rapid and Safe Tool to Determine Peanut Contamination in Food. *International Journal of Food Science and Technology* **39** (2004) 869–871.
- [296] M. W. Trucksess, V. A. Brewer, K. M. Williams, C. D. Westphal, J. T. Heeres. Preparation of Peanut Butter Suspension for Determination of Peanuts Using Enzyme-Linked Immunoassay Kits. *Journal of AOAC International* **87** (2004) 424–428.

- [297] T. B. Whitaker, K. M. Williams, M. W. Trucksess, A. B. Slate. Immunochemical Analytical Methods for the Determination of Peanut Proteins in Foods. *Journal of AOAC International* **88** (2005) 161–174.
- [298] S. J. Koppelman, A. C. Knulst, W. J. Koers, A. H. Penninks, H. Peppelman, R. Vlooswijk, I. Pigmans, G. van Duijn, M. Helsing. Comparison of Different Immunochemical Methods for the Detection and Quantification of Hazelnut Proteins in Food Products. *Journal of Immunological Methods* **229** (1999) 107–120.
- [299] B. W. Blais, L. Phillippe. Detection of Hazelnut Proteins in Foods by Enzyme Immunoassay Using Egg Yolk Antibodies. *Journal of Food Protection* **64** (2001) 895–898.
- [300] E. Drs, S. Baumgartner, M. Bremer, A. Kemmers-Voncken, N. Smits, W. Haasnoot, J. Banks, P. Reece, C. Danks, V. Tomkies, U. Immer, K. Schmitt, R. Krska. Detection of Hidden Hazelnut Protein in Food by IgY-Based Indirect Competitive Enzyme-Immunoassay. *Analytica Chimica Acta* **520** (2004) 223–228.
- [301] S. Ben-Rejeb, M. Abbott, D. Davies, J. Querry, C. Cleroux, C. Streng, P. Delahaut, J. M. Yeung. Immunochemical-Based Method for Detection of Hazelnut Proteins in Processed Foods. *Journal of AOAC International* **86** (2003) 557–563.
- [302] N. Graf, D. Knötgen. Bestimmung von Richtigkeit und Präzision kommerzieller ELISA-Kits zur Quantifizierung von Erdnuss-, Haselnuss- und Gliadin-Spuren in Lebensmitteln durch den Anwender. *Lebensmittelchemie* **58** (2004) 114–115.
- [303] K. Snowden, M. Hommel. Antigen-Detection Immunoassay Using Dipsticks and Colloidal Dyes. *Journal of Immunological Methods* **140** (1991) 57–65.
- [304] C. Morissette, J. Goulet, G. Lamoureux. Rapid and Sensitive Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Staphylococcal Enterotoxin-B in Cheese. *Applied and Environmental Microbiology* **57** (1991) 836–842.
- [305] E. Schneider, E. Usleber, E. Märthlbauer. Rapid Detection of Fumonisin B1 in Corn-Based Food by Competitive Direct Dipstick Enzyme Immunoassay/Enzyme-Linked Immunofiltration Assay with Integrated Negative Control Reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43** (1995) 2548–2552.
- [306] S. de Saeger, C. van Peteghem. Dipstick Enzyme Immunoassay to Detect Fusarium T2 Toxin in Wheat. *Applied and Environmental Microbiology* **62** (1996) 1880–1884.

- [307] N. V. Cuong, T. T. Bachmann, R. D. Schmid. Development of a Dipstick Immunoassay for Quantitative Determination of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid in Water, Fruit and Urine samples. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **364** (1999) 584–589.
- [308] V. Kutilek, R. Lee, G. B. Kitto. Development of Immunochemical Techniques for Detecting Karnal Bunt in Wheat. *Food and Agricultural Immunology* **13** (2001) 103–114.
- [309] S. Baumgartner, I. Steiner, S. Kloiber, D. Hirmann, R. Krska, J. Yeung. Towards the Development of a Dipstick Immunoassay for the Detection of Trace Amounts of Egg Proteins in Food. *European Food Research and Technology* **214** (2002) 168–170.
- [310] O. Stephan, N. Möller, S. Lehmann, T. Holzhauser, S. Vieths. Development and Validation of Two Dipstick Type Immunoassays for Determination of Trace Amounts of Peanut and Hazelnut in Processed Foods. *European Food Research and Technology* **215** (2002) 431–436.
- [311] I. Leitzenberger, E. Drs, S. Baumgartner, R. Krska, M. Bremer, A. Kemmers-Voncken, N. Smits, W. Haasnoot, J. Banks, P. Reece, C. Danks, V. Tomkies, U. Immer, K. Schmitt. Development of a Dipstick Assay for the Determination of Traces of Peanut and Hazelnut Proteins in Food Employing Chicken Egg Yolk Antibodies (IgY), Poster at the Annual Meeting of the Austrian Society for Allergology and Immunology, Wien, Österreich (2004).
- [312] B. W. Blais, L. M. Phillippe. A Cloth-Based Enzyme Immunoassay for Detection of Peanut Proteins in Foods. *Food and Agricultural Immunology* **12** (2000) 243–248.
- [313] B. W. Blais, M. Gaudreault, L. M. Phillippe. Multiplex Enzyme Immunoassay System for the Simultaneous Detection of Multiple Allergens in Foods. *Food Control* **14** (2003) 43–47.
- [314] H. Hird, J. Lloyd, R. Goodier, J. Brown, P. Reece. Detection of Peanut Using Real-Time Polymerase Chain Reaction. *European Food Research and Technology* **217** (2003) 265–268.
- [315] T. Holzhauser, A. Wangorsch, S. Vieths. Polymerase Chain Reaction (PCR) for Detection of Potentially Allergenic Hazelnut Residues in Complex Food Matrixes. *European Food Research and Technology* **211** (2000) 360–365.
- [316] T. Holzhauser, O. Stephan, S. Vieths. Detection of Potentially Allergenic Hazelnut (*Corylus avellana*) Residues in Food: A Comparative Study with DNA PCR-ELISA and Protein Sandwich-ELISA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50** (2002) 5808–5815.

- [317] I. Mohammed, W. M. Mullett, E. P. C. Lai, J. M. Yeung. Is Biosensor a Viable Method for Food Allergen Detection? *Analytica Chimica Acta* **444** (2001) 97–102.
- [318] H. Jonsson, K. E. Hellenäs, I. Malmheden-Yman. Automated Biosensor Immunoassay for Detection of Hazelnut Allergens in Food, Poster at the Agri-Food Antibodies Conference, Prag, Tschechien (**2001**).
- [319] R. Verheijen, C. Mayer, T. Schalkhammer. Development of an Immuno Cluster Chip for the Detection of Food Allergens, Poster at the Agri-Food Antibodies Conference, Prag, Tschechien (**2001**).
- [320] T. Holzhauser, L. I. Dehne, A. Hoffmann, D. Haustein, S. Vieths. Rocket Immunoelectrophoresis (RIE) for Determination of Potentially Allergenic Peanut Proteins in Processed Foods as a Simple Means for Quality Assurance and Food Safety. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A* **206** (1998) 1–8.
- [321] I. Malmheden-Yman, B. Kruse. Detection of Milk, Egg, Peanut and Hazelnut in Food Products – An NMKL Collaborative Study, Poster at the Agri-Food Antibodies Conference, Prag, Tschechien (**2001**).
- [322] B. Scheibe, W. Weiss, F. Rueff, B. Przybilla, A. Gorg. Detection of Trace Amounts of Hidden Allergens: Hazelnut and Almond Proteins in Chocolate. *Journal of Chromatography B* **756** (2001) 229–237.
- [323] MicroBC Assay: Protein Quantitation Kit, Uptima, Interchim (Montluçon, Frankreich) (**2005**).
- [324] M. van Duijnhoven, P. C. M. van de Kerkhof, M. C. Pasch, L. Muys, P. E. J. van Erp. The Combination of the Zenon Labeling Technique and Microscopic Image Analysis to Study Cell Populations in Normal and Psoriatic Epidermis. *Journal of Cutaneous Pathology* **32** (2005) 212–219.
- [325] J. K. Brown, A. D. Pemberton, S. H. Wright, H. R. P. Miller. Primary Antibody-Fab Fragment Complexes: A Flexible Alternative to Traditional Direct and Indirect Immunolabeling Techniques. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **52** (2004) 1219–1230.
- [326] L. Bjorck, G. Kronvall. Purification and Some Properties of Streptococcal Protein G, a Novel IgG Binding Reagent. *Journal of Immunology* **133** (1984) 969–974.
- [327] B. Akerström, T. Brodin, K. Reis, L. Bjorck. Protein G – A Powerful Tool for Binding and Detection of Monoclonal and Polyclonal Antibodies. *Journal of Immunology* **135** (1985) 2589–2592.

- [328] C. Aybay. Differential Binding Characteristics of Protein G and Protein A for Fc Fragments of Papain-Digested Mouse IgG. *Immunology Letters* **85** (2003) 231–235.
- [329] M. Kiening, R. Niessner, E. Drs, S. Baumgartner, R. Krska, M. Bremer, V. Tomkies, P. Reece, C. Danks, U. Immer, M. G. Weller. Sandwich Immunoassays for the Determination of Peanut and Hazelnut Traces in Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53** (2005) 3321–3327.
- [330] W. J. Malaisse, T. M. Zhang, I. Verbruggen, R. Willem. D-Glucose Generation from [2-<sup>13</sup>C] Pyruvate in Rat Hepatocytes: Implications in Terms of Enzyme-to-Enzyme Channelling. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **332** (1996) 341–351.
- [331] W. J. Malaisse, Y. Zhang, H. Jijakli, P. Courtois, A. Sener. Enzyme-to-Enzyme Channelling in the Early Steps of Glycolysis in Rat Pancreatic Islets. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **36** (2004) 1510–1520.
- [332] M. Serafini, R. Bugianesi, G. Maiani, S. Valtuena, S. D. Santis, A. Crozier. Plasma Antioxidants from Chocolate – Dark Chocolate May Offer its Consumers Health Benefits the Milk Variety Cannot Match. *Nature* **424** (2003) 1013.
- [333] A. J. Charlton, N. J. Baxter, M. L. Khan, A. J. G. Moir, E. Haslam, A. P. Davies, M. P. Williamson. Polyphenol/Peptide Binding and Precipitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50** (2002) 1593–1601.
- [334] H.-D. Belitz, W. Grosch. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, **1992**.
- [335] W. Baltes. *Lebensmittelchemie*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, **1995**.
- [336] K. E. Sharpless, C. S. Phinney, L. J. Wood, J. H. Yen, D. W. Howell. Value Assignment of Nutrient and Aflatoxin Concentrations in Standard Reference Material 2387 Peanut Butter. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51** (2003) 6745–6751.
- [337] *RidascreenFast Peanut – Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Erdnuss*. R-Biopharm AG, Darmstadt, **2003**.
- [338] *RidascreenFast Hazelnut – Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Haselnuss*. R-Biopharm AG, Darmstadt, **2004**.
- [339] I. Fürtler-Leitzenberger, U. Immer, K. Schmitt, S. Baumgartner, C. Danks, V. Tomkies, P. Reece, M. Bremer, P. Wilson, E. Corsini, M. Kiening, M. G.

Weller, R. Niessner, M. Janotta, R. Krska. Detection of Peanut and Hazelnut Protein in Food Matrices by Prototype ELISA Test Kits: Results of a Collaborative Trial. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2005) eingereicht.

- [340] *Gel Filtration – Principles and Methods*. Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden, **2002**.