

Forschungsbericht FZKA-BWPLUS

Aufbau eines "humanisierten" *in vitro* Testsystems zur Bestimmung von allergenen Bestandteilen in verarbeiteten Erzeugnissen und der Potenz von Nahrungsmittelallergenen in Lebensmittelextrakten

von

Lothar Vogel
Abteilung Allergologie
Paul-Ehrlich-Institut

Förderkennzeichen: PUGP 96002

Die Arbeiten des Programms Umwelt und Gesundheit wurden mit Mitteln des Landes Baden-Württemberg gefördert

Juli 1999

Abschlußbericht: Projekt PUG 96 002

Aufbau eines "humanisierten" *in vitro* Testsystems zur Bestimmung von allergenen Bestandteilen in verarbeiteten Erzeugnissen und der Potenz von Nahrungsmittelallergenen in Lebensmittelextrakten

Projektleiter: Dr. Lothar Vogel
Abteilung Allergologie
Paul-Ehrlich-Institut
Paul-Ehrlich-Str. 51-59
63225 Langen

1 MOTIVATION

Nahrungsmittelallergien gewinnen immer mehr an Bedeutung, nicht zuletzt durch die Verwendung von neuen Lebensmittelzutaten bzw. Entwicklung von neuen (z. B. gentechnologisch veränderten) Lebensmitteln. Außerdem stellen versteckte Allergene eine ernsthafte Gefahrenquelle dar. Der Nachweis von geringen Mengen bzw. Spuren von Proteinen in Lebensmitteln bzw. Lebensmittelzutaten mit allergenem Potential ist deshalb essentiell zum Schutz von Patienten, die auf solche Allergene reagieren können. Die zur Zeit verwendeten *in vitro*-Verfahren zum Nachweis von Nahrungsmittelallergenen, z. B. RAST-Inhibition, ELISA und Western-Blot, beruhen auf der Bindung von spezifischem humanem IgE an trägergebundenes Allergen. Diese Bindung wird durch die Anwesenheit von IgG und anderen Serumkomponenten stark beeinflusst. Außerdem erreichen diese Tests oft nicht die erforderliche Empfindlichkeit, um Spuren von Allergenen in komplizierten Gemischen nachzuweisen. *In vivo*-Verfahren wie Haut- und Provokationstests sind für lebensmittelchemische Untersuchungslabors und routinemäßige Allergenextrakt-Untersuchungen aus praktischen und ethischen Gründen nicht verwendbar.

2 AUFGABENSTELLUNG

Es sollte daher innerhalb des geförderten Projekts ein biologisches Testsystem entwickelt werden, das auf einem Modell der Typ 1 Allergie aufbaut. Das Verfahren beruht auf der Bindung von allergenspezifischem IgE an den hochaffinen IgE-Rezeptor (FcεR1) auf basophilen Granulozyten bzw. Mastzellen. Die Vernetzung der IgE-beladenen Rezeptoren durch Allergen führt zur Signalübertragung in die Zellen. Hieraus resultiert die Freisetzung von Mediatoren von Entzündungsreaktionen, die relativ einfach bestimmt werden können. Als Modell diene zunächst ein basophile Rattenleukämiezelle (RBL-2H3) und das Verfahren sollte dann durch Transfektion der IgE-bindenden Kette des humanen Rezeptors in die Rattenzelllinie auf das menschliche System übertragen werden. Im Verlauf der Arbeiten wurde die Transfektion dahingehend erweitert, daß der komplette humane Rezeptor, bestehend aus drei verschiedenen Untereinheiten, transfiziert wurde. Neben der erwarteten hohen Empfindlichkeit sollte der biologische Test auch die Prüfung der allergenen Wirksamkeit der Extrakte erlauben, was mit den oben erwähnten immunchemischen Methoden nicht möglich ist. Alternativ zur Transfektion

der RBL-Zellen sollte versucht werden, die unreife humane basophile Zelllinie KU-812 zur Differenzierung und damit zur vermehrten Histaminproduktion anzuregen. Im Falle eines Erfolgs wäre es möglich, daß nach Sensibilisierung mit spezifischem IgE die Vernetzung durch Allergen in Lebensmittelextrakten zur Freisetzung meßbarer Mengen von Mediatoren führt.

Als Modell sollten im Rahmen dieses Projekts Untersuchungen zum Nachweis von Haselnuß- bzw. Erdnußallergenen durchgeführt werden. Haselnüsse und Erdnüsse werden nicht nur als solche verzehrt, sondern auch bei der Herstellung von anderen Lebensmitteln verwendet oder können im Herstellungsprozeß als Verunreinigung auftreten. Die Anwesenheit von versteckten Allergenen hat große Bedeutung für die betroffenen Allergiker. Die Haselnuß zählt zu den Birkenpollen-assoziierten Lebensmitteln; das heißt, die Sensibilisierung erfolgt durch Birkenpollen und das induzierte birkenspezifische IgE reagiert kreuz mit Haselnußallergenen. Die Erdnußallergie ist deshalb so wichtig, weil schon geringste Mengen von Erdnußallergenen zu sehr schweren Symptomen führen können; es wurden z. B. häufig Anaphylaxien, in Einzelfällen mit tödlichem Ausgang, berichtet. Es war deshalb geplant, mit geeigneten Patientenseren, die spezifisches IgE gegen Haselnuß- oder Erdnußproteine enthalten, verschiedene Lebensmittelextrakte und Proben von verarbeiteten Lebensmitteln auf ihren Gehalt an Allergen zu testen.

3 PLANUNG UND ABLAUF DES VORHABENS

3.1 ETABLIERUNG VON "HUMANISIERTEN" PERMANENTEN ZELLINIEN

3.1.1 Transfektion einer Rattenzelllinie mit Genen des humanen IgE-Rezeptors

Im ersten Teil des Projekts sollten RBL-2H3-Zellen mit Genen des humanen Fcε-Rezeptors transfiziert werden. Die Transfektion kann zum einen mit Lipofectamin und zum anderen durch Elektroporation induziert werden. Beides sind Verfahren, die im Paul-Ehrlich-Institut (PEI) etabliert sind. Zunächst war geplant, das Gen der α-Kette des humanen IgE-Rezeptors in die RBL-Zellen einzuschleusen. Das daraus resultierende Protein soll mit den endogenen β- und γ-Ketten zu einem funktionellen Rezeptor assoziieren. Später wurde das Vorhaben so erweitert, daß die Transfektion mit drei Plasmiden erfolgte, von denen jedes eine Kette des humanen Rezeptors enthält. Die einzelnen Parameter der Transfektion (DNA-Menge, Lipofectamin-Konzentration und Transfektionszeit bzw. Elektroporationsbedingungen) wurden optimiert. Die Plasmide enthalten ein Resistenzgen, das dafür sorgt, daß nur die transfizierten Zellen in Gegenwart des Antibiotikums Geneticin überleben. Diese Selektion führt zur Etablierung von stabilen Transfektanten.

Die resultierenden Zelllinien sollten wie folgt biochemisch und funktionell charakterisiert werden. Die erfolgreiche Integration der humanen Rezeptorketten in das Genom soll durch den Nachweis von Boten-RNA durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach reverser Transkription (RT-PCR) verifiziert werden. Die Expression der chimären Rezeptoren auf der Zelloberfläche wird durch Bindung von humanem IgE in FACS-Analysen demonstriert. Die Rezeptoren sind an die intrazelluläre Signaltransduktionskaskade angekoppelt. Daß dies auch für die "humanisierten" bzw. kompletten humanen Rezeptoren der Fall ist, kann durch Messung der Mobilisierung von Calcium ins Zytosol untersucht werden. Schließlich wird die

Freisetzung von Mediatoren nach Bindung von humanem IgE und Vernetzung mit anti-IgE oder Allergen gemessen.

3.1.2 Differenzierung einer unreifen humanen basophilen Zelllinie

Als Alternative zur Transfektion sollte versucht werden, die humane Zelllinie KU-812, die unreifen basophilen Granulozyten entspricht, zur Differenzierung anzuregen, so daß sie nach Sensibilisierung mit IgE und Vernetzung durch Allergen meßbare Mengen von Mediatoren freisetzt. Die Ursprungslinie trägt zwar FcεR1, setzt aber nach antigener Stimulation keine Mediatoren frei (eigene Beobachtungen). Deshalb sollte versucht werden, durch Zugabe von Zytokinen aus KU-812 eine Zelllinie zu etablieren, die die erforderlichen Eigenschaften für das beschriebene Testsystem hat. Die erfolgversprechendsten Kandidaten für dieses Vorhaben waren die Zytokine IL-3, IL-6 und TNF-α. Es war von anderen Arbeitsgruppen zwar gezeigt worden, daß sie die Produktion von Histamin erhöhen, jedoch nicht, ob nach dieser Behandlung die Zellen weiterhin kontinuierlich wachsen und ob das vermehrt gebildete Histamin durch Vernetzung von FcεR1 auch sekretiert werden kann. Diese Studien waren aber erforderlich, um die Eignung differenzierter KU-812-Zellen (KU-812-diff) für die geplanten Arbeiten zu belegen. Zusätzlich sollte die Frage beantwortet werden, ob differenzierte KU-812 außer Histamin auch noch andere Mediatoren (wie z.B. die von uns routinemäßig gemessene β-Hexosaminidase) bildet und freisetzt.

3.2 UNTERSUCHUNG DER ALLERGEN POTENZ VON LEBENSMITTELPROBEN MIT HILFE VON hu-FcεR1⁺ ZELLINIEN

Nach der Etablierung von permanenten Zelllinien, die humanes IgE binden und nach Vernetzung mit der Freisetzung von Mediatoren reagieren, kann die Untersuchung von Lebensmittelproben erfolgen. Dazu wurden Seren von Allergikern benötigt, die hohe Titer von spezifischem IgE gegen Erdnuß bzw. Haselnuß besitzen. Im Falle von Haselnuß sollten Seren von Birkenpollenallergikern verwendet werden, die im Rahmen der Untersuchungen am PEI gewonnen werden. Da die Mehrzahl der Birkenpollenallergiker auch gegen Haselnußallergene sensibilisiert sind, stehen genügend Proben zur Verfügung, die für die geplanten Studien geeignet sind. Ein Poolserum mit hohem IgE-Titer gegen Erdnußallergene wurde von Dr. Becker und Dr. Buschmann, Forschungsinstitut Borstel, zur Verfügung gestellt.

Die Analyse von Lebensmittelproben sollte durch Sensibilisierung der huFcεR1⁺ Zelllinie(n) mit IgE aus den Einzeleren und Messung der Menge an freigesetzter β-Hexosaminidase nach Vernetzung der IgE-Moleküle auf den Zellen durch die Allergene erfolgen. Aus geeigneten Einzeleren sollte dann ein Serumpool hergestellt werden, mit dem die Qualität von kommerziell erhältlichen Haselnuß- bzw. Erdnußextrakten überprüft werden kann. Schließlich sollten die Ergebnisse mit den durch andere Methoden wie Elektrophorese (IEF, SDS-PAGE), Western-Blot und RAST-Hemmung erhaltenen verglichen werden. Ziel des Projekts war der Nachweis von Spuren von Allergenen, die mit anderen Methoden nicht erfaßt werden können in Extrakten aus Handelserzeugnissen, die Nüsse enthalten und solche, die keine Nüsse enthalten sollten (z.B. Kuchen, Kekse, Schokoladen, Mehl usw.)

4 STAND DER KENNTNISSE BEI BEGINN DES VORHABENS

Die Bedeutung von Allergien gegen Lebensmittel bzw. deren Inhaltsstoffe nimmt zu. Gleichzeitig ist ein erheblich gestiegenes Problembewußtsein bei Verbrauchern und Lebensmittelherstellern festzustellen. Im Vergleich zu vielen Inhalationsallergenen, die inzwischen sehr gut charakterisiert sind, gibt es nach wie vor große Kenntnislücken über die Eigenschaften von Lebensmittelallergenen. Ferner weisen Nahrungsmittlextrakte für die Diagnostik, insbesondere solche aus pflanzlichen Lebensmitteln, häufig eine sehr schlechte Qualität auf (Vieths et al., 1995; Ortolani et al., 1989). Im Zusammenhang mit der Lebensmittelallergie ist außerdem das Problem der "versteckten Allergene" in zusammengesetzten Lebensmitteln von großer Bedeutung. Darunter werden allergene Bestandteile verstanden, die in technologisch behandelten, zusammengesetzten Produkten in aktiver Form enthalten sind und vom Verbraucher nicht erkannt werden können. In der Literatur finden sich zahlreiche Fallbeschreibungen darüber, daß solche versteckten Allergene in zum Teil extrem geringen Mengen sehr schwere und sogar tödliche anaphylaktische Reaktionen verursacht haben (Vieths et al., 1994; Loza & Brostoff, 1995). Bereits Anteile von deutlich weniger als 0,5% allergener Proteine im Gesamtprodukt haben solche Reaktionen ausgelöst. Aufgrund dieser komplexen Problematik ist für die Lebensmittelallergie in besonderem Maße die Etablierung von geeigneten Testsystemen erforderlich.

Die Eigenschaften der für die Studie ausgewählten Modell-Lebensmittel unterscheiden sich in charakteristischer Weise. Haselnuß zählt zu den typischen Birkenpollen-assoziierten Lebensmitteln, unterscheidet sich von den Obst- und Gemüsearten aus dieser Gruppe aber dadurch, daß die allergene Aktivität teilweise thermostabil ist und in verarbeiteten Lebensmitteln noch vorhanden sein kann (Eriksson & Malmheden Yman, 1992; Malmheden Yman et al., 1994). Das Hauptallergen der Haselnuß weist Kreuzreaktionen zu Bet v 1, dem Hauptallergen aus Birkenpollen auf (Hirschwehr et al., 1992) und die Sensibilisierung der Allergiker erfolgt mit großer Wahrscheinlichkeit durch Inhalation von Birkenpollen.

Die Erdnußallergie ist hingegen oft unabhängig von der Birkenpollenallergie und es ist sehr wahrscheinlich, daß die Sensibilisierung in den meisten Fällen auf oralem Wege erfolgt. Erdnüsse sind in gerösteter und verarbeiteter Form nahezu immer sehr stark allergen und die Erdnußallergie ist oft mit einer sehr schweren Symptomatik verbunden (Burks et al., 1992; Burks et al., 1994; Vieths et al., 1994). Das thermostabile Hauptallergen Ara h 1 ist gut charakterisiert und wurde bereits kloniert und sequenziert. Aufgrund der oben erläuterten sehr komplexen Problematik in Zusammenhang mit der Nahrungsmittelallergie ist die Entwicklung neuer Methoden in der beschriebenen Weise auf diesem Gebiet in besonderer Weise angezeigt. Die typischen Unterschiede zwischen den beiden dazu ausgewählten Arten der Lebensmittelallergie sind sehr gut dazu geeignet, im Rahmen der vorgeschlagenen Modelluntersuchung die Leistungsfähigkeit der zu entwickelnden Methode zu prüfen.

Es ist geplant, ein "humanisiertes" biologisches *in vitro*-Testsystem zu etablieren, welches die Messung der allergenen Aktivität in Lebensmittlextrakten und verarbeiteten Erzeugnissen in extrem niedrigen Konzentrationen ermöglichen könnte. Bisherige Verfahren beruhen zum Teil auf der Bindung von Allergenen an spezifisches IgE (z.B. RAST-Inhibition, ELISA, Western-Blot). Sie reagieren sehr empfindlich auf die Anwesenheit von IgG und die Ergebnisse korrelieren in vielen Fällen nicht mit denen aus *in vivo*-Tests (Casanovas et al., 1994; Platts-Mills & Chapman, 1991). Außerdem erreichen sie oft nicht die erforderliche Sensitivität, um

Spuren von Allergenen in komplizierten Gemischen wie Lebensmittelextrakten zu erfassen. Andere Verfahren wie Haut- oder Provokationstests und der Histaminfreisetzungstest sind für Labormessungen nicht anwendbar, da sie Untersuchungen am Menschen darstellen bzw. frische Blutproben erfordern und somit schlecht standardisierbar sind.

Ausgangspunkt für die neue Methode ist die Messung der Mediatorfreisetzung durch eine basophile Rattenleukämiezelllinie (RBL-2H3) nach Vernetzung des an Fc ϵ R1 gebundenen IgE durch Allergen (Schwartz et al., 1981; Schneider et al., 1993). In unserer Arbeitsgruppe wurde das Verfahren so optimiert, daß Allergenkonzentrationen, die im pg/ml-Bereich (in manchen Fällen sogar fg/ml) liegen, eine meßbare Freisetzung von β -Hexosaminidase bewirkt haben (Hoffmann et al., 1995). Leider läßt sich diese Methode nicht ohne weiteres in das humane System übertragen. RBL-2H3-Zellen sind nicht in der Lage, durch Sensibilisierung mit humanem IgE zur Mediatorfreisetzung angeregt zu werden. Andererseits gibt es zwar zwei permanente humane Zelllinien, sie sind aber für die geplanten Untersuchungen ungeeignet. Die Mastzelllinie HMC-1 besitzt keine hochaffinen IgE-Rezeptoren (Durand et al., 1994) und ist nicht in der Lage, Mediatoren freizusetzen (Nilsson et al., 1994a). Die den basophilen Granulozyten ähnliche Leukämiezelllinie KU-812 entspricht einem unreifen Stadium (Blom et al., 1992; Almlöf et al., 1988) und setzt nach passiver Sensibilisierung keine Mediatoren frei (eigene Beobachtungen). Es gibt Hinweise darauf, daß diese Zelllinie, im Gegensatz zu HMC-1, durch Zytokine (z.B. IL-3, IL-6, TNF- α) zur weiteren Differenzierung angeregt werden kann (Forsberg et al., 1993; Nilsson et al., 1994b; Valent et al., 1990). Jedoch ist noch keine systematische Studie durchgeführt worden, ob diese Zellen weiterhin permanent wachsen und in der Lage sind, nach Rezeptorvernetzung Mediatoren freizusetzen. Schließlich ist noch keine Methode etabliert, um funktionelle Mastzellen *ex vivo* über einen längeren Zeitraum in Kultur zu halten (Levi-Schaffer et al., 1995).

Ein Ausweg aus diesem Dilemma wird darin gesehen, die RBL-2H3-Zellen mit der α -Kette des humanen IgE-Rezeptors zu transfizieren. Der hochaffine IgE-Rezeptor besteht bei Säugern aus vier Ketten: einer α -Kette, einer β -Kette und zwei durch Disulfidbrücken verbundenen γ -Ketten (Adamczewski & Kinet, 1994). Die α -Kette bindet mit ihrer extrazellulären Domäne den Fc-Teil von IgE. Durch Transfektion einer murinen Mastzelllinie (P815) wurde gezeigt, daß die humane α -Kette mit den endogenen β - und γ -Ketten zu einem funktionellen Rezeptor assoziiert (Alber et al., 1991). Als Alternative kann ins Auge gefaßt werden, mit den Genen für die humanen α - und γ -Ketten eine Kotransfektion durchzuführen. Mit COS-Zellen wurde gezeigt, daß dies zu einer Expression von $\alpha\gamma$ -Komplexen führt (Ra et al., 1989). Allerdings eignen sich weder COS-Zellen noch P815 für Mediatorfreisetzungstudien (Wilson et al., 1993). Neuere Untersuchungen haben außerdem ergeben, daß der β -Kette eine verstärkende Wirkung bei der Signaltransduktion zukommt (Lin et al., 1996). Entsprechende Studien mit RBL-Zellen haben bisher noch nicht den gewünschten Erfolg erbracht, da die Transfektanten entweder nur eine geringe Expression der chimären Rezeptoren zeigten oder nicht stabil waren (Taudou et al., 1993).

5 ZUSAMMENARBEIT MIT ANDEREN STELLEN

Das Plasmid, das das Gen für die humane α -Kette von Fc ϵ R1 enthält, wurde von Dr. U. Blank vom Pasteur-Institut in Paris erhalten. In Zusammenarbeit mit ihm wurden auch von Frau Große-Tebbe die Plasmide konstruiert, die die β - und γ -Ketten enthalten. Von Dr. W. Becker,

Forschungsinstitut Borstel wurde ein Poolserum von Erdnußallergikern erhalten, das für einige Untersuchungen verwendet werden konnte. Dr. K. Cichutek aus der Abteilung Biotechnologie des PEI hatte wesentlichen Anteil an der Etablierung der Transfektionsmethoden in unserer Arbeitsgruppe. Aus dem Fachgebiet von Herrn Dr. Vieths wurden die Lebensmittelextrakte erhalten, die in den Experimenten eingesetzt wurden.

6 ERZIELTE ERGEBNISSE

6.1 MATERIAL UND METHODEN

6.1.1 Zellen und Reagenzien

Als Ausgangszelle für die Transfektionen wurde die Zelllinie RBL-2H3 verwendet, die ursprünglich vom Weizmann-Institut in Rehovot, Israel stammt und auf besonders hohe Mediatorfreisetzungskapazität selektioniert wurde. Als Referenz für eigene Transfektionen wurde von Dr. Kochan (Hoffman-LaRoche, Nutley, USA) die mit der humanen FcεR1α-Kette transfizierte Linie RBL-48 zur Verfügung gestellt. Die Zelllinie KU-812 ist eine freundliche Gabe von Dr. Becker, Forschungsinstitut Borstel. Als Maus-IgE wurde der Überstand des Hybridoms IgEL.b4 verwendet, das von ATCC (Code TIB-141) bezogen wurde. Humanes Myelom-IgE der Firma biodesign wurde bei Dunn Labortechnik GmbH (Asbach) gekauft. Alle Anti-Ig Antikörper waren von der Firma Nordic Immunology (Tilburg, NL).

6.1.2 Herstellung der Plasmide

Das Plasmid, das die humane α-Kette enthält (pCMV4_{neo}huα; Taudou et al., 1993), wurde von Dr. U. Blank, Pasteur-Institut, Paris erhalten. Das Gen der α-Kette ist dort unter der Kontrolle des CMV-Promotors und enthält ein Neomycin-Resistenzgen, das die Selektion von stabil transfizierten Zellen mit Geneticinsulfat (G-418) erlaubt. Die humane β-Kette wurde in den Vektor pBJ1 kloniert, der zuvor mit dem SRα-Promotor versehen worden war. Daten aus der Literatur (Takebe et al., 1988; Dombrowicz et al., 1996) deuten darauf hin, daß SRα ein stärkerer Promotor in Säugerzellen ist als CMV. Versuche zur Klonierung der humanen α-Kette in pSRα_{puro}, die eine Doppelselektion mit Geneticin und Puromycin erlaubt hätten, schlugen allerdings bisher fehl. Die humane γ-Kette schließlich wurde in den Vektor SRα_{neo} eingeführt. Die Umklonierung erfolgte in der Art, daß die einzelnen Ketten mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion unter Anhängen von Schnittstellen für Restriktionsenzyme amplifiziert wurden. Die Reaktionsprodukte wurden elektrophoretisch aufgereinigt und mit den entsprechenden Restriktionsenzymen behandelt. In gleicher Weise wurden die Vektoren mit den Restriktionsenzymen geschnitten und anschließend die Geninserts in die Vektoren ligiert. Sequenzanalysen ergaben, daß die Inserts vollständig und in der richtigen Orientierung eingebaut worden waren.

6.1.3 Transfektion von RBL-2H3 Zellen

Adhärenent wachsende RBL-2H3 Zellen wurden von den Kulturflaschen abgelöst, zweimal mit Medium gewaschen und jeweils 2 ml Zellsuspension (5×10^5 Zellen) in ein Loch einer 6-Loch-Platte (Ø 35 mm) gegeben. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) inkubiert, so daß sie am nächsten Tag 50-70% konfluent waren. Die präparierten

Plasmide wurden in einer Konzentration von 30 µg/ml in serumfreiem Medium ohne Antibiotika angesetzt. Das Liposomengemisch (Lipofectamine™ von Gibco BRL) wurde in einer Konzentration von 10 µl/ml ebenfalls in serumfreiem Medium suspendiert. Gleiche Mengen der Plasmid- und Liposomlösungen wurden gemischt und für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit wurden die Zellen zweimal mit serumfreiem Medium gewaschen (je ca. 20 min). Zu dem DNA-Liposom-Gemisch wurde die vierfache Menge serumfreies Medium gegeben und die Zellen mit jeweils 1 ml dieser Reagenzlösung versetzt. Nach einer Inkubation von 6h im Brutschrank wurde das Transfektionsgemisch entfernt und durch 2 ml komplettes Medium (ohne Geneticin) ersetzt. Zwei Tage nach der Transfektion erfolgte die Selektion stabil transfizierter Klone. Dazu wurde dem Kulturmedium 1 mg/ml G-418 zugesetzt. Nach etwa einer Woche waren alle nicht transfizierten Zellen abgestorben und es waren Klone von Transfektanten zu beobachten. Wenn diese Klone eine Größe von etwa 200 Zellen erreicht hatten, wurden sie geerntet und in Mikrotiterplatten rekloniert (ca. 1 Zelle/Loch). Die Zellen wurden zunächst in Zellkulturplatten und schließlich in Kulturflaschen vermehrt. Die Passage erfolgte daraufhin zweimal pro Woche im Verhältnis 1:10. Zellklone, die in Experimenten eingesetzt werden sollten, wurden für mindestens 4 Tage ohne G-418 in Kultur gehalten, da dieses manche Reaktionen der Zellen beeinträchtigt.

6.1.4 Messung der Mediatorfreisetzung von RBL-Zellen

Zur Sensibilisierung (Bindung von IgE an den Rezeptor) der RBL-Zellen wurde entweder der Überstand des Hybridoms IGEL.b4 (enthält Maus-IgE gegen das Hapten TNP (Trinitrophenyl)), gereinigtes humanes IgE oder IgE-reiche Seren von Mäusen bzw. Allergikern eingesetzt. Dazu wurden 1×10^5 Zellen pro Loch einer Mikrotiterplatte eingesät und über Nacht bei 37°C in Kulturmedium inkubiert, so daß sich die Zellen anheften konnten. Humanes IgE wurde ebenfalls über Nacht zu den Zellen gegeben, während für Maus-IgE normalerweise eine Sensibilisierungszeit von 1-2 h ausreicht. Die Vernetzung wurde entweder mit Ziege anti-Maus- bzw. anti-human IgE (kommerziell erhältlich) oder mit Allergenextrakten in Tyrode-Puffer induziert. Voruntersuchungen hatten ergeben, daß die Mediatorfreisetzung im humanen System nur in Gegenwart von D₂O in nennenswerter Weise erfolgt. Deshalb wurden die anti-IgE-Antikörper und Allergenextrakte in Tyrode-Puffer angesetzt, die 50% D₂O enthielten (vgl. Maeyama et al., 1986). Die Bestimmung des freigesetzten Mediators β-Hexosaminidase erfolgte durch Umsetzung des Substrats p-Nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosamin und Messung der Extinktion bei 405 nm im Photometer. Berechnet wurde die Mediatorfreisetzung nach der Formel

$$\frac{\text{spezifische Freisetzg.} - \text{Spontanfreisetzg.}}{\text{Totalgehalt} - \text{Spontanfreisetzg.}} \times 100 = \% \text{ Mediatorfreisetzung}$$

Dabei bedeutet Spontanfreisetzung die Menge von β-Hexosaminidase ohne Vernetzung, der Totalgehalt wird durch Lyse der Zellen mit 1% Triton-X100 bestimmt.

6.1.5 Messung der Mobilisierung von intrazellulärem Calcium

Die zu untersuchenden Zellen wurden von den Kulturflasche abgelöst und zweimal mit komplettem Medium (mit 5% Kälberserum) gewaschen. Die Zellkonzentration wurde auf 5×10^6 Zellen/ml eingestellt und $1 \mu\text{g/ml}$ IgE (human oder murin) sowie $15 \mu\text{M}$ FURA-2AM (Acetoxymethylester des Calcium-Chelators FURA-2) zugegeben. Nach einer Inkubation von 60 min im Brutschrank wurden die Zellen abzentrifugiert und zweimal mit komplettem Medium gewaschen. Dann erfolgte die Hydrolyse von FURA-2AM für 30 min bei 37°C . Anschließend wurden die Zellen in Tyrode-Puffer ohne Serumalbumin dreimal gewaschen und in einer Konzentration 1×10^7 Zellen/ml in Tyrode ohne BSA, aber mit 50% D_2O , resuspendiert. $700 \mu\text{l}$ dieser Zellsuspension wurde in Fluoreszenzküvetten 1:3 mit Tyrode-Puffer (ohne BSA, mit D_2O) verdünnt und in einem Spektrometer (LS50B der Firma Perkin-Elmer) für 5 min auf 37°C equilibriert. Die Maxima der Anregungswellenlängen von FURA-2 liegen bei 340 bzw. 380 nm, je nachdem ob Calcium gebunden hat oder nicht. Die Emissionswellenlänge beträgt 510 nm. Es wurde nun zunächst das Intensitätsverhältnis bei 340 und 380 nm ohne Stimulus aufgenommen (Grundlinie). Nach etwa einer Minute wurden anti-Maus-IgE bzw. anti-Human-IgE zugegeben. Die Endkonzentration betrug jeweils $20 \mu\text{g/ml}$. Die Kinetik der Calciumfreisetzung wurde für weitere 4 min aufgenommen. Zur anschließenden Kalibrierung wurden die Zellen mit Triton X-100 lysiert (FURA-2 wird mit Calcium gesättigt) und dann alles Calcium an EDTA gebunden (FURA-2 liegt in freier Form vor). Aus diesen Meßwerten wurde mit dem Programm "Intracellular Biochemistry" der Firma Perkin-Elmer die Konzentration der Calciumionen im Zytoplasma bestimmt.

6.1.6 FACS-Analysen

Die Zellen wurden geerntet und zweimal mit Waschpuffer (1% BSA und 0,1% NaN_3 in PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) gewaschen. Jeweils 1×10^5 Zellen wurden in ein Loch einer Spitzboden-Mikrotiterplatte gegeben und $2,5 \mu\text{g/ml}$ Maus-IgE oder Human-IgE (optimierte Konzentrationen) für 30 min bei 4°C inkubiert. Als Kontrollen dienten irrelevantes IgG. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit Waschpuffer gewaschen und die zweiten, mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten, Antikörper zugegeben ($2,5 \mu\text{g/ml}$ Ziege anti-MIgE-PE bzw. $10 \mu\text{g/ml}$ Ziege anti-HIgE-FITC). Nach weiteren 30 min bei 4°C wurden die Zellen wieder dreimal mit Waschpuffer gewaschen, in $100 \mu\text{l}$ Fixierpuffer (1% Paraformaldehyd in PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) aufgenommen und in Plastikröhrchen ($6 \times 38 \text{ mm}$) überführt. Die Messung erfolgte in einem FACScan der Firma Becton Dickinson, die Auswertung wurde mit der Lysis II Software von Becton Dickinson durchgeführt.

6.2 RESULTATE

6.2.1 Differenzierung der humanen basophilen Zelllinie KU-812

In Übereinstimmung mit dem Projektantrag wurden Experimente durchgeführt, um das Potential der Zelllinie KU-812 zur Differenzierung zu untersuchen. Diese Zelllinie trägt $\text{Fc}\epsilon\text{R1}$, enthält aber nur wenig Mediatoren und entspricht einem unreifen Stadium von basophilen Granulozyten (Kishi, 1985). Zu diesem Zweck wurden die Zytokine IL-3, IL-6 und $\text{TNF-}\alpha$ (Nilsson et al., 1994; Valent et al., 1990) sowie Natriumbutyrat oder Cytosinarabinosid (Almlöf et al., 1988) verwendet. Wenn diese Reagenzien eingesetzt wurden, stieg der Totalgehalt an β -Hexosaminidase nur geringfügig und meist nur dann, wenn über den Kulturzeitraum von zwei Wochen frisches Medium zugesetzt wurde (alle 3-4 Tage). Auch die

Verwendung höherer Konzentrationen brachte keine Änderung dieser Ergebnisse. Die Freisetzung von β -Hexosaminidase konnte weder vor noch nach der Inkubation von KU-812 mit Zytokinen nachgewiesen werden. Weil außerdem die Transfektionen sehr erfolgreich waren (s. u.), wurde dieser Teil des Projekts nicht weiter verfolgt.

6.2.2 Transfektion von RBL-2H3-Zellen

Zunächst wurden verschiedene Methoden zum Einschleusen von Genmaterial in RBL-2H3 getestet und optimiert. Bei der sogenannten Lipofektion werden die Plasmide mit Hilfe von Phospholipidvesikeln durch Endozytose in die Zellen gebracht. Optimiert wurden bei dieser Technik die Zahl der eingesäten Zellen, die DNA- und Lipofectamin-Mengen sowie die Transfektionszeit. Als DNA-Material wurde ein Plasmid verwendet, das das Gen für die β -Galaktosidase enthält. Durch die Umsetzung eines Farbstoff-erzeugenden Substrats kann so die Transfektionseffizienz gemessen werden. Als zweite Technik wurde DNA mit Calciumphosphat kopräzipitiert. Das Präzipitat wird dann von den Zellen aufgenommen und in das Genom integriert. Hier wurden Zellzahl und DNA-Menge optimiert. Schließlich wurde die Transfektion noch durch Bindung der Plasmide an DEAE-Dextran induziert. Auch hier wurden Zellzahl und DNA-Menge variiert. Diese Untersuchungen zeigten, daß die Transfektion mit Lipofectamin die besten Ergebnisse ergab.

Zuerst wurden RBL-2H3 nur mit dem Plasmid pCMV4_{neo}hu α transfiziert. Die Resultate einer dieser Transfektionen, bei der die Zellen in unterschiedlicher Konzentration eingesetzt wurden, sind in Tabelle 1 dargestellt. Es zeigte sich, daß eine Zellkonzentration von $5-10 \times 10^5$ Zellen pro 35-mm Loch sowohl hinsichtlich der Ausbeute an stabil transfizierten Klonen als auch in bezug auf eine gute Mediatorfreisetzung mit humanem IgE und anti-Human-IgE am günstigsten war. Dies ist wahrscheinlich auf einen positiven Effekt von Zellkontakten bei der Transfektion zurückzuführen. Im Gegensatz zu früheren, eher negativ verlaufenen Transfektionen wurde hier außerdem eine größere Menge an DNA eingesetzt (10 μ g im Vergleich zu 3 μ g bei transienter Expression der humanen α -Kette).

Tabelle 1: Ausbeute an transfizierten Klonen in Abhängigkeit der eingesetzten Zellzahl

Zellzahl	geerntet	rekloniert	in Flaschen kultiviert	Mediatorfreisetzung				maximale Freisetzg.
				<10%	10-20%	20-30%	>30%	
$2,5 \times 10^5$	11	10	8	1	3	1	3	42%
5×10^5	49	30	26	9	3	7	7	65%
1×10^6	21	12	12	0	2	6	4	75%
Summen	81	52	46	10	8	14	14	

Eine weitere Transfektion wurde mit den Plasmiden, die die Gene für die drei unterschiedlichen Ketten des humanen IgE-Rezeptors enthalten, durchgeführt. Dabei entstanden etwa 60 Klone, von denen nach der Reklonierung 50 in Kulturflaschen überführt wurden. Die Auswahl von Klonen, die für weitere Untersuchungen verwendet werden sollte, erfolgte nach Überprüfung der Expression der humanen Rezeptorketten. Das molekularbiologische Verfahren mittels RT-PCR lieferte bis jetzt noch keine eindeutigen Ergebnisse, da die verwendeten Primer nicht speziesspezifisch genug waren. Das Vorhandensein der humanen α -Kette auf der Zelloberfläche wurde mit Hilfe von FACS-

Analysen nachgewiesen. Beispiele dafür sind in Abbildung 1 gezeigt. Alle untersuchten Zelllinien exprimieren die endogenen Rezeptoren in etwa gleicher Anzahl. Bei der Zahl der transfizierten Rezeptoren hingegen zeigen sich charakteristische Unterschiede, die sich auch in den funktionellen Eigenschaften der Klone widerspiegeln (s. u.).

6.2.3 Charakterisierung der transfizierten Klone

Die erfolgreichen Transfektionen spiegeln sich auch in den Untersuchungen zur Mobilisierung von Calcium aus intrazellulären Speichern wider. Der hochaffine IgE-Rezeptor gehört zur Klasse der mit Tyrosinkinase assoziierten Rezeptoren (Beaven & Baumgartner, 1996; Daëron, 1997). Im Verlauf der Aktivierung der Zellen werden dabei Phospholipide gespalten. Einer der sekundären Botenstoffe, das Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃), bindet an Rezeptoren am endoplasmatischen Retikulum, was zur Abgabe von Calcium ins Zytoplasma führt (Villereal & Byron, 1992; Beaven & Kassessinoff, 1997). Abbildung 2 zeigt entsprechende Daten aus Experimenten, bei denen transfizierte Klone und die Ausgangszelllinie mit murinem (Abb. 2a) und humanem IgE (Abb. 2b) inkubiert wurden. Gleichzeitig wurden die Zellen mit einem calciumbindenden Farbstoff beladen, dessen Anregungswellenlänge der Fluoreszenz sich verschiebt, je nachdem, ob Calcium gebunden ist oder nicht. Aus dem Verhältnis der Intensitäten und der bekannten Dissoziationskonstante kann die Konzentration des Calciums im Zytoplasma berechnet werden. Alle RBL-Zelllinien lassen sich im murinen System zur Calcium-Mobilisierung stimulieren. Das gleiche gilt für die transfizierten Klone im humanen System. Die Höhe des Plateaus der maximal erreichbaren Calciumkonzentration im Zytoplasma korreliert in etwa mit der Anzahl der humanen Rezeptoren auf den Zellen (vgl. Abb. 1).

Die endgültige Auswahl der weiter zu verwendenden Klone erfolgte aufgrund ihrer Mediatorfreisetzungskapazität. Dazu wurden sie zunächst mit humanem Myelom-IgE sensibilisiert und dann mit anti-Human-IgE Antikörpern vernetzt. Im Gegensatz zur Transfektion mit der humanen α -Kette allein (vgl. Tabelle 1) zeigten fast alle Klone bei der Kotransfektion aller drei Ketten eine Mediatorfreisetzung von über 40% im humanen System. In Abbildung 3 sind ausgewählte Klone aus beiden Transfektionen im Vergleich dargestellt. Außerdem sind die Ergebnisse mit der nicht transfizierten Ausgangszelllinie RBL-2H3 sowie der Zelllinie RBL-48 gezeigt. Wie schon früher beobachtet, können RBL-2H3 Zellen nicht mit humanem IgE sensibilisiert werden, zeigen aber im murinen System eine hohe Mediatorfreisetzungskapazität. RBL-48 Zellen geben nach Stimulation mit humanem IgE etwa 25% der β -Hexosaminidase in den Überstand ab, während die Werte für die einfach transfizierten Klone RBL-B6 und RBL-C8 bei 30-40% liegen. Diese beiden Klone sind als die besten aus der heterogen verlaufenen Transfektion (siehe Tabelle 1) ausgewählt worden. Bei der Kotransfektion entstanden wie oben schon erwähnt nur sehr wenige Klone, die kaum oder keine Mediatoren freisetzen, als Beispiele sind RBL-50/11 und RBL-50/15 in Abb. 3 gezeigt. Von den "guten" Klonen wurden RBL-30/25 und RBL-50/10 ausgewählt, die nach der Sensibilisierung mit humanem Myelom-IgE reproduzierbar zu mehr als 50% degranulierten. Im weiteren Verlauf der Studien wurde dann nur noch der Klon RBL-30/25 eingesetzt.

6.2.4 Auswahl der geeigneten Humanseren

Als nächstes wurde untersucht, ob die transfizierten Klone auch mit Allergikerseren sensibilisiert werden können, um nach der Vernetzung mit Allergenextrakten Mediatoren freizusetzen.

Dabei ergab sich, wie schon für RBL-48 berichtet (Zwischenbericht 3/97), ein relativ hoher Serumverbrauch. Eine Verdünnungsreihe mit Seren von Personen, die gegen Birkenpollen, Haselnüsse bzw. Erdnüsse allergisch sind, ergab, daß bei einer Serumverdünnung von 1:10 bis 1:20 ein Plateau der Mediatorfreisetzung erreicht wurde (Abb. 4). Aus praktischen Gründen wurden in den darauffolgenden Versuchen die Seren in einer Verdünnung von 1:20 eingesetzt. Im Gegensatz dazu können die Seren, die durch Immunisierung von Mäusen mit einem Protokoll, bei dem bevorzugt IgE gebildet wird (Hoffmann et al., 1997a) auf 1:100 verdünnt werden und oftmals erfolgt eine meßbare Mediatorfreisetzung auch noch bei Verdünnungen von 1:400 und darunter (Abb. 5). Der Grund dafür könnte sein, daß beim Menschen im Serum Faktoren vorhanden sind, die einer Allergie entgegen wirken, während die Bildung von IgE bei Mäusen wie oben erwähnt eine Immunisierung darstellt. Jedenfalls zeigen die Mäuse bei diesem Immunisierungsprotokoll keine allergischen Reaktionen.

Nun wurde eine Reihe von Seren untersucht, die bei der Messung im RAST-Inhibitionstest bzw. CAP-Test hohe Konzentrationen an IgE gegen Birkenpollen, Haselnuß und Erdnuß aufwiesen. Dabei stellte sich heraus, daß nicht alle positiven Seren in gleicher Weise für den Degranulationstest geeignet sind. Manche ergaben keine meßbare Mediatorfreisetzung, obwohl sie einen relativ hohen Gehalt an allergenspezifischem IgE hatten und die Patienten teilweise klinische Symptome zeigten. In den Abbildungen 6 bis 8 ist eine Auswahl der Ergebnisse mit einigen Seren gezeigt. Die Induktion der Rezeptorvernetzung erfolgte mit Birkenpollenextrakt, Haselnuß- und Erdnußextrakt (jeweils 100 pg - 10µg/ml). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden einige Seren ausgewählt, aus denen ein Poolserum für Untersuchungen von Birkenpollenextrakten und Extrakten von Lebensmitteln, die Haselnuß enthalten können, hergestellt wurde. Für die Untersuchung von Erdnuß-haltigen Extrakten eignete sich nur das Poolserum aus Borstel, mit dem einige erfolgversprechende Vorversuche durchgeführt werden konnten. Leider stand dies Serum für weitere Studien nicht mehr zur Verfügung. Andere Seren, die einen erdnußspezifischen IgE-Gehalt hatten, der der RAST-Klasse 3 entspricht, konnten mit Erdnußextrakten kaum eine Mediatorfreisetzung hervorrufen. Weitergehende Untersuchungen können deshalb erst durchgeführt werden, wenn geeignete Spender gefunden werden.

6.2.5 Untersuchung von Extrakten im Mediatorfreisetzungstest

Wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, wurde ein Poolserum hergestellt aus Proben, die einen hohen IgE-Titer gegen Haselnüsse enthalten. In Einklang mit der Tatsache, daß die Sensibilisierung von Haselnußallergikern über Birkenpollen erfolgt, zeigten sowohl die Einzelseren (vgl. Abb. 6 und 8) als auch das Poolserum (Abb. 9) eine hohe Mediatorfreisetzungskapazität. Nun wurden Zellen des transfizierten Klons RBL-30/25 mit dem Poolserum vorinkubiert und dann mit zwei Stammextrakten von Birkenpollen eines Herstellers sowie dem aus einem der Stammextrakte hergestellten Pricktest die Vernetzung induziert. Aus Abbildung 9 läßt sich erkennen, daß die beiden Stammextrakte fast identische Dosis-Wirkungskurven ergaben. Daraus läßt sich schließen, daß die Zusammensetzung der Extrakte und die allergene Aktivität in den Extrakten gleich ist. Der Abstand der Kurven der Extrakte zur Kurve des Pricktests spiegelt in idealer Weise die Reduktion der allergenen Aktivität durch die Verdünnung im Verhältnis 1:100 wider.

Als nächstes wurden verschiedene Handelsprodukte untersucht, die zum Teil als haselnußhaltig deklariert waren. Von diesen Lebensmitteln wurden Extrakte hergestellt und im Mediatorfreisetzungstest zur Vernetzung eingesetzt. Zum Vergleich wurden Extrakte von Birkenpollen und Haselnüssen mitgeführt. Als Negativkontrollen diente eine speziell für diesen Zweck produzierte Vollmilchschokolade ohne geglichen Nußanteil und der zur Extraktion verwendete Puffer. Die Ergebnisse sind in Abb. 10 dargestellt und zeigen zum einen, daß im Einklang mit den früheren Befunden die allergene Aktivität von Haselnußextrakten etwa 100-fach geringer ist als die von Birkenpollenextrakten. Die Proben, die Nougat enthalten, das aus Haselnüssen hergestellt wird, haben nach diesen Untersuchungen einen Haselnußanteil von 0,5 – 1%. In allen anderen Proben konnten in diesen Tests keine Haselnußallergene nachgewiesen werden.

Schließlich wurde der Einfluß der Modifizierung von Haselnüssen auf deren Allergengehalt untersucht. Dazu wurden Extrakte aus nativen und gerösteten Haselnüssen hergestellt. Mit diesen Extrakten wurde die Vernetzung auf Zellen induziert, die zum einen mit dem Poolserum von Haselnußallergikern und zum anderen mit einem Einzelerum eines Haselnußallergikers sensibilisiert worden waren. Die Seren zeigten im Western-Blot unterschiedliche Reaktivitäten gegen die verschiedenen Haselnußallergene. Dies spiegelt sich auch in der Mediatorfreisetzung wider (Abb. 11). Beim Poolserum war zwar eine deutliche Abnahme der allergenen Aktivität nach der Röstung zu beobachten, aber bei höheren Extraktkonzentrationen war eine recht gute Mediatorfreisetzung zu messen. Im Gegensatz dazu reagiert das Einzelerum offensichtlich bevorzugt mit den hitzelabilen Komponenten des Haselnußextrakts, da auch bei hohen Konzentrationen fast keine Mediatorfreisetzung mehr nachgewiesen werden konnte.

7 NUTZEN DER ERGEBNISSE UND WEITERE FORTSCHRITTE

Die beschriebenen Daten zeigen, daß sich RBL-2H3-Zellen nach Transfektion mit Genen des humanen hochaffinen IgE-Rezeptors mit humanem IgE (als Myelomprotein oder in Serum) sensibilisieren lassen, um nach der Vernetzung der IgE-beladenen Rezeptoren Mediatoren freizusetzen. Insbesondere die Kotransfektion aller drei Ketten des humanen Rezeptors ergab Klone, die eine Degranulation in der Höhe der Ausgangszelllinie mit Maus-IgE ermöglichen. Die bisherigen Ergebnisse zeigen, daß mit dem beschriebenen biologischen Testsystem Haselnußproteine bis zu einer Konzentration von 1 ng/ml sicher nachgewiesen werden können. Auch der Einfluß der Prozessierung von Lebensmitteln ist mit dieser Methode im untersuchten Modellsystem nachzuvollziehen. Weitere Arbeiten sollen nun zeigen, ob diese Ergebnisse mit anderen Allergenen reproduzierbar sind. Durch eine weitere Optimierung, insbesondere in Hinsicht auf die verwendeten Allergikerseren, ist es eventuell möglich, die Nachweisgrenze dieser Methode noch weiter herunterzusetzen.

Wie sich gezeigt hat ist ein großer Nachteil des Verfahrens, daß man zur Zeit darauf beschränkt ist, IgE-haltige Seren zur Sensibilisierung einzusetzen. Zum einen ist es an unserem Institut mangels einer angeschlossenen Klinik schwierig, überhaupt Allergikerseren zu bekommen. Selbst wiederholte Versuche, Freiwillige zur Blutspende zu bewegen, sind von eher bescheidenem Erfolg gekrönt. Zum anderen enthalten die meisten Seren IgE gegen einige, manchmal sogar viele, Allergene. Dies ist im Fall von pollenassoziierten

Nahrungsmittelallergenen durchaus erwünscht bzw. nicht zu umgehen. Im Fall der Erdnußallergiker war diese Tatsache bisher jedoch eher ein Grund dafür, daß das Testsystem nicht in gewünschter Weise angewendet werden konnte. Ein Ausweg aus diesem Dilemma wird darin gesehen, humanes IgE rekombinant herzustellen, wie dies in einem Fortsetzungsantrag formuliert wurde, oder IgE aus dem Serum von Allergikern zu isolieren. Dadurch würden die Probleme, die durch die heterogene Zusammensetzung von Serum entstehen, vermieden und die Methode wäre in idealer Weise standardisierbar.

In der Zwischenzeit wurde die Messung der biologischen Aktivität mittels Mediatorfreisetzung im murinen System weiter ausgebaut. Es stehen eine Reihe von IgE-reichen Mauseren gegen eine Vielzahl von Allergenen zur Verfügung (Hoffmann et al., 1997a, 1997b, 1998). Erste Befunde deuten darauf hin, daß die Ergebnisse von Mediatorfreisetzungstests im humanen und murinen System vergleichbar sind. Weitere Studien sollen zeigen, ob tatsächlich in beiden Fällen dieselben Epitope auf den Allergenen erkannt werden. Falls die Resultate übereinstimmen, könnten die entsprechenden Zelllinien parallel in sich ergänzenden Verfahren verwendet werden. So wäre es möglich, in Fällen, in denen keine humanen Seren erhältlich sind, die Prüfung der Allergenextrakte im murinen System durchzuführen. Außerdem wurde ein elektrophoretisches Verfahren zum Nachweis von Spuren von Erdnußproteinen in Lebensmitteln entwickelt (Holzhauser et al., 1998). Es ist so empfindlich, daß noch 0,001 % (10 ppm) Erdnußprotein in einer Schokoladenprobe entdeckt werden konnte. Im Vergleich dazu konnten mit der biologischen Methode im murinen System noch 0,01% Erdnußprotein in der Probe nachgewiesen werden. Insgesamt ist durch die kombinierte Anwendung der neuen Verfahren zusammen mit schon bestehenden Methoden eine weitere Verbesserung der Analyse von Allergenextrakten möglich. Studien zur Reproduzierbarkeit und zur weiteren Steigerung der Empfindlichkeit sind in Arbeit.

8 VERÖFFENTLICHUNGEN

Die Veröffentlichung der in diesem Bericht präsentierten ist für 1999 geplant, wenn alle Daten zur molekularbiologischen Charakterisierung der transfizierten Klone vorliegen. Ein Teil der Ergebnisse wurde bei der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (23.-26. Sept. 1998 in Freiburg) in Form eines Posters vorgestellt. Die Abstracts sind erschienen in: *Immunobiology*, **199** (3-5) 391-681. Sept. 1998/

9 LITERATUR

- ADAMCZEWSKI, M. & KINET, J. P. (1994): The high-affinity receptor for immunoglobulin E. *Chem. Immunol.* **59**, 173-190.
- ALBER, G., MILLER, L., JELSEMA, C. L., VARIN-BLANK, N. & METZGER, H. (1991): Structure-function relationships in the mast cell high affinity receptor for IgE. Role of the cytoplasmic domains and of the β subunit. *J. Biol. Chem.* **266**, 22613-22620.
- ALMLÖF, I., NILSSON, K., JOHANSSON, V., ÅKERBLÖM, E., SLOTTE, H., AHLSTEDT, S. & MATSSON, P. (1988): Induction of basophilic differentiation in the human basophilic cell line KU812. *Scand. J. Immunol.* **28**, 293-300.

- BEAVEN, M. A. & BAUMGARTNER, R. A. (1996): Downstream signals initiated in mast cells by FcεRI and other receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **8**, 766-772.
- BEAVEN, M. A. & KASSESSINOFF, T. (1997): Role of phospholipases, protein kinases and Calcium in FcεRI-induced secretion. In: *IgE Receptor (FcεRI) Function in Mast Cells and Basophils* (Hrsg. Hamawy, M. M.) R. G. Landes, Georgetown, S. 55-73.
- BLOM, T., HUANG, R., AVESKOGH, M., NILSSON, K. & HELLMAN, L. (1992): Phenotypic characterization of KU812, a cell line identified as an immature human basophilic leukocyte. *Eur. J. Immunol.* **22**, 2025-2032.
- BURKS, A. W., COCKRELL, G., CONNAUGHTON, C. & HELM, R. M. (1994): Epitope specificity and immunoaffinity purification of the major peanut allergen, Ara h I. *J. Allergy Clin. Immunol.* **93**, 743-750.
- BURKS, A. W., WILLIAMS, L. W., THRESHER, W., CONNAUGHTON, C., COCKRELL, G. & HELM, R. M. (1992): Allergenicity of peanut and soybean extracts altered by chemical or thermal denaturation in patients with atopic dermatitis and positive food challenges. *J. Allergy Clin. Immunol.* **90**, 889-897.
- CASANOVAS, M., MARAÑÓN, F. & BEL, I. (1994): Comparison of skin-prick test assay and reverse enzyme immunoassay competition (REINA-C) for biological activity of allergens. *Clin. Exp. Allergy* **24**, 134-139.
- DAËRON, M. (1997): Fc receptor biology. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 203-234.
- DOMBROWICZ, D., BRINI, A. T., FLAMAND, V., HICKS, E., SNOUWAERT, J. N., KINET, J. P. & KOLLER, B. H. (1996): Anaphylaxis mediated through a humanized high affinity IgE receptor. *J. Immunol.* **157**, 1645-1651.
- DURAND, B., MIGLIACCIO, G., YEE, N. S., EDDLEMAN, K., HUIMA-BYRON, T., MIGLIACCIO, A. R. & ADAMSON, J. W. (1994): Long-term generation of human mast cells in serum-free cultures of CD34⁺ cord blood cells stimulated with stem cell factor and interleukin-3. *Blood* **84**, 3667-3674.
- ERIKSSON, A. & MALMHEDEN YMAN, I. (1992): Quantitative analysis of casein, egg proteins and hazelnut in food by rocket immunoelectrophoresis on PhastSystemTM. In: *Food Safety and Quality Assurance, Application of Immunoassay Systems* (Hrsg. Morgan, M. R., Smith, C. J. & Williams, P. A.) Elsevier, Barking, S. 65-68.
- FORSBERG, K., NILSSON, G., REN, Z., HELLMAN, L., WESTERMARK, B. & NISTÉR, M. (1993): Constitutive and inducible expression of PDGF in the human basophilic cell line, KU 812. *Growth Fact.* **9**, 231-241.
- HIRSCHWEHR, R., VALENTA, R., EBNER, C., FERREIRA, F., SPERR, W. R., VALENT, P., ROHAC, M., RUMPOLD, H., SCHEINER, O. & KRAFT, D. (1992): Identification of common allergenic structures in hazel pollen and hazelnuts: a possible explanation for sensitivity to hazelnuts in patients allergic to tree pollen. *J. Allergy Clin. Immunol.* **90**, 927-936.
- HOFFMANN, A., JAMIN, A. & HAUSTEIN, D. (1995): Generation of cat dander specific IgE in mice permits detection of femtograms of Fel d 1 by RBL cell mediator release assay. *Allergo J.* **4**, 42.
- HOFFMANN, A., VIETHS, S. & HAUSTEIN, D. (1997a): Biologic allergen assay for *in vivo* test allergens with an *in vitro* model of the murine type I reaction. *J. Allergy Clin. Immunol.* **99**, 227-232.
- HOFFMANN, A., JAMIN, A., MAY, S., HAUSTEIN, D. & VIETHS, S. (1997b): A new *in vitro* model for testing of food allergens: allergen-specific mediator release of passively sensitized rat basophil leukaemia cells. *Food Agric. Immunol.* **9**, 309-325.
- HOFFMANN, A., SCHMITZ, N., DEICHSEL, H., FRANKE, S., VIETHS, S. & HAUSTEIN, D. (1998): Generation of mould specific IgE in mice permits determination of the biologic activity in *Cladosporium Aspergillus* and *Alternaria* skin prick test solutions by RBL cell degranulation assay. *Allergy* **53 (Suppl. 43)**, 197.

- HOLZHAUSER, T., DEHNE, L. I., HOFFMANN, A., HAUSTEIN, D. & VIETHS, S. (1998): Rocket immunoelectrophoresis (RIE) for determination of potentially allergenic peanut proteins in processed foods as a simple means for quality assurance and food safety. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* **206**, 1-8.
- KISHI, K. (1985): A new leukemia cell line with Philadelphia chromosome characterized as basophil precursors. *Leuk. Res.* **9**, 381-390.
- LEVI-SCHAFFER, F., KELAV-APPELBAUM, R. & RUBINCHIK, E. (1995): Human fore-skin mast cell viability and functional activity is maintained *ex vivo* by coculture with fibroblasts. *Cell. Immunol.* **162**, 211-216.
- LIN, S. Q., CICALA, C., SCHARENBERG, A. M. & KINET, J. P. (1996): The Fc ϵ RI β sub-unit functions as an amplifier of Fc ϵ RI γ -mediated cell activation signals. *Cell* **85**, 985-995.
- LOZA, C. & BROSTOFF, J. (1995): Peanut allergy. *Clin. Exp. Allergy* **25**, 493-502.
- MAEYAMA, K., HOHMAN, R. J., METZGER, H. & BEAVEN, M. A. (1986): Quantitative relationships between aggregation of IgE receptors, generation of intracellular signals, and histamine secretion in rat basophilic leukemia (2H3) cells. Enhanced responses with heavy water. *J. Biol. Chem.* **261**, 2583-2592.
- MALMHEDEN YMAN, I., ERIKSSON, A., EVERITT, G., YMAN, L. & KARLSSON, T. (1994): Analysis of food proteins for verification of contamination or mislabelling. *Food Agric. Immunol.* **6**, 167-172.
- NILSSON, G., BLOM, T., KUSCHE-GULLBERG, M., KJELLÉN, L., BUTTERFIELD, J. H., SUNDSTRÖM, C., NILSSON, K. & HELLMAN, L. (1994a): Phenotypic characterization of the human mast-cell line HMC-1. *Scand. J. Immunol.* **39**, 489-498.
- NILSSON, G., CARLSSON, M., JONES, I., AHLSTEDT, S., MATSSON, P. & NILSSON, K. (1994b): TNF- α and IL-6 induce differentiation in the human basophilic leukaemia cell line KU812. *Immunology* **81**, 73-78.
- ORTOLANI, C., ISPANO, M., PASTORELLO, E., ANSALONI, R. & MAGRI, C. G. (1989): Comparison of results of skin prick tests (with fresh foods and commercial food extracts) in 100 patients with oral allergy syndrome. *J. Allergy Clin. Immunol.* **83**, 683-690.
- PLATTS-MILLS, T. A. E. & CHAPMAN, M. D. (1991): Allergen standardization. *J. Allergy Clin. Immunol.* **87**, 621-624.
- RA, C., JOUVIN, M. H. & KINET, J. P. (1989): Complete structure of the mouse mast cell receptor for IgE (Fc ϵ RI) and surface expression of chimeric receptors (rat-mouse-human) on transfected cells. *J. Biol. Chem.* **264**, 15323-15327.
- SCHNEIDER, H., KORN, M. & HAUSTEIN, D. (1993): CD45-deficient RBL-2H3 cells: cellular response to Fc ϵ R- and ionophore-induced stimulation. *Immunol. Invest.* **22**, 503-515.
- SCHWARTZ, L. B., LEWIS, R. A., SELDIN, D. & AUSTEN, K. F. (1981): Acid hydrolases and tryptase from secretory granules of dispersed human lung mast cells. *J. Immunol.* **126**, 1290-1294.
- TAKEBE, Y., SEIKI, M., FUJISAWA, J., HOY, P., YOKOTA, K., ARAI, K., YOSHIDA, M. & ARAI, N. (1988): SR α promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 466-472.
- TAUDOUD, G., VARIN-BLANK, N., JOUIN, H., MARCHAND, F., WEYER, A. & BLANK, U. (1993): Expression of the alpha chain of human Fc ϵ RI in transfected rat basophilic leukemia cells: functional activation after sensitization with human mite-specific IgE. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **100**, 344-350.

- VALENT, P., BESEMER, J., KISHI, K., KALTENBRUNNER, R., KUHN, B., MAURER, D., LECHNER, K. & BETTELHEIM, P. (1990): IL-3 promotes basophilic differentiation of KU812 cells through high affinity binding sites. *J. Immunol.* **145**, 1885-1889.
- VIETHS, S., AULEPP, H., SCHÖNING, B. & TSCHIRNICH, R. (1995): Untersuchungen zur Apfelallergie bei Birkenpollenallergikern. *Allergologie* **18**, 89-97.
- VIETHS, S., FISCHER, K., DEHNE, L. I., AULEPP, H., WOLLENBERG, A. & BÖGL, K. W. (1994): Versteckte Allergene in Lebensmitteln. *Bundesgesundhbl.* **37**, 51-60.
- VILLEREAL, M. L. & BYRON, K. L. (1992): Calcium signals in growth factor signal transduction. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **119**, 67-121.
- WILSON, A. P., PULLAR, C. E., CAMP, A. M. & HELM, B. A. (1993): Human IgE mediates stimulus secretion coupling in rat basophilic leukemia cells transfected with the α chain of the human high-affinity receptor. *Eur. J. Immunol.* **23**, 240-244.

ABBILDUNGEN

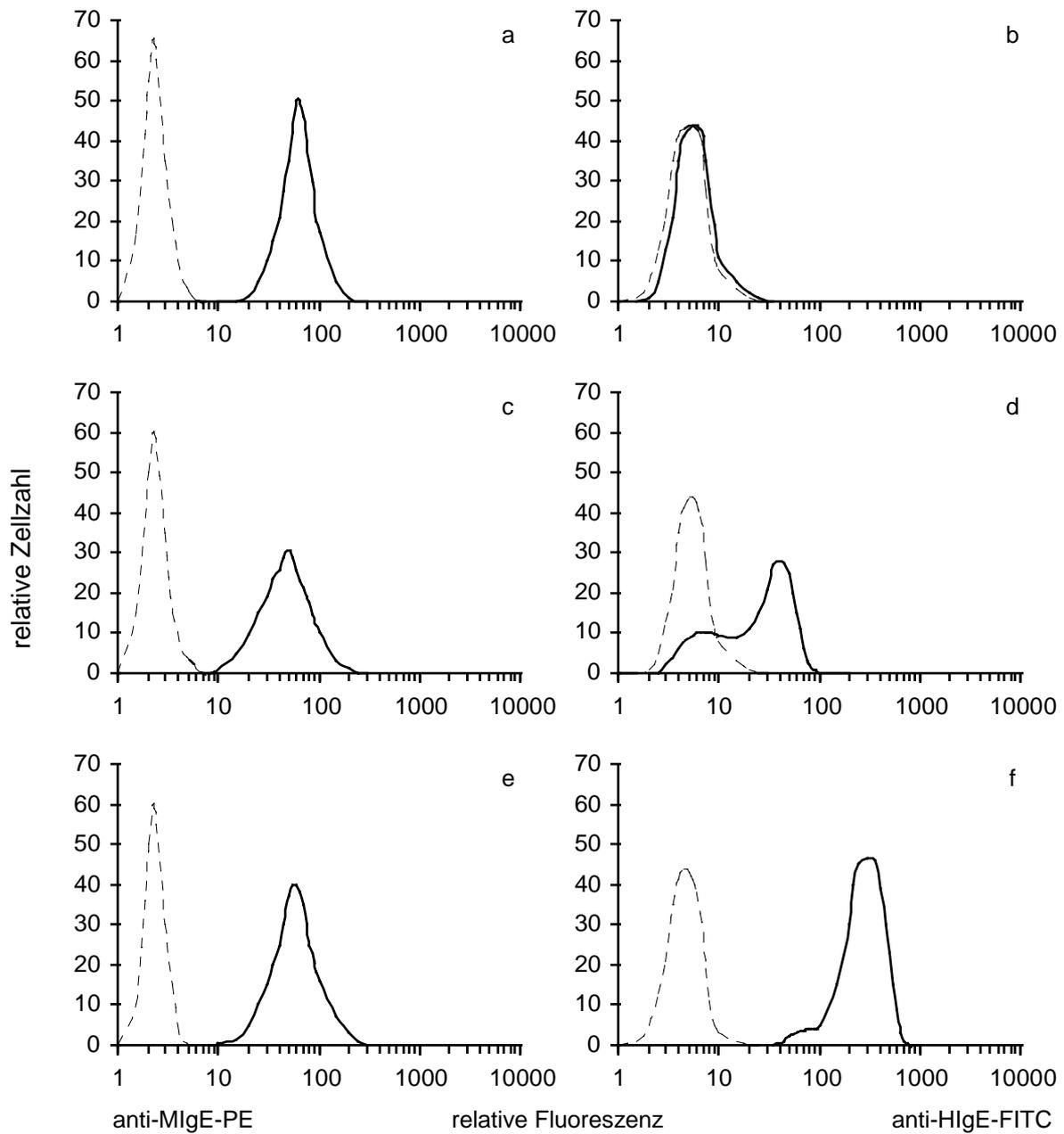


Abb. 1: FACS-Analyse transfizierter Zellen. Die Zelllinien RBL-2H3 (a, b), RBL-48 (c, d) und RBL-30/25 (e, f) wurden mit MIgE (a, c, e) und HIgE (b, d, f) inkubiert. Die an FcεR1 gebundenen IgE-Moleküle wurden Ziege anti-MIgE bzw. Ziege anti-HIgE, die mit Phycoerythrin (linke Seite) bzw. FITC (rechte Seite) gekoppelt sind, nachgewiesen. Die gestrichelten Linien sind die Isotypkontrollen mit irrelevantem IgG.

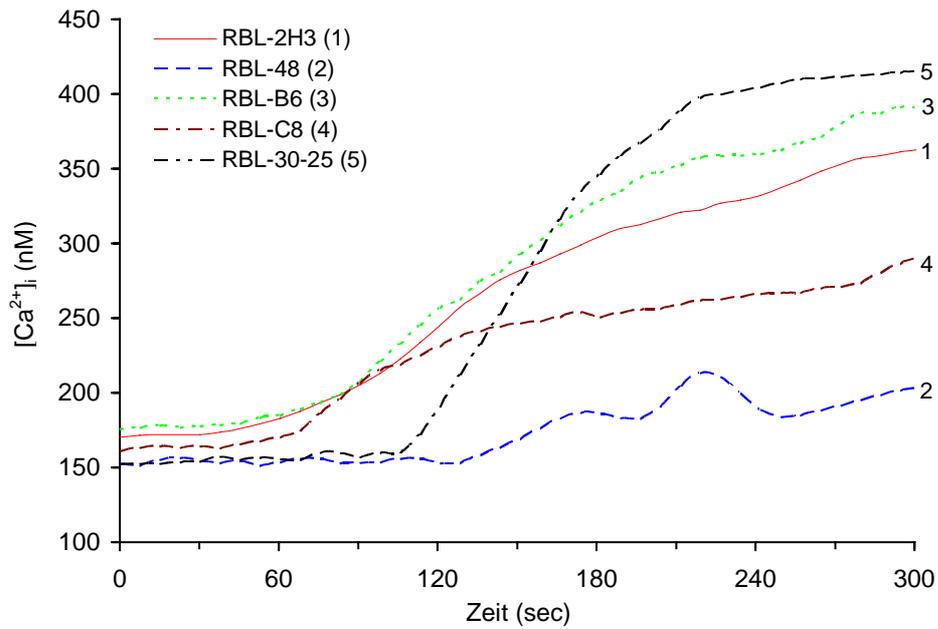


Abb. 2a: Messung der intrazellulären Calcium-Mobilisierung. RBL-2H3 (1) und transfizierte Klone (2-5) wurden mit Maus-IgE sensibilisiert und mit FURA-2 beladen. Nach der Hydrolyse von FURA-2 und Equilibrierung der Zellen auf 37°C im Spektrometer wurden die IgE-beladenen Rezeptoren mit Ziege anti-Maus-IgE vernetzt.

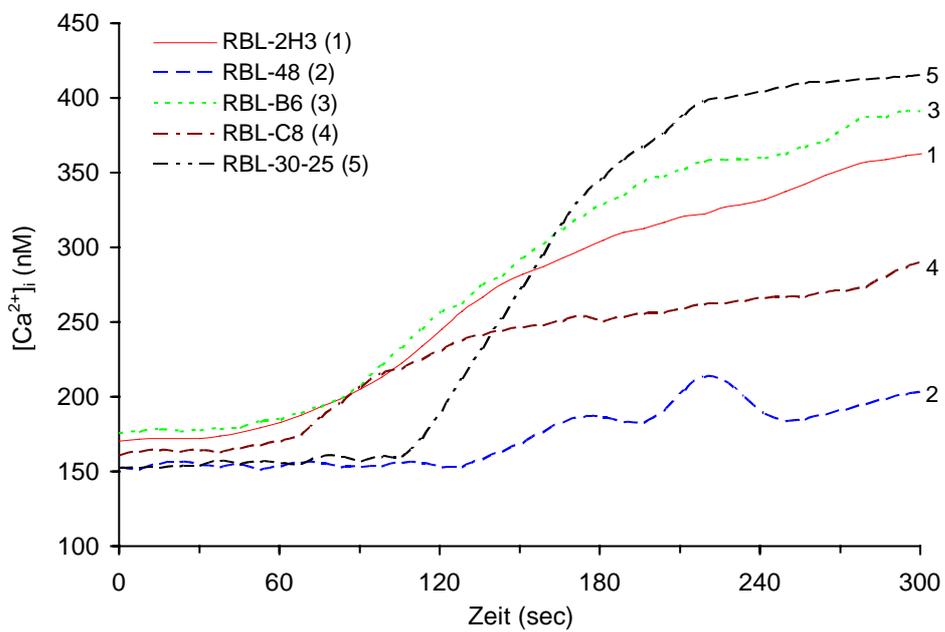


Abb. 2b: Durchführung wie Abb. 2a, aber mit humanem IgE und Ziege anti-human-IgE.

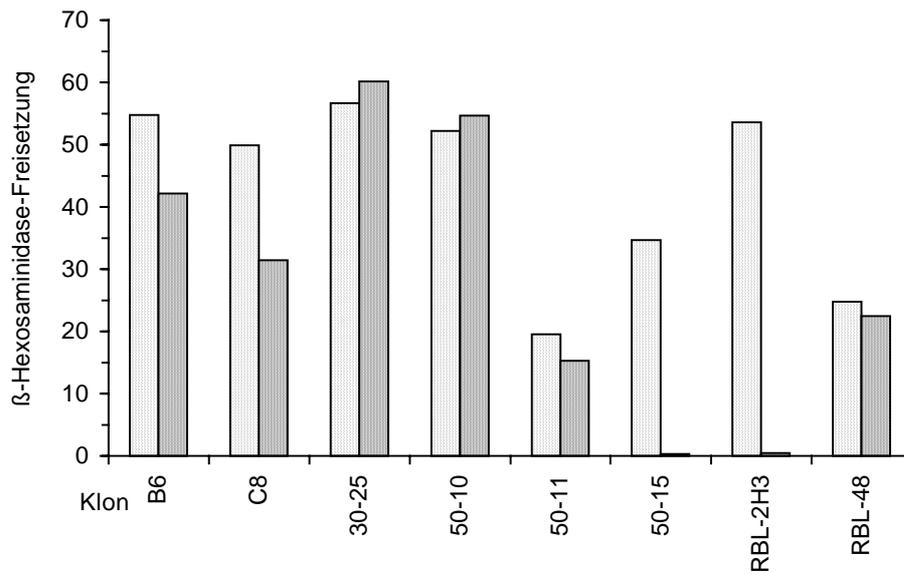


Abb. 3: Vergleich ausgewählter Klone (siehe Text). Die Zellen wurden mit Maus-IgE sensibilisiert und mit Ziege anti-Maus-IgE vernetzt (helle Balken). In gleicher Weise wurden die Zellen mit humanem Myelom-IgE und Ziege anti-Human-IgE behandelt (dunkle Balken).

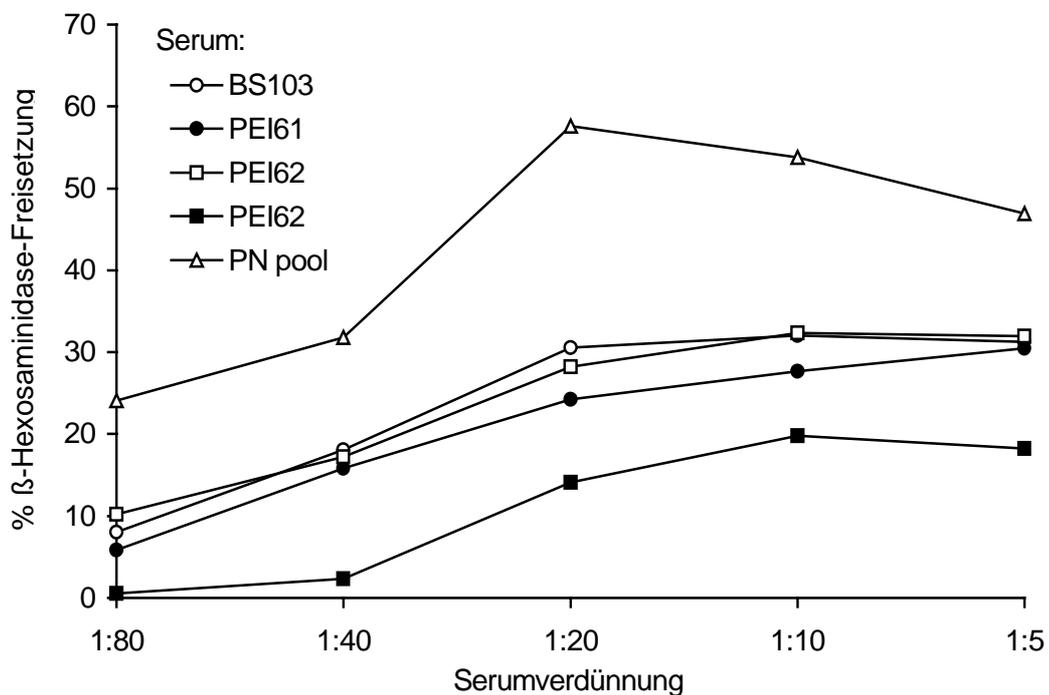


Abb. 4: Bestimmung der optimalen Serumkonzentration. Zellen des Klons RBL-30/25 wurden mit Allergikerseren sensibilisiert und anschließend mit Extrakt von Birkenpollen (○, ●, □), Haselnüssen (■) bzw. Erdnüssen (△) vernetzt.

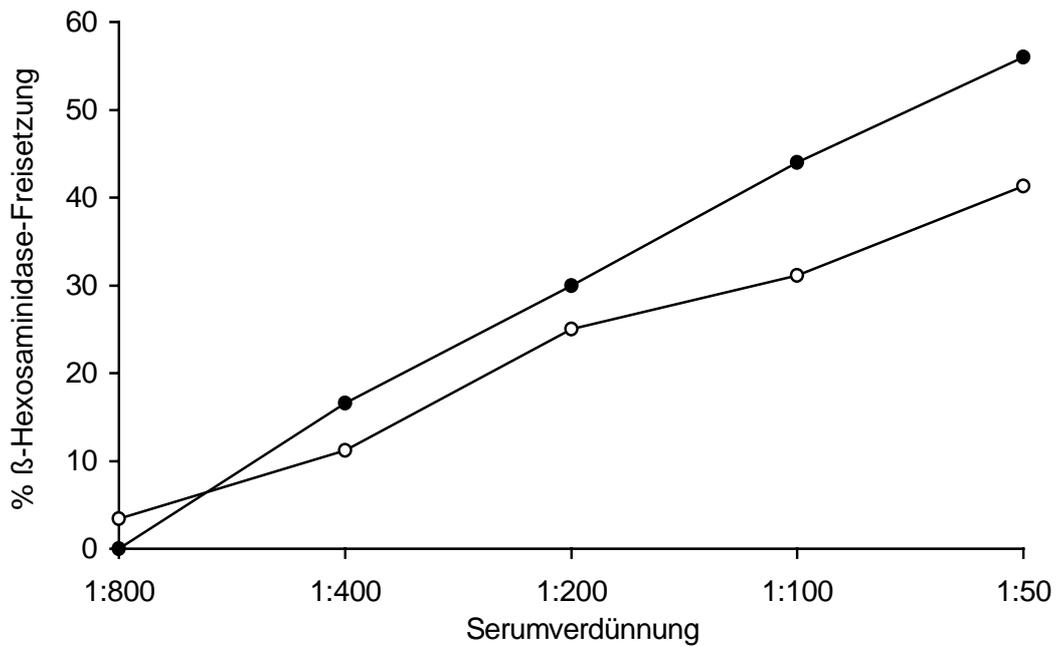


Abb. 5: Vergleich mit dem Maussystem. RBL-2H3-Zellen wurden mit Mausserum, das IgE gegen Birkenpollen (●) bzw. Erdnüsse (○) enthielt, sensibilisiert und mit den entsprechenden Allergenextrakten vernetzt.

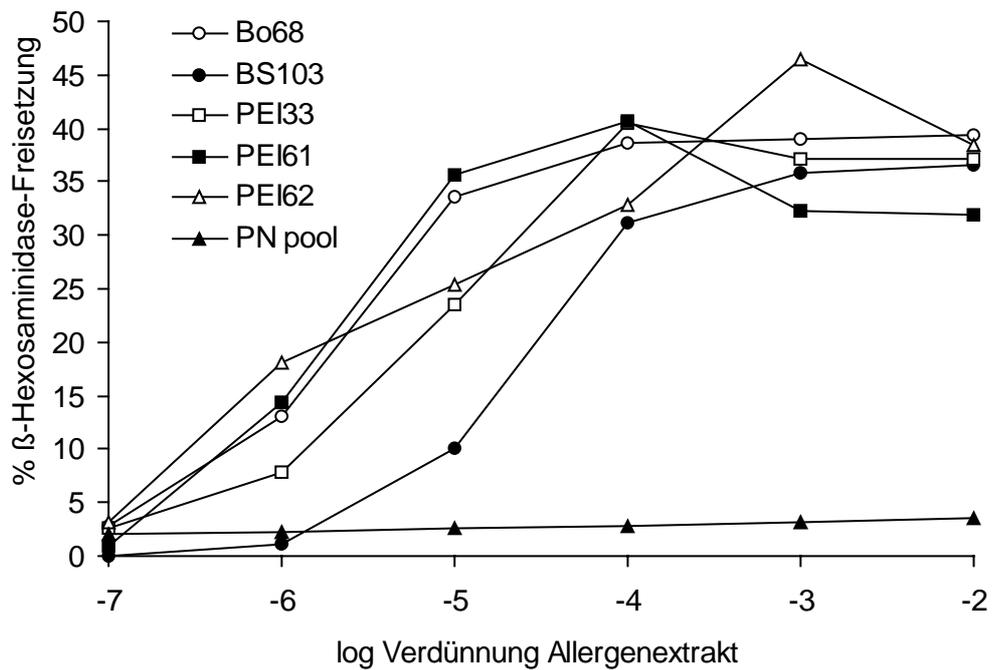


Abb. 6: Untersuchung ausgewählter Allergikerseren mit Allergenextrakten. Der transfizierte Klon RBL-30/25 wurde mit einer 1:20-Verdünnung der angegebenen Allergikerseren sensibilisiert. Die Vernetzung erfolgte mit Birkenpollenextrakt. Die Ausgangskonzentration des Extrakts betrug jeweils 1 mg/ml.

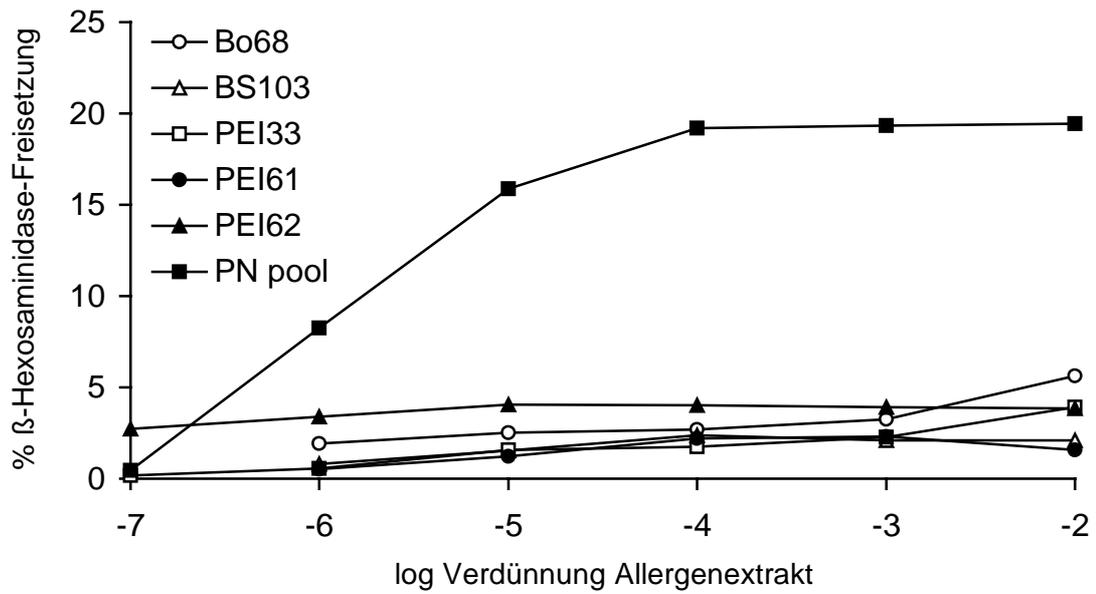


Abb. 7: Durchführung wie in Abb. 6 beschrieben, Vernetzung mit Erdnußextrakt.

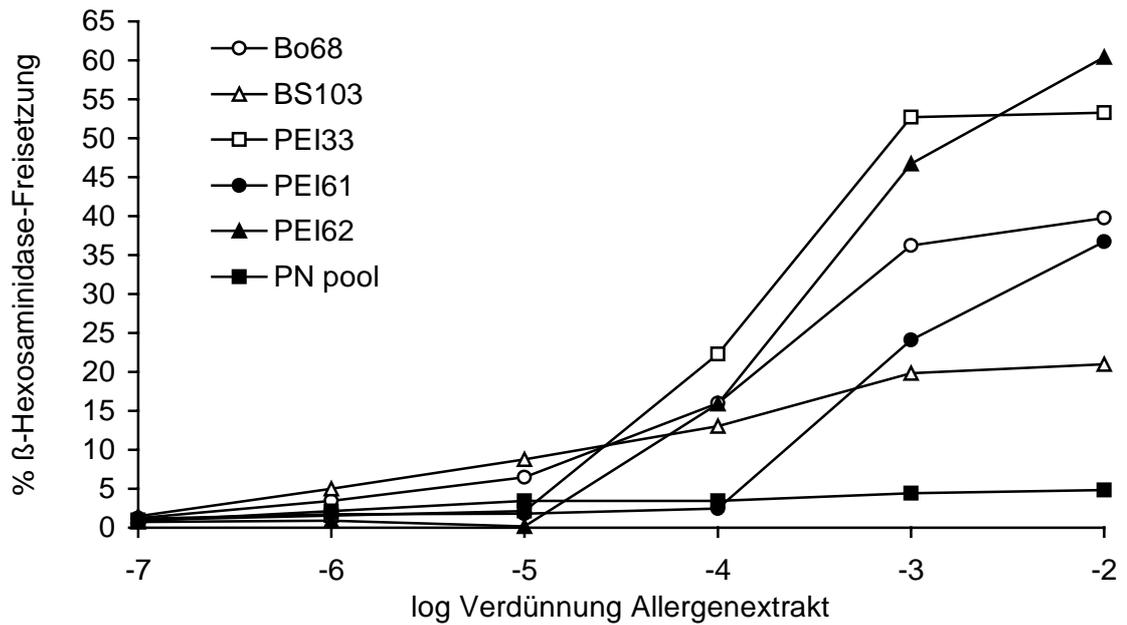


Abb. 8: Durchführung wie in Abb. 6 beschrieben, Vernetzung mit Haselnußextrakt.

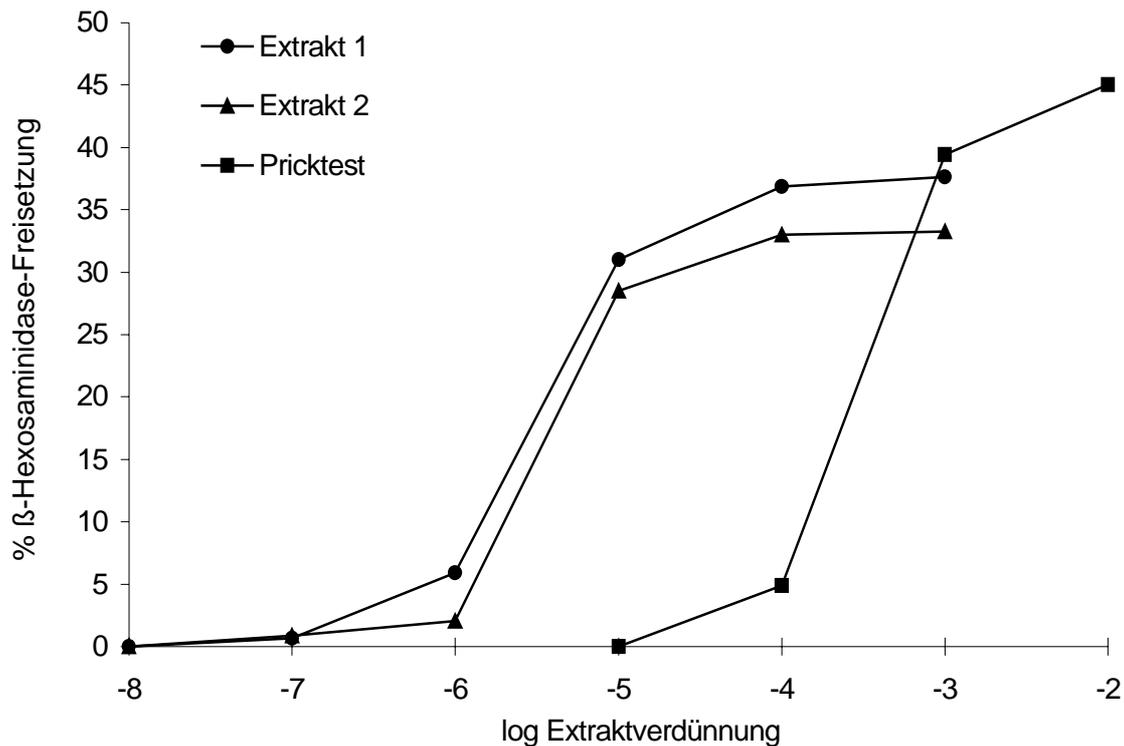


Abb. 9: Untersuchung der biologischen Aktivität von Birkenpollen-Extrakten. RBL-30/25 Zellen wurden mit einer 1:10-Verdünnung von Poolserum von Birkenpollenallergikern sensibilisiert. Die Vernetzung erfolgte mit verschiedenen Konzentration von Birkenpollen-Stammextrakten (Extrakt 1: ●; Extrakt 2: ▲) und einer Pricktestlösung (■).

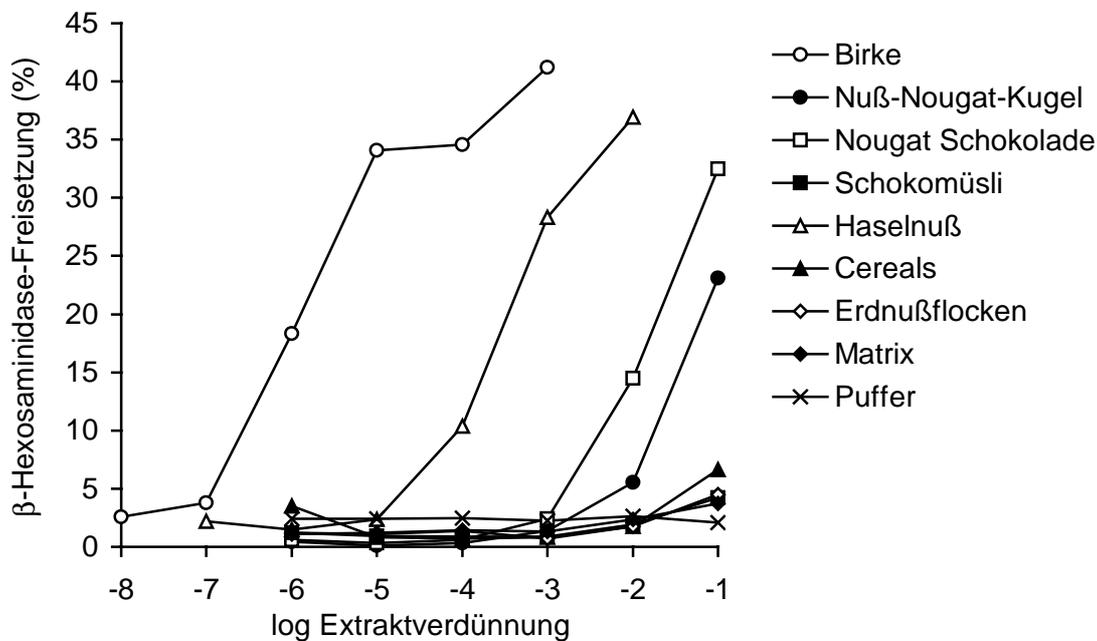


Abb. 10: Nachweis von Haselnußallergenen in Lebensmittelextrakten. Der Klon RBL-30/25 wurde mit Serum von Haselnußallergikern sensibilisiert und mit Extrakten von Birkenpollen, Haselnüssen und Lebensmittelproben vernetzt (Ausgangs-Proteinkonz. jeweils 1 mg/ml). Matrix ist ein Extrakt aus der Schokoladengrundmasse ohne jegliche Zusätze, Puffer ist die für die Extraktion verwendete Kochsalzlösung.

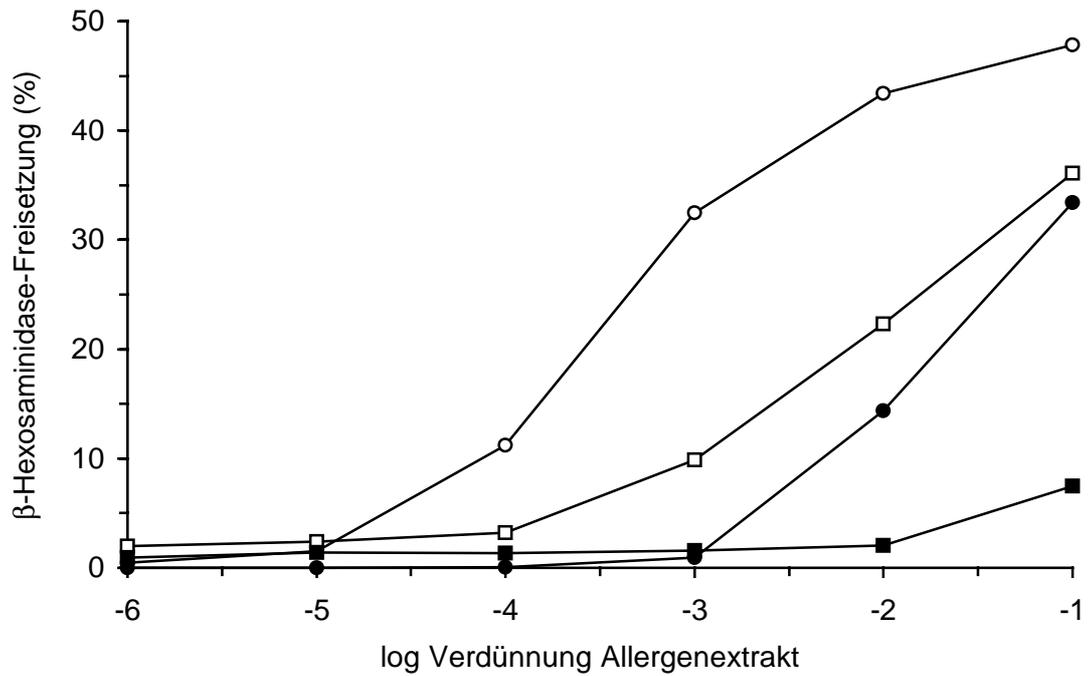


Abb. 11: Einfluß der Röstung von Haselnüssen auf ihren Allergengehalt. Zellen des Klon RBL-30/25 wurden mit einem Poolserum (Kreise) bzw. Einzelserum (Quadrate) sensibilisiert und mit Extrakten von nativen (offene Symbole) bzw. gerösteten Haselnüssen (geschlossene Symbole) vernetzt.. Die Proteinkonzentration der unverdünnten Extrakte betrug jeweils 1 mg/ml.