

Abschlussbericht

für die Heinrich-Stockmeyer-Stiftung

zum Forschungsprojekt

„Allergene Proteine in Lebensmitteln: Analytischer Nachweis
und Untersuchungen zur Interaktion mit der Lebensmittelmatrix“

Förderungszeitraum: 01. Mai 2012 – 30. April 2014

vorgelegt durch: Marlene Hummel

Betreuer: Prof. Hans-Ulrich Humpf und Dr. Jens Brockmeyer

Institut für Lebensmittelchemie
Westfälische Wilhelms-Universität Münster

1 Allgemeine Angaben

ANTRAGSTELLERIN

Marlene Hummel

Institut für Lebensmittelchemie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster

THEMA DES PROJEKTES

Allergene Proteine in Lebensmitteln: Analytischer Nachweis und Untersuchungen zur Interaktion mit der Lebensmittelmatrix

BERICHTS- UND FÖRDERUNGSZEITRAUM

2 Jahre (01.05.2012 – 30.04.2014)

PUBLIKATIONSLISTE

Publikationen:

- Hummel, M., Wigger, T., Brockmeyer, J.: „Identification of new 2S albumin isoforms in yellow mustard using a novel combination of Bottom-Up, Middle-Down and Top-Down Proteomics“, 2014, *submitted*

Posterpräsentationen:

- Hummel, M., Wigger, T., Brockmeyer, J.: „Identification and Characterization of Allergens in Spices by Mass Spectrometry“, International Symposium on Molecular Allergology 2013, Vienna, 05.-07.12.2013
- Wigger T., Hummel, M., Brockmeyer, J.: “Charakterisierung von allergenen Proteinen in Sesam und Senf”, 42. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Braunschweig, 16.-18.09.2013
- Hummel, M., Brockmeyer, J.: „Identifizierung allergener Proteine in Gewürzen mittels Massenspektrometrie“, 42. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Braunschweig, 16.-18.09.2013
- Hummel, M., Wigger, T., Brockmeyer, J.: „Identification of Major Allergens by Mass Spectrometry“, Food Allergy and Anaphylaxis Meeting 2013, Nice, 07.-09.02.2013
- Hummel, M., Brockmeyer, J.: “Allergene Proteine in Gewürzen”, 41. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Münster, 10.-12.09.2012

In sämtlichen Publikationen und Präsentationen wurde der Heinrich-Stockmeyer-Stiftung für ihre freundliche Unterstützung gedankt. Die Posterbeiträge sind dem Bericht angehängt, eine digitale Version der Publikation wird nach Veröffentlichung nachgereicht.

2 Arbeits- und Ergebnisbericht

2.1 Einleitung

In westlichen Industriestaaten leiden etwa 2-3 % der Bevölkerung an einer IgE-vermittelten Lebensmittelallergie [1]. Dabei reicht die Symptomatik dieser fehlgeleiteten Immunreaktion des Körpers von leichten Hautreizungen bis hin zu schweren und lebensbedrohlichen systemischen Reaktionen wie dem anaphylaktischen Schock. Eine kausale Therapie ist für Lebensmittelallergiker zur Zeit nicht verfügbar, sodass die konsequente Vermeidung des jeweiligen Allergens für Betroffene zwingend notwendig ist. Dieser Problematik begegnet der Gesetzgeber unter anderem mit der EU-Etikettierungs-Richtlinie 2000/13/EG [2], nach der Lebensmittelhersteller seit 2005 die 14 häufigsten Allergene auf der Verpackung von Lebensmitteln kenntlich machen müssen. Auf diese Weise soll Allergikern die Auswahl von allergenfreien Lebensmitteln erleichtert werden. Zusätzlich zu dieser verpflichtenden Deklaration der enthaltenen allergenen Zutaten kann der Hersteller auf freiwilliger Basis einen Hinweis auf möglicherweise im Lebensmittel enthaltene Allergene geben, die nicht gemäß Rezeptur, sondern unbeabsichtigt in das Produkt gelangt sein können. Auch wenn dieses sogenannte „may contain – labelling“ dem Verbraucherschutz dient, besteht das Risiko der Überdeklaration, die mit unnötigen Einschränkungen für Allergiker verbunden sein kann. Abhilfe kann an dieser Stelle nur eine verbesserte Analytik im Spurenbereich sowie die genaue Charakterisierung der allergieauslösenden Proteine liefern, sodass der freiwillige Hinweis auf mögliche Allergenkontamination zwar so häufig wie nötig, aber gleichzeitig so selten wie möglich erfolgt.

2.2 Projektbeschreibung und Zielsetzung

TEILPROJEKT 1 – NACHWEISMETHODE

Ein wesentliches Ziel des Projektes ist die Entwicklung einer Massenspektrometrie-basierten Nachweismethode für die Bestimmung der Hauptallergene in Senf, Sesam und Sellerie. In Verbindung mit geeigneten Verfahren der Probenvorbereitung stellt die Massenspektrometrie für den Nachweis von Allergenspuren in komplexen Lebensmittelmatrices ein bedeutendes Werkzeug dar. Die Entwicklung der Nachweismethode sollte dabei dreistufig verlaufen. Im ersten Schritt werden mit Hilfe des hochauflösenden Orbitrap XL FTMS geeignete Markerpeptide, die für das zu untersuchende Allergen spezifisch sind, identifiziert. Im nächsten Schritt erfolgt auf Basis der ausgewählten Peptidmarker eine Etablierung der Methode an einem Triple-Quadrupol Massenspektrometer (AB Sciex 5500). In einem letzten Schritt wird die Methode im Hinblick auf Leistung, Sensitivität, Zeitaufwand und Robustheit optimiert. Als interne Standards kommen in diesem letzten Schritt stabil-isotopenmarkierte

Peptide zum Einsatz. Anwendung könnte eine solche Methode in vielen Bereichen der Lebensmittelindustrie und -überwachung finden. Die gängigen Nachweismethoden, die größtenteils auf Basis eines ELISA-Assays oder PCR-basiert erfolgen, könnten durch ein massenspektrometrisches Verfahren abgelöst werden. Mit Hilfe einer etablierten massenspektrometrischen Methode sollte es möglich werden, die Nachweisgrenze für Allergene deutlich zu senken und somit Lebensmittel für den Verbraucher sicherer zu machen.

TEILPROJEKT 2 – CHARAKTERISIERUNG DER MAJORALLERGENE AUS SENF UND SESAM MITTELS NEUARTIGER KOMBINATION VON BOTTOM-UP, MIDDLE-DOWN UND TOP-DOWN-STRATEGIE

Ein weiteres Ziel der Arbeit ist die genaue Charakterisierung einzelner ausgewählter Allergene. Im Laufe der Arbeit erwies sich die Gruppe der 2S-Albumine als interessante und relevante Proteingruppe, zu der unter anderem die Majorallergene aus Senf und Sesam gehören. 2S-Albumine sind kleine, globuläre Proteine, die zur Prolamin-Superfamilie gehören. Sie kommen in Pflanzensamen vor, in denen sie zur Speicherung von Nährstoffen für die Entwicklung des Pflanzenkeimlings dienen. Strukturell handelt es sich bei dieser Proteingruppe um Heterodimere, die aus einer großen Untereinheit (8-10 kDa) und einer kleinen Untereinheit (3-4 kDa) bestehen. Die beiden Untereinheiten sind über zwei Disulfidbrücken miteinander verknüpft. Obwohl alle 2S-Albumine eine sehr ähnliche dreidimensionale Struktur mit einem hohen Anteil an α -Helices aufweisen, zeichnen sie sich im Hinblick auf die Aminosäuresequenz durch eine ausgeprägte Heterogenität aus. Weisen zwei Proteine eine Aminosäure-Sequenzübereinstimmung von mehr als 90 % auf, spricht man von Protein-Isoformen. Liegt die Sequenzübereinstimmung lediglich bei mehr als 67 %, spricht man von Isoallergenen. Isoformen können aufgrund von Genpolymorphismen, Variationen der mRNA-Prozessierung sowie unterschiedlicher posttranslationaler Modifizierungen entstehen [3].

Für das Hauptallergen Sin a 1 aus Senf sind bereits 8 Isoformen beschrieben [4, 5, 6], die jedoch lediglich auf der Basis von gentechnischen Methoden identifiziert wurden. Da die Anwesenheit eines Gens noch keine Aussage über die Exprimierbarkeit eines Proteins zulässt, stellt die Untersuchung auf Proteom-Ebene eine sinnvolle Ergänzung zur Analyse auf Genom-Ebene dar. Die hochauflösende Massenspektrometrie stellt ein ideales Werkzeug für die Bestätigung der bereits beschriebenen Isoformen dar und bietet darüber hinaus die Möglichkeit, noch nicht bekannte Isoformen zu identifizieren. Ermöglicht wird dies durch die Etablierung einer neuartigen Kombination von drei verschiedenen Proteomics-Ansätzen, die im Ergebnisteil näher beschrieben wird.

TEILPROJEKT 3 – *IN-VITRO* VERDAUMODELL

Mit Hilfe eines im Institut entwickelten *in-vitro* Verdaumodells sollen darüber hinaus Aussagen über das allergene Potential von unverarbeiteten und verarbeiteten Lebensmitteln getroffen werden. Das *in-vitro* Verdaumodell simuliert die Bedingungen, denen Substanzen im Körper während der Magen- bzw. Darmphase ausgesetzt sind. Auf diese Weise wird es möglich, die Veränderung von Proteinen im Laufe des Verdauungsprozesses sichtbar zu machen. Die Magenpassage zeichnet sich vor allem durch ein stark saures Millieu (pH 1-2) und die Anwesenheit der Protease Pepsin aus. In der Darmphase findet eine Erhöhung des pH-Wertes auf etwa 8-9 statt. Die Ausschüttung von Pankreasenzyme wird durch die Zugabe der beiden wichtigsten Proteasen – Trypsin und Chymotrypsin – simuliert. Außerdem werden Gallensalze in physiologisch relevanten Mengen zugegeben. Ein allergenes Protein zeichnet sich unter anderem durch eine außergewöhnliche Stabilität gegenüber Verdauungsprozessen aus, wodurch verhältnismäßig große Proteinbruchstücke unbeschadet den Magen-Darm-Trakt passieren und im Dünndarm in den Blutkreislauf aufgenommen werden können. Daraufhin kommt es bei Betroffenen zu der allergischen Reaktion. Welche Sequenzbereiche eines Proteins im Hinblick auf die Verdaubarkeit besonders geschützt sind und damit zum Auslöser der allergischen Reaktion werden, ist bislang nur unzureichend aufgeklärt. Auch für die Charakterisierung dieser Bruchstücke ist die hochauflösende Massenspektrometrie Instrument der Wahl. Nach Etablierung eines Systems für unverarbeitete Lebensmittel soll das Modell auf verarbeitete Lebensmittel übertragen werden. Auf diese Weise kann abgeschätzt werden, welchen Einfluss Verarbeitungsprozesse wie zum Beispiel das Rösten von Sesam auf die Allergenität haben. Dabei spielt vor allem die für Lebensmittelprozessierung relevante Maillard-Reaktion eine wichtige Rolle.

TEILPROJEKT 4 – SELEKTIVE EXTRAKTION AUSGEWÄHLTER ALLERGENE

Für die Isolierung einzelner Proteine kommen in der Praxis häufig präparative flüssigchromatographische Techniken zum Einsatz. Eine Auftrennung nach Proteingröße gelingt zum Beispiel mit Hilfe einer Gelpermeationschromatographie. Bis zur Isolierung eines einzelnen Proteins sind jedoch meist mehrere Aufreinigungsschritte notwendig. Zudem ist das Verfahren zeitaufwendig und die Anschaffung von geeigneten Chromatographie-Säulen und einer FPLC-Anlage kostspielig. Im Rahmen des Projektes soll ein einfaches Verfahren entwickelt werden, welches die selektive Extraktion einer einzelnen Proteingruppe (2S Albumine) ermöglicht.

2.3 Ergebnisse und Diskussion

TEILPROJEKT 1 – NACHWEISMETHODE

Für die allergenen Proteine aus Senf, Sesam und Sellerie sollte eine spezifische Nachweismethode entwickelt werden. Zu Beginn der Experimente zeigten sich Schwierigkeiten bei der Herstellung eines Sellerieextraktes aufgrund von oxidativen Veränderungen. Trotz Einsatz geeigneter Maßnahmen (Zusatz von Antioxidantien, Ausschluss von Luftsauerstoff) ließ sich kein reproduzierbares Extrakt erzeugen, weshalb die Nachweismethode zunächst vorrangig für Senf und Sesam entwickelt werden sollte. Im ersten Schritt sollten nach tryptischem Verdau eines Senf- oder Sesamextraktes aus der Vielzahl entstandener Peptiden diejenigen ausgewählt werden, die für eine spezifische Nachweismethode geeignet sind. Dabei spielen diverse Kriterien wie Extrahierbarkeit, Abundanz, Peptidgröße, Ionisierbarkeit und Spezifität eine Rolle. Ein erstes Screening führte zur reproduzierbaren Identifizierung von 120 potentiellen Markerpeptiden für Senf und 150 Markerpeptiden für Sesam. Durch Selektion nach oben genannten Kriterien reduzierte sich die Menge an geeigneten Markerpeptiden auf 10 Peptide für Senf und 30 Peptide für Sesam. Alle Peptide konnten reproduzierbar mit Hilfe der Orbitrap XL FTMS identifiziert werden. Im nächsten Schritt sollte eine Übertragung der Methode auf ein Triple-Quadrupol Massenspektrometer erfolgen. Nach intensiver Methodenentwicklung ließ sich keines der zuvor identifizierten Peptide am Triple-Quadrupol Gerät nachweisen. Da zu diesem Zeitpunkt die Neuanschaffung eines weiteren Massenspektrometers geplant war, mit dessen Hilfe dieses Problem möglicherweise lösbar wird, wurde das Teilprojekt zunächst pausiert und soll zum Zeitpunkt der Anschaffung des neuen Massenspektrometers wieder aufgenommen werden.

TEILPROJEKT 2 – CHARAKTERISIERUNG DER MAJORALLERGENE AUS SENF UND SESAM MITTELS NEUARTIGER KOMBINATION VON BOTTOM-UP, MIDDLE-DOWN UND TOP-DOWN-STRATEGIE

Im Laufe der Arbeit konnte eine neuartige Kombination von drei verschiedenen Proteomics-Ansätzen entwickelt werden, die dazu eingesetzt werden kann, Allergenisoformen zu identifizieren. Dabei kann sogar der Austausch einer einzelnen Aminosäure in der Proteinsequenz identifiziert und lokalisiert werden. Für diese Methode wurden die drei Proteomics-Ansätze „Bottom-Up“, „Middle-Down“ und „Top-Down“ kombiniert. Bei der verbreiteten Bottom-Up Technik werden die Proteine vor der Analytik zunächst proteolytisch verdaut. Das dadurch erhaltene Peptidgemisch kann nach flüssigchromatographischer Trennung mittels Massenspektrometrie untersucht werden. Mit Hilfe spezieller Software (PEAKS®) lassen sich die auf diese Weise entstandenen Fragmentspektren auswerten. Der in der Software integrierte SPIDER-Algorithmus macht eine Identifizierung und Lokalisierung

einzelner Punktmutationen möglich. Diese Technik liefert jedoch keine Hinweise darüber, wie die nachgewiesenen Mutationen im intakten Protein kombiniert sind. Bei der Top-Down Strategie werden die Proteine ohne vorherigen Verdau in ihrer intakten Form analysiert. Über die Masse der intakten Proteine können relativ schnell und ohne aufwendige Probenvorbereitung Hinweise zu verschiedenen Isoformen und Modifikationen erhalten werden. Eine Zwischenform dieser beiden Strategien stellt die sogenannte Middle-Down Technik dar, bei der die Proteine vor der Analytik mittels limitierter Proteolyse in Untereinheiten gespalten und anschließend massenspektrometrisch analysiert werden.

TEILPROJEKT 2A – CHARAKTERISIERUNG DER MAJORALLERGENE AUS SENF

Mit Hilfe der oben beschriebenen Kombination verschiedener Proteomics-Ansätze wurde das Hauptallergen aus Senf – Sin a 1 – genauer untersucht. Dabei konnten wir vier von den bereits in der Literatur beschriebenen Isoformen bestätigen und haben zusätzlich vier neue Isoformen identifiziert. Im ersten Schritt wurde das Allergen auf mögliche Punktmutationen untersucht. In Abb. 1 ist ein Beispiel für die Identifizierung von Mutationen mit Hilfe des SPIDER-Algorithmus dargestellt. Auf diese Weise ließen sich insgesamt 27 Mutationen in der 130 Aminosäuren langen Sin a 1 Sequenz feststellen.



Abb. 1: Kleine Untereinheit des Major-Allergens Sin a 1. Die Aminosäuresequenz ist grau hinterlegt, identifizierte Aminosäure-Mutationen sind in weißen Kästen ober- und unterhalb der Sequenz aufgeführt, Aminosäure-Modifikationen sind farbig dargestellt.

Im nächsten Schritt wurden die intakten Proteine bzw. die beiden Untereinheiten analysiert. Nach Berechnung der monoisotopischen Masse der identifizierten Proteine wurden die auf Bottom-Up Ebene identifizierten Mutationen mit den Top-Down bzw. Middle-Down Ergebnissen zusammengeführt. Abb. 2 zeigt ein Top-Down Spektrum des intakten Proteins Sin a 1.

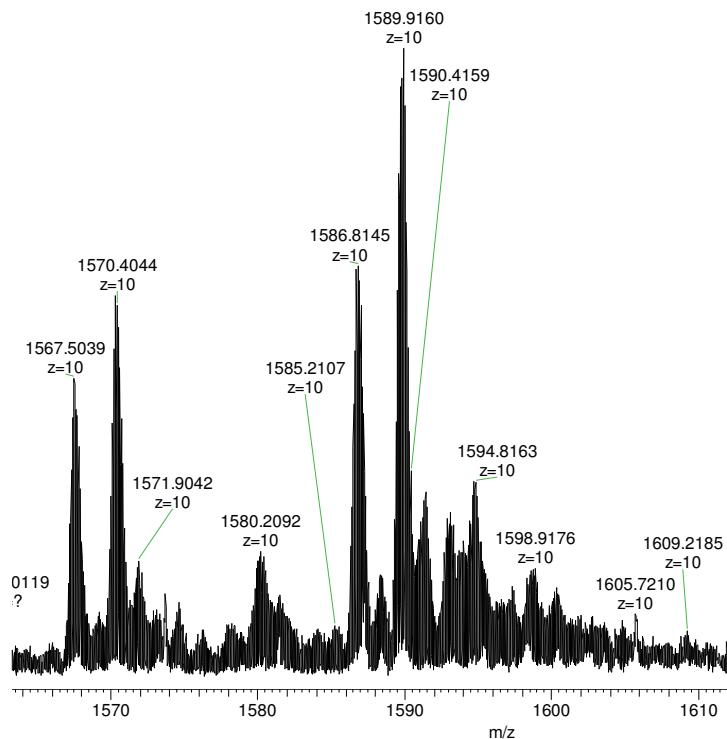


Abb. 2: HESI-MS-Top-Down-Spektrum des intakten Sin a 1 Proteins, positiver Ionenmodus. Dargestellt ist der Ladungszustand $z = +10$.

Jeder Peak in dem in Abb. 2 dargestellten Spektrum repräsentiert eine identifizierte Isoform. Es lässt sich deutlich erkennen, dass 4 abduante und etwa 4-6 noch gut identifizierbare Isoformen vorliegen. Auf Basis von 1216 Top-Down Massen, 1312 Middle-Down Massen für die große Untereinheit und 1308 Middle-Down Massen für die kleine Untereinheit ließen sich die 4 bekannten Isoformen Sin a 1.0105, Sin a 1.0106, Sin a 1.0107 und Sin a 1.0108 eindeutig nachweisen. Zusätzlich konnten wir vier neue Isoformen identifizieren. Die Charakterisierung der einzelnen Isoformen eines Allergens ist insbesondere für den medizinisch-diagnostischen Bereich interessant. Es ist bislang nicht bekannt, ob alle Isoformen gleichermaßen allergene Wirkung aufweisen. Aufgrund der mutierten Aminosäuresequenz wäre eine veränderte Faltung des intakten Proteins durchaus denkbar. Die veränderte 3-dimensionale Struktur könnte somit auch ein abweichendes IgE-Bindungsverhalten zur Folge haben, was im direkten Zusammenhang mit der Allergenität des Proteins steht. Die Ergebnisse dieses Projektes werden in wenigen Tagen einem Journal zur Veröffentlichung angeboten (siehe Publikationsliste).

TEILPROJEKT 2B – CHARAKTERISIERUNG DER MAJORALLERGENE AUS SESAM

Mit Hilfe der oben beschriebenen Technik wurde außerdem das Hauptallergen aus Sesam – Ses i 1 – genauer charakterisiert. Im Gegensatz zu den in Teilprojekt 2a beschriebenen Ergebnissen konnten wir für Ses i 1 keine Isoformen-Heterogenität nachweisen. Es ließ sich jedoch ein für 2S-Albumine bereits beschriebenes Phänomen nachweisen, das als C-

terminales Clipping bekannt ist. Dabei lassen sich Aminosäuresequenzen nachweisen, die vom C-terminalen Ende ausgehend jeweils um eine oder mehrere Aminosäuren verkürzt sind. Während das C-terminale Clipping für die kleine Untereinheit von Ses i 1 bereits 2005 von Moreno et al. [7] beschrieben wurde, ist es uns gelungen, das Clipping erstmals auch am C-Terminus der großen Untereinheit nachzuweisen. Die physiologische Bedeutung dieses Phänomens ist bislang nicht bekannt. Die Quantifizierung der geclippten Proteine soll erste Hinweise darauf geben, ob möglicherweise eine pflanzenspezifische Protease vorliegt, die ausschließlich C-terminal arbeitet. Nach diesem noch ausstehenden Experiment zur Quantifizierung, die mit Hilfe eines isotopenmarkierten Standards erfolgen wird, sollen diese Ergebnisse in den nächsten Wochen publiziert werden.

TEILPROJEKT 3 – IN-VITRO VERDAUSYSTEM

Mit Hilfe eines im Institut entwickelten *in-vitro* Verdaumodells sollen die Bedingungen, denen ein Allergen während der Verdauung im Magen- und im Darmtrakt ausgesetzt ist, simuliert werden. Auch in diesem Projekt haben wir uns zunächst auf die Gruppe der 2S Albumine beschränkt. Diese Proteingruppe ist aufgrund seiner dreidimensionalen Struktur bekannt für seine Stabilität gegenüber Verdauungsprozessen. Welche Strukturen im Allergen besonders resistent gegenüber Verdauungsprozessen sind, ist jedoch noch unzureichend erforscht. In den ersten bereits durchgeführten Experimenten lässt sich die Stabilität der Proteine bestätigen. Es wurde zunächst eine Kinetik-Studie durchgeführt, bei der die Allergene für eine Stunde in simulierten Magenbedingungen und anschließend für eine Stunde in simulierten Darmbedingungen bewegt wurden. Alle 10 Minuten wurden Aliquots entnommen, welche anschließend mit Hilfe von SDS-Page untersucht wurden. Das Ergebnis zeigte, dass selbst am Endpunkt des simulierten Verdauprozesses kein Abbau der Proteine stattgefunden hat. Die Versuche sollen in den nächsten Woche mit einer verlängerten Verweildauer in Magen- und Darmpassage wiederholt und anschließend massenspektrometrisch untersucht werden. Auf der Basis von massenspektrometrischen Daten könnte eine genaue Aussage über stabile und labile Bereiche des Proteins getroffen werden, was wiederum Hypothesen zu potentiellen IgE-Bindungsepitopen zulässt.

TEILPROJEKT 4 – SELEKTIVE EXTRAKTION AUSGEWÄHLTER ALLERGENE

Im Rahmen des Projektes konnte eine selektive Extraktion der Gruppe der 2S-Albumine erreicht werden. Dabei wurden die Parameter Pufferart, pH-Wert, Puffermolarität, Einstalzeffekt, Extraktionsdauer und Extraktionstemperatur getestet. Es hat sich herausgestellt, dass insbesondere der pH-Wert eine entscheidende Rolle für die Selektivität der Extraktion darstellt. Während bei gängigen Extraktionssystemen, bei denen häufig ein pH-Wert von 7-8 eingestellt wird, die gesamte Bandbreite an Proteinen extrahiert wird, erfolgt

bei einem pH-Wert von etwa 3,5 eine selektive Extraktion der 2S-Albumine. In Abb. 3 sind die Unterschiede in Abhängigkeit vom pH-Wert deutlich sichtbar.

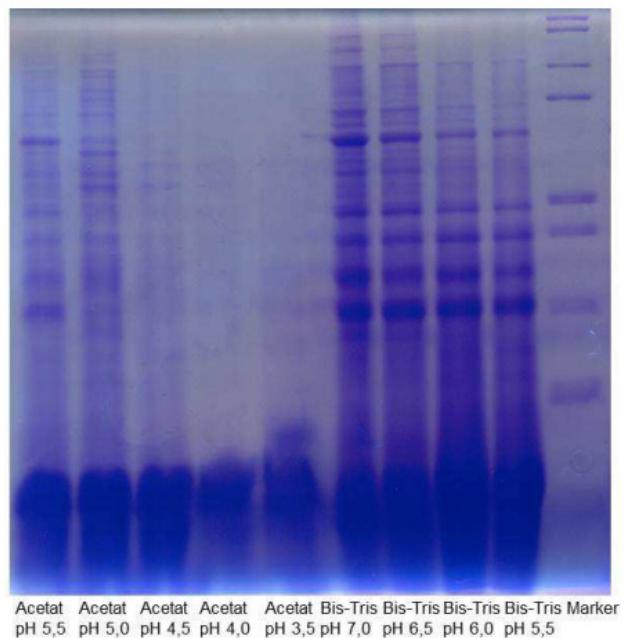


Abb. 3. Tricin-SDS-Page von unter verschiedenen Bedingungen extrahiertem Sesam.

Während bei pH 7 noch das gesamte Proteinspektrum aus fein vermahlener Sesamsaat extrahiert wird, lässt sich der zunehmend selektive Charakter mit Absenkung des pH-Wertes deutlich erkennen. Ab pH-Werten von 4,0 kann von einer selektiven Extraktion gesprochen werden, die im Hinblick auf ihre Effizienz einer Aufreinigung mittels flüssigchromatographischer Techniken nicht nachsteht. Auf diese Weise kann in Abhängigkeit von der Fragestellung allein durch richtige Wahl des Puffersystems bereits eine Voraufreinigung einer Proteingruppe erreicht werden.

3 Zusammenfassung

Die Allergene Senf und Sesam gehören zu den 14 häufigsten allergieauslösenden Lebensmittelinhaltstoffen in Europa. Bereits 2-3 % der Bevölkerung westlicher Industriestaaten leiden an einer IgE-vermittelten Lebensmittelallergie. In dem Projekt „Allergene Proteine in Lebensmitteln – Analytischer Nachweis und Interaktion mit der Lebensmittelmatrix“ steht die umfassende Charakterisierung der Hauptallergene aus Senf und Sesam im Mittelpunkt. Es handelt sich dabei um 2S-Albumine, von denen häufig mehrere Isoformen vorliegen, verursacht durch Genpolymorphismen und unterschiedliche posttranskriptionale Prozessierung. In Kombination mit einer geeigneten Probenvorbereitung stellt die hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS) ein bedeutendes Werkzeug im Repertoire aktueller Methoden zur Analyse von Protein-Isoformen dar. Mit Hilfe einer neuartigen Kombination aus Bottom-Up, Middle-Down und Top-Down Proteomics konnten wir nicht nur bereits in der Literatur beschriebene Isoformen des Senf-Majorallergens Sin a 1 bestätigen, sondern auch bislang nicht beschriebene Isoformen nachweisen. Dabei waren wir in der Lage, mit Hilfe der hochauflösenden Massenspektrometrie den Austausch einer einzelnen Aminosäure nicht nur zu identifizieren, sondern auch zu lokalisieren. Da bereits einzelne Punktmutationen zu einer Änderung in der Ausbildung der dreidimensionalen Proteinstruktur führen können, ist nicht auszuschließen, dass damit auch ein verändertes IgE-Bindungsverhalten einhergeht. Die genaue Kenntnis über die Heterogenität von Allergenisoformen stellt somit eine notwendige Basis für das Verständnis von allergieauslösenden Prozessen dar. Bei der Untersuchung des Hauptallergens aus Sesam – Ses i 1 – ließ sich das bereits beschriebene Phänomen des C-terminalen Clippings an der kleinen Untereinheit des Proteins bestätigen. Im Laufe des Projektes konnten wir das Clipping erstmals auch am C-Terminus der großen Untereinheit nachweisen. Des Weiteren wurde ein Extraktionssystem entwickelt, welches die selektive Extraktion von 2S-Albuminen ermöglicht. Das System ist im Hinblick auf die Effizienz vergleichbar mit gängigen präparativen flüssigchromatographischen Aufreinigungstechniken und stellt eine kostengünstige und schnelle Alternative dar.

Dieses Promotionsprojekt wurde durch die Heinrich-Stockmeyer Stiftung gefördert.

This study was financed by the Heinrich-Stockmeyer Foundation.

4 Literatur

- [1] Sicherer, S. H., Sampson, H. A., Food allergy, *The Journal of allergy and clinical immunology*, 125 (2), 2010, 116-125.
- [2] Richtlinie 2000/13/EG des europäischen Parlaments und des Rates vom 20.03.2000 zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedsstaaten über die Etikettierung und Aufmachung von Lebensmitteln sowie die Werbung hierfür (Abl. Nr. L 109, p. 29).
- [3] Chapman, M. D., Pomés, A., Breiteneder, H., Ferreira, F., Nomenclature and structural biology of allergens, *The Journal of allergy and clinical immunology*, 119 (2), 2007, 414-420.
- [4] Menendez-Arias, L., Moneo, I., Dominguez, J., Rodriguez, R., Primary structure of the major allergen of yellow mustard (*Sinapis alba* L.) seed, *Sin a 1*, *European Journal of Biochemistry*, 177 (1), 1988, 159-166.
- [5] Gonzalez de la Pena, M. A., Monsalve, R. I., Batanero, E., Villalba, M., Rodriguez, R., Expression in *Escherichia coli* of *Sin a 1*, the major allergen from mustard, *European Journal of Biochemistry*, 237 (3), 1996, 827-832.
- [6] Gonzalez de la Pena, M. A., Villalba, M., Garcia-Lopez, J. L. Rodriguez, R., Cloning and expression of the major allergen from yellow mustard seeds, *Sin a 1*, *Biochemical and biophysical research communications*, 190 (2), 1993, 648-653.
- [7] Moreno, F. J., Maldonado, B. M., Wellner, N., Mills, E. N., Thermostability and in vitro digestibility of a purified major 2S albumin (*Ses i 1*) from white sesame seeds (*Sesamum indicum* L.), *Biochimica et biophysica acta*, 1752 (2), 2005, 142-153

M. Hummel, T. Wigger, J. Brockmeyer

Identification and Characterization of Allergens in Spices by Mass Spectrometry



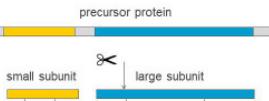
Background

One of the major sources of hidden allergens in food is the use of spices that contain undeclared allergenic ingredients. Sesame and mustard are highly relevant in this context, as both seeds are frequently used in a variety of spices and can elicit severe allergic reactions. Major allergens of mustard and sesame belong to the 2S-albumin family of seed storage proteins. [1,2]

2S albumin storage proteins

2S albumins are members of the prolamin superfamily and are widely distributed in seeds and tree nuts. They are synthesized as a single 13 kDa precursor protein that is subjected to extensive posttranslational proteolytic processing. The mature 2S albumins are composed of two subunits of approximately 9-10 kDa and 3-4 kDa size, which are linked by two disulfide bridges. [3]

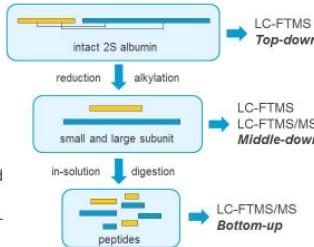
The 2S albumins are encoded by a multigene family possibly leading to numerous isoforms that may show considerable differences in their structure and allergenicity.



Methods

1. Extraction (2h, 60 °C, Tris-HCl)
2. Gel permeation chromatography
 - Superdex 200
3. HPLC-HRMS
 - Accucore C4/C18
 - LTQ Orbitrap XL

➤ Intact proteins (*Top-down*)
➤ Subunits after reduction and alkylation (*Middle-down*)
➤ Peptides after in-solution-digestion (*Bottom-up*)



Sesame allergen Ses i 1



Combination of *Bottom-up*, *Middle-down* and *Top-down*

1 Q...QRYLSQGRSPYGGEE 26
Q_{Pyro} Q...QRYLSQGRSPYGGEE
Q_{Pyro} Q...QRYLSQGRSPYGGEE
Q_{Pyro} Q...QRYLSQGRSPYGGEE
Q_{Pyro} Q...QRYLSQGRSPYGGEE

1 Q...DLPRRCNMRPQQCQFRVIF 61
Q_{Pyro} Q...DLPRRCNMRPQQCQFRVIF
Q_{Pyro} Q...DLPRRCNMRPQQCQFRVIF

Fig. 1: C-terminal clipping of small subunit (above) and large subunit (right) of sesame allergen Ses i 1. Q_{Pyro}: Conversion of glutamate to pyroglutamate.

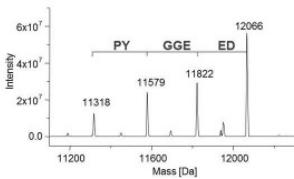


Fig. 2: HPLC-ESI-HRMS positive ion spectrum, small subunit of Ses i 1, deconvoluted spectrum. The designated mass shifts represent the clipping of single amino acids.

C-terminal Clipping was observed in the small and large subunit of sesame allergen Ses i 1 due to combination of Bottom-up, Middle-down and Top-down proteomics.

N-terminal conversion of glutamate to pyroglutamate was confirmed.

Westfälische Wilhelms-Universität Münster
Institut of Food Chemistry | Corrensstr. 45 | 48149 Münster
jbrockm@uni-muenster.de | www.uni-muenster.de/chemie.ic

This study was financed by the Heinrich-Stockmeyer Foundation

Conclusion

The 2S albumin **Sin a 1** is a major mustard allergen that exists in different isoforms, which are not fully characterized. Using a combination of Bottom-up, Middle-down and Top-down proteomics and high resolution mass spectrometry, we were able to identify 9 isoforms of **Sin a 1**. Notably, 6 isoforms have not been described in literature yet demonstrating the pronounced level of heterogeneity of this allergen.

For the major sesame allergen **Ses i 1**, we observed C-terminal clipping of both subunits and N-terminal conversion of glutamate to pyroglutamate.

Mustard allergen Sin a 1



A: Bottom-up (Peptide level)

Fig. 3: Precursor peptide sequence of mustard allergen Sin a 1 with all modifications identified by HRMS after tryptic in-solution digestion. Data evaluation was performed with the Software PEAKS®. Sequence of the small subunit is highlighted in yellow, sequence of the large subunit is displayed in blue. Linker peptide (highlighted in grey) is excised during posttranslational processing. All asterisked modifications are unknown so far.

B: Middle-down (Subunit level)

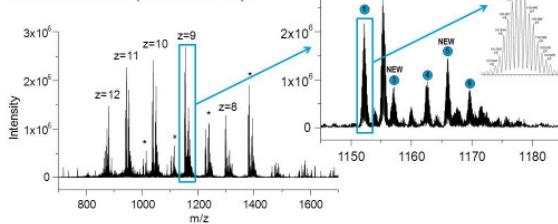


Fig. 4: HPLC-ESI-HRMS positive ion spectrum, large subunit. Low molecular weight fraction of mustard (isolated by gel permeation chromatography) was reduced, alkylated, applied to an Accucore 150-C4 column and analyzed by high resolution mass spectrometry. The heterogeneity of signals results from the different isoforms of the large subunit with corresponding charge states. Asterisked signals were identified as phytic acid complexes.

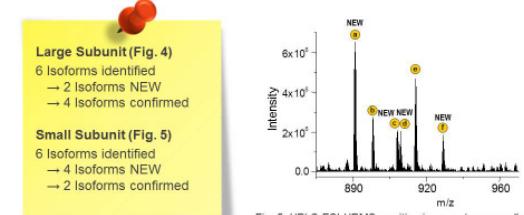
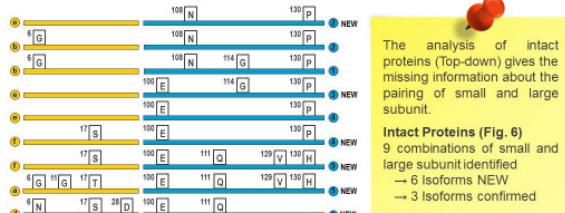


Fig. 5: HPLC-ESI-HRMS positive ion spectrum, small subunit.

C: Top-Down (Protein level)



The analysis of intact proteins (*Top-down*) gives the missing information about the pairing of small and large subunit.

Intact Proteins (Fig. 6)
9 combinations of small and large subunit identified
→ 6 Isoforms NEW
→ 3 Isoforms confirmed

Fig. 6: Different Isoforms of mustard allergen Sin a 1. Using a combination of three different proteomics strategies, the nature and position of point-mutations (*Bottom-up*), existance of mutations in the small and large subunit (*Middle-down*) and pairing of the subunits (*Top-down*) could be identified.

References

- [1] Dalal, I., Goldberg, M., Katz, Y. Sesame Seed Food Allergy. *Current Allergy and Asthma Reports*. 12(4) 2012. 339–345.
- [2] Monsalve, R. I., Villalba, M., Rodríguez, R. Allergy to Mustard Seeds. *The Importance of 2S Albumins as Food Allergens*. *Internet Symposium on Food Allergens*. 3(2) 2001. 57–69.
- [3] Moreno, F. J., Clemente, A. 2S Albumin Storage Proteins: What Makes them Food Allergens? *The open biochemistry journal*. 2 2008. 16–28.

Charakterisierung von allergenen Proteinen in Sesam und Senf

Hintergrund

Sesam und Senf gehören mittlerweile zu den häufigsten allergieauslösenden Lebensmitteln in Europa. Besonders problematisch für Allergiker ist, dass sie oft als versteckte Allergene in Lebensmitteln vorkommen und in vielen Fällen zu besonders schwerwiegenden Symptomen führen. Um die Mechanismen von Allergien besser zu verstehen und somit geeignete Methoden sowohl zur Prävention als auch zur Therapie entwickeln zu können, ist eine vollständige Charakterisierung der für die Allergien verantwortlichen Proteine von großer Bedeutung. [1,2]

2S-Albumine

2S-Albumine sind etwa 10-14 kDa große Samenspeicherproteine, die in Sesam und Senf als Majorallergene identifiziert wurden. Sie bestehen aus zwei Unter-einheiten, die durch Disulfidbrücken verknüpft sind und aus einem gemeinsamen Vorläuferpeptid entstehen. [3]

Durch Genpolymorphismen und posttranskriptionale Prozessierung existieren häufig verschiedene Isoformen der 2S Albumine.

Ergebnisse: Sin a 1 aus Senf

A: Bottom-up



Abb. 1: Sequenz des in der Datenbank gespeicherten Vorläuferpeptids des Senfallergens Sin a 1 und Darstellung aller nach In-Solution-Verdau identifizierten Mutationen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software PEAKS®. Der durch Peptid abgedeckte Sequenzbereich ist fett gedruckt. Der Sequenzbereich der kleinen Untereinheit ist gelb markiert, die große Untereinheit ist blau markiert. Das Linkerpeptid ist im prozessierten Protein nicht mehr vorhanden und ist grau hinterlegt.

B: Middle-down

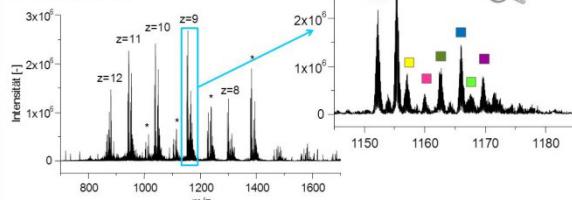


Abb. 2: FTMS-Massenpektrum der großen Untereinheit des Senfallergens Sin a 1. Es sind mehrere Signale entsprechend unterschiedlicher Varianten der Untereinheit und deren verschiedenen Ladungszuständen zu erkennen. Die mit einem Stern gekennzeichneten Signale (*) wurden als Phytinsäurekomplexe identifiziert.

Große Untereinheit:

- 8 Varianten mit jeweils spezifischen Punktmutationen (farblich hervorgehoben in Abb. 2 und Abb. 4).

Kleine Untereinheit:

- zwei Hauptvarianten (farblich markiert in Abb. 3 und Abb. 4).

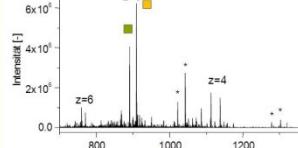


Abb. 3: FTMS-Massenpektrum der kleinen Untereinheit des Senfallergens Sin a 1. Die mit einem Stern gekennzeichneten Signale (*) wurden als Phytinsäurekomplexe identifiziert.

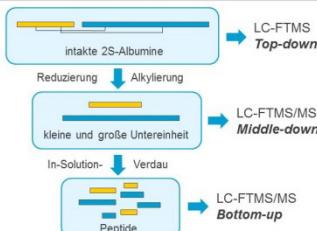
Zusammenfassung

- Das Senfallergen **Sin a 1** aus der Familie der 2S Albumine konnte in acht Isoformen nachgewiesen werden, darunter sieben in der Literatur bisher nicht beschriebene
- Für **Ses i 1** wurde C-terminales Clipping der kleinen Untereinheit sowie die Modifikation des N-terminalen Glutamins zu Pyroglutamat nachgewiesen
- Hochauflösende Massenspektrometrie ist ein ausgesprochen wertvolles Werkzeug zur Mikrocharakterisierung von Modifikationen in Lebensmittelallergenen

Methodisches

Extraktion, Aufreinigung mit GPC und Analyse mittels hochauflösender Massenspektrometrie (LC-FTMS) in drei Ansätzen:

- intakte Proteine (**Top-down**)
- Untereinheiten (**Middle-down**) nach Reduktion und Alkylierung
- Peptide nach *In-Solution*-Verdau (**Bottom-up**)



Ergebnisse: Ses i 1 aus Sesam

A: Kombination von Bottom-up, Middle-down und Top-down

Q_{Pyr} QSQQCRQQLQGRQFRSCQRYLSQGRSPYGGEED
Q_{Pyr} QSQQCRQQLQGRQFRSCQRYLSQGRSPYGGE
Q_{Pyro} QSQQCRQQLQGRQFRSCQRYLSQGRSPY
Q_{Pyro} QSQQCRQQLQGRQFRSCQRYLSQGRS

Abb. 5: Verschiedene Varianten der kleinen Untereinheit des Sesamallergens Ses i 1. Q_{Pyro}: Umwandlung von Glutamin zu Pyroglutamat.

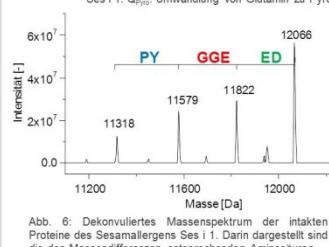


Abb. 6: Dekonvolviertes Massenspektrum der intakten Proteine des Sesamallergens Ses i 1. Darin dargestellt sind die den Massendifferenzen entsprechenden Aminosäuren.

In allen drei Ansätzen konnte sowohl C-terminales Clipping als auch die Modifikation des N-terminalen Glutamins zu Pyroglutamat bestätigt werden (Abb. 5 und 6). Für die große Untereinheit wurde im Wesentlichen eine Hauptvariante nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

C: Top-down

Zuordnung der Massen der intakten Proteine zu den zuvor identifizierten Varianten der kleinen und großen Untereinheit (Abb. 4). Die Positionen der Mutationen wurden anhand der *Bottom-up*-Ergebnisse zugeordnet. Sieben der acht so erhaltenen Isoformen sind zuvor noch nicht beschrieben worden.



Abb. 4: Verschiedene Isoformen des Senfallergens Sin a 1. Bei den mit einem Stern (*) gekennzeichneten Isoformen handelt es sich um zuvor noch nicht beschriebene Isoformen. Bei den Mutationen in einem gestrichelten Kasten war keine eindeutige Zuordnung der Position möglich.

Literatur

- [1] Dalal, I., Goldberg, M., Katz, Y. Sesame Seed Food Allergy. *Current Allergy and Asthma Reports*. 12(4) 2012. 339–345.
- [2] Monsalve, R. I., Vilalba, M., Rodriguez, R. Allergy to Mustard Seeds: The Importance of 2S Albumins as Food Allergens. *Internet Symposium on Food Allergens*. 3(2) 2001. 57–69.
- [3] Moreno, F. J., Clemente, A. 2S Albumin Storage Proteins: What Makes them Food Allergens? *The open biochemistry journal*. 2 2008. 16–28.



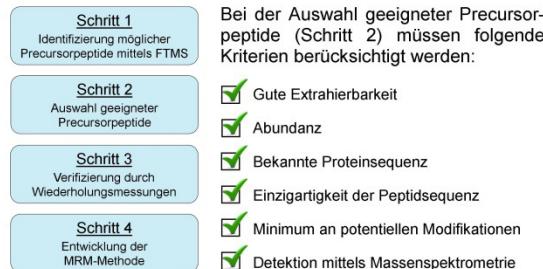
Identifizierung allergener Proteine in Gewürzen mittels Massenspektrometrie

Einleitung

Die Verbreitung IgE-vermittelter Lebensmittelallergien in der Bevölkerung westlicher Industriestaaten wird auf etwa 3-4 % geschätzt. Dabei reicht die Symptomatik von leichten Hautreizungen bis zu schweren und lebensbedrohlichen systemischen Reaktionen, wie dem anaphylaktischen Schock. Die konsequente Vermeidung des jeweiligen Allergens ist für die Betroffenen zwingend notwendig, weshalb eine ausreichend informative Deklaration von Lebensmitteln seitens der Lebensmittelindustrie angestrebt werden muss. Voraussetzung dafür ist eine eindeutige und zuverlässige Analytik von Allergenspuren in Lebensmitteln.

Zielsetzung

Ziel der Arbeit war die Entwicklung eines massenspektrometrischen Nachweisverfahrens für Spuren der Gewürze Senf und Sesam. Für die empfindliche Quantifizierung eignet sich vor allem die Messung im MRM (Multiple Reaction Monitoring)-Modus, bei dem ausgewählte Precursorpeptide und deren Fragmentionen beobachtet werden.



Methode

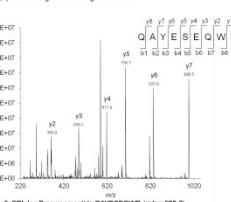
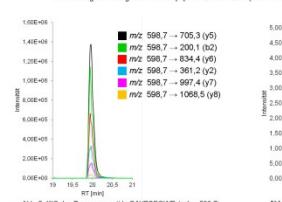
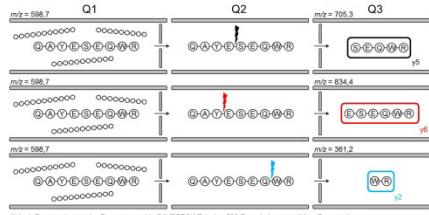
Nach Zerkleinerung der Senf- bzw. Sesamsaaten wurden die Proteine mit 100 mM Tris-HCl (pH 8) extrahiert. Die Spaltung in Peptide erfolgte mit Hilfe der Protease Trypsin, die Proteine selektiv nach den Aminosäuren Lysin (K) und Arginin (R) spaltete. Nach Trennung an einer C18-Phase wurden die Peptide mittels Massenspektrometer detektiert. Die Auswahl der Precursorpeptide fand nach Messung mit einem hochauflösenden FTMS statt, die Entwicklung der MRM-Methode erfolgte an einem Triple-Quad-MS.

Zusammenfassung

- Erfolgreiche Identifizierung und Selektion geeigneter Precursor für die Entwicklung einer MRM-basierten Nachweismethode
- Auswahl erster MRM-Übergänge
- Endgültige Methodenentwicklung noch ausstehend

Entwicklung der MRM-Methode

Die Darstellung der Methodenentwicklung erfolgt beispielhaft anhand des signifikanten Peptids QAYESEQWR aus *Sinapis alba*.



Auswahl der Precursorpeptide

Die Auswahl der Precursorpeptide nach tryptischem Verdau wird beispielhaft anhand des 11S-Globulins Sin a 2 aus *Sinapis alba* dargestellt.

FNTLETTLTR AR GGQQ PQLIEEIVEV

Abb. 3: Darstellung der signifikanten und detektierbaren Peptide.

- █ cysteinhaltige Peptide → potentielle Modifikationen ✗
- █ zu lange/kurze Peptide → nicht mittels MS detektierbar ✗
- █ Peptide nicht einzigartig in Lebensmitteln ✗
- █ signifikante und reproduzierbar detektierbare Peptide ✓



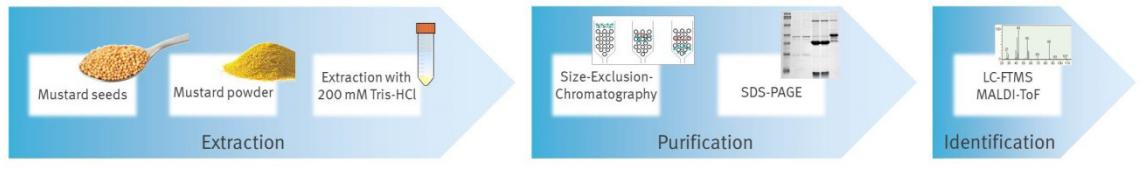
Identification of Major Allergens in Spices by Mass Spectrometry

Marlene Hummel, Tina Wigger, Jens Brockmeyer

Background

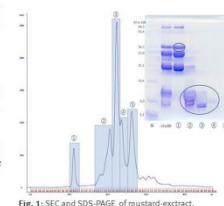
About 3-4 % of the population in industrial countries are adversely affected by food allergens^[1]. Spice allergy represents 2 % of these cases. Spices are widely used to ameliorate flavour and are often used in blends. Spice blends in general consist of a variety of potentially allergenic ingredients which complicates the identification of the particular offending component. Furthermore, such compositions may vary depending on local availability of ingredients and on manufacturer's recipes. An increasing use of spices in food is observed in the last few decades. So far no curative therapy against food allergies has been established. Therefore consequent avoidance of allergens is mandatory for allergic individuals and precise labeling of prepacked food is necessary. Since 2005 the labeling of the 14 most common allergens (e.g. mustard and sesame) is required by law^[2].

Methods

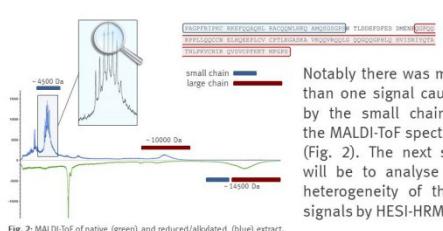


Mustard

Extracted mustard-proteins were separated by size-exclusion-chromatography and fractions were analysed by SDS-PAGE. Two bands of interest are marked.



The shown „low-molecular-weight“-fraction mainly consists of the 2S-Albumin Sin a 1. The mature protein is formed by two chains that are linked by disulfide bonds. After reduction and alkylation these chains are separated.



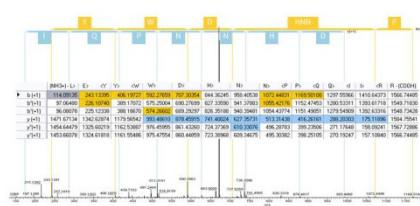
Notably there was more than one signal caused by the small chain in the MALDI-ToF spectrum (Fig. 2). The next step will be to analyse the heterogeneity of these signals by HESI-HRMS.

After tryptic digestion the ~36 kDa band was analysed by LC-HESI-HRMS and identified as the large chain of the major allergen Sin a 2.

Fig. 3: Sequence of Sin a 2 (large chain), underlined peptides could be identified after tryptic digestion.

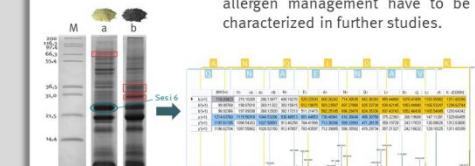
The identification of several allergen specific proteins was the first step to develop a trace analysis method for allergens. The next step will be the detection of these proteins in complex matrices.

The fragmentation of the peptide LEYWDHNNPQIR is shown in Fig. 4.



Sesame

Besides identification of allergens by mass spectrometry, species-dependent differences could be discovered for sesame. The differences and their role in allergen management have to be characterized in further studies.



Conclusion

A precise and reliable diagnosis on component resolved level is the key to determine the appropriate therapeutic measures and to avoid unnecessary medical investigations. The intention of this project is to develop a method to detect smallest traces of allergens in food by using HRMS. Due to the ubiquitous presence of spices in food the purification and characterization of major spice allergens is important for subsequent allergen-related medical application.

Correspondence Address

Westfälische Wilhelms-Universität Münster
Institute of Food Chemistry
Corrensstr. 45
48149 Münster
Email: jbrockm@uni-muenster.de

References

- [1] Sicherer, S. H., Sampson, H. A., *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2010, 125, 116-125
- [2] Directive 2000/13/EG of the European Parliament and of the Council of 20 March 2000 on the approximation of the laws of the Member States relating to the labeling, presentation and advertising of foodstuffs (Abl. Nr. L 109 p. 29)

Heinrich-Stockmeyer-Stiftung
This project was supported by Heinrich-Stockmeyer-Stiftung

Allergene Proteine in Gewürzen

Hummel, M., Brockmeyer, J.

Einleitung

Die Verbreitung IgE-vermittelter Lebensmittelallergien in der Bevölkerung westlicher Industriestaaten wird auf etwa 3-4 % geschätzt^[1]. Dabei reicht die Symptomatik von leichten Hautreizungen bis zu schweren und lebensbedrohlichen systemischen Reaktionen, wie dem anaphylaktischen Schock. Die konsequente Vermeidung des jeweiligen Allergens ist für die Betroffenen zwingend notwendig, weshalb eine ausreichend informative Deklaration von Lebensmitteln seitens der Lebensmittelindustrie angestrebt werden muss. Mit Verabschiedung der EU-Etikettierungs-Richtlinie^[2], nach der Lebensmittelhersteller seit 2005 die 14 häufigsten Allergene (u.a. Sellerie, Senf und Sesam) auf Lebensmittelverpackungen kenntlich machen müssen, soll Allergikern die Auswahl von allergenfreien Lebensmitteln erleichtert werden. Voraussetzung dafür ist eine eindeutige und zuverlässige Analytik von Allergenspuren in Lebensmitteln. Eine besondere Problematik stellen dabei Allergene dar, die als Bestandteil von Mischungen (z.B. Gewürzmischungen) in ein Lebensmittel gelangen und nicht ausreichend deklariert sind (hidden allergens). Da allergene Proteine aus Gewürzen zudem häufig einen geringen Auslöserswert aufweisen^[3], hat die Analytik von Gewürzallergenen eine hohe Relevanz.

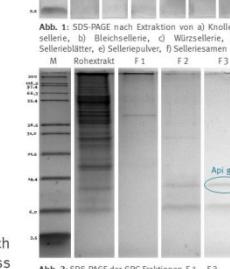
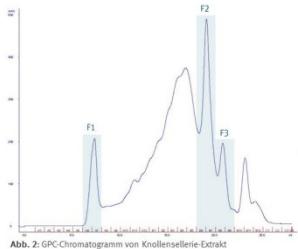


Sellerie

Zum Würzen von Lebensmitteln mit Sellerie (*Apium graveolens*) werden industriell sowohl *Apium graveolens* var. *rapaceum* (Knollen-sellerie), als auch *Apium graveolens* var. *dulce* (Bleichsellerie) und *Apium graveolens* var. *secalinum* (Schnitt-sellerie) eingesetzt.

Um einen Überblick über die Sortenvielfalt zu erhalten, werden die Proteine aus ausgewählten Sellerie-Produkten mit Tris-HCl extrahiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 1).

Zur genaueren Identifizierung der Proteine erfolgt anschließend eine Aufreinigung des Rohextraktes mittels GPC (Gelpermeations-Chromatographie) (Abb. 2).



Bei dem 154 Aminosäuren großen Api g 1 handelt es sich um ein Major-Allergen des Selleries. Das bedeutet, dass mind. 50 % der Sellerieallergiker auf Api g 1 reagieren.

