



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
Professur für Biotechnologie der Naturstoffe



# **Untersuchungen zur Abhängigkeit der Allergenität von Apfelgenotypen vom Mal d 1-Gesamtgehalt, den Mal d 1-Proteinvarianten und dem Polyphenolgehalt**

Emilia Johanna Romer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät TUM School of Life Science der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	Prof. Dr. Harald Luksch
Prüfer der Dissertation:	1. Prof. Dr. Wilfried Schwab
	2. Prof. Dr. Michael Rychlik

Die Dissertation wurde am 07.09.2020 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät TUM School of Life Science am 23.11.2020 angenommen



## Danksagung

Es gibt viele Menschen, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Und auf diesem Wege möchte ich allen von ganzem Herzen danken.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Wilfried Schwab gebührt ein besonderer Dank, für die Möglichkeit an der BiNa promovieren zu können. Vielen Dank für Deine Unterstützung, die Betreuung, die Motivation und das Vertrauen in meine Arbeit.

Den Projektpartnern des „AllArm“ – Projektes danke ich für die Kooperation und Zusammenarbeit. Zunächst Herrn Dr. Engelke vom Bundesministerium für Landwirtschaft und Ernährung für das Vertrauen und die Finanzierung des Projektes. Herrn Prof. Dr. Werner Dierend und Katrin Plate aus Osnabrück danke ich für die Organisation und die Ernte und Versendung der Proben, ebenso wie der Züchtungsinitiative Niederelbe für die Kultivierung der Äpfel, Herrn Prof. Dr. Karl-Christian Bergmann und seinem Team der Charité in Berlin für die Durchführung der Humanstudien. Ebenso wie Frau Dr. Christina Ludwig und Herrn Dr. Chen Meng für die Analysen der Isoformsequenzen am BayBioMS-Zentrum in Freising.

Was wäre die Arbeit ohne die Kollegen? Ich danke allen Mitarbeitern der BiNa-Gruppe, für die Arbeit, die Gespräche und die hilfreiche Unterstützung während der ganzen Zeit.

Hervorheben möchte ich Soraya Chebib, für die Zusammenarbeit in dem Projekt. Du bist meine „Apfel-Verbündete“ und hast die Höhen und Tiefen mit mir zusammen gemeistert. Ich wünsche Dir noch ganz viel Erfolg beim Weiterführen der Arbeit im Projekt.

Vielen Dank, Dr. Elisabeth Kurze, für Deine fachliche und persönliche Unterstützung. Im Labor konnte ich einiges von Dir lernen. Vielen Dank für die tolle Zeit mit ELISA-Diskussionen, Kaffee-Pausen, Grillabenden, Fahrradtour und vielem mehr.

Frau Dr. Katja Härtl möchte ich danken, für ihre Funktion als Mentorin. Du hattest stets ein offenes Ohr und einen guten Rat.

Mein ganz besonderer Dank gilt Annika Haugeneder. Seit dem ersten Semester bist du mir immer eine wunderbare Freundin, Verbündete und Unterstützerin. Du hast mit mir die Erfolge gefeiert und mich bei Rückschlägen aufgebaut. Ohne Dich wäre ich wahrscheinlich nicht hier!

Und zu guter Letzt, möchte ich denen danken, die mir bisher in jeder Lebenslage zur Seite standen und stehen werden. Meiner Familie, meinen Eltern, meiner Schwester Antonia, meinem wunderbaren Partner Moritz und unserem gemeinsamen Wunder. Ohne Euch und Eure bedingungslose Liebe, Unterstützung und Eure Motivation wäre das alles nicht möglich gewesen. Ihr habt mir Mut und Kraft gegeben und habt mich immer unterstützt, egal was war. Dafür bin ich auf ewig dankbar!

**Danke!**



## Publikationen

Die Arbeit dieser Dissertation wurde von Dezember 2016 bis Dezember 2019 unter der Leitung von Prof. Dr. Wilfried Schwab an der Professur für Biotechnologie der Naturstoffe der Fakultät TUM School of Life Science der Technischen Universität München durchgeführt. Sie entstand im Rahmen des Projektes „AllArm – Züchtung allergenarmer Äpfel als multidisziplinäres Entwicklungsvorhaben“ in Kooperation mit der Hochschule Osnabrück, des Allergiezentrum der Charité in Berlin und der Züchtungsinitiative Niederelbe. Gefördert wurde dieses Projekt vom Bundesministerium für Landwirtschaft und Ernährung (BMLE).

Auszüge dieser Arbeit wurden bereits publiziert.

## Originalartikel

**Romer, Emilia; Chebib, Soraya; Bergmann, Karl-Christian; Plate, Katrin; Becker, Sylvia; Ludwig, Christina; Meng, Chen; Fischer, Thilo; Dierend, Werner; Schwab, Wilfried** (2020) Tiered approach for the identification of Mal d 1 reduced, well tolerated apple genotypes. *Sci Rep.* 10, 9144

## Vorträge

**Emilia Romer, Wilfried Schwab:**

Züchtung allergenarmer Äpfel über Mal d 1-ELISA-Selektion und Provokationstests  
53. BGG & DHGL Jahrestagung vom 6. – 8. März 2019 in Berlin

**Emilia Romer, Wilfried Schwab:**

Breeding of hypoallergenic apples using ELISA-assays – Quantification and characterisation of the major apple allergen Mal d 1  
Forschungsseminar der Lebensmittelchemie am 22. Oktober 2018 in Freising



# Inhaltsverzeichnis

Danksagung .....	I
Publikationen .....	III
Inhaltsverzeichnis .....	V
Abbildungs- & Tabellenverzeichnis .....	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
Zusammenfassung .....	XIII
Summary.....	XVII
1 Einleitung .....	1
1.1 Der Kulturapfel <i>Malus × domestica</i> – Des Deutschen liebstes Obst.....	1
1.2 Nährstoffe, gesundheitlicher Nutzen und Risiken.....	2
1.3 Das Immunsystem und die Reaktion bei Typ-I-Allergie .....	5
1.4 Pollenassoziierte Nahrungsmittelallergie .....	9
1.5 Pathogen-assoziierte Proteine (PR-Proteine) .....	10
1.5.1 Bet v 1 – das Hauptallergen der Birkenpollen.....	13
1.5.2 Mal d 1 – das Hauptallergen der Äpfel aus <i>Malus × domestica</i> .....	14
1.6 Ursachen und Therapiemöglichkeiten.....	17
1.7 Der Einfluss von Polyphenolen auf die Verträglichkeit.....	19
1.8 Ansätze zur Züchtung allergenarmer Äpfel .....	20
2 Ziel der Arbeit .....	23
3 Material & Methoden .....	25
3.1 Materialien .....	25
3.1.1 Chemikalien.....	25
3.1.2 Antikörper und Enzyme.....	27
3.1.3 Weitere Materialien .....	28
3.1.4 Pflanzenmaterial .....	28
3.1.5 Geräte.....	29
3.1.6 LC-MS Parameter.....	30
3.1.7 Software.....	32
3.2 Methoden.....	33
3.2.1 Transformation von <i>E.coli</i> BL21(DE3) pLysS mit dem Expressionsplasmid für Mal d 1 .....	33
3.2.2 Herstellung des rekombinanten Proteins (rMal d 1.02).....	33

3.2.3	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	35
3.2.4	SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	35
3.2.5	Western Blot .....	37
3.2.6	Proteinextraktion aus Äpfeln .....	38
3.2.7	Mal d 1-Bestimmung mittels indirekt kompetitiven ELISA-Assays.....	38
3.2.8	Lagerungsstabilitätstests .....	39
3.2.9	Klinische Provokationstest .....	40
3.2.10	Extraktion der Polyphenole und Quantifizierung mittels LC-MS.....	41
3.2.11	Sequenzierung der Mal d 1 Isoformen mittels LC-MS/MS.....	43
4	Ergebnisse .....	45
4.1	Biosynthese und Reinigung des rekombinanten Mal d 1 .....	45
4.2	Bestimmung der Mal d 1-Konzentration mittels ELISA.....	46
4.2.1	Entwicklung und Optimierung der Proteinextraktion und des ELISA-Tests .	46
4.2.2	Selektionsstufe 1 .....	48
4.2.3	Selektionsstufe 2 .....	49
4.2.4	Mal d 1-Gehalte ausgewählter Elternsorten .....	50
4.2.5	Lagerungsstabilitätstest und Einfluss auf den Mal d 1-Gehalt.....	51
4.3	Humanstudie mit Provokationstest.....	53
4.4	Analyse der Polyphenol-Zusammensetzung mittels LC-MS .....	56
4.5	Bestimmung spezifischer Peptide und Isoformen mittels LC-MS/MS .....	61
5	Diskussion .....	69
5.1	Biosynthese und Reinigung des rMal d 1 in <i>E. coli</i> .....	69
5.2	Bestimmung der Mal d 1 Konzentration in Apfelproben mittels ELISA-Tests.	69
5.2.1	Der Allergengehalt ist abhängig von Genotyp und von Umweltfaktoren .....	70
5.2.2	Die Lagerungszeit und -bedingung beeinflusst den Allergengehalt.....	72
5.3	Kein direkter Zusammenhang zwischen Verträglichkeit und Mal d 1-Gehalt...	73
5.4	Starke Abhängigkeit zwischen dem Mal d 1-Gehalt und den Flavan-3-olen....	76
5.5	Spezifische Peptide und Isoformen des Mal d 1 .....	79
5.6	Chancen in der Züchtung .....	82
6	Literaturverzeichnis.....	85
7	Anhang .....	103
7.1	Mal d 1-Gehalte Selektionsstufe 1 .....	103
7.2	Mal d 1-Gehalte Selektionsstufe 2 .....	105
7.3	Konzentrationen weiterer Polyphenolgruppen.....	109

## Abbildungs- & Tabellenverzeichnis

### Abbildungen

Abbildung 1	Strukturen ausgewählter Polyphenole in Äpfeln.....	3
Abbildung 2	Schematischer Aufbau eines IgE-Antikörpers (nach Rink <i>et al.</i> (2015)). .....	6
Abbildung 3	Reaktion des Immunsystems auf Antigene.....	7
Abbildung 4	Vergleich pflanzenübergreifender homologer Allergene.....	10
Abbildung 5	Struktur des Apfelallergens Mal d 1 als Beispiel eines PR-10 Proteins. ....	12
Abbildung 6	hydrophobe Bindungstasche des Mal d 1.....	16
Abbildung 7	SDS-Gel nach Coomassie-Färbung und Western Blot des rMal d 1. ....	45
Abbildung 8	Schwankungen in Messergebnissen .....	46
Abbildung 9	Untersuchung der Reproduzierbarkeit des ELISA-Tests.....	47
Abbildung 10	Mal d 1-Gehalte ausgewählter Genotypen der Selektionsstufe 1. ....	48
Abbildung 11	Ausgewählte Apfelgenotypen der Selektionsstufe 2.....	49
Abbildung 12	Mal d 1-Gehalte einiger Elternsorten.....	50
Abbildung 13	Entwicklung des Mal d 1-Gehaltes während der Lagerung 2016. ....	51
Abbildung 14	Entwicklung des Mal d 1-Gehaltes während der Lagerung 2017. ....	52
Abbildung 15	Genotyp p40 bei ULO-Lagerung. Vergleich 2016 und 2017.....	53
Abbildung 16	Ergebnisse der Provokationstest der Humanstudie. ....	54
Abbildung 17	Gesamtpolyphenolgehalte ausgewählter Genotypen .....	57
Abbildung 18	Korrelationsdiagramm der Polyphenole 2017.....	58
Abbildung 19	Korrelationsdiagramm der Polyphenole 2018.....	59
Abbildung 20	Konzentration der Flavan-3-ole in verschiedenen Apfel-Genotypen .....	60
Abbildung 21	Vulkandiagramm aller identifizierten Peptide der Mal d 1 Isoformen. ....	62
Abbildung 22	Phylogenetischer Baum der Isoformen des Mal d 1. ....	66
Abbildung 23	Abgleich spezifischer Peptide mit den Proteinsequenzen von Bet v 1 und Mal d 1.....	67

## **Tabellen**

Tabelle 1	Verwendete Chemikalien .....	25
Tabelle 2	Verwendete Antibiotika .....	27
Tabelle 3	Verwendete Antikörper und Enzyme .....	27
Tabelle 4	Weitere Verbrauchsmaterialien.....	28
Tabelle 5	Geräteliste.....	29
Tabelle 6	LC-MS Parameter Polyphenole .....	30
Tabelle 7	Verwendete Software .....	32
Tabelle 8	Kultivierungsmedien .....	33
Tabelle 9	Pufferlösungen zur Proteinreinigung .....	35
Tabelle 10	Verwendete SDS-Gele .....	36
Tabelle 11	Puffer- und Färbelösungen für SDS-Page .....	37
Tabelle 12	Pufferlösungen für Western Blot.....	38
Tabelle 13	Pufferlösungen für ELISA.....	39
Tabelle 14	Bedingungen und Auslagerungszeitpunkte für Lagerungsversuche .....	40
Tabelle 15	Quantifizierte Metaboliten .....	41
Tabelle 16	LC-MS/MS Parameter zur Analyse tryptischer Peptide .....	43
Tabelle 17	Liste der für die weitere Züchtung geeigneten Apfelgenotypen .....	56
Tabelle 18	Auflistung der identifizierten, signifikanten Peptide .....	65

## **Anhang**

Anhang 1	Mal d 1-Gehalte aller Genotypen der Selektionsstufe 1 aus 2016.....	103
Anhang 2	Mal d 1-Gehalte aller Genotypen der Selektionsstufe 1 aus 2017.....	105
Anhang 3	Mal d 1-Gehalte der Genotypen der Selektionsstufe 2.....	105
Anhang 4	Ergebnisse der Anthocyane 2017 (A) und 2018 (B) .....	109
Anhang 5	Ergebnisse der Flavonole aus 2017 (A) und 2018 (B) .....	110
Anhang 6	Ergebnisse der Zimtsäurederivate aus 2017 (A) und 2018 (B) .....	111
Anhang 7	Ergebnisse der Dihydrochalkone aus 2017 (A) und 2018 (B).....	112

## Abkürzungsverzeichnis

1-MCP	1-Methylcyclopropen
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
APZ	allergenpräsentierende Zelle
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat, Substrat für Western Blot
Bet v 1	Hauptallergen der Birkenpollen
BR	'Braeburn' (Vergleichssorte)
BSA	Bovines Serumalbumin
c	Konzentration
DBPCFC	engl. double-blind, placebo-controlled food challenge
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	engl. deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
ECARF	engl. European Centre of Allergy Research Foundation, Europäische Stiftung für Allergieforschung
ELISA	<i>engl. Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> , enzymgekoppelter Immunabsorbtionstest
EtOH	Ethanol
FAO	<i>engl. Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> , Organisation für Lebensmittel und Landwirtschaft der vereinten Nationen
FDA	engl. U.S. Food & Drug Administration
FG	Frischgewicht
GD	'Golden Delicious' (Vergleichssorte)
His <sub>6</sub> -Tag	C-terminaler Hexahistindin-Rest
HRP	<i>engl. horseradish-peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
IB	<i>engl. inclusion bodies</i> , Einschlusskörperchen
IEDB	engl. Immune epitope database
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
IMAC	Immobilisierte-Metallionen Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid

IS	Interner Standard
IUIS	<i>engl. International Union of Immunological Societies</i> , Internationale Union immunologischer Gesellschaften
kDa	Kilodalton
KL	Kühlagerung
LB	<i>engl. Lysogeny Broth</i> , Kultivierungsmedium
LC-MS	<i>engl. liquid-chromatography coupled with mass spectrometer</i> , Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie
LC-MS/MS	<i>engl. liquid-chromatography coupled with tandem mass spectrometry</i> , Flüssigkeitschromatographie mit Tandemmassenspektrometrie
LMIV	Lebensmittel-Informationsverordnung
LTP	Lipid-Transfer-Protein
<i>mal d 1</i>	Gen zur Kodierung des Apfelallergens Mal d 1
Mal d 1	Hauptallergen im Apfel aus der Bet v 1 Proteinfamilie
MAS	<i>engl. marker assisted selection</i> , Markerbasierte Selektion
MWCO	<i>engl. molecular weight cut-off</i> Molekulargewichtsgrenzwert
NBT	p-Nitrotetrazolium-blau-chlorid, Substrat für Western Blot
OAS	orales Allergiesyndrom
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid, Phenylmethylsulfonylfluorid
PPO	Polyphenoloxidase
PVDF-Membran	Polyvinyliden-Membran
QTL	<i>engl. quantitative trait locus</i>
RAST	Radio-Allergo-Sorbent-Test
rMal d 1	rekombinantes Mal d 1
rpm	<i>engl. revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SAN	'Santana' (Vergleichssorte)
SD	Standardabweichung
SDS	<i>engl. Sodium dodecylsulfat</i> , Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
SOC	<i>engl. super optimal broth with catabolic repression</i> , Nährmedium
TCR	T-Zell-Rezeptor

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
T <sub>H</sub> -Zellen	T-Helferzellen
TMB	3,3',5,5'- Tetramethylbenzidin, Substrat für ELISA
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ULO	<i>engl. ultra-low-oxygen</i> , Niedrigsauerstoffbedingung bei der Lagerung
WHO	<i>engl. World Health Organisation</i> , Weltgesundheitsorganisation

In dieser Arbeit umfasst der Begriff „Protein Expression“ sowohl die Genexpression, d.h. die Prozesse, die die Information der DNA Gene in funktionelle RNA Kopien in lebenden Zellen umschreiben, als auch die Proteinproduktion, d.h. die Methode zur Herstellung von spezifischen Proteinen in der Biotechnologie.



## Zusammenfassung

In den letzten Jahrzehnten nahm die Zahl der Menschen, die von einer Allergie gegen Birkenpollen betroffen sind, ständig zu. Bei den meisten kommt es zusätzlich zu einer Kreuzreaktion des Allergietyps I mit den zu dem Antigen der Birke Bet v 1, strukturell sehr ähnlichen Proteinen aus Früchten wie Äpfeln, Pflaumen, Kirschen oder Erdbeeren. Im Falle des Apfels löst das 17,5 kDa große Pathogen-assoziierte Protein (PR-10) Mal d 1, Symptome wie Kribbeln, Jucken, Brennen oder Schwellungen im oberen Mund- und Rachenraum aus, die unter dem Begriff ‚Orales Allergiesyndrom‘ (OAS) zusammengefasst werden. Die PR-Proteine, die jeweils Multiproteinfamilien darstellen, werden stressinduziert in unterschiedlichen Pflanzenorganen gebildet, wobei die genaue biologische Funktion der meisten Proteine in den Pflanzen bislang jedoch weitestgehend unbekannt ist.

Ziel dieser Arbeit war es, den Mal d 1-Gehalt von Apfel-Genotypen unterschiedlicher Selektionsstufen von verschiedener Kreuzungspopulationen mittels eines eigens entwickelten indirekt kompetitiven ELISA-Tests (enzymgekoppelter Immunadsorptionstest), unter Zuhilfenahme polyklonaler Antikörper zu ermitteln und anschließend ausgewählte Genotypen mit niedrigen Mal d 1-Gehalten in Provokationstests auf ihre Verträglichkeit für Apfelallergiker zu untersuchen.

Dafür wurde zunächst rekombinantes Mal d 1 in *Escherichia coli* heterolog exprimiert, aufgereinigt und die Stabilität optimiert. Dieses Protein wurde im weiteren Verlauf sowohl für die Immunisierung von Kaninchen zur Produktion polyklonaler Antikörper als auch für die ELISA-Tests eingesetzt.

Die Mal d 1 Proteine aus Äpfeln wurden zunächst mit bereits publizierten Extraktionsmethoden isoliert. Aufgrund der geringen Stabilität des Mal d 1 war die Reproduzierbarkeit der Messwerte jedoch nicht gewährleistet. Daher wurde eine neue Extraktionsmethode unter denaturierenden Bedingungen entwickelt. Mit dieser Methode konnte der Mal d 1-Gehalt reproduzierbar bestimmt werden.

Der Gehalt an Mal d 1 im Fruchtfleisch schwankte, abhängig vom Genotyp, zwischen 0,1 µg/g Frischgewicht (FG) und 40 µg/g FG. Dabei konnten neben den Unterschieden zwischen den Genotypen auch Unterschiede zwischen den Erntejahren festgestellt werden. Diese Schwankungen waren unabhängig der Selektionsstufe zu ermitteln. Zur Untersuchung des Einflusses der Lagerungszeit auf die Entwicklung des Mal d 1-Gehaltes wurden die Genotypen nach einer Lagerung unter Niedrigsauerstoffbedingungen im ULO-Lager (*ultra-low*

*oxygen*) wie auch nach der Überlagerung im Kühllager (KL) bei 4 °C unter Normal-Atmosphäre über einen Lagerungszeitraum von bis zu 38 Wochen bezüglich ihres Mal d 1-Gehalts untersucht. In den meisten Fällen kam es dabei zu einem Anstieg des Mal d 1-Gehaltes auf bis zu 400 % der ursprünglichen Konzentration. Lediglich der Genotyp p13 zeigte über den Zeitraum der Lagerung eine Abnahme des Mal d 1-Gehaltes.

Der entscheidende Faktor für die Identifizierung gut verträglicher Genotypen, die Verträglichkeit bei Patienten mit einem OAS nach Birkenpollenallergie, wurde in humanen Provokationstests des Allergiezentrum der Charité in Berlin untersucht. Dabei wurden ausgewählte Genotypen mit einem niedrigen Mal d 1-Gehalt untersucht. Hierbei konnte keine direkte Abhängigkeit der Mal d 1-Proteinkonzentration und den auftretenden Symptomen festgestellt werden, jedoch konnten einige Genotypen identifiziert werden, die von der Mehrheit der Patienten ohne Einschränkungen verzehrt werden konnten. Auf der Suche nach allergenarmen gut-verträglichen Genotypen verdeutlichen diese Erkenntnisse, dass neben der Bestimmung des Mal d 1-Gehaltes, die Durchführung von Provokationstests unerlässlich sind.

Um weitere Einblicke in des allergene Potential der Genotypen zu erhalten und eine mögliche Erklärung für die variierende Verträglichkeit zu finden, wurde der viel diskutierte Polyphenolgehalt mittels LC-MS untersucht. Dabei konnte eine starke Korrelation des Mal d 1-Gehaltes mit den Konzentrationen der Flavan-3-ole Epicatechin, Catechin und den dimeren Proanthocyanidinen mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,78 in 2017 bzw. 0,8 in 2018 festgestellt werden. Weder die Konzentrationen anderer Polyphenole noch der Gesamtpolyphenolgehalt zeigte eine ähnliche Abhängigkeit. So wird von einer möglichen Bindungsaffinität des Mal d 1-Proteins mit den Flavan-3-olen ausgegangen.

Die aufgrund der Multigenfamilie existierende Vielzahl an möglichen Isoformen des Mal d 1, stellte eine weitere Erklärung für das unterschiedliche allergene Potential der Apfelgenotypen dar. Trotz vergleichbarem Mal d 1-Gehalt lösten die Sorten 'Golden Delicious' und 'Santana' unterschiedlich starke Symptome bei den Patienten auf. Eine detaillierte massenspektrometrische Untersuchung der Mal d 1-Proteine nach tryptischem Verdau der Sorten 'Golden Delicious' und 'Santana' zeigte, dass sich die Isoformzusammensetzung der einzelnen Genotypen stark unterscheidet. Einige der spezifischen Peptide konnten einzelnen Isoformen zugeordnet werden und sind in bereits beschriebenen Epitopregionen lokalisiert. Da die Isoformen eine unterschiedliche Allergenität aufweisen, kann davon ausgegangen werden, dass die Isoformzusammensetzung der einzelnen Genotypen einen wichtigen Einfluss auf die Verträglichkeit des Apfels hat.

Die gewonnenen Erkenntnisse verdeutlichen die Komplexität der Einflussfaktoren auf die Verträglichkeit und helfen bei der zukünftigen Züchtung und Selektion zur Identifizierung gut verträglicher Apfelgenotypen um die Sicherheit der gesunden Frucht für Allergiker zu verbessern.



## Summary

In the past decades, the number of people that are affected by an allergy of type I against birch pollen is constantly increasing. Most of them, in addition to the birch pollen allergy, have a cross-reaction with proteins from fruits such as apples, plums, cherries or strawberries, which are structurally very similar to the antigen of birch Bet v 1. In the case of apples, the major apple allergen is the 17.5 kDa pathogenesis-related protein (PR-10-protein) Mal d 1, that causes reactions of the mouth and throat, the oral allergy syndrome (OAS). The expression of PR-proteins in different plant tissues is stress-induced. However, their exact biological function is still largely unknown.

The aim of this work was to determine the Mal d 1 content of apple genotypes of different selection levels of different crossbreeding populations by means of a specially developed indirect competitive ELISA test (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), using polyclonal antibodies. Subsequently, selected genotypes with low Mal d 1 contents were examined for their tolerance for apple allergy sufferers by means of provocation tests.

First, recombinant Mal d 1 was heterologously expressed in *Escherichia coli*, purified and its stability optimized. This protein was then used for the immunisation of rabbits to produce polyclonal antibodies and for ELISA tests.

The Mal d 1 proteins from apples were isolated in a first try using extraction methods that have already been published. Due to the low stability of the protein, the reproducibility of the measured values was not guaranteed. Therefore, a new extraction method under denaturing conditions was developed. With this method the Mal d 1 content could be determined reproducibly.

The Mal d 1 content in the fruit flesh varied, depending on the genotype, between 0.1 µg/g fresh weight (FG) and 40 µg/g FG. In addition to the differences between the genotypes, differences between the harvest years were also found. These fluctuations could be determined independently of the selection level. To investigate the influence of storage time on the development of the Mal d 1 content, the genotypes were examined for their Mal d 1 content after storage under low oxygen conditions in ULO (ultra-low oxygen) storage as well as after superposition in cold storage (KL) at 4 °C under normal atmosphere over a storage period of up to 38 weeks. In most cases, a 400 % increase of the Mal d 1 content compared to the original concentration.

Only the genotype p13 showed a decrease in the Mal d 1 content over the period of storage. The decisive factor for the identification of well-tolerated genotypes, the tolerance in patients

with an OAS after birch pollen allergy, was investigated in human provocation tests at the Allergy Centre of the Charité in Berlin. Selected genotypes with a low Mal d 1 content were examined. No direct dependence of the Mal d 1 protein concentration and the occurring symptoms could be found, but some genotypes could be identified which could be consumed by most patients without restrictions. In the search for genotypes that are low in allergens and well tolerated, these findings make it clear that, in addition to determining the Mal d 1 content, provocation tests are essential.

In order to gain further insights into the allergenic potential of the genotypes and to find a possible explanation for the varying tolerability, the polyphenol content that's much discussed, was examined by LC-MS analysis. A strong correlation of the Mal d 1 content with the concentrations of flavan-3-ols epicatechin, catechin and the dimeric proanthocyanidins with a correlation coefficient of 0.78 and 0.8 respectively was found. Neither the concentrations of other polyphenols nor the total polyphenol content showed a similar dependence. Thus, a possible binding affinity of the Mal d 1 protein with the flavan-3-ols is assumed.

The large number of possible isoforms of Mal d 1 due to the multigene family was another explanation for the different allergenic potential of the apple genotypes. Despite comparable Mal d 1 content, the 'Golden Delicious' and 'Santana' varieties resolved symptoms of varying severity in patients. A detailed mass spectrometric analysis of the Mal d 1 proteins after tryptic digestion of the 'Golden Delicious' and 'Santana' varieties showed that the isoform composition of the individual genotypes differed significantly. Some of the specific peptides could be assigned to individual isoforms and are located in epitope regions already described. Since the isoforms have different allergenicity it can be assumed that the isoform composition of the individual genotypes has an important influence on the tolerance of the apple.

The insights gained illustrate the complexity of the factors influencing tolerability and will help in future breeding and selection of apple genotypes to identify well-tolerated apple genotypes in order to improve the safety of the healthy fruit for allergy sufferers.

# 1 Einleitung

## 1.1 Der Kulturapfel *Malus × domestica* – Des Deutschen liebstes Obst

Der Kulturapfel *Malus × domestica* Borkh. ist ein Vertreter der Familie der Rosengewächse (*Rosaceae*). Die aktive Zuchtauslese und somit die Entwicklung der Wildapfelsorten zu dem nun bekannten Kulturapfel, die Domestikation, begann bereits vor drei Jahrtausenden (Spengler, 2019).

Seinen Ursprung hat der Kulturapfel jedoch schon deutlich früher in Kasachstan im Tian Shan-Gebirge (Duan *et al.*, 2017). Nördlich davon liegt die größte Stadt Kasachstans Almaty, die bis 1993 den Namen Alma-Ata, übersetzt aus dem Kasachischen ‚Vater der Äpfel‘, trug. Der Asiatische Wildapfel *Malus sieversii*, der auch heute noch in den Wäldern Zentralasiens zu finden ist, gelangte über die Seidenstraße sowohl nach Osten, Richtung Sibirien und China, als auch nach Westen, nach Europa (Duan *et al.*, 2017). Auf diesem Weg kam es zu Einkreuzungen weiterer Wildapfelformen wie *Malus orientalis* am Kaukasus und *Malus sylvestris* in Europa. Daraus entstand, der heute bekannte und geschätzte Kulturapfel *Malus × domestica* (Wang *et al.*, 2018). Diese Aufklärung der bisher umstrittenen Vorfahren des Kulturapfels waren dank der vollständigen Sequenzierung des Genoms des *Malus × domestica* möglich (Velasco *et al.*, 2010).

Heute zählt der Apfel neben Bananen und Trauben zu den wichtigsten Obstarten. Dabei erstreckt sich der Apfelanbau über die ganze Welt, einschließlich Europa, Asien und Amerika, mit einem Ertrag von rund 86 Millionen Tonnen im Jahre 2018 (FAOSTAT Statistical Database, 2019). Hauptproduzent, mit ca. 50 % des Ertrags ist China.

Der Großteil, der in Deutschland geernteten Äpfel stammt aus der Bodenseeregion (Baden-Württemberg) und dem „Alten Land“ (Niedersachsen). Der Ertragsdurchschnitt der letzten zehn Jahre liegt dabei bei knapp unter einer Million Tonnen (Statistisches Bundesamt, 2018). Obwohl rund 2500 Apfelsorten in Deutschland bekannt sind (Bundessortenamt, 2019), von denen rund 660 Sorten für den EU-weiten Vertrieb registriert sind (FRUMATIS, 2019), spielen nur etwa zehn Kultivare eine wirtschaftlich entscheidende Rolle. In den Supermärkten werden vor allem Sorten wie ‚Golden Delicious‘, ‚Cripps Pink‘, ‚Braeburn‘, ‚Jonagold‘, ‚Elstar‘, ‚Gala‘ oder ‚Granny Smith‘ angeboten.

Mit einem pro-Kopf-Verbrauch von rund 21 kg, lag der Apfel als meistverzehrteste Obst klar vor den Bananen (12,4 kg) und Trauben (5,3 kg) im Jahre 2017/18 (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, 2019). Dabei wird der Apfel sowohl roh als auch verarbeitet, in Form von Apfelsaft, Apfelmus oder Cidre verzehrt.

Die meisten Apfelsorten sind diploid ( $2 \times 17 = 34$ ), jedoch gibt es auch triploide Kultivare ( $3 \times 17 = 51$ ) wie 'Boskoop' oder 'Jonagold' (Kellerhals *et al.*, 2003).

## 1.2 Nährstoffe, gesundheitlicher Nutzen und Risiken

Neben einem meist süßen bis säuerlichen Geschmack, der den Apfel zu dem beliebtesten Obst in Deutschland macht, zeichnet er sich durch diverse positive Eigenschaften zur Beeinflussung der Gesundheit aus was auch durch ein bekanntes amerikanisches Sprichwort angedeutet wird:

„*An apple a day, keeps the doctor away*”.

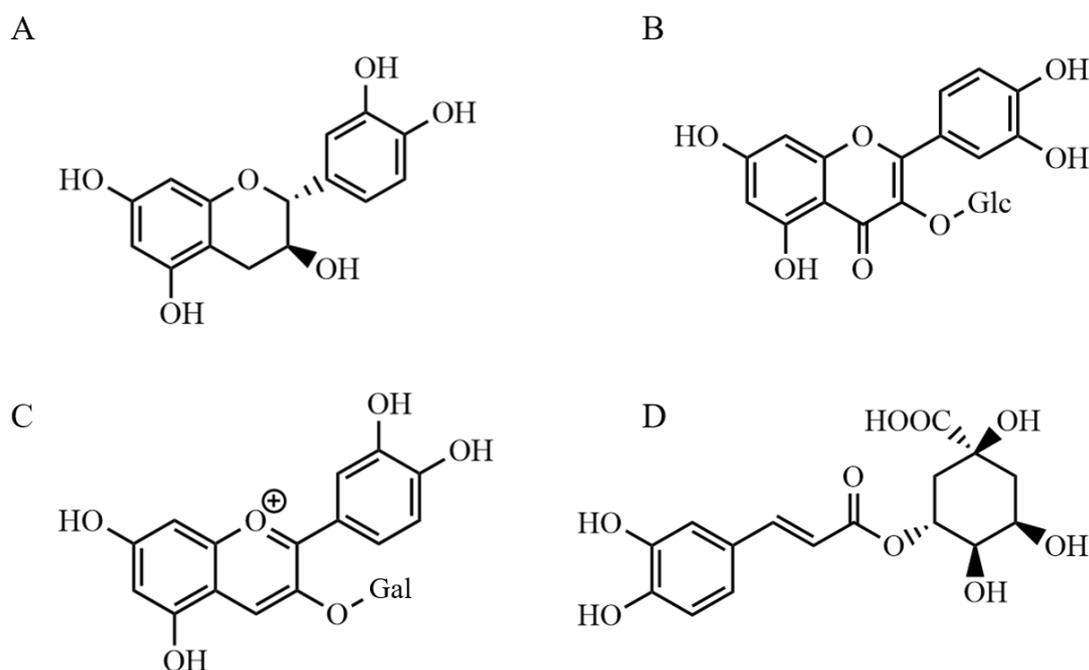
Die Hauptbestandteile des Apfels sind 85 % Wasser und 13,4 % Kohlenhydrate, darunter hauptsächlich Fructose, Saccharose, Glucose und das Polysaccharid Pektin als Ballaststoff (Kirchhoff *et al.*, 2009). Pektin hat sowohl einen positiven Effekt auf den Cholesterolspiegel im Blut (Brouns *et al.*, 2012), als auch präbiotische Eigenschaften auf das Mikrobiom des menschlichen Darms. Dadurch wird die entzündungshemmende Aktivität der Darmbakterien unterstützt und somit das Risiko für Darmentzündungen wie auch Darmkrebs gesenkt (Chung *et al.*, 2017, Tan *et al.*, 2018).

Zudem enthält der Apfel wichtige Vitamine, wie Vitamin C, Vitamin E oder Mineralstoffe, wie, Kalium, Magnesium oder Eisen (Kirchhoff *et al.*, 2009).

Jedoch wird ein gesundheitlicher Nutzen der Äpfel sehr häufig mit den sogenannten Polyphenolen in Verbindung gebracht. Polyphenole sind sekundäre Pflanzenstoffe, die von der Pflanze vermehrt unter abiotischen und biotischen Stressbedingungen gebildet werden. Sie spielen dabei sowohl im Schutz gegen UV-Schäden der Pflanze (Agati und Tattini, 2010), als auch als Abwehrmechanismus gegen Insekten (Lattanzio *et al.*, 2006) oder Pilz- und Bakterieninfektionen (Padmavati *et al.*, 1997) eine Rolle. Dabei sind sie jedoch nicht bei grundlegenden Abläufen wie Wachstum oder Entwicklung beteiligt (Ververidis *et al.*, 2007). Strukturell zeichnen sich Polyphenole durch mindestens einen aromatischen C<sub>6</sub>-Ring und mehrere Substituenten, wie Hydroxyl- oder Methoxygruppen aus (Lattanzio *et al.*, 2006). Die strukturelle Vielfalt der Substanzen ist sehr groß (Bravo, 1998). Gebildet werden deren strukturelle Vorläufer hauptsächlich durch den Shikimisäure-Weg (Santos-Sánchez *et al.*, 2019). Daraus entstehen sowohl Strukturvorläufer der Ellagsäure-Derivate (Schulenburg *et al.*,

2016), welche in Zusammenhang mit antikanzerogenen Eigenschaften gebracht werden (Mertens-Talcott *et al.*, 2003, Landete, 2011) als auch die Aminosäure L-Phenylalanin, welche im weiteren Verlauf zum Schlüssel-Zwischenprodukt 4-Cumaryl-CoA umgewandelt wird (Ververidis *et al.*, 2007, Naoumkina *et al.*, 2010, Härtl *et al.*, 2017). Über enzymatische Cyclisierungen, Hydroxylierungen und weitere Reaktionen, werden unzählige, strukturell unterschiedliche polyphenolische Verbindungen biosynthetisiert (Naoumkina *et al.*, 2010). Die Polyphenole lassen sich in mehrere Unterkategorien einteilen (Heldt und Piechulla, 2015) u.a. die Zimtsäurederivate (Phenylpropanoide), die Chalcone, die Stilbene und die Flavonoide wie Anthocyane, Flavonole und Flavanole (Ververidis *et al.*, 2007).

Die, aufgrund der hohen Vorkommen in Obst und Gemüse relevantesten Substanzen für die menschliche Gesundheit und Ernährung, stellen die Flavonoide dar. Mehr als 8000 unterschiedliche Substanzen lassen sich dieser Gruppe zuordnen (Tahara, 2007). In der Natur kommen Flavonoide immer in der wasserlöslichen und stabileren Form der Glycoside vor. Neben den Monosacchariden Glucose, Rhamnose, Galaktose oder auch Xylose und Arabinose, können diese auch als Di- und Oligosaccharide vorliegen oder mit Zuckersäuren verknüpft sein (Rice-Evans *et al.*, 1996, Bravo, 1998). Dabei unterscheidet man, abhängig von ihrer Grundstruktur mehrere Gruppen. Abbildung 1 zeigt einige Vertreter der Gruppen.



**Abbildung 1** Strukturen ausgewählter Polyphenole in Äpfeln. **A** Catechin als Beispiel für die Klasse der Flavan-3-ole, **B** Quercetin-3-Glucosid als Beispiel für Flavonol-Glucoside, **C** Cyanidin-3-O-Galactosid als Vertreter der Anthocyanidine, **D** Chlorogensäure, eine wichtige Substanz in Äpfeln und Vertreter der Zimtsäurederivate. Glc Glucose; Gal Galaktose.

So divers die Substanzstrukturen sind, so unterschiedlich sind auch die Funktionen der Polyphenole in der Pflanze. Die Substanzklasse der Anthocyanidine und ihrer natürlich vorkommenden Glycoside, der Anthocyane, die eine rote bis bläuliche Färbung aufweisen, sind für die Pigmentierung vieler Blüten und Früchte verantwortlich. Zudem bieten sie Schutz vor UV-Strahlung und daraus resultierender Schädigung (Holton und Cornish, 1995). Flavan-3-ole, zu denen Catechin gehört (Abbildung 1A), haben eher eine antimykotische Wirkung und werden in u.a. in Pflanzen nach einer Infektion mit Rostpilz vermehrt gebildet (Ullah *et al.*, 2017). Weitere Funktionen der Polyphenole in Pflanzen reichen von antioxidativen Effekten über antimikrobielle Funktionen bis hin zu Signalwirkungen (Lattanzio *et al.*, 2006, Treutter, 2006, Agati und Tattini, 2010).

In der menschlichen Ernährung und Gesundheit spielen Polyphenole u.a. als Antioxidantien eine große Rolle. Die strukturelle Fähigkeit vieler polyphenolischen Verbindungen wie Flavonolen und Flavonen, aufgrund des konjugierten Doppelbindungssystems Radikale abzufangen, resultiert in einer antioxidativen Wirkung. Diese kann die oxidative Zellschädigung verringern und beugt somit Herz-Kreislaufkrankungen (Ginter und Simko, 2012), degenerativen kognitiven Erkrankungen wie Alzheimer (Whyte *et al.*, 2017, Carrillo *et al.*, 2019) oder auch Krebs vor (Liu *et al.*, 2005, Kubatka *et al.*, 2016, Wu *et al.*, 2018). Auch die bioaktiven Effekte von Flavonoiden, wie Isoflavonen oder dem Phytoalexin Resveratrol auf den Blutdruck, oder den Blutfett- bzw. Blutzucker Gehalt reduzieren das Risiko für Herz-Kreislaufkrankungen (Anthony *et al.*, 1996, Ververidis *et al.*, 2007, Ginter und Simko, 2012).

In vielen Studien wird auch eine antiallergene Wirkung von Polyphenolen beschrieben (Bronner und Landry, 1985, Kanda *et al.*, 1998, Tokura *et al.*, 2005, Singh *et al.*, 2011), was im Zusammenhang dieser Arbeit von besonderem Interesse ist. Dies wird näher in Kapitel 1.7 beschrieben.

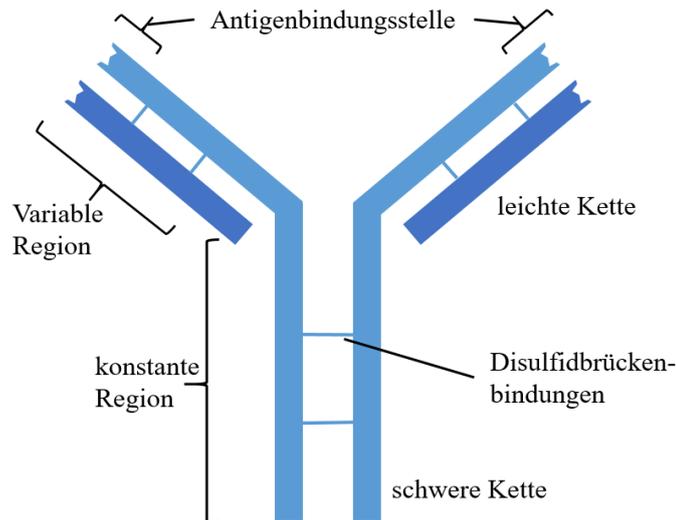
Der Apfel produziert Polyphenole die fünf verschiedenen Hauptgruppen zugerechnet werden. Die Chlorogensäure (Abbildung 1D) aus der Gruppe der Zimtsäurederivate zählt zu den wichtigsten Polyphenolen in Äpfeln. Zudem bilden Flavan-3-ole, zu denen die Diastereomere Catechin (Abbildung 1A) und Epicatechin, wie auch die Procyanidine B1 und B3 zählen, Flavonole wie das Quercetin-Glucosid (Abbildung 1B) und Anthocyane wie das Cyanidin-3-Galactosid (Abbildung 1C) weitere wichtige Komponenten. Außerdem akkumulieren Äpfel das Dihydrochalkon Phloretin und dessen Glucosid, das Phlorizin (Manach *et al.*, 2004). Lange war man der Meinung, Phloretin und Phlorizin wären spezifische Substanzen in Äpfeln und sie wurden zum Nachweis von Apfelkontaminationen in anderen Lebensmitteln verwendet. Jedoch konnten die Substanzen in den letzten Jahren u.a. durch

verbesserte Analysemethoden auch in Tomaten und Erdbeeren nachgewiesen werden (Hilt *et al.*, 2003, Slimestad *et al.*, 2008).

Neben den vielen positiven Effekten, die Äpfel auf die menschliche Gesundheit haben, treten bei immer mehr Menschen nach dem Verzehr von Äpfeln gesundheitliche Probleme auf. Grund dafür ist meist eine Allergie gegen die im Apfel befindlichen Proteine.

### 1.3 Das Immunsystem und die Reaktion bei Typ-I-Allergie

Das Immunsystem des Menschen dient als Schutzmechanismus vor dem Eindringen von Viren, Bakterien und anderen infektiösen Organismen und auch zur Abwehr entarteter Zellen, wie Tumorzellen (Gonzalez *et al.*, 2018). Dabei unterscheidet man zwischen der angeborenen und der erworbenen (adaptiven) Immunität (Medzhitov und Janeway, 1997). Die angeborene Immunität beschreibt den Mechanismus des Körpers zum Schutz vor dem Eindringen von Viren, Bakterien oder Parasiten ohne Antikörperbeteiligung durch Schleimhäute oder die Abwehr von Erregern mit Hilfe von Leukozyten (Ring, 2005). Unter der adaptiven Immunität versteht man die Bildung von Antikörpern, nach einer Infektion mit Pathogenen oder anderen Infektionserregern. Diese teilt sich in zwei Kategorien auf. Bei der aktiven Immunität bildet der Körper Antikörper als Antwort auf eine Infektion. Bei einem erneuten Kontakt mit den Infektionserregern agiert das Immunsystem, dank der gebildeten Antikörper, schneller und effektiver. Viele Impfungen machen sich diesen Mechanismus zunutze, in dem sie wenig aktive oder inaktivierte Erreger injizieren und so die Antikörperbildung induzieren (Baxter, 2007, Marshall *et al.*, 2018). Die passive adaptive Immunität entsteht entweder, wenn durch medikamentöse Behandlung oder durch die Muttermilch bereits gebildete Antikörper in den Körper gelangen und so vor Infektionen schützen (Marshall *et al.*, 2018). Es gibt unterschiedliche Arten von Antikörpern. Dabei handelt es sich um Immunglobuline Glycoproteine, die alle eine Y-förmige Struktur aufweisen. Diese Form setzt sich aus zwei schweren Ketten und zwei identischen leichten Ketten zusammen, welche durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Am oberen Ende befindet sich die spezifische Antigenbindungsstelle. Die einzelnen Antikörpertypen, im menschlichen Organismus IgA, IgD, IgE, IgG und IgM, unterscheiden sich in der Zusammensetzung und Länge der schweren und leichten Ketten (Burton *et al.*, 2017). Abbildung 2 zeigt den schematischen Aufbau eines IgE-Antikörpers.



**Abbildung 2 Schematischer Aufbau eines IgE-Antikörpers (nach Rink *et al.* (2015)).**

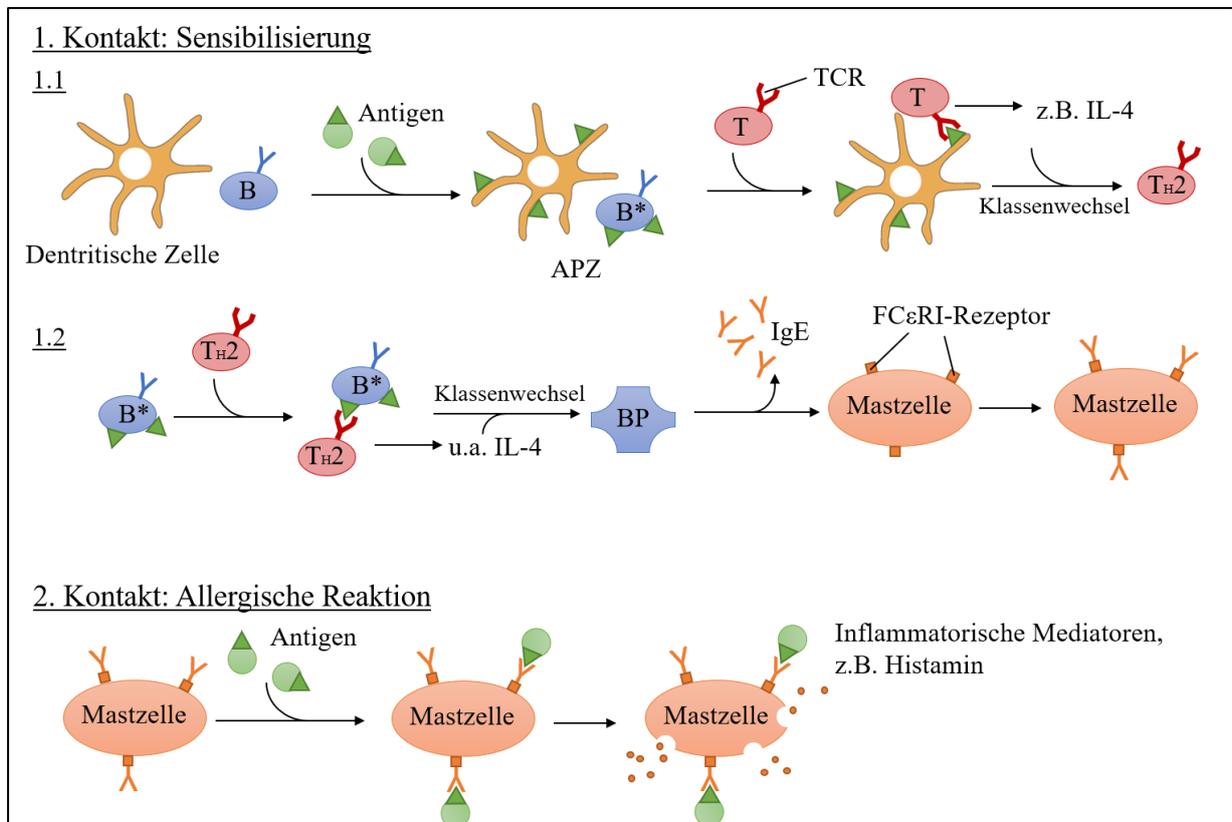
Auch die Allergie ist bedingt durch eine Immunantwort, jedoch wird sie meist durch harmlose, nicht-infektiösen Umweltantigenen, wie Proteine aus Pollen oder Tierhaaren ausgelöst (Kizis und Siragakis, 2014). Der Begriff Allergie hat seinen Ursprung in der griechischen Sprache mit den Worten  $\acute{\alpha}\lambda\lambda\omicron\varsigma$  (*állos*) = anderer und  $\epsilon\rho\gamma\omicron\nu$  (*érgon*) = Tätigkeit, Fremdeinwirkung und wurde das erste Mal 1906 von dem Wiener Kinderarzt Clemens von Pirquet beschrieben (Galli *et al.*, 2008). Die Symptome und Folgen der Allergie waren jedoch bereits im alten Ägypten bekannt und beschrieben (Ring, 2005).

Neben Pollen-, Hausstaub- oder Kontaktallergien, gehören Nahrungsmittelallergien zu einer weit verbreiteten Form der Allergie. Etwa 5 % der deutschen Erwachsenen leiden derzeit an einer Nahrungsmittelallergie (Langen *et al.*, 2013). Die häufigsten Auslöser einer Nahrungsmittelallergie in Europa, sind die Proteine aus Kuhmilch, Sojabohnen und Hühnereiweiß, wie auch aus Schalenfrüchten, wie Erd-, Hasel- oder Walnüssen. Diese Zutaten müssen, laut Art. 21 und Anhang 2 der Lebensmittelinformationsverordnung (LMIV) 1169/2011, neben weiteren Inhaltsstoffen wie Sellerie, Krebstieren, Fisch, Senf, und glutenhaltigem Getreide, auf Lebensmittelverpackungen als Allergene besonders deklariert werden.

Die Symptomatik der Nahrungsmittelallergie ist je nach Antigen und Patient vielfältig und reicht von gastrointestinalen Symptomen, wie Übelkeit oder Durchfall, Hautausschlag oder juckenden Lippen bis hin zu lebensbedrohlichen anaphylaktischen Schocks und akuter Atemnot (Sicherer und Sampson, 2010).

Man unterteilt die allergischen Reaktionen nach Coombs und Gell (1963) in vier Allergietypen. (Coombs und Gell, 1963, Rink *et al.*, 2015) Die Typ-I Allergie stellt dabei den

häufigsten Allergietyp dar und beschreibt rund 90 % der bekannten Allergien, wie z.B. Pollen-, Hausstaub-, Tierhaar- oder Nahrungsmittelallergien. Dabei sind sogenannte Immunglobuline E, auch IgE-Antikörper genannt, involviert. Abbildung 3 zeigt den schematischen Ablauf der Immunantwort einer Typ-I Allergie bei Kontakt mit Antigenen.



**Abbildung 3 Reaktion des Immunsystems auf Antigene.** B = B-Lymphozyten, B\* = antigenpräsentierende B-Lymphozyten, APZ = antigenpräsentierende Zellen, T = T-Zelle, TCR = T-Zell-Rezeptor, T<sub>H</sub>2 = T<sub>H</sub>2-Zellen, BP = B-Plasma-Zelle, entstanden durch einen Interleukin induzierten Klassenwechsel der B-Lymphozyten.

Bei dem ersten Kontakt des Immunsystems mit einem Allergen, der sogenannten Sensibilisierung, dringt das Antigen über die Haut, die Schleimhäute oder die Lunge in den Körper ein. Dort erkennen und verarbeiten dendritische Zellen das Allergen, in dem sie spezifische Epitope des Proteins auf ihrer Oberfläche präsentieren. Sie fungieren also als allergenpräsentierende Zellen, kurz APZ. Parallel dazu können auch B-Lymphozyten als APZ agieren. Weitere Lymphozyten, wie naive T-Zellen, erkennen die Epitope auf den dendritischen Zellen mit Hilfe von T-Zell-Rezeptoren (TCR) und dies führt zu einer Ausschüttung an Interleukinen (IL) durch die T-Zellen. Neben IL-12, IL-13 oder IL-5 wird auch das bei Typ-I Allergien wichtigste Interleukin IL-4 gebildet. Ein Kontakt mit Interleukinen führt zu einer Differenzierung der T-Zellen zu sogenannten T-Helferzellen (T<sub>H</sub>-Zellen), genauer zu T<sub>H</sub>1-

Zellen und  $T_{H2}$ -Zellen.  $T_{H1}$ -Zellen produzieren  $\gamma$ -Interferon, während die durch IL-4 differenzierten  $T_{H2}$ -Zellen in der humoralen Immunantwort die Produktion von spezifischen IgE-Antikörpern anregen (Constant *et al.*, 1995). Dabei binden  $T_{H2}$ -Zellen an die aktivierten antigenpräsentierenden B-Lymphozyten und schütten dabei erneut Interleukine aus, was in diesem Fall zu einem Klassenwechsel der B-Zelle zu einer IgE-antikörperproduzierenden Plasmazelle führt. Die gebildeten IgE-Antikörper binden schließlich an FC $\epsilon$ RI-Rezeptoren an Mastzellen und Basophilen und markieren somit deren Oberfläche. Dieser Erstkontakt mit dem Antigen bleibt jedoch symptomlos.

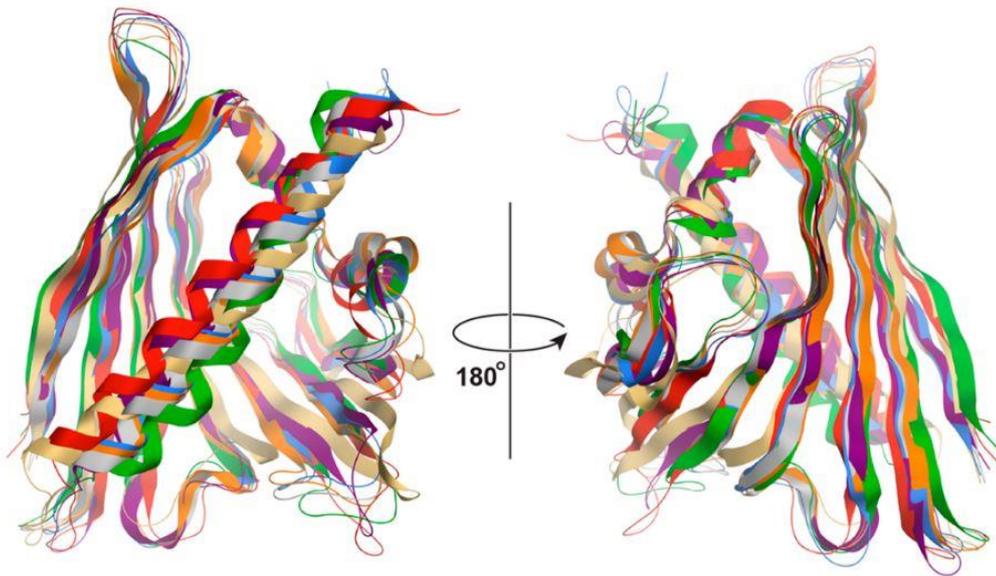
Erst bei einem erneuten Kontakt mit dem Allergen, wird dieses von IgE-Antikörpern der sensibilisierten Mastzellen erkannt. Dies führt zu einer Degranulierung der Mastzelle und somit zur Freisetzung von verschiedenen vasoaktiven Mediatoren wie z.B. Histamin, Prostagladine, Enzyme, wie Tryptase oder Chymase aber auch weiteren Interleukinen und neu gebildeten Leucotrienen (Williams und Galli, 2000, Broide, 2001). Die Mediatoren bewirken eine Erweiterung der Blutgefäße, die Reizung der Schleimhäute oder die Kontraktion der glatten Muskulatur in der Lunge und im Gastrointestinaltrakt. Die Folge sind Schwellungen und Rötungen der Haut oder Atemnot und Verdauungsbeschwerden. Das sogenannte orale Allergiesyndrom (OAS) (Galli *et al.*, 2008, Kashyap und Kashyap, 2015) beschreibt eine Reaktion, die hauptsächlich den oberen Mund- und Rachenraum betrifft. Dabei kommt es zu Ödemen der Mundschleimhaut oder der Zunge oder zu Kribbeln und Juckreiz in Lippen oder Gaumen. Es können jedoch auch nicht-orale Symptome, wie tränende Augen oder Hautreaktionen im Gesichts- und Nackenbereich auftreten (Ausukua *et al.*, 2009). Der Begriff OAS wird hauptsächlich im Zusammenhang mit einer pollenassozierten Nahrungsmittelallergie verwendet.

Die weiteren Allergietypen spielen im Zusammenhang mit Nahrungsmittelallergien eine deutlich untergeordnetere Rolle. Im Gegensatz zu Allergien des Typ-I, bei der es sich um eine IgE-vermittelte Reaktion handelt, beschreiben die Typ-II Allergien, eine IgG-vermittelte Unverträglichkeitsreaktion auf an eine Matrix gebundenen Antigene. Ein Beispiel dafür sind Blutgruppenunverträglichkeiten. Auch beim dem Allergietyp III sind IgG-Antikörper involviert. Jedoch unterscheidet sich diese Reaktion dadurch, dass auch lösliche Antigene erkannt und von Antikörpern gebunden werden können. Die Allergie des Typ-IV wird auch Spättyp genannt. Dieser Allergie-Typ wird hauptsächlich durch die Reaktion von vermehrt gebildeten T-Zellen ausgelöst. Typische Antigene sind Kontaktallergene wie Nickel. Aufgrund der langsameren Reaktionszeit der T-Zellen, können die Reaktionen 24 bis 72 Stunden nach dem Kontakt mit dem Allergen auftreten (Rink *et al.*, 2015).

## 1.4 Pollenassoziierte Nahrungsmittelallergie

Die pollenassoziierte Nahrungsmittelallergie ist die häufigste Nahrungsmittelallergie in Deutschland und ist beispielhaft für eine Typ-I-Allergie. Sie beschreibt eine Reaktion, die viele Pollenallergiker betrifft. Die Pollenallergie, auch Heuschnupfen genannt, ist mit ca. 40 % Betroffenenquote, eine sehr verbreitete Allergie in Europa. Dabei treten Beschwerden nach dem Kontakt mit diversen Gräser- und Baumpollen auf. Die häufigste Baumpollenallergie in Nord- und Mitteleuropa stellt die Immunreaktion auf Birkenpollen dar, während in südlichen Breiten, wie Italien oder Griechenland vermehrt eine Allergie gegen Olivenpollen auftritt (D'Amato *et al.*, 2007). Die pollenassoziierte Nahrungsmittelallergie beruht auf der Kreuzreaktion von IgE-Antikörpern mit verschiedenen Proteinen (Henzgen *et al.*, 2005). Die Vielzahl der Birkenpollenallergiker leidet nicht nur nach dem Kontakt mit Birkenpollen, sondern auch nach dem Kontakt mit anderen Baumpollen wie Buchen- oder Eichenpollen (Egger *et al.*, 2008) an den Symptomen. Sie weisen auch meist nach dem Verzehr von bestimmten pflanzlichen Lebensmitteln typische Allergiesymptome auf. Die Hauptauslöser sind dabei Früchte wie Äpfel, Erdbeeren, Pflaumen oder Kirschen (Fritsch *et al.*, 1998, Neudecker *et al.*, 2001, Franz-Oberdorf *et al.*, 2016, Picchi *et al.*, 2019). Bis zu 80 % der Birkenpollenallergiker weisen eine solche Kreuzreaktion auf (Eriksson *et al.*, 1982, Asero, 1998, Geroldinger-Simic *et al.*, 2011) und zeigen die dafür typischen Symptome des OAS (Ausukua *et al.*, 2009).

Der Grund dieser pflanzenübergreifenden Kreuzallergie liegt in der hohen strukturellen Ähnlichkeit der allergieauslösenden Proteine (Abbildung 4). Die Sensibilisierung und die damit verbundene Antikörperproduktion tritt dabei in der Regel nach Kontakt der Nasen- und Mundschleimhaut mit den inhalativen, wasserlöslichen Proteinen der Pollen auf (Webber und England, 2010). Bei einem Kontakt mit strukturähnlichen Proteinen aus pflanzlichen Lebensmitteln, können diese durch die gegen Pollenproteine gerichteten IgE-Antikörper erkannt werden, was zu einer Auslösung typischer Allergiesymptome führt (Kashyap und Kashyap, 2015).



**Abbildung 4** Vergleich pflanzenübergreifender homologer Allergene und ihrer Tertiärstruktur. Strukturähnliche Proteine aus Birkenpollen (Bet v 1, blau), Apfel (Mal d 1, grün), Karotte (Dauc c 1, orange), Sellerie (Api g 1, grau), Sojabohnen (Gly m 4, gelb), Erdbeere (Fra a 1, rot) und Kirsche (Pru av 1, lila). Die Ähnlichkeit ist ursächlich für die häufig auftretende Kreuzreaktion (Ahammer *et al.*, 2017).

Neben der Kreuzreaktion von Birkenpollen und Früchten der Familie der Rosengewächse, sind weitere Kreuzreaktionen zwischen Aeroallergenen aus Pollen und Lebensmittelallergenen bekannt (Han *et al.*, 2012). So wird ebenfalls das Latex-Frucht-Syndrom und die damit häufig beobachtete Bananenallergie (Sanchez-Monge *et al.*, 1999) wie auch das Sellerie-Beifuß-Gewürz-Syndrom, welches Graspollenallergiker betrifft (Wüthrich und Hofer, 1984) beschrieben (Henzgen *et al.*, 2005).

## 1.5 Pathogen-assoziierte Proteine (PR-Proteine)

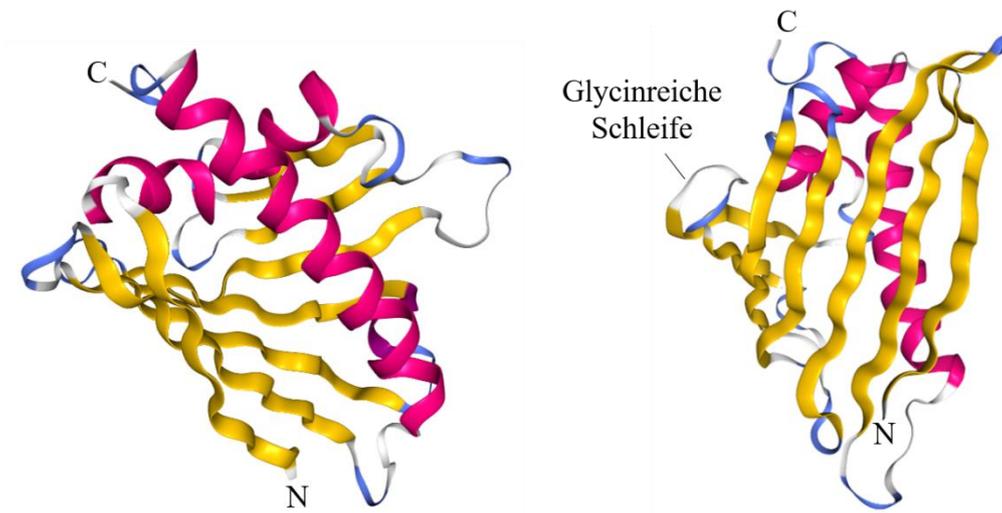
Als Grund für die pollenassoziierte Nahrungsmittelallergie sowie für andere Allergien pflanzlichen Ursprungs werden häufig sogenannte pathogen-assoziierte Proteine (PR-Proteine) genannt. Diese Proteine wurden erstmals 1970 beschrieben, nachdem die Proteinzusammensetzung einer Kontrollpflanze mit der einer Virus infizierten Tabakpflanze verglichen wurde (van Loon und van Kammen, 1970). Seitdem konnten verschiedene PR-Proteine in einer Vielzahl an unterschiedlichen Pflanzen nachgewiesen werden. Heute unterscheidet man siebzehn Unterfamilien der PR-Proteine (Sinha *et al.*, 2014). Die einzelnen Familien weisen untereinander keine Strukturähnlichkeit auf. Jedoch handelt es sich meist um Proteine mit niedrigem Molekulargewicht zwischen 6 und 43 Kilodalton (kDa), die eine hohe

Stabilität bei niedrigen pH-Werten (unter 3) aufweisen und meist extrazellulär exprimiert werden (van Loon *et al.*, 1994). Die Expression der PR-Proteine in der Pflanze wird durch unterschiedliche Faktoren, wie mikrobiellen, viralen oder pilzlichen Befall (van Loon, 1985, Stintzi *et al.*, 1993), aber auch durch weitere Stressbedingungen, wie UV-, Wasser- oder Hitzestress induziert (Liu und Ekramoddoullah, 2006, Botton *et al.*, 2008, Jain *et al.*, 2012, Agarwal und Agarwal, 2014). Aufgrund der hohen strukturellen Diversität der unterschiedlichen PR-Proteine, haben sie variierende Funktionen als Folge von biotischem und abiotischem Stress. So zeigen einige Proteine antimykotische Eigenschaften z.B. in Form von Enzymaktivität. Proteine unterschiedlicher Proteinfamilien, z.B. der PR-3 und PR-4-Familien, weisen beispielsweise eine Endochitinase-Aktivität auf, die in der Abwehr von Organismen involviert ist, indem sie den Abbau von Chitin katalysiert (Legrand *et al.*, 1987, Kombrink *et al.*, 1988, Sanchez-Monge *et al.*, 1999). Chitin ist ein Polysaccharid, das den Hauptbestandteil der Zellwand von Pilzen oder Hefen ausmacht (Bacon *et al.*, 1966, El Gueddari *et al.*, 2002). Aber auch eine RNase Aktivität einiger PR-10-Proteine konnte bereits nachgewiesen werden (Bufe *et al.*, 1996, Besbes *et al.*, 2019). Neben der Funktion der PR-Proteine als Schutzmechanismus der Pflanze, spielen sie auch eine wichtige Rolle in der Pflanzenentwicklung. Die Expression wird dabei durch Phytohormone wie Brassinosteroide, Ethylen, Salicylsäure oder Jasmonsäure induziert. PR-Proteine spielen u.a. eine Rolle bei der Blüten- und Wurzelentwicklung und der Samenkeimung (Lotan *et al.*, 1989, Chye *et al.*, 2005, Seo *et al.*, 2008) eine wichtige Rolle.

Unabhängig von ihrer Funktion in der Pflanze, weisen PR-Proteine unterschiedlicher Familien häufig ein hohes allergenes Potential auf (Hoffmann-Sommergruber, 2002, Sinha *et al.*, 2014). Darunter fallen einige Proteine der PR-14-Familie, den sogenannten Lipid-Transfer-Proteinen (LTP), zu der das Apfelallergen Mal d 3 gehört, oder die Thaumatin-ähnlichen Proteinen der PR-5-Familie, zu denen auch das Minorallergen des Apfels, Mal d 2, zählt. Aber auch weitere PR-Proteinfamilien beinhalten allergieauslösende Proteine (Hoffmann-Sommergruber, 2002, Breiteneder und Mills, 2005). Die Hauptauslöser der pollenassozierten Nahrungsmittelallergie sind die Proteine der PR-10-Proteinfamilie.

PR-10-Proteine, die erstmals in Petersilie beschrieben wurden, umfassen eine Gruppe leicht azider, intrazellulärer Proteine mit einem Molekulargewicht von 16 kDa bis 18 kDa (154-160 Aminosäuren) (Somssich *et al.*, 1988, Walter *et al.*, 1996), welche meist stabil gegenüber enzymatischem Abbau sind (Sinha *et al.*, 2014). PR-10 Proteine weisen spezieübergreifend eine hohe strukturelle Ähnlichkeit innerhalb der Proteinfamilie auf. Die dreidimensionale Struktur besteht aus einem sieben-strängigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt-Grundgerüst, welches

durch zwei kleinere  $\alpha$ -Helices erweitert wird. Ein sehr konserviertes Motiv in der Aminosäuresequenz aller homologen PR-10 Proteine ist die glycinreiche Schleife (P-Loop), die die Stränge  $\beta 2$  und  $\beta 3$  des Faltblattes miteinander verbindet (Abbildung 5). Gemeinsam mit einer weiteren C-terminalen  $\alpha$ -Helix bildet das Protein eine hydrophobe Bindungstasche, welche kleinere Liganden binden kann (Fernandes *et al.*, 2013). Der P-Loop ist auch in anderen Proteinen ein bekanntes konserviertes Motiv und dient in vielen Nukleotid-bindenden Proteinen als Bindungsstelle (Saraste *et al.*, 1990).



**Abbildung 5 Struktur des Apfelallergens Mal d 1 als Beispiel eines PR-10 Proteins.** Die  $\alpha$ -Helices sind gelb, die  $\beta$ -Faltblattstrukturen sind in pink dargestellt. Die hochkonservierte glycinreiche Schleife verbindet zwei Stränge des  $\beta$ -Faltblattes (RSCB Protein Data Bank, 2020). Die Struktur formt eine hydrophobe Bindungstasche, in die unterschiedliche Liganden binden können.

Die Liganden können, abhängig vom Protein, Polyphenole wie Flavanole (Casanal *et al.*, 2013a) Flavonol-Glycoside (Seutter von Loetzen *et al.*, 2014, Jacob *et al.*, 2019) oder auch Pflanzenhormone (Zubini *et al.*, 2009) und Fettsäuren (McBride *et al.*, 2019) sein. Daher wird die Beteiligung der PR-10-Proteine am physiologischen Transport von kleineren Molekülen diskutiert (Koistinen *et al.*, 2005).

In den folgenden Jahren nach ihrer Entdeckung wurden PR-10 Proteine in zahlreichen Pflanzen identifiziert, darunter viele Baumarten wie Birke, Buche oder Koniferen (de Groot *et al.*, 1996, Ekramoddoullah, 2004, Moraes *et al.*, 2018) oder Obst- und Gemüsearten wie Äpfel (Gao *et al.*, 2005, Ahammer *et al.*, 2017), Erdbeeren (Munoz *et al.*, 2010, Kurze *et al.*, 2018a), Nüssen (Chadha und Das, 2006, Jacob *et al.*, 2019) oder Sellerie (Haka *et al.*, 2015). Die genaue Funktion der PR-10 Proteine bleibt jedoch weitestgehend unklar. Bisher bekannte Funktionen einzelner PR-10-Proteine sind sehr unterschiedlich und vielseitig und reichen von Schutzmechanismen bei abiotischem und biotischem Stress durch antimykotische

Eigenschaften (Andrade *et al.*, 2010) über eine mögliche RNase-Aktivität (Besbes *et al.*, 2019) bis hin zu Hinweisen auf ein Mitwirken in der Pflanzenentwicklung. Darauf deuten sowohl der mögliche Transport von in der Bindungstasche gebundenen Molekülen oder Hormonen, wie auch die Tatsache der Proteinexpression in unterschiedlichen Pflanzenorganen (van Loon und van Kammen, 1970, Yamamoto *et al.*, 1997, Mogensen *et al.*, 2002, Wu *et al.*, 2017).

Grund für die vielfältigen Funktionen der PR-10 Proteine könnte die Codierung durch eine Vielzahl an unterschiedlichen Genen auf mehreren Chromosomen sein. Man spricht von einer Multigenfamilie (Gao *et al.*, 2005, Schenk *et al.*, 2006, Lebel *et al.*, 2010, Franz-Oberdorf *et al.*, 2016, Gao, 2019).

### 1.5.1 Bet v 1 – das Hauptallergen der Birkenpollen

Der bekannteste Vertreter der PR-10 Proteinfamilie ist das Hauptallergen des Birkenpollens Bet v 1, weshalb auch andere Proteine dieser Familie oft als Bet v 1-homologe Proteine bezeichnet werden (Vieths *et al.*, 2002).

Die Aminosäuresequenz des Bet v 1 wurde erstmals 1989 beschrieben (Breiteneder *et al.*, 1989) und sieben Jahre später wurde die dreidimensionale Struktur aufgeklärt (Gajhede *et al.*, 1996). Die Nomenklatur des Allergens Bet v 1 setzt sich nach den Nomenklatur-Regeln der Weltgesundheitsorganisation WHO und der Internationalen Union Immunologischer Gesellschaften IUIS aus den Anfangsbuchstaben des lateinischen Namens des Genus und der Spezies der Weißbirke oder Hängebirke, *Betula verrucosa* (Synonym: *Betula pendula*), zusammen. Anschließend werden die Allergene nach der chronologischen Reihenfolge der erstmaligen Isolierung nummeriert (Chapman *et al.*, 2007).

Bet v 1 wird, wie auch andere Vertreter der PR-10-Proteinfamilie, durch eine Multigenfamilie kodiert (Schenk *et al.*, 2009) Dies führt zur Existenz verschiedener Isoformen des Allergens (Swoboda *et al.*, 1995, Breitenbach *et al.*, 1996), welche sich in kleinen Änderungen der Aminosäuresequenz unterscheiden. Daher können sie unterschiedliche Eigenschaften in Bezug auf Stabilität, Bindungsaffinität oder Allergenität aufweisen (Ferreira *et al.*, 1996, Seutter von Loetzen *et al.*, 2015, Machado *et al.*, 2016). So gilt die Isoform Bet v 1a als reaktivste Isoform, während Bet v 1d und Bet v 1l eine deutlich geringere IgE-Reaktivität zeigen (Markovic-Housley *et al.*, 2003, Schenk *et al.*, 2009).

Wie auch bei den meisten anderen PR-10-Proteinen, ist die genaue physiologische Funktion des Bet v 1 in vielen Punkten noch unklar. Eine RNase-Aktivität konnte bereits nachgewiesen werden (Bufe *et al.*, 1996). Jedoch ist für Bet v 1 auch eine Bindung natürlicher Liganden in die hydrophobe Bindungstasche der Proteinstruktur beschrieben. Das native Bet v 1 aus Pollen

zeigt dabei eine starke Bindungsaffinität zu Quercetin-3-O-sophorosid (Seutter von Loetzen *et al.*, 2014) und in geringerem Maße auch zu anderen glykosilierten und nicht-glykosilierten Flavonoiden. In Kristallstrukturen des Bet v 1 konnten noch weitere Liganden identifiziert werden, was auf eine zusätzliche Funktion des Proteins im Hormontransport der Pflanze hindeutet (Markovic-Housley *et al.*, 2003). Die Stärke der Bindungsaffinität ist dabei, wie auch die Allergenität, isoformabhängig (Seutter von Loetzen *et al.*, 2015). Eine Untersuchung der Isoformen ist daher von steigender Wichtigkeit.

### 1.5.2 Mal d 1 – das Hauptallergen der Äpfel aus *Malus × domestica*

Im Apfel weisen verschiedene Proteine aus unterschiedlichen Proteinfamilien ein allergenes Potential auf. Die Nomenklatur, setzt sich dabei, wie schon bei dem Birkenpollenallergen Bet v 1 aus den Anfangsbuchstaben des lateinischen Namens des Genus und der Spezies *Malus × domestica* zusammen. Für den Kulturapfel sind vier verschiedene Allergene beschrieben (Marzban *et al.*, 2005). In Südeuropa stellt das nichtspezifische Lipid-Transfer-Protein (nsLTP) Mal d 3 aus der Familie der PR-14 Proteine den häufigsten Auslöser für eine Apfelallergie dar. Dabei handelt es sich um ein hitzestabiles Protein mit einer Größe von etwa 9 kDa, das hauptsächlich in der der Schale des Apfels exprimiert ist (Marzban *et al.*, 2005, Hoffmann-Sommergruber *et al.*, 2007). Homologe nsLTPs konnten in Pollen und Früchten des Pfirsichs sowie auch in anderen Früchten nachgewiesen werden, jedoch trat keine oder nur selten eine Kreuzreaktion auf (Marzban *et al.*, 2006). Die Symptome, die durch eine Allergie gegen Mal d 3 ausgelöst werden, sind dabei meist schwerwiegender als die Symptome des OAS. Daneben sind das Thaumatin-ähnliche Protein Mal d 2 aus der PR-5-Familie und das Profilin Mal d 4 für die Apfelallergiethematik bedeutend weniger relevant (Marzban *et al.*, 2005).

Das Haupt-Apfelallergen in Nord- und Mitteleuropa, wie auch in Nordamerika, ist das PR-10 Protein Mal d 1, welches zu den Bet v 1-homologen Protein zählt (Ahammer *et al.*, 2016). Eine genaue Zahl der Patienten mit pollen-assoziiertes Apfelallergie in Europa ist nicht bekannt. Die Angaben reichen von 47 % (Eriksson *et al.*, 1982) bis 80 % (Geroldinger-Simic *et al.*, 2011) der Birkenpollenallergiker, die zudem bezüglich Mal d 1 sensibilisiert sind.

Mal d 1 wurde erstmals 1995 isoliert und charakterisiert (Vanek-Krebitz *et al.*, 1995). Es handelt sich hierbei um ein Protein mit der Größe von 17.5 kDa (160 Aminosäuren), welches in unterschiedlichen Pflanzenorganen exprimiert wird. Es wurde in den Früchten, sowohl in der Schale als auch im Fruchtfleisch (Marzban *et al.*, 2005) gefunden, konnte jedoch auch in Blättern (Beuning *et al.*, 2004, Gilissen *et al.*, 2005), Blüten (Sung *et al.*, 1998) und Pollen

(Marzban *et al.*, 2006) der Bäume nachgewiesen werden. Es gibt Unterschiede in der Expression des Proteins sowohl innerhalb eines Baumes als auch innerhalb einer Frucht (Marzban *et al.*, 2005, Asero *et al.*, 2006).

Wie auch das Bet v 1, wird Mal d 1 durch eine Vielzahl an Genen kodiert, die sich auf unterschiedlichen Chromosomen befinden (Pagliarani *et al.*, 2012). Bei den unterschiedlichen Genen handelt es sich sowohl um Gene, die ein Intron enthalten, als auch um Gene ohne Intron (Gao *et al.*, 2008). Während über die Expression der bereits bekannten 31 Gene bereits mehrfach berichtet wurde (Atkinson *et al.*, 1996, Beuning *et al.*, 2004, Botton *et al.*, 2008), liegen nur wenig Informationen über die Expression, die Eigenschaften und die Funktionen der daraus resultierenden allelischen Varianten vor. Für jedes Gen sind mehrere Isoformen möglich. Allein für das Gen, das Mal d 1.06C kodiert, konnten sechs unterschiedliche Proteinvarianten (allelische Varianten) in verschiedenen Kultivaren charakterisiert werden (Gao *et al.*, 2008). Aufgrund der Diploidie der meisten Apfel sind dabei jedoch maximal zwei Varianten pro Gen für jeden Genotyp möglich.

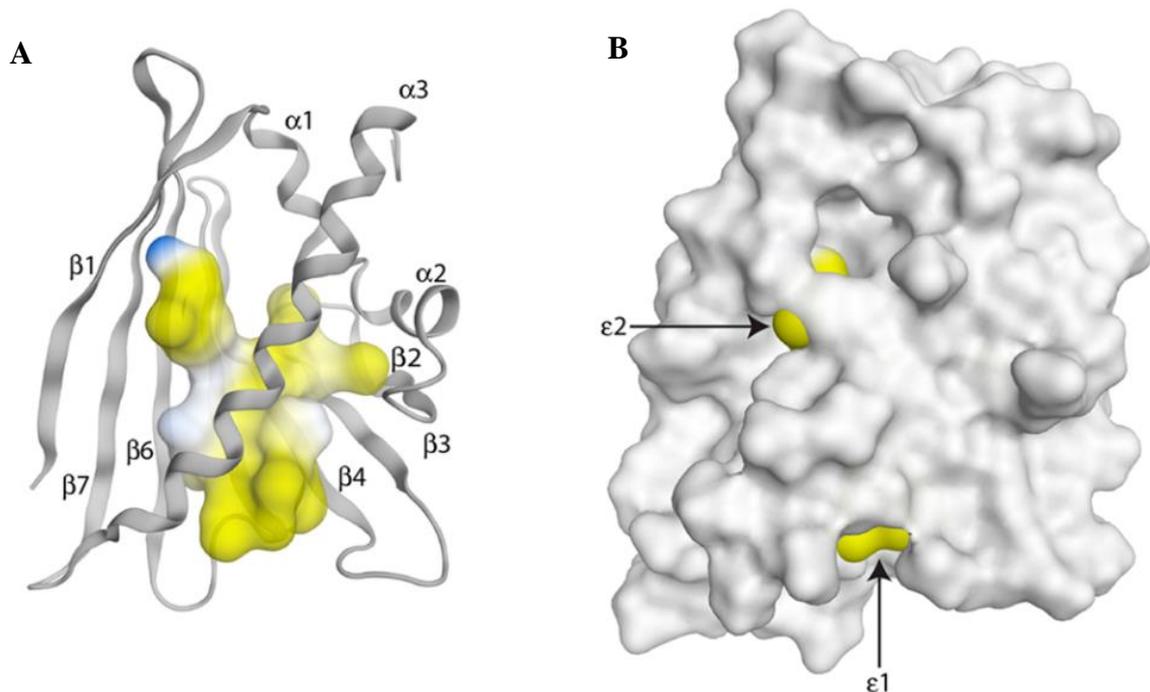
Es gibt Hinweise, die auf ein unterschiedliches allergenes Potential der Isoformen hindeutet (Son *et al.*, 1999, Uehara *et al.*, 2001). Dies unterstreicht die Wichtigkeit der Isoformzusammensetzung im Apfel bezüglich der Allergenität und könnte eine mögliche Erklärung auf die unterschiedliche Verträglichkeit der Apfelgenotypen darstellen (Vegro *et al.*, 2016).

Aufgrund der hohen Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen von Mal d 1 und Bet v 1 von über 64 % und einer hohen dreidimensionalen Strukturähnlichkeit, weisen beide Proteine ähnliche physikalische und chemische Charakteristika auf (Vanek-Krebitz *et al.*, 1995, Ahammer *et al.*, 2017). So ist Mal d 1, wie Bet v 1, sehr labil gegenüber Hitzeeinwirkung und der Zersetzung durch Proteinasen (Vieths *et al.*, 1998, Gruber *et al.*, 2004, Mills *et al.*, 2009, Somkuti *et al.*, 2011, Szamos *et al.*, 2011). Ein Grund für die Labilität ist, dass die meisten Isoformen des Mal d 1, aufgrund fehlender Cysteinreste, keine stabilisierenden Disulfidbrücken ausbilden können. Diese Tatsache der Hitze- und Proteinaselabilität ermöglicht den meisten Patienten den symptomfreien Verzehr von prozessierten und erhitzten Apfelprodukten, wie pasteurisierte Säfte, Cidre, Mus oder Kuchen (Bolhaar *et al.*, 2005).

Aufgrund des niedrigen Gesamtproteingehaltes von Äpfeln liegt der Gehalt an Mal d 1 im Bereich Mikrogramm pro Gramm Frischgewicht (Garcia *et al.*, 2007, Matthes und Schmitz-Eiberger, 2009, Kiewning und Schmitz-Eiberger, 2014). Die Mal d 1-Gehalte sind stark vom Genotyp abhängig (Matthes und Schmitz-Eiberger, 2009, Ahammer *et al.*, 2017). Sorten wie 'Golden Delicious' oder 'Jonagold' zeigen in der Regel ein höheren Allergengehalt als Äpfel

der Sorten 'Santana' oder 'Gloster' (Vieths *et al.*, 1994, Marzban *et al.*, 2005, Asero *et al.*, 2006, Kootstra *et al.*, 2007, Vlieg-Boerstra *et al.*, 2011, Kschonsek *et al.*, 2019b). Jedoch beeinflussen auch die Umweltbedingungen beim Anbau (Botton *et al.*, 2008, Matthes und Schmitz-Eiberger, 2009) und die Lagerungsbedingungen nach der Ernte (Sancho *et al.*, 2006, Schmitz-Eiberger und Matthes, 2011, Kiewning und Schmitz-Eiberger, 2014) den Mal d 1-Gehalt in hohem Maße.

Oft wird der Mal d 1-Gehalt mit dem allergenen Potential der Äpfel gleichgesetzt (Matthes und Schmitz-Eiberger, 2009, Kiewning und Schmitz-Eiberger, 2014). Jedoch wird immer deutlicher, wie wichtig eine Kombination aus *in vitro* und *in vivo* Versuchen zur Bestimmung der Allergenität ist, denn eine direkte Korrelation zwischen der Verträglichkeit einer Apfelsorte und dem allergieauslösenden Proteins Mal d 1 ist oft nicht nachzuweisen (Asero *et al.*, 2006). Die Sorte 'Fuji' zeigt in Mal d 1-ELISA Tests einen hohen Allergengehalt (Marzban *et al.*, 2005), eine mittlere Allergenität in Skin-Prick-Tests zum Nachweis einer allergischen Reaktion bei Patienten (Bolhaar *et al.*, 2005) und bei Betrachtung der Gen-Expression eine sehr geringes Potential (Botton *et al.*, 2008).



**Abbildung 6 hydrophobe Bindungstasche des Mal d 1.** **A** Hydrophile Bereiche sind blau, hydrophobe Bereiche sind gelb dargestellt.  $\beta 1 - \beta 7$ : Stränge der  $\beta$ -Faltblattstruktur,  $\alpha 1 - \alpha 3$ :  $\alpha$ -Helices. **B** Oberflächenstruktur energetisch günstigen Proteinfaltung des Mal d 1.0101.  $\epsilon 1 - \epsilon 2$  sind hydrophobe Eingänge in die Bindungstasche des Proteins (Ahammer *et al.*, 2017).

Über die genaue Funktion des Mal d 1 in der Pflanze ist derzeit nicht viel bekannt. Eine Ribonuklease-Aktivität, wie sie das Bet v 1 aus Birkenpollen, das homologe Protein der Erdbeere, Fra a 1, oder das Lupinenprotein LaPR-10 aufweisen, konnte für Mal d 1 nicht nachgewiesen werden (Bufe *et al.*, 1996, Bantignies *et al.*, 2000, Besbes *et al.*, 2019). Auch sind bisher noch keine physiologischen Liganden, wie beispielsweise bei Bet v 1, bekannt. Da auch beim Mal d 1 eine hydrophobe Bindungstasche mit zwei hydrophoben Eingängen existiert, kann eine Funktion als Transportprotein nicht ausgeschlossen werden (Ahammer *et al.*, 2017). Es konnte jedoch bereits ein assoziiertes Protein zu Mal d 1 identifiziert werden (Puehringer *et al.*, 2003), welches unter anderem Motive aufweist, die eine Rolle bei der mikrobiellen Abwehr in der Zellwand spielen. Einen Hinweis über die Funktion dieses Proteins in Kombination mit Mal d 1 sind nicht bekannt.

## 1.6 Ursachen und Therapiemöglichkeiten

Die Zahl der Allergiepazienten ist in den letzten Jahren deutlich angestiegen und steigt bis heute. Dabei erhöht sich vor allem die Zahl der Pollen- und Nahrungsmittelallergiker. Die Birkenpollenallergie tritt in Europa bei 8 – 16 % der Bevölkerung auf, mit steigender Tendenz (Biedermann *et al.*, 2019). Es werden mehrere mögliche Gründe für diesen Anstieg diskutiert, jedoch gibt es bisher keine eindeutigen Beweise für einen Zusammenhang.

Eine Theorie stellt die sogenannte Hygiene-Hypothese dar, die erstmals 1989 beschrieben wurde (Strachan, 1989). Sie beschreibt den Zusammenhang von zunehmenden Hygienestandards und der damit einhergehenden Abnahmen infektiöser Krankheiten, mit der starken Zunahme an Immunerkrankungen wie Allergien, Asthma oder Multipler Sklerose in Industrieländern in den letzten 70 Jahren (Scudellari, 2017). Unterstützt wird diese Theorie durch Tiermodellstudien und die Tatsache, dass die Zahl der Immunerkrankungen in Entwicklungsländern deutlich geringer ist, als in Industriestaaten (Yazdanbakhsh *et al.*, 2002). Jedoch erfolgten die größten Veränderungen bei den Hygienestandards der Industrieländer bereits bis zum Anfang des 20. Jahrhunderts, während der Anstieg der Allergien erst Jahrzehnte später eintrat (Platts-Mills, 2015).

Daher wird neben der Hygiene wird seit ein paar Jahren der Klimawandel als mögliche Ursache für ein erhöhtes Risiko an Heuschnupfen zu erkranken, diskutiert. Die höheren Temperaturen und vermehrt auftretenden Luftschadstoffen wie beispielsweise Kohlenstoffdioxid führt zu einer erhöhten Pflanzenbiomasse und somit auch zu einer erhöhten Pollenproduktion (Ziska und Caulfield, 2000, Damialis *et al.*, 2019). Zudem erfolgt die

vermehrte Bildung von stressinduzierten Proteinen, die in den meisten Fällen als Antigene fungieren. Aber auch vermehrte Schadstoffe wie Dieselpartikel oder Ozon lassen das Risiko eine Pollenallergie zu entwickeln, ansteigen (Diaz-Sanchez *et al.*, 1999, Parker *et al.*, 2009).

Die Veranlagung für Allergien wird zudem genetisch vererbt. Das Risiko einer Allergieentwicklung des Kindes steigt von 0-15 % auf bis zu 60-80 %, wenn eines, oder beide Elternteile bereits Allergien aufweisen (Deutscher Allergie- und Asthmabund (DAAB), 2020).

Für die Diagnose einer Allergie werden mehrere Methoden verwendet. Zum Nachweis von Urtikaria oder anderen Hautreaktion auslösenden Allergenen eignen sich Hauttests, wie der Einstich- oder Kratztest (*engl.* prick-test oder scratch-test). Dabei werden die Allergene durch Einritzen oder Einstechen in die Haut eingebracht und die allergische Reaktion anhand der Rötung und Schwellung diagnostiziert (de Groot *et al.*, 1996, Ricci *et al.*, 2010, Rink *et al.*, 2015). Für Nahrungsmittelallergene können die allergieauslösenden Proteine bei Provokationstests, entweder in natürlicher Form im Lebensmittel oder in Kapseln oral verabreicht werden (Bucher *et al.*, 2004, Kopac *et al.*, 2012). Die Symptome sind in vielen Fällen nicht direkt messbar, sondern werden vom Patienten anhand einer Skala beschrieben und beurteilt (Worm *et al.*, 2014).

Da bei *in vivo* Tests die Gefahr starker körperlicher Symptome mit teilweise gesundheitsgefährdenden Auswirkungen besteht, bieten *in vitro* Analysen eine ungefährliche Alternative. Dabei erfolgt der Nachweis meist über die Messung der spezifischen Antikörper im Blut oder Serum. Beim Radio-Allergo-Sorbent-Test (RAST) werden festphasengebundene Antigene mit Patientenserum inkubiert. Vorhandene Antikörper der Patienten binden an das Antigen und können anschließend in einem Radioimmunoassay nachgewiesen werden (Rossen und Birdsall, 2012, Rink *et al.*, 2015).

Deutlich sensitiver kann eine Immunreaktion durch die Analyse, der durch die allergische Reaktion aktivierten basophilen Granulozyten, erfolgen. Diese bilden nach der Immunreaktion als Folge von Allergenkontakt, Oberflächenproteine wie CD203c oder CD63 aus (Hemmings *et al.*, 2018). Die Expression dieser Oberflächenmarkierung der Basophilen kann per Durchflusszytometrie gemessen werden (MacGlashan, 2010, Hoffmann-Sommergruber *et al.*, 2015, Franz-Oberdorf *et al.*, 2016).

Bei der Behandlung der Allergiesymptome können diese mit Hilfe von Antihistaminika oder anderen Medikamenten eingedämmt werden, jedoch gibt es bisher kaum wirkungsvolle Therapien für Pollen- oder Nahrungsmittelallergiker. Meist ist die einzige Möglichkeit, eine strikte Meidung der allergieauslösenden Proteine oder Lebensmittel (Worm *et al.*, 2014). Dies ist, vor allem bei Pollenallergikern oft sehr schwierig umzusetzen. Daher wird bei

Heuschnupfen häufig die Hyposensibilisierung eingesetzt. Über einen langen Zeitraum, meist über mehrere Jahre hinweg, werden den Patienten regelmäßig kleinere Dosen des allergieauslösenden Proteins beispielsweise in Form von rekombinantem Bet v 1, injiziert. Es erfolgt ein Gewöhnungseffekt des Immunsystems und zu einer Minderung der allergischen Reaktion nach dem Kontakt mit dem nativen Antigen. Bei pollenassoziierten Nahrungsmittelallergien kann eine solche Behandlung der Pollenallergie auch die Symptome der Lebensmittelallergie mindern (Asero, 1998, Bucher *et al.*, 2004). Auch eine Hyposensibilisierung mit rekombinantem Mal d 1 führte bereits zu einer Reduktion der allergischen Symptome der Apfelallergie (Kinaciyan *et al.*, 2018)

Der Bedarf an allergenarmen Lebensmitteln steigt stetig an, weshalb die Forschung und Entwicklung in diesem Bereich von erhöhter Wichtigkeit ist.

## 1.7 Der Einfluss von Polyphenolen auf die Verträglichkeit

Polyphenole werden, neben zahlreichen positiven Eigenschaften auf die menschliche Ernährung, welche im Kapitel 1.2 beschrieben wurden, auch immer wieder mit einem positiven Einfluss auf die Allergenität eines Lebensmittels in Verbindung gebracht. Zahlreiche Studien schlagen verschiedene Gründe für einen antiallergenen Effekt vor. Dabei greifen die Polyphenole in unterschiedliche Wirkmechanismen, zu verschiedenen Zeitpunkten der allergischen Reaktion ein (Singh *et al.*, 2011).

Zum einen können Polyphenole die Bindungsaffinität von IgE-Antikörpern zu Antigenen hemmen. Ein Grund dafür ist die Bindung einiger Polyphenole an das Antigen, beispielsweise in eine hydrophobe Bindungstasche, wie es bei einigen PR-10-Proteinen der Fall ist. Dies kann zu einer Konformationsänderung des Proteins führen (Casanal *et al.*, 2013a) und damit zu einer verminderten IgE-Bindungsaffinität (Seutter von Loetzen *et al.*, 2014, Moraes *et al.*, 2018). Die Antikörpererkennung kann jedoch auch durch einen weiteren Faktor gestört werden. Die Polyphenoloxidase (PPO) katalysiert die Oxidation von aromatischen Polyphenolen zu Chinonen und spielt, dank ihrer Cresolase- und Catecholaseaktivität eine wichtige Rolle bei der enzymatischen Bräunung von Obst (Nicolas *et al.*, 1994, Holderbaum *et al.*, 2010, Kiewning *et al.*, 2013). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit kann die PPO jedoch auch die Aminosäure Tyrosin als Substrat oxidieren. Die entstehenden Strukturen können mit anderen Aminosäuren des Proteins kovalente Vernetzungen bilden, was ebenfalls zu einer Änderung der Konformation führt (Wu *et al.*, 2016, Kschonsek *et al.*, 2019a).

Neben der IgE-Bindung kann auch die Freisetzung von Mediatoren, wie Histamin aus den Mastzellen durch Polyphenole beeinflusst werden (Pearce *et al.*, 1984, Bronner und Landry, 1985). Polymere Polyphenole wie Tannine können dabei die Bindung von IgE-Antikörpern mit den auf den Mastzellen befindliche FC $\epsilon$ RI-Rezeptoren hemmen (Tokura *et al.*, 2005) oder beeinflussen die für die Histaminausschüttung ebenfalls essenzielle Tyrosinkinasen (Maeda-Yamamoto *et al.*, 2004, Gilfillan und Rivera, 2009).

Aufgrund dieser Erkenntnisse werden polyphenolreiche Apfelsorten oft als verträglicher eingestuft (Kschonsek *et al.*, 2019b). Durch die natürliche Diversität der Apfelsorten und der Abhängigkeit des Allergengehaltes und der Polyphenole vom Genotyp, muss jedoch eine individuelle Bewertung der Allergenität erfolgen.

## 1.8 Ansätze zur Züchtung allergenarmer Äpfel

Aufgrund der stetig steigenden Zahlen der Menschen, die an einer Lebensmittelallergie, insbesondere der pollenassoziierten Nahrungsmittelallergie leiden, steigt auch die Bedeutung und das Interesse an allergenarmen Früchten. Bei der Züchtung neuer Apfelsorten handelt es sich um ein sehr zeitintensives Unterfangen. Die Vorgaben des Marktes und die Erwartungen der Verbraucher sind ebenfalls sehr hoch. Neben dem Geschmack, dem Aroma, der Fruchtfarbe und der Ertragsstabilität gehören auch eine gute Lagerfähigkeit, Resistenzen gegenüber Krankheiten und eine gute Anpassung an die sich ändernden klimatischen Bedingungen zu den Hauptkriterien für Apfelsorten (Sansavini *et al.*, 2004, Peil *et al.*, 2011, Rühmer, 2014)

Es gibt zwei Hauptansätze, die bei der Züchtung von allergenarmen Pflanzen und Früchten eine wichtige Rolle spielen. Die erste Strategie ist die genetische Modifizierung des Pflanzenmaterials, beispielsweise durch Suppression der proteinkodierenden Sequenzen durch die RNA-Interferenz-Technik (RNAi) was zu genetisch-modifizierten Früchten führt (Gilissen *et al.*, 2005, Krath *et al.*, 2009). Versuche dieser Art führten bereits erfolgreich zu Apfelfrüchten, die in Humanstudien als deutlich besser verträglich eingestuft wurden als der Wildtyp der Sorte 'Elstar' (Dubois *et al.*, 2015). Dieser Ansatz kann für den amerikanischen Markt von großer wirtschaftlicher Bedeutung sein. Nach einer Genehmigung durch die U.S. Food & Drug Administration (FDA) und der Organisation für Lebensmittel und Landwirtschaft der vereinten Nationen (FAO), können gentechnisch veränderte Lebensmittel im Handel zugelassen werden (FAO GM Foods Platform, 2020, FDA U.S. Food and Drug Administration, 2020). So sind bereits gentechnisch veränderte Apfelsorten, deren PPO-Gehalt mittels RNAi

herabreguliert wurde, unter der Produktbezeichnung „Arctic<sup>®</sup> Apples“ auf dem Markt ([www.arcticapples.com](http://www.arcticapples.com)).

In der Europäischen Union ist eine Zulassung von gentechnisch veränderten Lebensmitteln basierend auf geltenden Europäischen Lebensmittelrecht, Verordnung 1831/2003 nicht möglich. Daher muss der Ansatz bei der Produktion allergenarmer Früchte den klassischen Züchtungsansätzen entsprechen. Dabei werden die Äpfel nach phänotypischen Kriterien, ihrer Fruchtqualität und anderen Kriterien, wie dem Allergengehalt selektioniert. Über mehrere Jahre und Jahrzehnte muss nun die Qualität beobachtet und bestimmt werden (Flachowsky *et al.*, 2011). Dabei unterstützt seit einigen Jahren die Kenntnis des Genoms (Velasco *et al.*, 2010) und somit die genetischen Grundlage, die Selektion von geeigneten Kandidaten. Dies eignet sich vor allem bei multigenen Eigenschaften wie dem Mal d 1-Gehalt (Perez *et al.*, 2012, Benevenuto *et al.*, 2019). In Kombination mit Humanstudien und Untersuchungen auf molekularer Ebene ist es auch möglich die Verträglichkeit dieser Genotypen für Allergiker zu ermitteln (Hoffmann-Sommergruber *et al.*, 2007). Bisher spielte diese Eigenschaft der neuen Sorten keine Rolle, was sich aber durch die gesteigerte Nachfrage der Konsumenten in den letzten Jahren entscheidend geändert hat. Erst wenn alle Kriterien erfüllt sind, kann dies zu einer potenziellen Sortenzulassung und somit zu einer Zulassung für den Markt führen. Eine Zeitdauer von 20 Jahren und mehr ist keine Seltenheit (Flachowsky *et al.*, 2011). Daher ist es von entscheidender Wichtigkeit fundierte Kenntnisse auf molekularer und genetischer Ebene, wie auch über die Zusammenhänge zu erlangen.



## 2 Ziel der Arbeit

Die Zahl an Allergikern in Deutschland und weltweit stieg in den letzten Jahren rapide an und alles deutet darauf hin, dass sie auch in den folgenden Jahren weiter ansteigen wird. Vor allem die Anzahl der Pollenallergiker, und mit ihr die Zahl der an pollenassoziierter Nahrungsmittelallergie leidenden Personen nimmt stark zu. Die Symptome sind in den meisten Fällen nicht lebensgefährlich, beeinträchtigen jedoch ein normales Alltagsleben erheblich.

Meist ist die einzige Möglichkeit, diesen Symptomen zu entgehen, ein strikter Verzicht auf die allergieauslösenden Lebensmittel. Die Hoffnung sind allergikerfreundliche Produkte, deren Nachfrage kontinuierlich steigt.

Bei Naturprodukten, wie Äpfeln oder anderen Obst- und Gemüsearten ist die Gewährleistung einer guten Verträglichkeit, mit einem großen und zeitintensiven Züchtungseinsatz möglich. Daher hat es sich das Projekt „Züchtung allergenarmer Äpfel über Mal d 1-ELISA-Selektion als multidisziplinäres Entwicklungsvorhaben (AllArm)“ zum Ziel gesetzt, als Kooperationsprojekt der TUM, der Hochschule Osnabrück, der Charité in Berlin und der Züchtungsinitiative Niederelbe, den Allergengehalt als Selektionsparameter in der Züchtung zu etablieren und neue Genotypen in Humanstudien auf ihre Verträglichkeit hin zu testen.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Etablierung eines ELISA-Tests mit rekombinantem Mal d 1, welches in *E. coli* exprimiert und isoliert wurde. Damit ist es möglich, zunächst patientenunabhängig, aus einer Vielzahl an Nachkommen einer Kreuzungspopulation, Genotypen zu ermitteln, die einen geringen Mal d 1-Gehalt aufweisen und somit für die weitere Züchtung eines allergikerfreundlichen Apfels geeignet sind. Diese Allergenbestimmung fand zu verschiedenen Zeitpunkten der Selektion statt, um dieses Wissen in Zukunft als weiteres standardmäßiges Selektionskriterium anzuwenden.

Des Weiteren wurden die Daten aus Provokationsstudien der Charité Berlin ausgewählter Genotypen mit den analysierten Mal d 1-Gehalten korreliert.

Um das Allergiepotenzial von Äpfeln besser zu verstehen, wurden im Zuge dieser Arbeit auch die Polyphenolgehalte und die Isoformen des Mal d 1 in ausgewählten Genotypen untersucht.

Dieses Wissen kann in naher Zukunft dazu beitragen, einen allergikerfreundlichen Apfel zu züchten, der das Allergiesiegel der Europäischen Stiftung für Allergieforschung (ECARF) verliehen bekommt.



## 3 Material & Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Chemikalien

Soweit nicht anders erwähnt, wurden alle Chemikalien in analysenreiner Qualität (p. A.) eingesetzt.

**Tabelle 1** Verwendete Chemikalien

<b>Chemikaliename</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Hersteller</b>
2-Propanol		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	TMB	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
30 % Acrylamid-/ Bisacrylamidlösung (37,5:1)		Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
5-Brom-4-chlor-3- indolylphosphat, Dinatriumsalz	BCIP	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Agar		Molekula, Taufkirchen
Aluminiumsulfat × 18 H <sub>2</sub> O		Merck, Darmstadt
Ameisensäure 98-100 %		Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat	APS	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Biochanin A		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bovines Serumalbumin	BSA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Coomassie Brillant Blau G-250		Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Cyanidin-3-O-galactosid		Extrasynthese, Genay, Frankreich
Cyanidin-3-O-glucosid		Extrasynthese, Genay, Frankreich
D(+)-Glucose, wasserfrei		Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Essigsäure 100 %		Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Ethanol, absolut	EtOH	VWR International GmbH, Darmstadt
Glycin ≥ 99 %		Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Harnstoff ≥ 99,5 %		Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

<b>Chemikalienname</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Hersteller</b>
Hefeextrakt		Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Imidazol		Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	KCl	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
L(+)-Cystein $\geq 99\%$		Acros organics, New Jersey, USA
Laemmlli Sample Buffer, 2 $\times$		Bio-Rad Laboratories, München
Magnesiumchlorid	MgCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid, 50 mM	MgCl <sub>2</sub>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Magnesiumsulfat Heptahydrat	MgSO <sub>4</sub> 7 $\times$ H <sub>2</sub> O	JT Baker, Deventer, Niederlande
Methanol HiPerSolv , LC-MS-grade		VWR International GmbH, Darmstadt
Methanol, absolut		Merck, Darmstadt
N,N-Dimethylformamid	DMF	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin $\geq 99\%$	TEMED	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Natriumcarbonat, wasserfrei	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Fluka, Steinheim
Natriumchlorid	NaCl	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> $\times$ H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	SDS	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO <sub>3</sub>	Fluka, Steinheim
<i>o</i> -Phosphorsäure 95-98 %		Merck, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid	PMSF	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<i>p</i> -Nitrotetrazolium-blau-chlorid	NBT	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Roti <sup>®</sup> -Nanoquant (5 $\times$ Konzentrat)		Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Salzsäure, 37 % rauchend	HCl	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure 96 %		Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	TRIS	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Trypton/ Pepton aus Casein		Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Tween-20 <sup>®</sup>		Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

**Tabelle 2** Verwendete Antibiotika

<b>Antibiotika</b>	<b>Hersteller</b>
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Chloramphenicol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

### 3.1.2 Antikörper und Enzyme

**Tabelle 3** Verwendete Antikörper und Enzyme

<b>Antikörper</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Hersteller</b>
anti-Mal d 1(polyklonal)	929 µg/mL	Dauids Biotechnologie GmbH, Regensburg
anti-Kaninchen-HRP*	1 mg/mL	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
anti-Kaninchen-HRP*	1 mg/mL	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
anti-Kaninchen-AP**	1 mg/mL	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
DNase		Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Lysozym (Eiweiß Huhn)		Fluka, Steinheim
Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade		Promega, Fitchburg, USA

\* HRP = Meerrettich-Peroxidase (*engl. horseradish-peroxidase*)

\*\* AP = Alkaline Phosphatase

### 3.1.3 Weitere Materialien

**Tabelle 4 Weitere Verbrauchsmaterialien**

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
96-well Mikrotiterplatte, Immunograde™ (ELISA)	Brand, Wertheim
96-well Mikrotiterplatte, Microtiter™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
NuPAGE 4-12 % Bis-Tris-Protein-Gel	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Größenstandard 10-180 kDa)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Profinity™ IMAC His-Tag-Resin	Bio-Rad, Basel
Roti®-PVDF-Membran (Polyvinyliden-Difluorid)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Rotilabo®-Blottingpapier (Dicke 0,35 mm)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
ZelluTrans Dialyseschlauch MWCO 3,5 kDa	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

### 3.1.4 Pflanzenmaterial

Die untersuchten Äpfel wurden von der Hochschule Osnabrück in Kooperation mit der Züchtungsinitiative Niederelbe GmbH & Co. KG in Balje (Niederelbe) gekreuzt, kultiviert und selektiert und im Zuge des „AllArm“-Projekts für Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

Es wurden Apfelgenotypen unterschiedlicher Selektionsstufen unterschiedlicher Kreuzungspopulationen untersucht. Die Selektionsstufe 1 beinhaltet alle fruchttragenden Nachkommen der Kreuzungspopulationen. Ab dem zweiten Standjahr wurden im Zuge des Projekts die Fruchteigenschaften wie Festigkeit, Säuregehalt und gelöste Trockensubstanz untersucht. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit der Mal d 1-Gehalt bestimmt. Die Genotypen wurden anschließend hinsichtlich der Fruchtgröße, des Erscheinungsbildes und des Geschmacks selektioniert. Alle Genotypen, die diese Kriterien erfüllten, gelangten in Selektionsstufe 2.

Neben dem Allergengehalt wurden Äpfel der Selektionsstufe 2 auch hinsichtlich des Ertrags, Deckfarbe und Krankheitsanfälligkeit während der Anbauzeit bewertet. Die Probenbezeichnungen sind numerische Kodierungen für den Standort der Apfelbäume im Versuchsfeld. Aufgrund von Geheimhaltungserklärungen können die genauen Bezeichnungen und Elternsorten nicht weiter spezifiziert werden.

## 3.1.5 Geräte

Tabelle 5 Geräteliste

<b>Geräte</b>	<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Autoklav	Fedegari FVA/A1	Ibs tecnomara, Fernwald
Blotting Apparatur	Mini Semi-Dry-Blotter, V10-SDB	Biosteps, Jahnsdorf
Elektrophorese (SDS-PAGE)	MINI-vertikal Doppel-Elektrophorese-Kammer	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Feinwaage	Precisa 125A	Precisa, Dietikon, Schweiz
Feinwaage	Timberline Analytical Balances TP-214	Denver Instrument, Bohamia, New York, USA
Gefriertrockner	Modulyo <sup>®</sup> D	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Heizblock	Thermomixer <sup>™</sup> R	Eppendorf, Hamburg
Heizplatte/ Magnetrührer	MR Hei-Standard RSM-01HS	Heidolph Instruments, Schwabach Phoenix Instrument, Garbsen
Mixer	Personal Blender PB250	Tribest, Anaheim, USA
pH-Meter	Tisch-pH-Meter 50	Dostmann Electronic GmbH, Wertheim
Photometer	Nicolet Evolution 100	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Plattenlesegerät	CLARIOstar Plus	BMG Labtech, Ortenberg
Reinstwasseranlage	Purelab <sup>®</sup> Classic UVF MK2	Elga Labwater, Celle
Rotationsinkubator	Rotary-mixer Model L26	Labinco, Breda Niederlande
Schüttelinkubator	GFL3032	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Spannungsquelle	E835 Electrophoresis Power Supply EV245 Electrophoresis Power Supply	Consort, Turnhout, Belgien Consort, Turnhout, Belgien
Sterilbank	Hera Safe	Heraeus Holding, Hanau
Ultraschallbad	Sonorex RK103H	Bandelin Electronic, Berlin

<b>Geräte</b>	<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Ultraschall-Sonde	Sonoplus Ultraschall-Homogenisator	Bandelin Electronic, Berlin
Vakuum-Zentrifuge	RVC 2-18 CDplus	Christ, Osterode am Harz
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc. Bohemia, USA
Waage	Scout Pro	Ohaus, Nänikon, Schweiz
Wasserbad	Julabo HC 5/7	Julabo GmbH, Seelbach
Wippschüttler	Polymax 1040	Heidolph Instruments, Schwabach
	Enduro™ Mini Mix™	Labnet International Inc., Edison New Jersey, USA
Zentrifuge	Color Sprout Mini-Zentrifuge	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
	Mikrozentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
	Sigma 1-14	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz
	Sigma 4K15C	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz

### 3.1.6 LC-MS Parameter

**Tabelle 6 LC-MS Parameter Polyphenole**

<b>System</b>	<b>Details</b>
HPLC-System	Agilent 1100 Series (Agilent Technologies Inc.)
Entgaser	Vakuum Degaser G1379A (Agilent Technologies Inc.)
Autosampler	Autosampler G1313A (Agilent Technologies Inc.)
Pumpe	Capillary pump G1376A (Agilent Technologies Inc.)
Injektor	Sample injector G1313A (Agilent Technologies Inc.)
Injektionsvolumen	5 µL
Trennsäule	Luna 3 µm C18(2) 100Å, 150 × 2 mm (Phenomenex)
Säulentemperatur	25 °C

<b>System</b>	<b>Details</b>
Mobile Phase	A: Reinstwasser + 0,1 % (v/v) Ameisensäure B: Methanol + 0,1 % (v/v) Ameisensäure
Fließgeschwindigkeit	0,2 mL/min
Gradient	0 – 50 % B in 30 min 50 – 100 % B in 5 min 100 % B für 15 min 100 – 0 % in 10 min Gesamtzeit: 65 min
UV-Detektor	Variable Wavelength Detector G1314A, $\lambda=280$ nm (Agilent Technologies Inc.)
Massenspektrometer	Agilent 6340 Ion Trap LC/MS, Ionenfalle (Agilent Technologies Inc.)
Spraygas	Stickstoff, 30,00 psi
Trockengas	Stickstoff, 9 L/min, 330 °C
Scan-Bereich	$m/z = 50 - 1000$
Polarität	Positiv und negativ alternierend
ICC Target	70 000
Max. Akkumulationszeit	20 ms
Auflösung	26.000 $m/z$ per sec Einheitsauflösung
Zielmasse (SPS)	400 $m/z$ (smart)
Kapillarspannung	$\pm 4000$ V
Endplattenspannung	$\pm 3500$ V (= Kapillarspannung – 500 V)
MS/MS	Auto-tandem MS <sup>2</sup> – Einstellungen
Kollisionsgas	Helium 5.0, $4,21 \times 10^6$ bar
Kollisionsspannung	1,0 V

## 3.1.7 Software

**Tabelle 7** Verwendete Software

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
ChemDraw	PerkinElmer, Waltham, USA
Data Analysis	Bruker, Bremen
EndNote X9	Bilaney Consultans GmbH, Düsseldorf
Excel 2016	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
Geneious 5.6.7	Biomatters Ltd, Auckland, Neuseeland
PowerPoint 2016	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
Quant-Analysis	Bruker, Bremen
RStudio 3.6.0	R Studio Team, Boston, USA
Sublime Text	Sublime HQ Pty Ltd, Sidney, Australien

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Transformation von *E.coli* BL21(DE3) pLysS mit dem Expressionsplasmid für Mal d 1

Um das gewünschte Plasmidkonstrukt pQE70 *mal d 1* (zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Elisabeth Kurze) heterolog in *Escherichia coli* Zellen zu exprimieren, wurden 50 µL kompetente *E.coli* BL21(DE3) pLysS Zellen mit 2 µL der Ziel-DNA (Desoxyribonukleinsäure, *engl.* deoxyribonucleic acid) gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42 °C im Wasserbad. Nach 5 minütigem Abkühlen der Zellen auf Eis, wurden die Bakterien mit 500 µL warmem SOC-Medium (Nährmedium, *engl.* super optimal broth with catabolic repression) versetzt und bei 37 °C und 200 rpm für eine Stunde inkubiert. Die transformierten Zellen wurden anschließend auf Lysogeny Broth (LB)-Agar Platten die die Antibiotika Ampicillin (1 mg/mL) und Chloramphenicol (0,34 mg/mL) enthielten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

Die Zusammensetzung der Kultivierungsmedien ist in Tabelle 8 dargestellt.

**Tabelle 8 Kultivierungsmedien**

<b>LB-Medium</b>	10 g/L	NaCl
(pH 7)	10 g/L	Trypton
	5 g/L	Hefeextrakt
optional für Platten	15 g/L	Agar
<b>SOC-Medium</b>	0,5 g/L	NaCl
(pH 7)	20 g/L	Trypton
	5 g/L	Hefeextrakt
	2,5 mM	KCl
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>
	10 mM	MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O
	20 mM	Glucose

### 3.2.2 Herstellung des rekombinanten Proteins (rMal d 1.02)

Eine Einzelkolonie der transformierten *E.coli* BL21 (DE3) Zellen wurden in LB-Medium (siehe Tabelle 8) mit den Antibiotika Ampicillin (100 µg/mL) und Chloramphenicol

(34 µg/mL) bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) von 0,6 kultiviert. Die Proteinexpression wurde mit 100 µg/mL Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert und bei 18 °C über Nacht inkubiert. Die Zellen wurde durch Zentrifugation (10 min, 4 °C, 5525 × g) geerntet und für mindestens 30 min bei -80 °C gelagert.

Alle für die Aufarbeitung verwendeten Pufferlösungen wurden mit Reinstwasser hergestellt und sind in Tabelle 9 dargestellt.

Die Zellen wurden mit 12 mL Waschpuffer und 0,5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 0,5 mg/mL Lysozym, 1 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 µL DNase versetzt und 20 min bei Raumtemperatur (RT) invertiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschallbehandlung (3 × 1 min, 50 % Energie). Danach wurde der Rohextrakt zentrifugiert (30 min, 4 °C, 21.000 × g). Im Überstand befanden sich lösliche Mal d 1 Proteine und andere löslichen Zellbestandteile. Der Rückstand enthielt Zelltrümmer und unlösliche Proteine in Einschlusskörperchen (IB, *engl. inclusion bodies*). Das rMal d 1 wurde aus den IB isoliert und aufgereinigt. Dafür wurde der Rückstand unter denaturierenden Bedingungen mit 12 mL Denaturierungspuffer versetzt und über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert. Die Lösung wurde anschließend zentrifugiert (30 min, 4 °C, 21.000 × g) und der Überstand über Nacht gegen Rückfaltungspuffer dialysiert (4 °C, Molekulargewichtsgrenzwert (MWCO) 3,5 kDa). Der dialysierte Proteinextrakt wurde erneut zentrifugiert (30 min, 4 °C, 21.000 × g) und die Proteine mittels Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) über den kodierten C-terminalen Hexahistidin-Rest (His<sub>6</sub>-Tag) aufgereinigt. Dazu wurde der Überstand auf eine Säule mit His<sub>6</sub>-Tag-Resin für 2 h bei 4 °C rotierend inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit je 10 mL Waschpuffer, wurde das Zielprotein in fünf Schritten mit je 300 µL Elutionspuffer eluiert.

Zur Erhöhung der Stabilität der Proteine wurden die Elutionen über Nacht gegen Natriumcarbonatpuffer dialysiert und anschließend in Aliquots lyophilisiert. Die getrockneten Aliquots waren bei -20 °C für mehrere Monate haltbar und wurden bei Bedarf in Reinstwasser mit 1 mM Cystein rückgelöst (Biomay AG, 2020).

**Tabelle 9 Pufferlösungen zur Proteinreinigung**

<b>Waschpuffer</b> (mit HCl auf pH 7,5)		50 mM	TRIS
		220 mM	NaCl
		10 mM	Imidazol
<b>Denaturierungspuffer</b> (pH 8)		6 M	Harnstoff
		20 mM	TRIS
		220 mM	NaCl
		5 mM	Imidazol
<b>Rückfaltungspuffer</b>		10 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O
		10 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
		0,5 M	NaCl
		20 mM	Imidazol
<b>Elutionspuffer</b> (mit HCl auf pH 7,5)		50 mM	TRIS
		220 mM	NaCl
		250 mM	Imidazol
<b>Natriumcarbonatpuffer</b> (pH 9)	I	10 mM	NaHCO <sub>3</sub>
	II	10 mM	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>

Lösung I vorlegen und mit Lösung II auf pH 9 einstellen

### 3.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration erfolgte mit der Methode nach Bradford (1976) unter Verwendung der Roti<sup>®</sup>-Nanoquant-Lösung der Firma Carl Roth. Die Proben wurden jeweils in einer 1:20 und 1:40 Verdünnung vermessen.

### 3.2.4 SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE wurden 3 µg Protein (c=0,1 µg/ml) mit 15 µL Laemmli-Puffer versetzt und 5 min bei 95 °C gekocht und denaturiert. Die Proben wurden anschließend auf ein 12 % bzw. 16 % SDS-Acrylamidgel (Tabelle 10) aufgetragen. Als Größenstandard wurde der PageRuler<sup>™</sup> Plus Prestained Protein Ladder (ThermoFischer, Scientific) verwendet.

Die Auftrennung erfolgte bei 100 V für 2,5 h. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend mit Coomassie-Färbelösung über Nacht angefärbt und das Gel für mehrere Stunden in Entfärbelösung entfärbt. Die Proteine waren als blaue Banden sichtbar.

**Tabelle 10** Verwendete SDS-Gele

<b>Trenngel 12 %</b>	2,45 mL	Reinstwasser
	3 mL	30 % Acrylamid-/ Bisacrylamidlösung (37,5:1)
	1,9 mL	1,5 M TRIS/HCl (pH 8,8)
	75 µL	10 % SDS
	75 µL	10 % Ammoniumpersulfat
	3 µL	TEMED
<b>Trenngel 16 %</b>	1,45 mL	Reinstwasser
	4 mL	30 % Acrylamid-/ Bisacrylamidlösung (37,5:1)
	1,9 mL	1,5 M TRIS /HCl (pH 8,8)
	75 µL	10 % SDS
	75 µL	10 % Ammoniumpersulfat
	3 µL	TEMED
<b>Sammelgel 7 %</b>	1,85 mL	Reinstwasser
	0,7 mL	30 % Acrylamid-/ Bisacrylamidlösung (37,5:1)
	375 µL	1 M TRIS /HCl (pH 6,8)
	30 µL	10 % SDS
	30 µL	10 % Ammoniumpersulfat
	5 µL	TEMED

**Tabelle 11 Puffer- und Färbelösungen für SDS-Page**

<b>Laufpuffer</b> (10 × konzentriert)	0,25 M	TRIS
	1,22 M	Glycin
	1 %	SDS
<b>Coomassie-Färbelösung</b> (kolloidal)	5 %	Aluminiumsulfat
	20 %	Ethanol, absolut
	0,1 %	Coomassie-Brillant Blau G-250
	2 %	<i>o</i> -Phosphorsäure 95-98 %
<b>Entfärbelösung</b>	70 mL	Essigsäure
	100 mL	Ethanol, absolut
		Ad 1000 mL mit Reinstwasser

### 3.2.5 Western Blot

Die für den Western Blot verwendeten Puffer sind in Tabelle 12 aufgeführt. Die Proteine aus dem SDS-Gel wurden mittels eines elektrischen Feldes auf die Transfermembran (PVDF) transferiert. Die Membran wurde zunächst für 1 min in Ethanol aktiviert und anschließend, wie auch das SDS-Gel, für 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Die Übertragung erfolgte, abhängig von der Größe des Gels, bei einer Stromstärke zwischen 39 und 45 mA für 50 min. Anschließend wurde die Membran über Nacht in 20 mL Blockierungspuffer inkubiert. Es folgten drei Waschschrte mit Waschpuffer und jeweils fünfminütiger Einwirkzeit. Für die Bindung des primären Antikörpers wurde die Membran für 2 h bei 4 °C in Blockierungspuffer mit 0,75 µg/mL polyklonalem anti-Mal d 1-Antikörper inkubiert. Nach erneutem viermaligem Waschen mit Waschpuffer wurde die Membran mit 0,25 µg/mL sekundärem anti-Kaninchen-AP Antikörper in Blockierungslösung für 1 h bei 4 °C inkubiert. Die Membran wurde viermal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend zweimal für je 5 min in 20 mL Detektionspuffer inkubiert. Die enzymkatalysierte Detektion erfolgte durch die Zugabe von 50 µL NBT und 25 µL BCIP-Lösung zu 20 mL Detektionspuffer. Sobald Banden sichtbar wurden, wurde die Membran in Wasser gewaschen.

**Tabelle 12 Pufferlösungen für Western Blot**

<b>Transferpuffer</b>	25 mM	TRIS
	1,22 M	Glycin
	20 % (v v)	Methanol
Ad 1000 mL mit Reinstwasser		
<b>Waschpuffer</b>	20 mM	TRIS
	140 mM	NaCl
	0,1 %	Tween-20 <sup>®</sup>
<b>Blockierungspuffer</b>	5 % (w v)	BSA
	95 % (w v)	Waschpuffer
<b>Detektionspuffer</b>	100 mM	TRIS
	100 mM	NaCl
	5 mM	MgCl <sub>2</sub>
<b>NBT – Substrat</b>	61 mM	NBT in 70 % DMF
<b>BCIP – Substrat</b>	135 mM	BCIP in H <sub>2</sub> O

### 3.2.6 Proteinextraktion aus Äpfeln

Die Apfelstückchen wurden mit flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver vermahlen. Je 1 g des gefrorenen Pulvers wurde in 15 mL Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 3 mL Denaturierungspuffer (Tabelle 9) homogenisiert. Die Probe wurde bei 4°C für 4 h rotierend inkubiert. Nach der Zentrifugation (30 min, 4 °C, 5525 × g) wurde der Überstand über Nacht gegen Natriumcarbonatpuffer (Tabelle 9) dialysiert. Die Extrakte wurden direkt für den ELISA eingesetzt

### 3.2.7 Mal d 1-Bestimmung mittels indirekt kompetitiven ELISA-Assays

Bei dem entwickelten ELISA handelt es sich um einen indirekt kompetitiven ELISA. Alle verwendeten Pufferlösungen sind in Tabelle 13 beschrieben.

Die 96-Well Mikrotiterplatte wurde mit je 100 µL rMal d 1-Proteinlösung, mit einer Konzentration von 0,5 µg/mL in Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS-Puffer), beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Als Leerwert wurden 100 µL reiner PBS-Puffer verwendet. Die Platte wurde dreimal mit je 300 µL Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die freien

Bindungsstellen der Platte mit Blockierungslösung für 1 h bei RT blockiert. Nach dreimaligem Waschen mit je 300 µL Waschpuffer wurden für die Erstellung der Standardkurve je 50 µL rMal d 1 Lösungen mit sieben unterschiedlichen Konzentrationen im Bereich von 0,0002 µg/mL und 75 µg/mL pipettiert. Als Leerwert wurden 50 µL reiner PBS-Puffer verwendet. Für die Apfelproben wurden jeweils 50 µL des Extraktes unverdünnt und in einer 1:1 Verdünnung mit PBS-T in Triplikaten aufgetragen.

In jedes Well wurden zusätzlich 50 µL primärer Antikörper (anti-Mal d 1) in PBS-T mit einer Konzentration von 0,75 µg/mL gegeben und für 1 h bei 4°C inkubiert.

Nach vier weiteren Waschschritten wurden je 100 µL sekundärer Antikörper (anti-Kaninchen-HRP, c=1 µg/mL) in PBS-T in jedes Well gegeben und bei RT für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Platte fünfmal gewaschen und die enzymatische Reaktion mit Tetramethylbenzidin (TMB)-Substrat gestartet. Dafür wurden 100 µL TMB Substrat in jedes Well gegeben und nach 3 min mit 100 µL 2 M Schwefelsäure gestoppt. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm gemessen.

**Tabelle 13 Pufferlösungen für ELISA**

<b>PBS-Puffer</b> (pH 7,4)	I	10 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
		150 mM	NaCl
	II	10 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Lösung I vorlegen und mit Lösung II auf pH 7,4 einstellen			
<b>Waschpuffer/ PBS-T</b>			PBS-Puffer
		0,5 %	Tween-20 <sup>®</sup>
<b>Blockierungslösung</b>			PBS-Puffer
		1 %	BSA

### 3.2.8 Lagerungsstabilitätstests

Die Lagerungsversuche wurden vom Projektpartner Hochschule Osnabrück unter der Leitung von Prof. Dr. Werner Dierend durchgeführt. Die Niedrigsauerstoff-Lagerung oder *ultra-low oxygen storage* (ULO) beschreibt die Lagerung unter kontrollierter Temperatur von 2,5 °C und kontrollierter Atmosphäre, in diesem Falle mit 1,5 % O<sub>2</sub> und 1 % CO<sub>2</sub> während bei der Kühllagerung (KL) die Äpfel bei 4 °C und normaler Atmosphäre gelagert wurden. Die Lagerung im Kühllager diente der Untersuchung des Einflusses einer Überlagerung der Früchte nach Erreichen der Genussreife auf den Mal d 1-Gehalt. Für das Erntejahr 2016 wurden jeweils

12 – 20 Früchte ausgewählter Genotypen in das ULO- bzw. das KL-Lager eingelagert. In 2017 erfolgte die Lagerung nur unter ULO-Bedingungen. Zu verschiedenen Zeitpunkten im Abstand von 4 – 11 Wochen wurden jeweils 3 – 4 Äpfel aus dem Lager entnommen, kleingeschnitten, in Vakuum verpackt und bei -20 °C eingefroren. Die Analyse des Mal d 1-Gehaltes mittels des ELISA-Tests erfolgt in Freising im Zuge dieser Arbeit.

Tabelle 14 fasst die Lagerungsbedingungen und die Auslagerungszeitpunkte der Äpfel zusammen.

**Tabelle 14 Bedingungen und Auslagerungszeitpunkte für Lagerungsversuche**

<b>Erntejahr</b>	<b>Lagerungsbedingung</b>	<b>Termine</b>	<b>Auslagerungszeitpunkt [in Wochen]</b>	
2016	ULO (2,5 °C; 1,5 % O <sub>2</sub> ; 1 % CO <sub>2</sub> )	ULO1	6 – 11 Wochen nach Ernte	
		ULO2	+ 6 Wochen	
		ULO3	+ 8 Wochen	
		ULO4	+ 6 Wochen	
		ULO5	+ 6 Wochen	
	KL (4 °C, normale Atmosphäre)	KL1	12 – 17 Wochen nach Ernte	
		KL2	+ 4 Wochen	
		KL3	+ 4 Wochen	
	2017	ULO	ULO1	9 – 12 Wochen nach Ernte
			ULO2	+ 8 Wochen
ULO3			+ 7 Wochen	
ULO4			+ 11 Wochen	

### 3.2.9 Klinische Provokationstest

Die Humanstudie mit den Provokationstests wurde vom Projektpartner Allergie-Centrums-Charité in Berlin unter der Leitung von Prof. Dr. Karl-Christian Bergmann durchgeführt (Romer *et al.*, 2020). Das Studiendesign wurde von der Ethikkommission der Charité begutachtet und genehmigt.

Dreizehn Patienten mit einer nachgewiesenen Allergie gegen Birkenpollen (allergische Rhinokonjunktivitis durch Birkenpollen) und Äpfel (Orales Allergie-Syndrom) verzehrten, unter medizinischer Aufsicht, jeweils 100 g Apfelfruchtfleisch mit Schale ausgewählter

Genotypen der Erntejahre 2017 und 2018. Die Symptome, die innerhalb der folgenden 20 – 30 Minuten nach Verzehr auftraten, wurden von den Patienten auf einer Skala von 0 – 3 bewertet. Dabei wurde die Skala wie folgt definiert: 0 = ein völliges Ausbleiben der Symptome, 1 = leichte Symptome wahrnehmbar, jedoch leicht zu tolerieren, 2 = störende Symptome wahrnehmbar, welche jedoch akzeptierbar waren, 3 = starke Symptome, die den Patienten stark beeinträchtigen.

### 3.2.10 Extraktion der Polyphenole und Quantifizierung mittels LC-MS

Die Polyphenolextraktion aus Äpfeln erfolgte nach Ring *et al.* (2013). Die Proben wurden in Triplikaten aufgearbeitet. Dafür wurden je 500 mg gefrorenes Apfelpulver eingewogen und viermal mit je 500  $\mu$ L Methanol extrahiert. Als Interner Standard (IS) wurden zu Beginn 250  $\mu$ L Biochanin A-Lösung in Methanol ( $c = 0,2$  mg/mL) zugesetzt. Die Extrakte wurden gesammelt und im Vakuumkonzentrator bis zur Trockene eingengt. In der Probe verbleibendes Wasser wurde durch Gefriertrocknung restlos entfernt. Der Rückstand wurde in 35  $\mu$ L Reinstwasser aufgenommen und mittels Vortex und Ultraschallbad gelöst. Der klare Überstand nach der Zentrifugation (30 min, 4 °C, 16000  $\times g$ ) wurde für die Analyse mittels LC-MS eingesetzt (LC-MS Parameter 3.1.6). Die Metaboliten, die anhand einer *in-house*-Datenbank identifiziert und mittels des internen Standards quantifiziert werden konnten, sind in folgender Tabelle aufgelistet:

**Tabelle 15 Quantifizierte Metaboliten**

<b>Klasse</b>	<b>Metabolit</b>	<b>Retentionszeit [min]</b>	<b>+m/z</b>	<b>- m/z</b>	<b>Fragmente</b>
IS	Biochanin A	40,1	285	283	
Flavan-3-ole	Procyanidin B3	18,9		577	425, 407, 451, 289, 559
	Catechin	20,8		289	245
	Procyanidin B1	22		577	425, 407, 451, 289, 559
	Epicatechin	25,5		289	245
	Procyanidin	29,9		577	425, 407, 451, 289, 559

Klasse	Metabolit	Retentionszeit [min]	+m/z	- m/z	Fragmente
Flavonole	Quercetin-3-glucosid	34,1		463	301
	Quercetin-pentosid 1	34,9		433	301
	Quercetin-pentosid 2	36,1		433	301
	Quercetin-glucuronid	36,6		477	301
	Kaempferol-glucosid	37,8		477	447, 327, 285, 255
	Kaempferol-glucuronid	38,1		461	285
Anthocyanidine	Cyanidin-hexosid 1	22,4	449		287
	Cyanidin-hexosid 2	31,1	449		287
	Cyanidin-pentosid 1	23,7	419		287
	Cyanidin-pentosid 2	26,7	419		287
	Cyanidin-pentosid 3	29,3	419		287
	Cyanidin-pentosid 4	32,9	419		287
Zimtsäurederivate	Chlorogensäuredimer	22,8		707	353
	Chlorogensäure 1	23		353	191, 173
	Chlorogensäure 2	25,4		353	191, 173
	Cumarylchinasäure	27		337	173
	Cumarylchinasäure-dimer	27		679	337
Dihydrochalkone	Phloretin-xyloglucosid	33,2		567	273, 167
	Phloridzin	34,8		435	273, 167

Die quantitative Berechnung der Metabolitkonzentration erfolgte nach folgender Formel:

$$c_{\text{Metabolit}} = \frac{\frac{A_{\text{Metabolit}}}{A_{\text{IS}}} \times m_{\text{IS}}}{m_{\text{Probe}}}$$

Dabei gilt:

- $c_{\text{Metabolit}}$  = ppm äq. IS
- $m_{\text{IS}}$  = 50 µg
- $m_{\text{Probe}}$  = Einwaage des Apfelpulvers in g

### 3.2.11 Sequenzierung der Mal d 1 Isoformen mittels LC-MS/MS

Für die Proteinextraktion wurden für drei technische Replikate pro Sorte je 1 g gefrorenes Apfelpulver mit 3 mL Denaturierungspuffer (Tabelle 9) für 3 h bei 4°C rotierend extrahiert. Anschließend wurde der Extrakt zentrifugiert (30 min, 4 °C, 5525 × g) und der Überstand mit der vierfachen Menge an eiskaltem Aceton versetzt und über Nacht bei -20 °C inkubiert. Der entstandene Niederschlag wurde fünfmal mit eiskaltem 90 % Aceton gewaschen und anschließend im Heizblock bei 35 °C getrocknet. Anschließend wurde der getrocknete Rückstand in 100 µL Laemmli-Puffer resuspendiert und 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Die weitere Probenaufarbeitung mit einem In-Gel-Verdau der Proteine nach Shevchenko *et al.* (2006), wie auch die Messung der Peptide erfolgte am Bayerischen Zentrum für Biomolekulare Massenspektrometrie (BayBioMS) (Romer *et al.*, 2020). Der tryptische Verdau nach Shevchenko *et al.* (2006). Dafür wurden zunächst die Disulfidbrückenbindungen mit 50 mM Dithiothreitol reduziert (70 °C, 10 min) und anschließend die freien Cystein-Reste mit Chloracetamid im Dunkeln alkyliert (RT, 30 min). Dreißig µL der Probe wurden auf ein 4-12 % Bis-Tris Gradientengel geladen und für 5 min (200 V, 500 mA) entwickelt. Die Proteinbande wurde aus dem Gel geschnitten und über Nacht mit Trypsin verdaut.

Die tryptischen Peptide wurden mittels LC-MS/MS aufgetrennt und fragmentiert. Dabei wurden folgende Parameter verwendet:

**Tabelle 16 LC-MS/MS Parameter zur Analyse tryptischer Peptide**

<b>System</b>	<b>Details</b>
HPLC-System	Ultimate 3000 RSLCnano (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
Injektionsvolumen	5 µL
Mobile Phase	A: Reinstwasser + 0,1 % (v v) Ameisensäure+ 5 % (v v) DMSO B: Acetonitril + 0,1 % (v v) Ameisensäure + 5 % (v v) DMSO
Trap-Säule	ReproSil-pur C18-AQ, 5 µm, 20 mm × 75 µm (self-packed, Dr. Maisch, Ammerbuch-Entringen)
Fließgeschwindigkeit Trap-Säule	5 µl/min
Fließmittel Trap-Säule	100 % A für 10 min

---

<b>System</b>	<b>Details</b>
Trennsäule	ReproSil Gold C18-AQ, 3 $\mu\text{m}$ , 450 mm $\times$ 75 $\mu\text{m}$ (self-packed, Dr. Maisch, Ammerbuch-Entringen)
Fließgeschwindigkeit Trennsäule	300 nL/min
Gradient	4 % – 32 % B in 50 min
Massenspektrometer	Q-Exactive HF-X (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
Polarität	Positiv
Scan-Bereich MS1	$m/z = 360 - 1300$
Signalverstärkung MS1	$3e^6$
Max. Ionen Injektionszeit (maxIT) MS1	45 ms
Auflösung MS1	60.000 $m/z$
Signalverstärkung MS2	$1e^5$
Max. Ionen Injektionszeit (maxIT) MS2	25 ms
Auflösung MS2	15.000 $m/z$

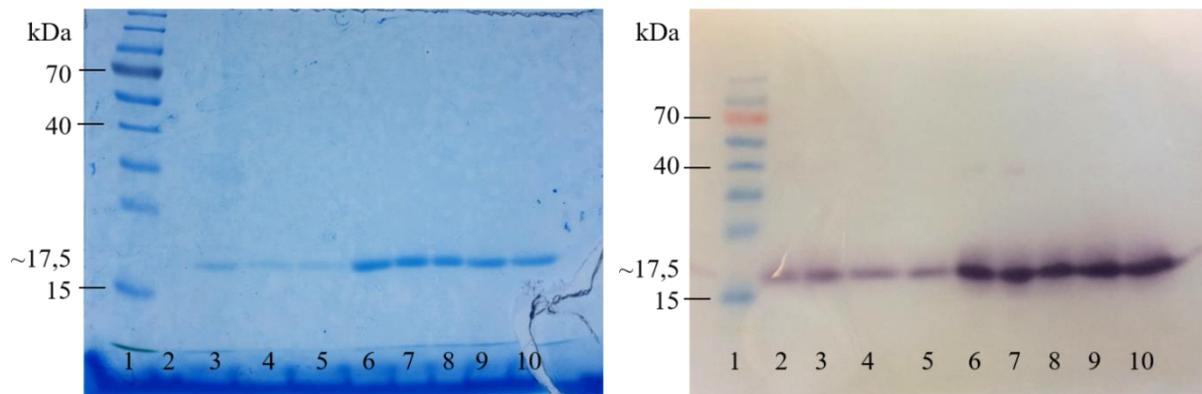
---

## 4 Ergebnisse

Teile der folgenden Ergebnisse wurden bereits publiziert (Romer *et al.*, 2020).

### 4.1 Biosynthese und Reinigung des rekombinanten Mal d 1

Rekombinantes rMal d 1 wurde in *E. coli* BL21(DE3)pLysS Zellen exprimiert. Da sowohl die Proteinausbeute ( $c_{\text{Elutionen(löslich)}} = \text{ca. } 200 \mu\text{g/mL}$  statt  $c_{\text{Elutionen(IB)}} = \text{ca. } 600 \mu\text{g/mL}$ ), wie auch die Reinheit der resultierenden Proteine aus der löslichen Fraktion der Zellen schlechter war, wurden für weitere Analysen ausschließlich das Mal d 1 aus den gebildeten Einschlusskörper (*engl. inclusion bodies, IB*) isoliert. Dafür wurden die IBs unter denaturierenden Bedingungen solubilisiert, durch Dialyse renaturiert und über Metallaffinitätschromatographie aufgereinigt. Ein Nachweis der Proteine erfolgte über SDS-Gelelektrophorese mit Coomassie-Färbung und Western Blot (Abbildung 7).



**Abbildung 7** SDS-Gel nach Coomassie-Färbung und Western Blot des rMal d 1. Die Proben wurden in einer Menge von 3  $\mu\text{g}$  pro Tasche in folgender Reihenfolge aufgetragen: **1** Proteinmarker 10-180 kDa, **2** Durchfluss, **3-5** Waschfraktionen, **6-10** rMal d 1-Elutionen.

Die Waschfraktionen zeigten nur schwach gefärbte Proteinbanden auf der erwarteten Höhe des rMal d 1 inklusive His<sub>6</sub>-Tag von ca. 17,5 kDa, während die Elutionsfraktionen deutlich stärkere Banden auf der gewünschten Höhe aufwiesen. Es waren keine weiteren Banden sichtbar, was auf eine hohe Reinheit des extrahierten Zielproteins schließen ließ. Der Western Blot, bei dem die Proteine mit dem polyklonalen anti-Mal d 1-Antikörper markiert und anschließend mit einem anti-Kaninchen-AP-Antikörper detektiert wurden, bestätigte die Reinheit des produzierten rMal d 1-Antigens. Im Durchfluss und den Waschfraktionen konnten lediglich geringe Mengen des rMal d 1 nachgewiesen werden, während die Banden in den

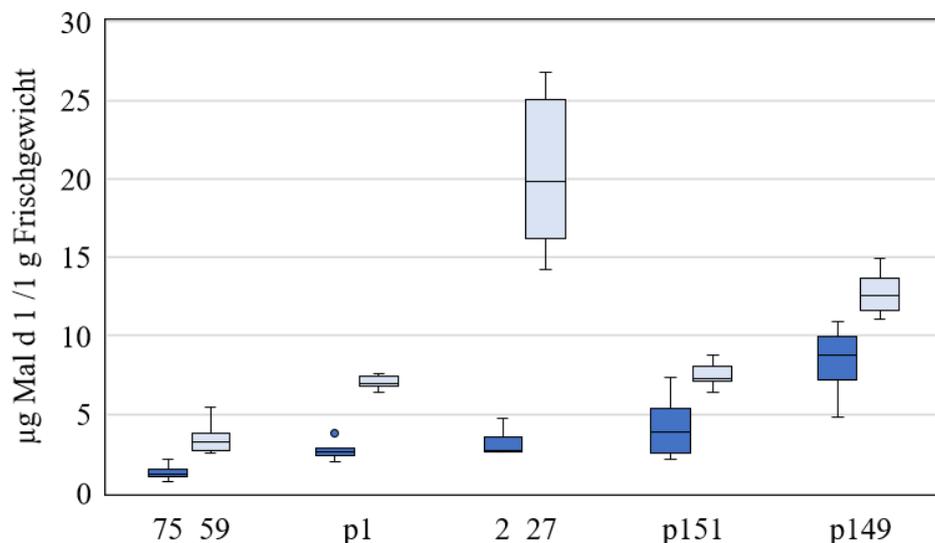
Elutionsfraktionen deutlicher sichtbar waren. Der Antikörper detektierte keine weiteren Proteine.

Durch die Dialyse gegen Natriumcarbonatpuffer (pH 9) und Gefriertrocknung konnte die Stabilität der Proteine deutlich verbessert werden. Es konnte dadurch verhindert werden, dass das rMal d 1 nach wenigen Tagen präzipitierten. Im getrockneten Zustand konnte es bei  $-20\text{ °C}$  über mehrere Monate gelagert werden. Es wurde sowohl als Antigen zur Produktion polyklonaler Antikörper durch Immunisierung von Kaninchen eingesetzt und im kompetitiven ELISA Test verwendet.

## 4.2 Bestimmung der Mal d 1-Konzentration mittels ELISA

### 4.2.1 Entwicklung und Optimierung der Proteinextraktion und des ELISA-Tests

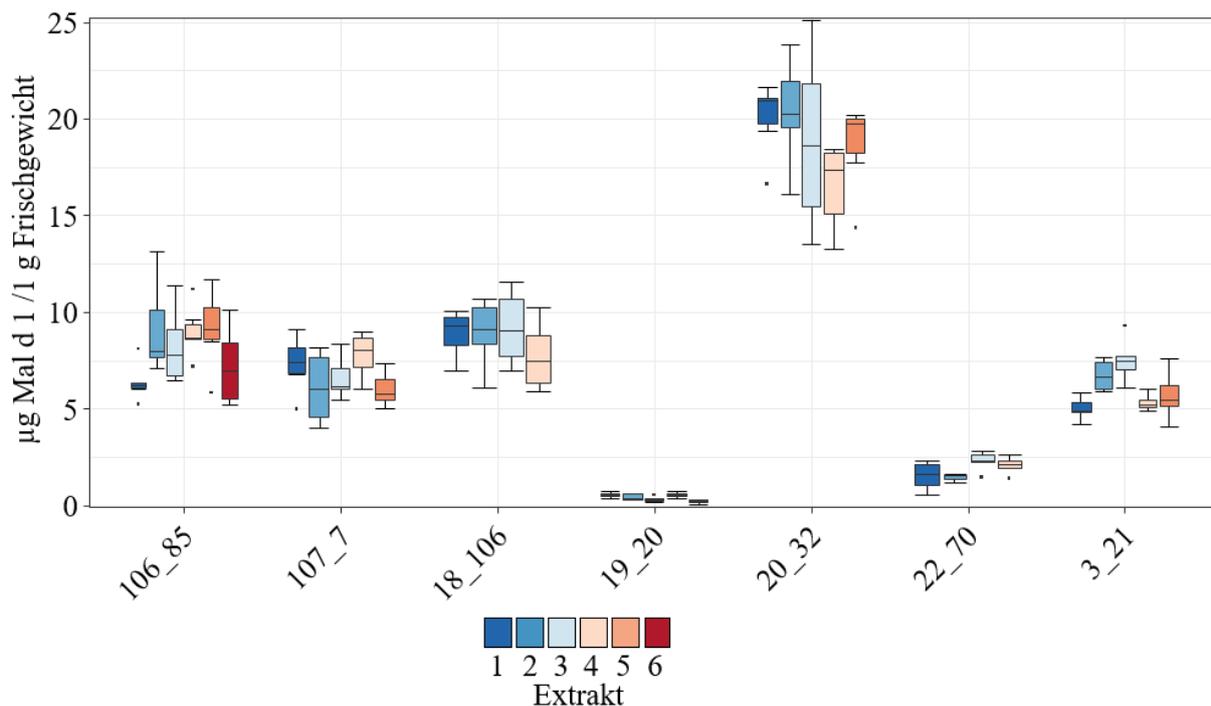
Eine Methode zur Proteinextraktion aus Äpfeln zur Analyse der Allergene wie Mal d 1 wurde bereits vor 40 Jahren beschrieben (Björkstén *et al.*, 1980) und seit dem mehrfach angewendet (Sancho *et al.*, 2006, Garcia *et al.*, 2007, Kurze *et al.*, 2018b). Dieses Protokoll führten jedoch nicht zu den gewünschten reproduzierbaren Ergebnissen (Abbildung 8). Die Schwankungen zwischen den einzelnen Extraktionen waren sehr groß und betrug, wie im Falle des Genotypes 2\_27, Variationen bis um das Fünffache.



**Abbildung 8 Schwankungen in Messergebnissen** Mal d 1-Gehalte in  $\mu\text{g/g}$  Frischgewicht (FG) von zwei Extrakten nach Björkstén *et al.* (1980) desselben Genotyps, gemessen an unterschiedlichen Tagen. Jede Box (biologische Replikate) setzt sich aus den Messwerten eines Messtages von sechs technischen Replikaten pro Platte zusammen.

Auch Varianten dieses Protokolls (Vassilopoulou *et al.*, 2007) und weitere bereits etablierte Extraktionsmethoden wie eine Extraktion mit einem Citratpuffer (Szamos *et al.*, 2011) oder Fällungsmethoden mit Trichloressigsäure oder eiskaltem Aceton erzielten keine reproduzierbaren Ergebnisse.

Daher wurde eine Proteinextraktion entsprechend der Aufarbeitung des rMal d 1 unter denaturierenden Bedingungen mit 6 M Harnstoff angewendet. Dies sollte eine hohe Vergleichbarkeit der Detektion des Mal d 1 aus Äpfeln und dem rMal d 1 zur Folge haben, da das rMal d 1 auch zur Produktion des polyklonalen Antikörpers eingesetzt wurde. Um dies näher zu untersuchen wurden mehrere Apfel-Genotypen der Selektionsstufe 1 mit Denaturierungspuffer bis zu sechsmal aufgearbeitet und der Mal d 1-Gehalt an unterschiedlichen Tagen gemessen (Abbildung 9).



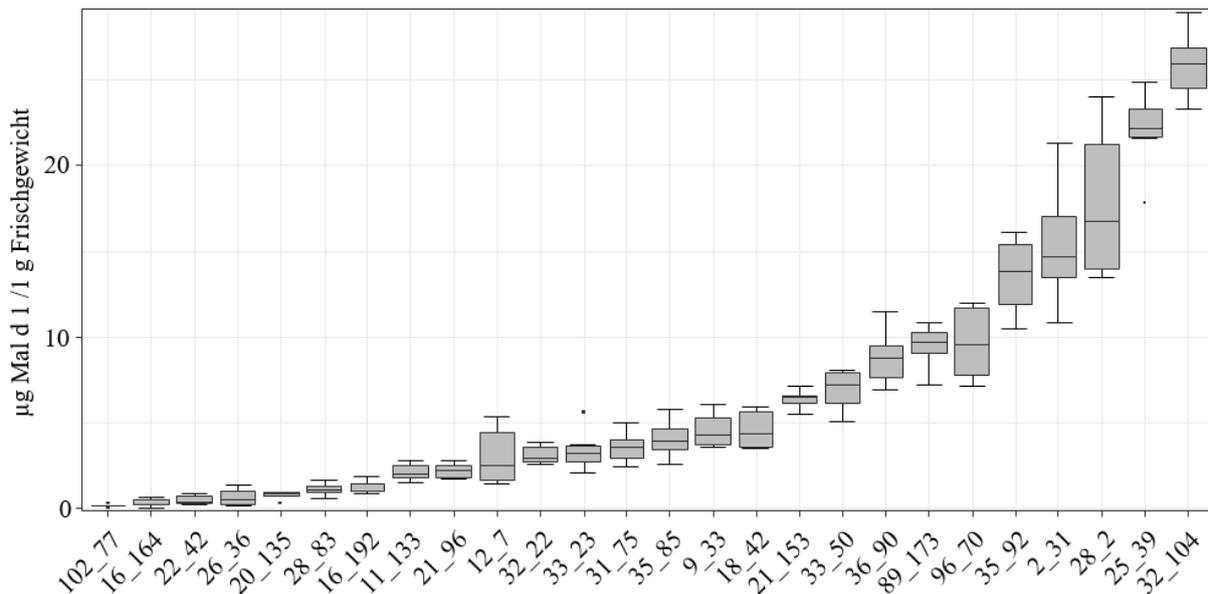
**Abbildung 9 Untersuchung der Reproduzierbarkeit des ELISA-Tests.** Mal d 1-Gehalte in µg/g Frischgewicht (FG) von mehreren Extrakten desselben Genotyps, gemessen an unterschiedlichen Tagen. Jede Box (biologische Replikate) setzt sich aus den Messwerten eines Messtages von sechs technischen Replikaten pro Platte zusammen.

Die Gehalte schwankten zwischen den Messungen leicht, jedoch konnten keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Messwerte eines Genotyps festgestellt werden. Die Unterschiede zwischen den Genotypen untereinander waren deutlich größer. Genotyp 19\_20 wies einen reproduzierbar niedrigen Mal d 1-Gehalt zwischen 0,21 µg/g und 0,47 µg/g FG auf, während die Konzentrationen von 20\_32 bei allen untersuchten Extrakten im Mittel zwischen 17,1 µg/g und 21,2 µg/g FG lagen. Die Genotypen 106\_85, 107\_7, 18\_106 und 3\_21 lagen

zwischen 5 µg/g und 10 µg/g FG. Bei Genotyp 22\_70 konnte ein Mal d 1-Gehalt von 1,7 µg/g bis 2,4 µg/g FG detektiert werden.

#### 4.2.2 Selektionsstufe 1

Nach den Reproduzierbarkeitsversuchen wurde eine Vielzahl weiterer Genotypen der Selektionsstufe 1 bezüglich ihres Mal d 1-Gehaltes untersucht. Ausgewählte Ergebnisse dieser Untersuchung aus dem Erntejahr 2016 sind in Abbildung 10 dargestellt, weitere Resultate der Erntejahre 2016 und 2017 sind im Anhang 1 und Anhang 2 aufgelistet.

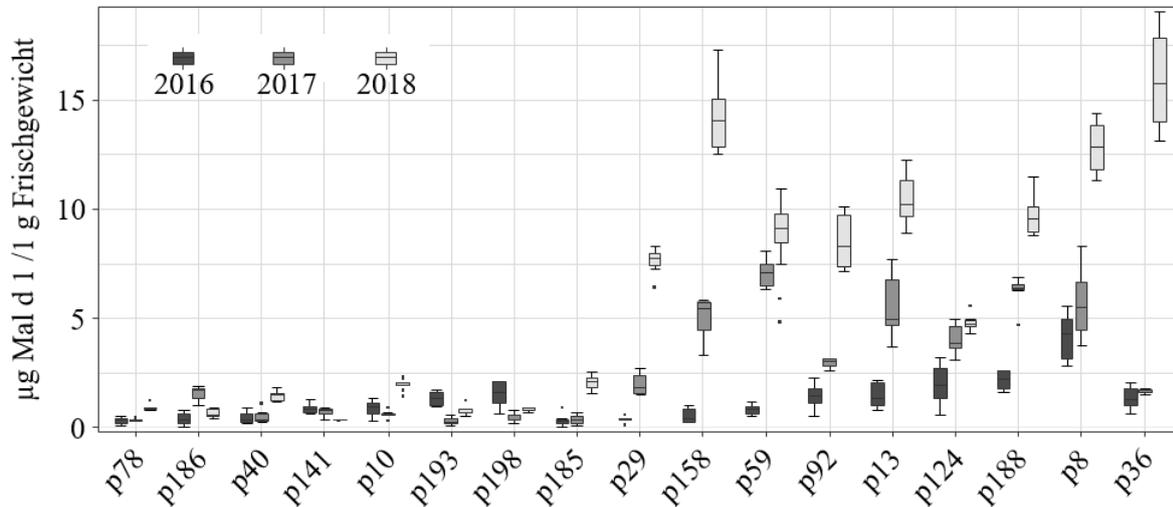


**Abbildung 10 Mal d 1-Gehalte ausgewählter Genotypen der Selektionsstufe 1.** Die Genotypen wurden 2016 geerntet und der Mal d 1-Gehalt (µg/g Frischgewicht) mittels ELISA bestimmt. Die Werte sind nach aufsteigendem Allergengehalt aufgetragen. Die Box setzt sich aus den Werten von mindestens sechs technischen Replikaten zusammen.

Selektionsstufe 1 umfasst alle fruchttragenden Nachkommen der Kreuzungspopulationen. Das Ergebnis verdeutlicht somit die große biologische Variabilität der Mal d 1-Gehalte in den verschiedenen Genotypen und lässt darauf schließen, dass durch gezielte Selektion die Reduktion des Mal d 1-Gehaltes möglich sein sollte. Die Werte variierten zwischen 0,13 µg/g FG für Genotyp 102\_77 und 26 µg/g Frischgewicht (FG) für Genotyp 32\_104. Dabei zeigten die meisten analysierten Apfelgenotypen einen Mal d 1-Gehalt unter 10 µg/g FG. Die Varianz zwischen den einzelnen technischen Replikaten ist dabei sehr gering.

### 4.2.3 Selektionsstufe 2

Bei der Selektionsstufe 2 wurden die Genotypen aus bis zu drei Erntejahren 2016, 2017 und 2018 auf den Mal d 1-Gehalt hin untersucht. Ausgewählte Genotypen und ihre Allergenkonzentrationen finden sich in Abbildung 11. Die Mal d 1-Gehalte weiterer untersuchter Genotypen sind im Anhang 3 dargestellt.



**Abbildung 11** Ausgewählte Apfelgenotypen der Selektionsstufe 2 welche drei Jahre in Folge mittels indirekt kompetitivem ELISA-Tests auf den Gesamtgehalt an Mal d 1 ( $\mu\text{g/g}$  Frischgewicht) untersucht wurden. Die Größe der Box setzt sich aus den Messwerten von mindestens sechs technischen Replikaten zusammen.

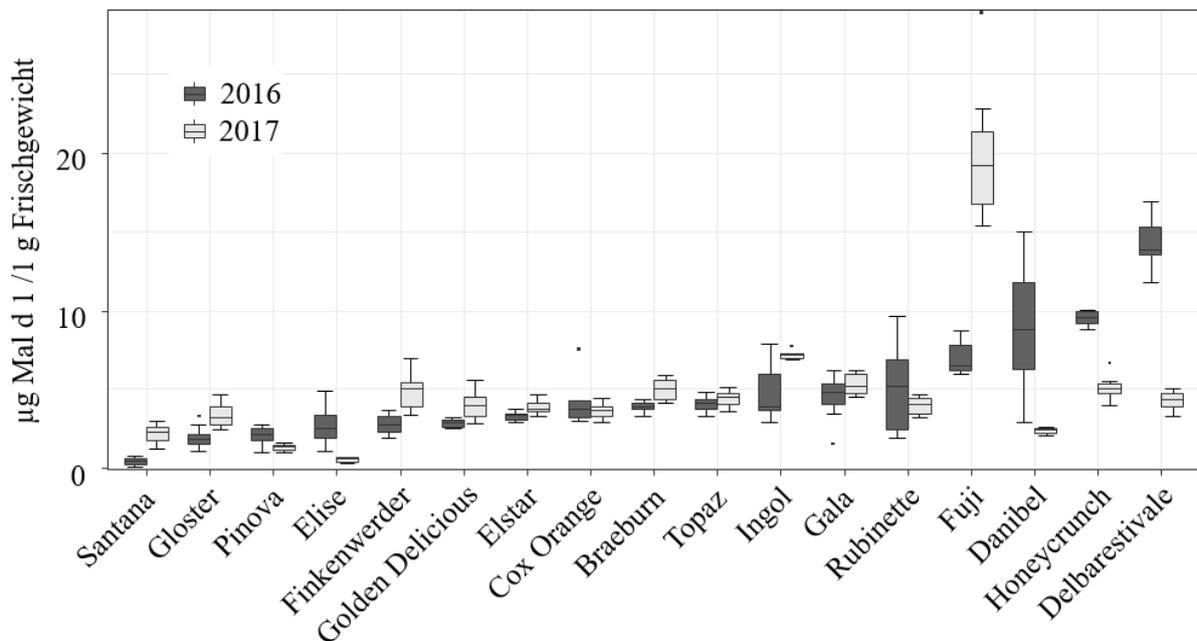
Die Mal d 1-Gehalte der ausgewählten Sorten schwankten zwischen  $0,4 \mu\text{g/g}$  FG für p78 des Erntejahres 2016 und  $15,3 \mu\text{g/g}$  FG für p36 des Erntejahres 2018.

Auffällig war, dass der Mal d 1-Gehalt derselben Genotypen zwischen den unterschiedlichen Erntejahren teilweise sehr stark variierte. Während Genotypen wie p78, p186 und p40 über alle drei Erntejahre gleichbleibend niedrige Mal d 1-Gehalte aufwiesen, zeigten andere Genotypen wie p29, p158 oder p8 starke Unterschiede. Dabei war der Allergengehalt tendenziell im Erntejahr 2016 am niedrigsten, gefolgt von 2017 während in 2018 die höchsten Gehalte gemessen wurden. Genotyp p158 ließ besonders große Schwankungen mit  $0,6 \mu\text{g/g}$  FG in 2016,  $4,9 \mu\text{g/g}$  FG in 2017 und  $13,7 \mu\text{g/g}$  FG in 2018 erkennen. Bei p124 waren die Unterschiede deutlich geringer, wenn auch dieselbe Tendenz ersichtlich wurde. Hier lagen die ermittelten Mal d 1-Gehalte bei  $1,9 \mu\text{g/g}$  in 2016,  $4,0 \mu\text{g/g}$  in 2017 und  $4,7 \mu\text{g/g}$  im Jahr 2018. Genotyp p36 wies in den ersten beiden Untersuchungsjahren gleichbleibende Gehalte auf ( $1,5 \mu\text{g/g}$  bzw.  $1,6 \mu\text{g/g}$  FG), jedoch steig dieser im Jahr 2018 um das 9,5-fache auf  $15,3 \mu\text{g/g}$  FG an.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass in einigen Genotypen Mal d 1 in niedriger Konzentration, unabhängig von Umwelteinflüssen produziert wird, während die Akkumulation des PR10-Proteins in anderen Genotypen vermutlich sehr stark von Umweltfaktoren abhängt.

#### 4.2.4 Mal d 1-Gehalte ausgewählter Elternsorten

Neben den Genotypen der Kreuzungspopulationen wurde auch der Mal d 1-Gehalt von einigen Elternsorten aus den Erntejahren 2016 und 2017 mittels des ELISA-Tests untersucht (Abbildung 12).



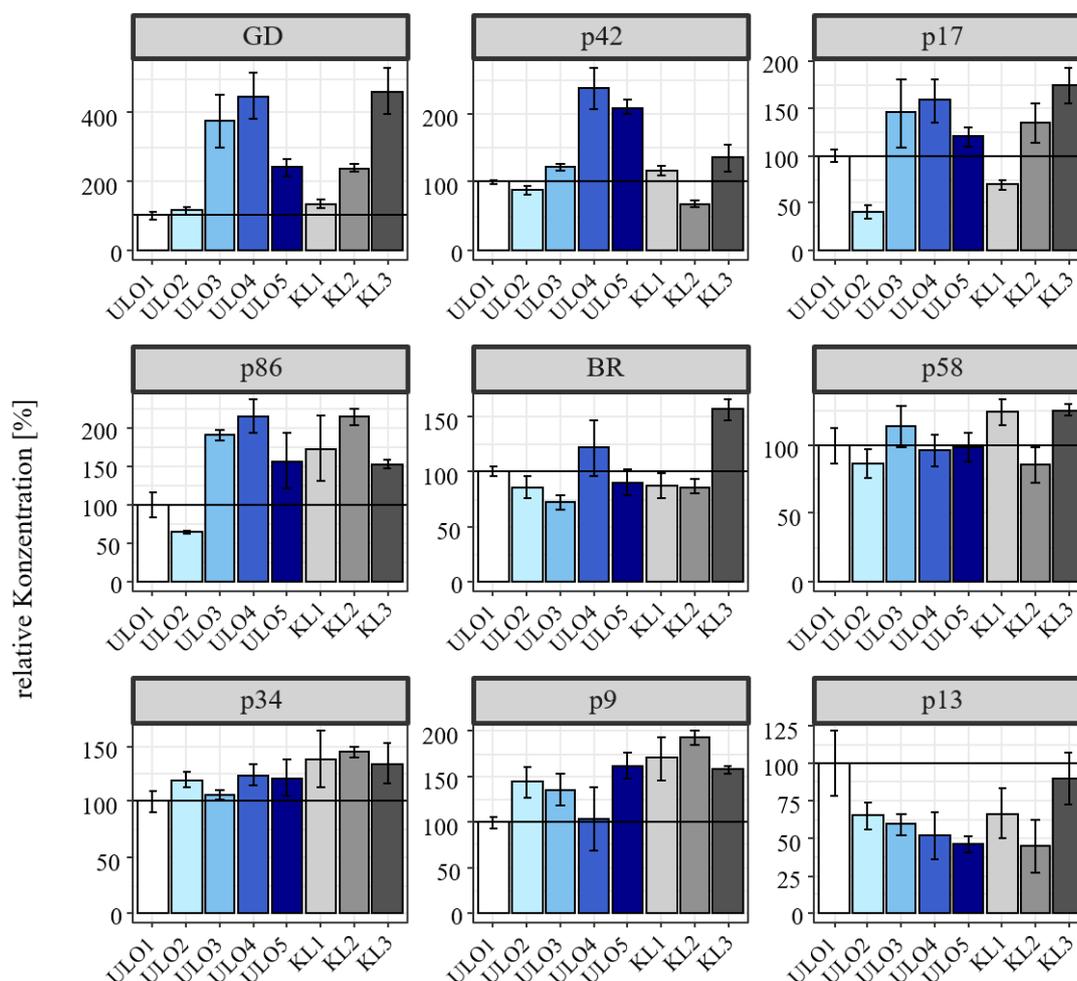
**Abbildung 12 Mal d 1-Gehalte einiger Elternsorten.** Die Sorten stammen aus den Erntejahren 2016 (dunkelgrau) und 2017 (hellgrau) und sind nach aufsteigendem Mal d 1-Gehalt ( $\mu\text{g/g}$  Frischgewicht) des Erntejahres 2016 sortiert. Die Größe der Box setzt sich aus den Messwerten von mindestens sechs Replikaten zusammen.

Die Mal d 1 Gehalte variierten, wie auch schon die bei den Genotypen der Kreuzungspopulationen, in einem Bereich von  $0,5 \mu\text{g/g}$  FG für 'Santana' im Jahr 2016 und  $19,2 \mu\text{g/g}$  FG für die Sorte 'Fuji' in 2017. Die meisten Mal d 1-Gehalte bewegten sich jedoch auch hier, in beiden Erntejahren, in einem Bereich von bis zu  $10 \mu\text{g/g}$  FG. Dabei wiesen einige Sorten, wie 'Elstar' oder 'Cox Orange', einen gleichbleibenden Mal d 1-Gehalt in beiden Erntejahren auf. Manche Elternsorten zeigten einen großen Unterschied im Mal d 1-Gehalt zwischen den Jahren auf. Die Sorte 'Fuji', deren Median des Mal d 1-Gehalt im Jahr 2016 bei  $6,4 \mu\text{g/g}$  FG lag, wies im darauffolgenden Jahr 2017 einen Gehalt von  $19,2 \mu\text{g/g}$  FG auf. Im Gegensatz dazu war der Mal d 1-Gehalt der Sorten 'Danibel', 'Honeycrunch' und 'Delbarestivale' im Jahr 2017 deutlich geringer als in 2016. Die Sorten 'Santana' und 'Elise',

welche bekanntermaßen von Allergikern gut vertragen werden, zeigten in dieser Untersuchung auch sehr niedrige Allergengehalte. Dies galt nicht für 'Golden Delicious'. Trotz des allgemein bekannten hohen Allergiepentials konnte in beiden Erntejahren ein verhältnismäßig niedriger Mal d 1-Gehalt von unter 6 µg/g FG gemessen werden.

#### 4.2.5 Lagerungsstabilitätstest und Einfluss auf den Mal d 1-Gehalt

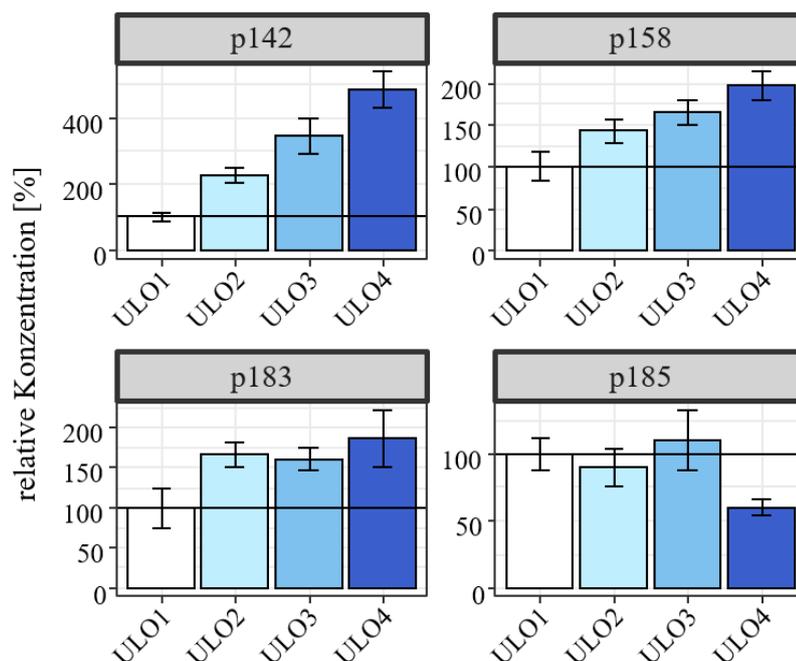
Da sich nachgewiesenermaßen der Mal d 1-Gehalt von Äpfeln während der Lagerung verändert (Sancho *et al.*, 2006, Matthes und Schmitz-Eiberger, 2009, Kiewning und Schmitz-Eiberger, 2014), wurden an der Hochschule Osnabrück im Jahr 2016 und 2017 Lagerungsstudien durchgeführt und die Veränderung des Mal d 1 Gehaltes unter ULO-Bedingungen wie auch bei einer Überlagerung der Früchte im Kühllager untersucht (Abbildung 13).



**Abbildung 13** Entwicklung des Mal d 1-Gehaltes während der Lagerung 2016. Die Genotypen der Kreuzungspopulationen und zwei Standardsorten 'Golden Delicious' (GD) und 'Braeburn' (BR) wurden 2016 geerntet und unter zwei verschiedenen Bedingungen gelagert. ULO = *ultra-low oxygen* (blau, Auslagerungszeitpunkte 1-5), KL = Kühllagerung (grau, Auslagerungszeitpunkte 1-3). Detaillierte Angaben zu den Auslagerungszeitpunkten sind in Tabelle 14 aufgelistet. Die Werte sind auf den Gehalt an Mal d 1 zum Zeitpunkt ULO1 des jeweiligen Genotyps normalisiert.

Die Vergleichssorte 'Golden Delicious' zeigte unter beiden Lagerungsbedingungen einen starken Anstieg der Mal d 1-Konzentration über den gesamten Zeitraum. Dabei stieg der Gehalt um mehr als das Vierfache des ursprünglichen Gehaltes an. Auch bei den Genotypen p42, p17 und p86 war ein Anstieg der Mal d 1-Konzentration im Laufe der Lagerungszeit feststellbar. Bei p42 war dieser Anstieg jedoch hauptsächlich unter den ULO-Lagerungsbedingungen zu erkennen. Während der KL blieb der Gehalt über den Zeitraum weitestgehend konstant. Einige Genotypen zeigten im Gegensatz dazu kaum Veränderungen im Allergengehalt während der Lagerung. Bei der Vergleichssorte 'Braeburn' konnte lediglich ein geringer Anstieg von 50 % zum Zeitpunkt KL3 festgestellt werden. Die Genotypen p58, p34 und p9 zeigten über den gesamten Zeitraum unter beiden Lagerungsbedingungen keine signifikanten Änderungen, die auf eine generelle Tendenz der Entwicklung hindeuten würde. Die Schwankungen waren auf die natürliche Varianz zwischen den biologischen Replikaten zurückzuführen. Auffällig war der Genotyp p13, der als einziger eine kontinuierliche Abnahme der Mal d 1-Konzentration während der Lagerung aufwies. Im KL war kein Trend erkennbar, jedoch reduzierte sich der Gehalt im ULO-Lager kontinuierlich auf etwa 50 % der ursprünglichen Konzentration.

Im Erntejahr 2017 wurden ausschließlich Äpfel auf ihre Lagerungsstabilität unter ULO-Bedingungen untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt.

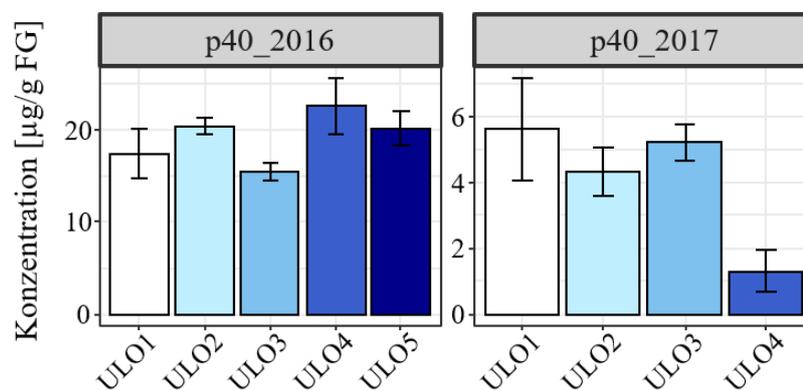


**Abbildung 14** Entwicklung des Mal d 1-Gehaltes während der Lagerung 2017. Die Genotypen wurden 2017 geerntet und unter ULO-Bedingungen gelagert. Die Werte sind auf den Mal d 1-Gehalt zum Zeitpunkt ULO1 des jeweiligen Genotyps normalisiert. Die Fehlerbalken setzen sich aus den Werten von mindestens 6 technischen Replikaten zusammen.

Dabei zeigte der Genotyp p142 einen starken Anstieg des Mal d 1-Gehaltes während des gesamten Zeitraumes. Der Gehalt an Mal d 1 stieg konstant bis zu einem fünffachen der ursprünglichen Konzentration. Eine ebenfalls sehr gleichmäßige Zunahme des Mal d 1-Gehalts konnte bei dem Genotyp p158 ermittelt werden, jedoch war die Gesamtzunahme nach vier Auslagerungszeitpunkten deutlich geringer. Der Gehalt verdoppelte sich nur. Der Mal d 1-Gehalt von p183 stieg zunächst leicht an und blieb dann konstant, während p185 zunächst gleichbleibende Mal d 1 Werte zeigte und diese gegen Ende der Lagerungszeit leicht abnahmen.

Zusammenfassend ließ sich eine starke Abhängigkeit der Lagerungsstabilität des Mal d 1-Gehaltes vom Genotyp feststellen. Zudem konnte eine geringere Abhängigkeit von den Lagerungsbedingungen ermittelt werden.

Beim Vergleich der Mal d 1-Konzentrationen bei der Lagerung eines Genotyps (p40) während zweier Jahre (2016 und 2017) zeigten sich deutliche Unterschiede (Abbildung 15).



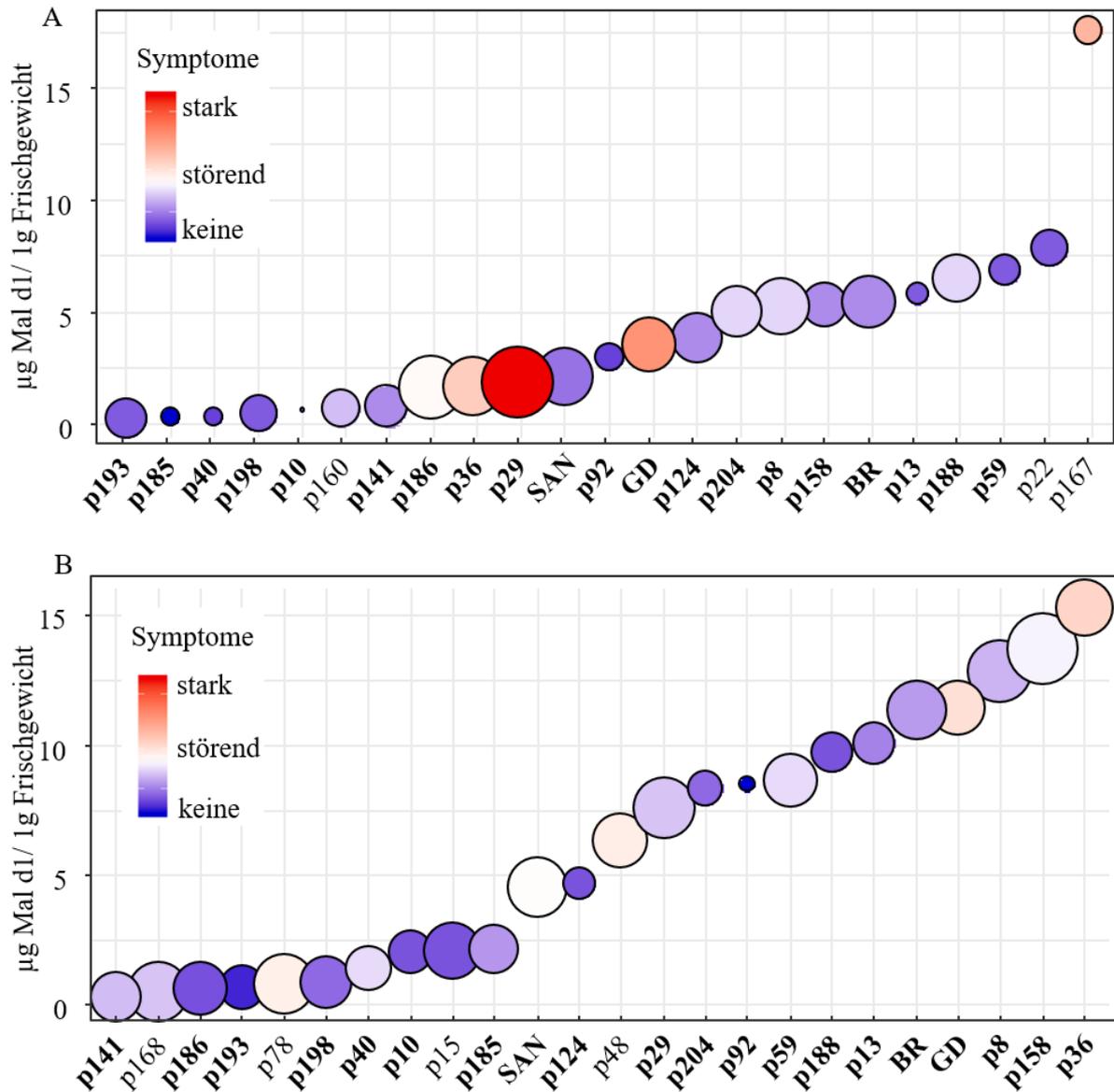
**Abbildung 15 Genotyp p40 bei ULO-Lagerung. Vergleich 2016 und 2017** Konzentrationen in µg/g FG. Sie sind normiert auf den Gehalt an Mal d 1 zum Zeitpunkt der Auslagerung von ULO1. Die Fehlerbalken setzen sich aus den Werten von mindestens 6 technischen Replikaten zusammen.

Während 2016 der Mal d 1-Gehalt über den gesamten Lagerungszeitraum konstant zwischen 15 µg/g FG und 20 µg/g FG lag, zeigte der identische Genotyp im folgenden Erntejahr 2017 einen deutlich niedrigeren Gehalt von knapp 6 µg/g FG mit einer fallenden Tendenz während der Lagerung.

### 4.3 Humanstudie mit Provokationstest

Um die Verträglichkeit ausgewählter Apfel-Genotypen zu testen, die gemäß den ELISA-Untersuchungen niedrige Mal d 1 Gehalte aufwiesen wurden an der Charité in Berlin Humanstudien durchgeführt in dessen Rahmen Allergiker mit einem Oralen Allergiesyndrom

bei Birkenpollenallergie diese Kandidaten in Provokationstests verkosteten. Die Rohdaten wurden anschließend graphisch ausgewertet und die Ergebnisse der Erntejahre 2017 und 2018 mit den Resultaten der ELISA-Tests verglichen (Abbildung 16).



**Abbildung 16 Ergebnisse der Provokationstest der Humanstudie.** Die Mal d 1-Gehalte, bestimmt mittels ELISA der jeweiligen Genotypen der Kreuzungspopulationen und der drei Vergleichssorten 'Santana' (SAN), 'Golden Delicious' (GD) und 'Braeburn' (BR) des Erntejahrs 2017 [A], und 2018 [B], sind nach aufsteigendem Mal d 1-Gehalt sortiert. Die Farbe stellt die Stärke der Symptome der Allergiker dar. Die Größe der Kreise beschreibt die Varianz der Symptome der einzelnen Patienten. Genotypen, die in beiden Jahren untersucht wurden, sind fett gedruckt (Romer *et al.*, 2020).

Bei den ausgewählten Genotypen des Erntejahrs 2017 (Abbildung 16A) lag der Mal d 1-Gehalt meist unter  $10 \mu\text{g/g}$  FG. Der Genotyp p167 wies mit einem Mal d 1-Gehalt von  $17,6 \mu\text{g/g}$  FG einen höheren Allergengehalt auf und wurde daher als Vergleichsgenotyp mit

einem hohen Allergengehalt bei der Studie mitgeführt. Nach dem Verzehr der meisten Äpfel traten keine, oder nur schwache Symptome bei den Probanden auf.

Jedoch gab es Genotypen, nach deren Verzehr einige Probanden deutliche Reaktionen zeigten. Der Genotyp p29 löste mit Abstand die gravierendsten Symptome bei den Patienten aus, die diese meist als Anschwellen der Mundschleimhaut, starkes Jucken und Kribbeln an der Zunge, dem Rachenraum und den Lippen oder tränende Augen beschrieben. In einigen Fällen traten multiple Reaktionen auf. So lag die durchschnittliche Bewertung der Symptome aller Patienten nach der Bewertungsskala (Kapitel 3.2.9) bei 3,6. Wenn multiple Symptome auftraten, wurden diese bei jedem Patienten einzeln berücksichtigt und aufaddiert. Der Allergengehalt von p29 lag jedoch deutlich im unteren Bereich der untersuchten Genotypen mit 1,84 µg/g FG. Auch p36, 'Golden Delicious' und p167 lösten bei den Patienten mittelstarke bis starke Symptome aus mit durchschnittlichen Bewertungen von 2,3 für p36 bzw. 2,8 für 'Golden Delicious' und 2,5 für p167.

Am besten vertragen wurden die Genotypen p185, p40 und p92. Bei p185 zeigten 90 % der Patienten keine klinisch relevanten Symptome. Auch der Allergengehalt von p185 war mit 0,29 µg/g FG sehr niedrig.

Identische Genotypen, die in 2018 geerntet wurden, wiesen tendenziell einen höheren Mal d1-Gehalt auf, als im Vorjahr. Die Mal d1-Gehalte der untersuchten Genotypen variierten zwischen 0,33 µg/g FG (p141) bis zu 15,29 µg/g FG (p36). Die allgemeine Verträglichkeit der untersuchten Genotypen war im Jahre 2018 jedoch deutlich besser. Keiner der Genotypen zeigte extrem starke, nicht tolerierbare Symptome bei den Patienten. Genotyp p29, der in 2017 sehr starke allergische Reaktionen auslöste, wurde in 2018 deutlich besser vertragen und wurde durchschnittlich mit einer 1,4 bewertet. Die untersuchten Proben p36 und 'Golden Delicious', die 2017 ebenfalls starke Symptome auslösten, zeigten von allen untersuchten Genotypen auch 2018 die stärksten Symptome, jedoch wurden diese, mit einer 2,0 für p26 und 1,9 bei 'Golden Delicious', deutlich geringer beurteilt.

Auch 2018 gab es sehr gut verträgliche Genotypen, wie p193 und p92, deren Symptome nach dem Verzehr durchschnittlich mit 0,6 bzw. 0,7 bewertet wurden.

Im direkten Vergleich der beiden Studienjahre wurden die Unterschiede in der Verträglichkeit und dem Allergengehalt deutlich. Die Genotypen p185, p40 und p59 blieben in der Mal d 1-Konzentration weitestgehend konstant und auch die Symptome waren in beiden Jahren vergleichbar niedrig. Die vergleichbare Symptomatik konnte auch bei p36 ermittelt werden, jedoch unterschied sich hierbei der Mal d 1-Gehalt extrem. 2018 war dieser mehr als 10-mal so hoch bei über 20 µg/g FG. Die Genotypen p92, 'Golden Delicious' und p29 zeigten

alle zwar einen höheren Mal d 1-Gehalt im Jahr 2018, jedoch lösten sie im zweiten Untersuchungsjahr deutlich geringere Symptome aus. Lediglich bei 'Santana', waren die Symptome im Jahr 2018 bei nahezu allen Probanden stärker.

**Tabelle 17** Liste der für die weitere Züchtung geeigneten Apfelgenotypen mit den Kriterien einer konstant guten Verträglichkeit über beide Erntejahre wie auch ein möglichst niedriger Mal d 1-Gehalt

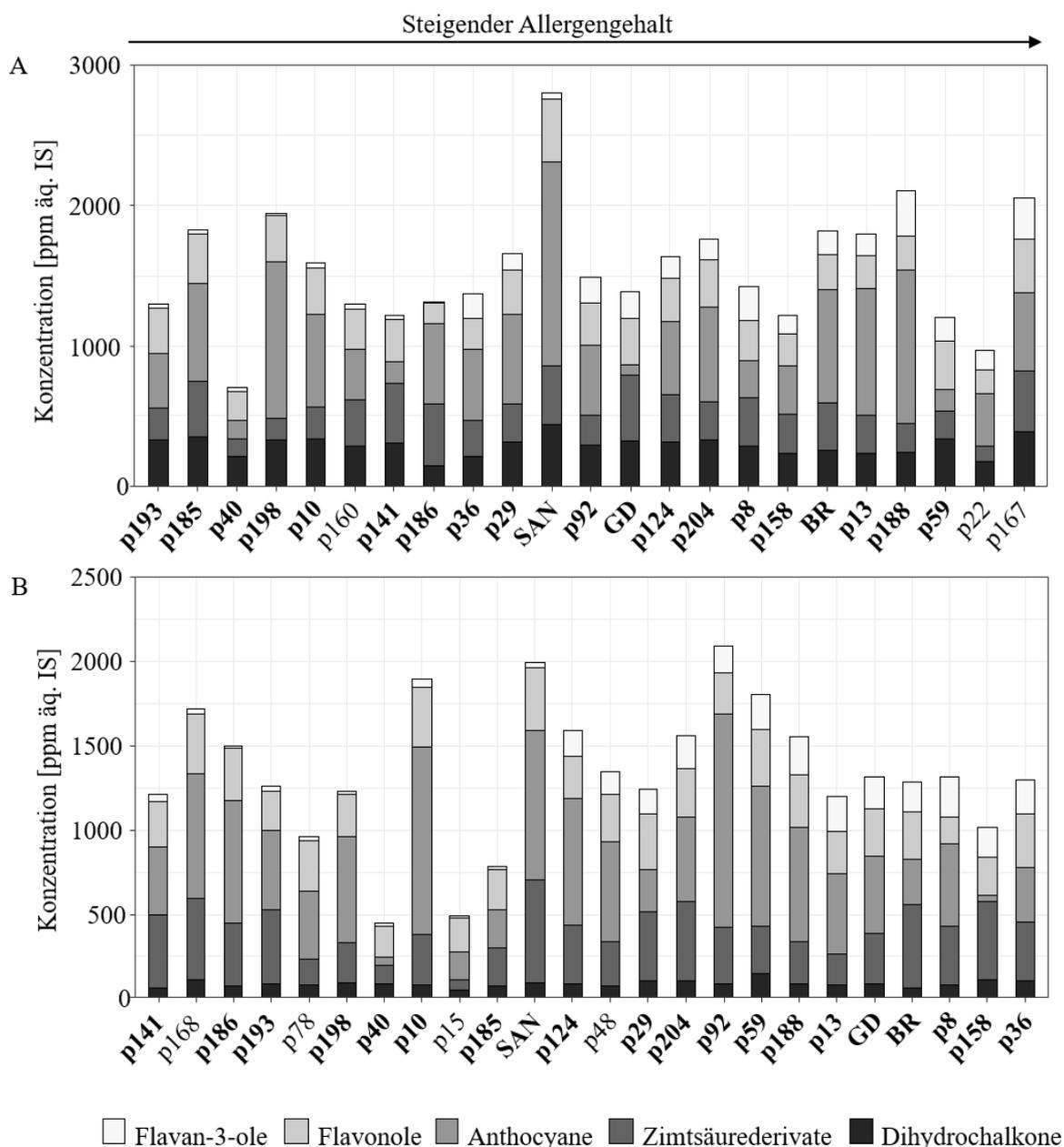
<b>Genotyp</b>	<b>Mal d 1-Gehalt</b>	<b>Verträglichkeit</b>	<b>Geeignet für Züchtung</b>
p10	niedrig	++	++
p185	niedrig	++	++
p193	niedrig	++	++
p198	niedrig	++	++
p92	mittlerer Bereich	++	+

Sowohl aus den Untersuchungen von 2017 als auch 2018 wurde deutlich, dass der Mal d 1-Gehalt, der mit Hilfe des ELISA-Tests quantifiziert wurde, nicht als alleiniges Kriterium für die Beurteilung der Verträglichkeit von Apfelgenotypen durch Allergiker herangezogen werden kann. Eine Berechnung der Korrelationskoeffizienten dieser beiden Parameter unter Verwendung des Spearman Rangkorrelation ergab einen Koeffizienten von 0,27 im Jahre 2017 und 0,29 im Jahre 2018, d.h. die Daten korrelieren nicht direkt miteinander.

#### 4.4 Analyse der Polyphenol-Zusammensetzung mittels LC-MS

Mittels LC-MS wurde von den 23 in der Humanstudie getesteten Genotypen der Polyphenolgehalt bestimmt und 24 Einzelsubstanzen aus fünf Polyphenoluntergruppen identifiziert. Diese wurden mit Hilfe eines internen Standards, Biochanin A, relativ quantifiziert (Abbildung 17).

Der relative Polyphenolgehalt der Genotypen schwankte zwischen den Genotypen von weniger als 500 ppm äq. IS für Genotyp p40 des Erntejahres 2018 und 2800 ppm äq. IS von 'Santana' aus 2017. Es traten Unterschiede sowohl zwischen den Genotypen, als auch zwischen den Erntejahren auf. Genotyp p40 wies in beiden Jahren einen niedrigen Gesamtpolyphenolgehalt auf, während für 'Santana' in beiden Jahren relativ hohe Gehalte ermittelt wurden. Jedoch zeigte p185 im Jahre 2017 einen hohen Polyphenolgehalt, während er 2018 zu den Äpfeln mit niedrigem Polyphenolgehalt zählte.

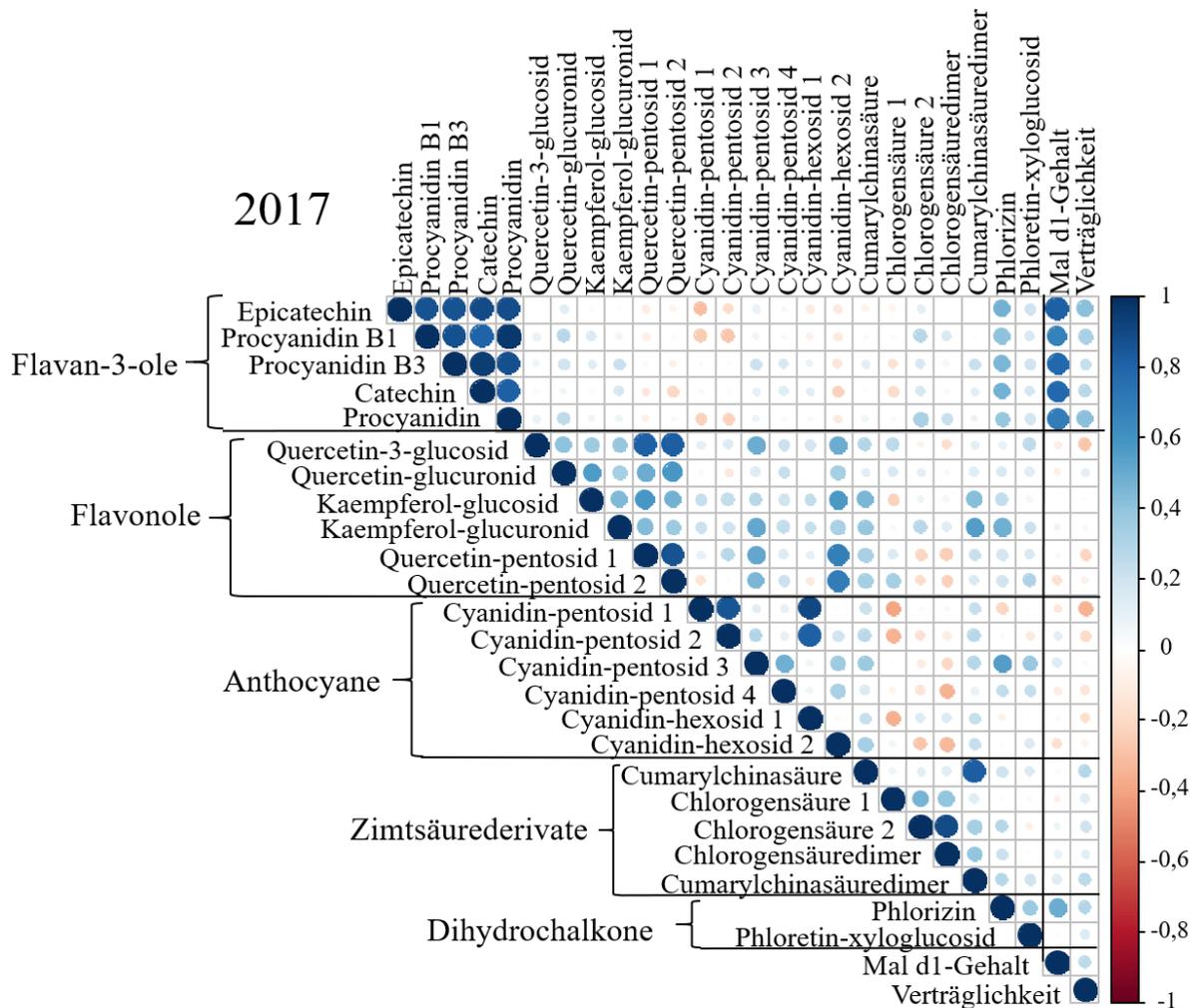


**Abbildung 17 Gesamtpolyphenolgehalte ausgewählter Genotypen** der Kreuzungspopulationen und drei Vergleichssorten 'Santana' (SAN), 'Braeburn' (BR) und 'Golden Delicious' (GD). Die Genotypen sind aufsteigend nach dem Mal d 1-Gehalt sortiert. Die Genotypen, die in beiden Jahren untersucht wurden, sind fett gedruckt. **A** Proben aus dem Erntejahr 2017, **B** Proben aus dem Erntejahr 2018. Die Gehalte wurden durch Aufsummieren der Einzelsubstanzen berechnet.

Um die Zusammenhänge zwischen den einzelnen polyphenolischen Substanzen und dem Allergengehalt bzw. der Verträglichkeit aus den Humanstudien näher zu beleuchten wurden Korrelationskoeffizienten unter Zuhilfenahme der Spearman Rangkorrelation berechnet (Abbildungen 18 und 19).

Zur Berechnung wurden die Mal d 1-Konzentration und die Verträglichkeit aller in der Humanstudie getesteten Genotypen und Vergleichssorten einbezogen, wie auch die

Konzentrationen aller polyphenolischen Substanzen, welche in technischen Triplikaten bestimmt wurden.

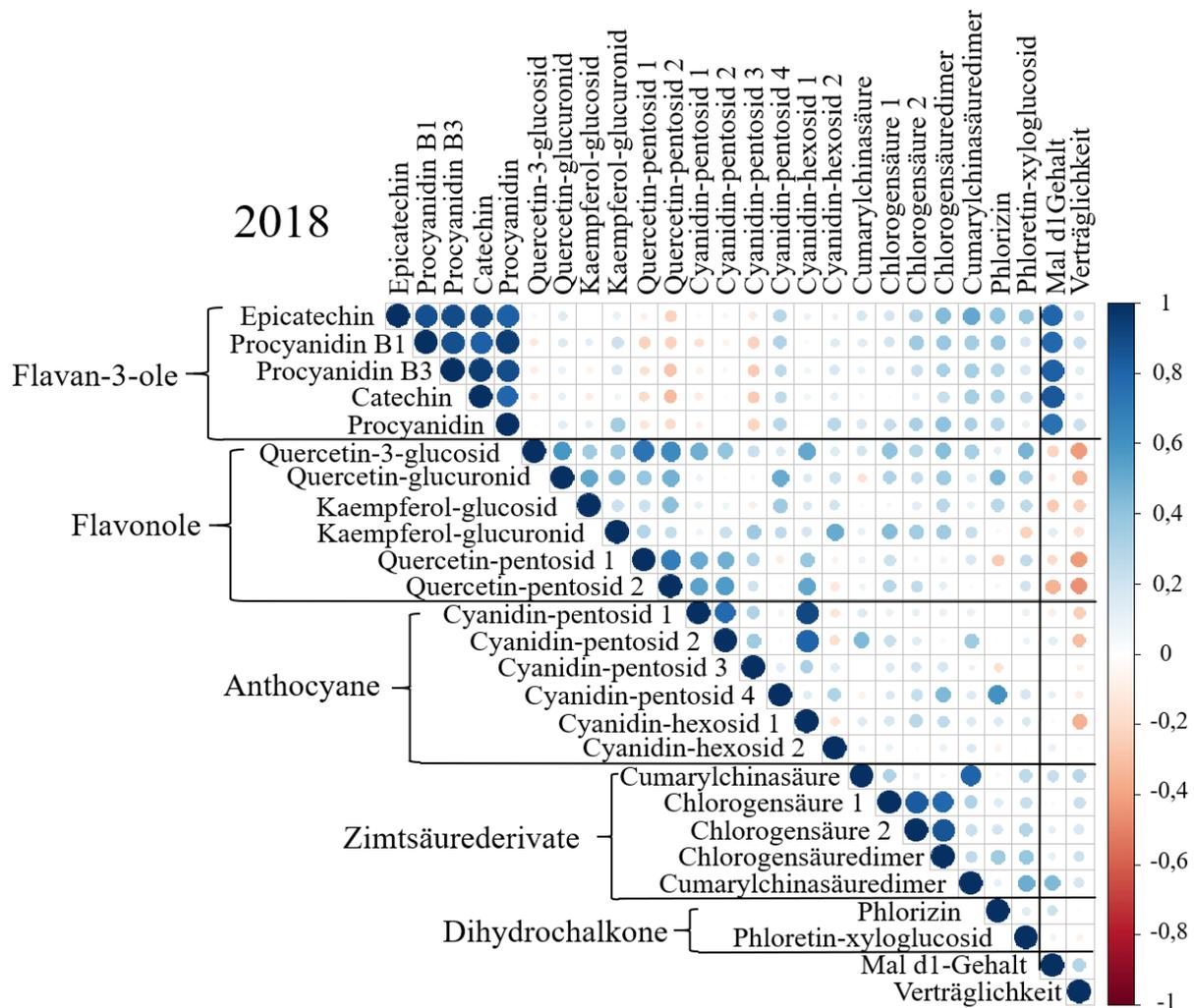


**Abbildung 18 Korrelationsdiagramm der Polyphenole 2017.** Korrelationskoeffizienten aller quantifizierten Polyphenole, des Mal d 1-Gehaltes und der Verträglichkeit. Berechnet mit der Spearman Rangkorrelation unter Berücksichtigung von 23 Genotypen. Die Größe der Punkte stellt den Wert des Korrelationskoeffizienten dar. Die Farbe beschreibt sowohl den Wert als auch das Vorzeichen dieses Koeffizienten (Romer *et al.*, 2020).

Mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,82 – 0,97 waren die Flavan-3-ol-Gehalte stark voneinander abhängig. Auch die Gehalte der einzelnen Flavonole korrelierten untereinander, jedoch nicht in einem so starken Maße. Lediglich Quercetin-3-glucosid und die Quercetin-pentoside zeigten ebenfalls einen starken positiven Zusammenhang mit Korrelationskoeffizienten von 0,81. Für die weiteren Polyphenolgruppen wurden keine relevanten Korrelationen beobachtet. Die Unterschiede der Gehalte der einzelnen Polyphenole waren stark vom Genotyp abhängig (siehe Anhang 4 bis Anhang 7). Bezogen auf die Verträglichkeit und den Mal d 1-Gehalt zeigte die Matrix ausschließlich eine starke positive Korrelation zwischen dem Mal d 1-Gehalt und den einzelnen Flavan-3-olen mit einem durchschnittlichen

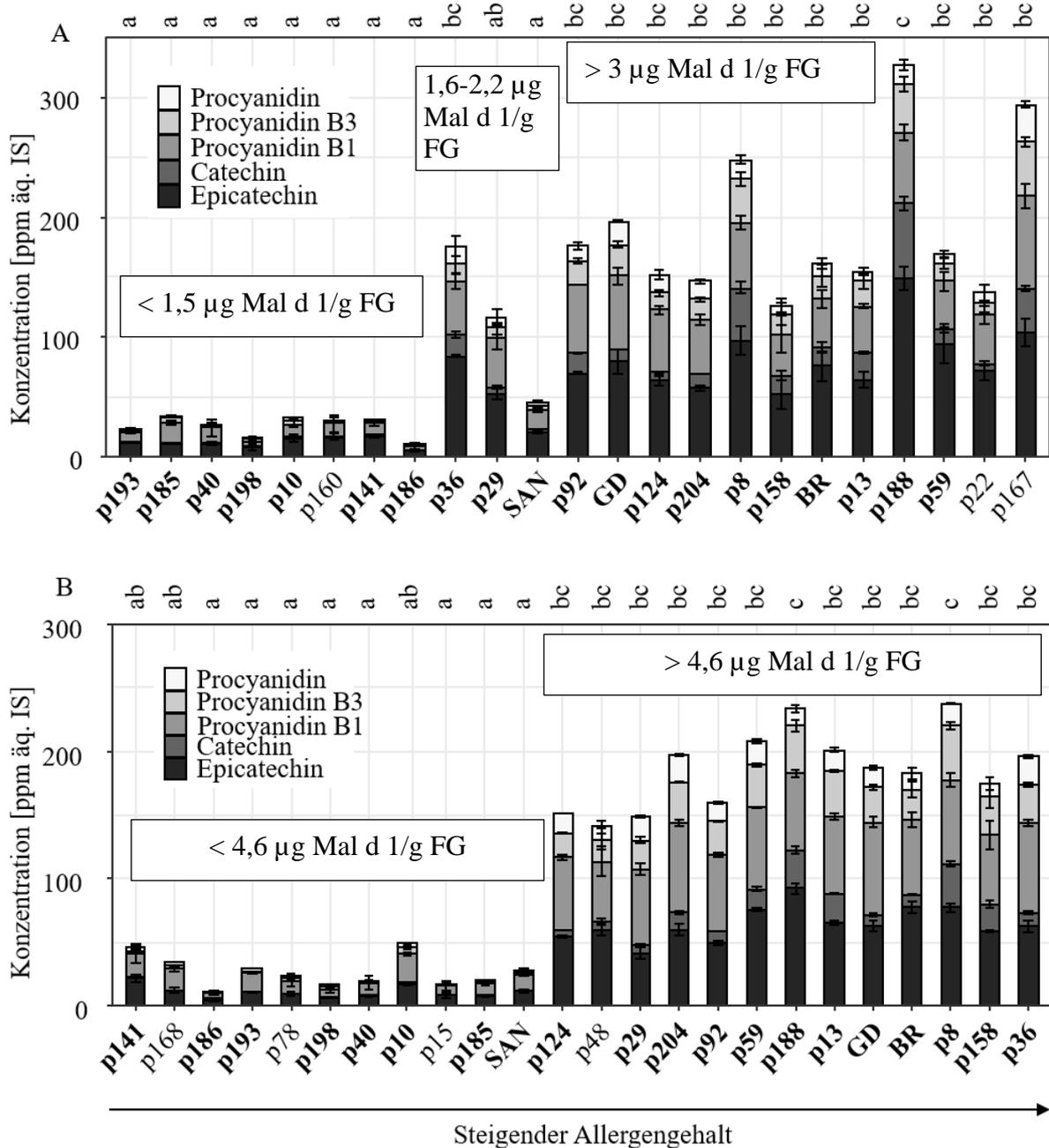
Korrelationskoeffizienten von 0,76. Ein Zusammenhang zwischen der Verträglichkeit und dem Gehalt an Flavan-3-olen bestand jedoch nicht (Korrelationskoeffizient: 0,3).

Ein ähnliches Bild ergab die Untersuchung der Korrelationen des Erntejahres 2018. Die starke Abhängigkeit der Gehalte der einzelnen Flavan-3-ole konnte bestätigt werden, wie auch die leichte Korrelation der Flavonol-Gehalte untereinander. Wie auch 2017 ergab sich erneut eine starke Korrelation zwischen den Flavan-3-olen und dem Mal d 1-Gehalt mit einem durchschnittlichen Korrelationskoeffizienten von 0,8. Aber auch in diesem Jahr konnte kein direkter Zusammenhang zwischen den Flavan-3-olen und der in der Humanstudie bestimmten Verträglichkeit der Apfelgenotypen nachgewiesen werden.



**Abbildung 19 Korrelationsdiagramm der Polyphenole 2018.** Korrelationskoeffizienten aller quantifizierten Polyphenole, des Mal d 1-Gehaltes und der Verträglichkeit. Berechnet mit der Spearman Rangkorrelation unter Berücksichtigung von 23 Genotypen. Die Größe der Punkte stellt den Wert des Korrelationskoeffizienten dar. Die Farbe beschreibt sowohl den Wert als auch das Vorzeichen dieses Koeffizienten (Romer *et al.*, 2020).

Aufgrund des positiven Zusammenhangs der Mal d 1-Konzentration und den Gehalten der einzelnen Flavan-3-ole wurden diese in den verschiedenen Genotypen und den beiden Erntejahren näher betrachtet. (Abbildung 20).



**Abbildung 20** Konzentration der Flavan-3-ole in verschiedenen Apfel-Genotypen der Kreuzungspopulationen und drei Vergleichssorten 'Santana' (SAN), 'Golden Delicious' (GD) und 'Braeburn' (BR). Alle Genotypen sind nach aufsteigendem Mal d 1-Gehalt aufgelistet. Die Genotypen, die in beiden Jahren untersucht wurden, sind fett gedruckt [A] Proben aus dem Erntejahr 2017, [B] Proben aus dem Erntejahr 2018. Die Buchstaben a-c beschreiben signifikante Unterschiede zwischen den Proben mit einem Signifikanzniveau von 5 % ( $p \leq 0,05$ ) berechnet mit dem Dunn's Test (Romer *et al.*, 2020).

Genotypen des Jahres 2017 mit einem Mal d 1-Gehalt von weniger als 1,5 µg/g FG wiesen einen Flavan-3-ol-Gehalt von maximal 35 ppm äq. IS auf. Ab 3 µg Mal d 1/g FG wurde ein deutlich höherer Flavan-3-ol-Gehalt gemessen (mind. die 4-fache Konzentration; 126 ppm äq. IS bis 326 ppm äq. IS). Die Genotypen p36, p29 und 'Santana', die mittlere Mal d 1-Gehalte zwischen 1,6 µg/g FG und 2,2 µg/g FG aufwiesen, zeigten inkonsistente Flavan-3-ol-Gehalte. Das Proanthocyanidin mit dem höchsten Anteil am Gesamtgehalt der Flavan-3-ole ist nach dem Epicatechin, das Procyanidin B1.

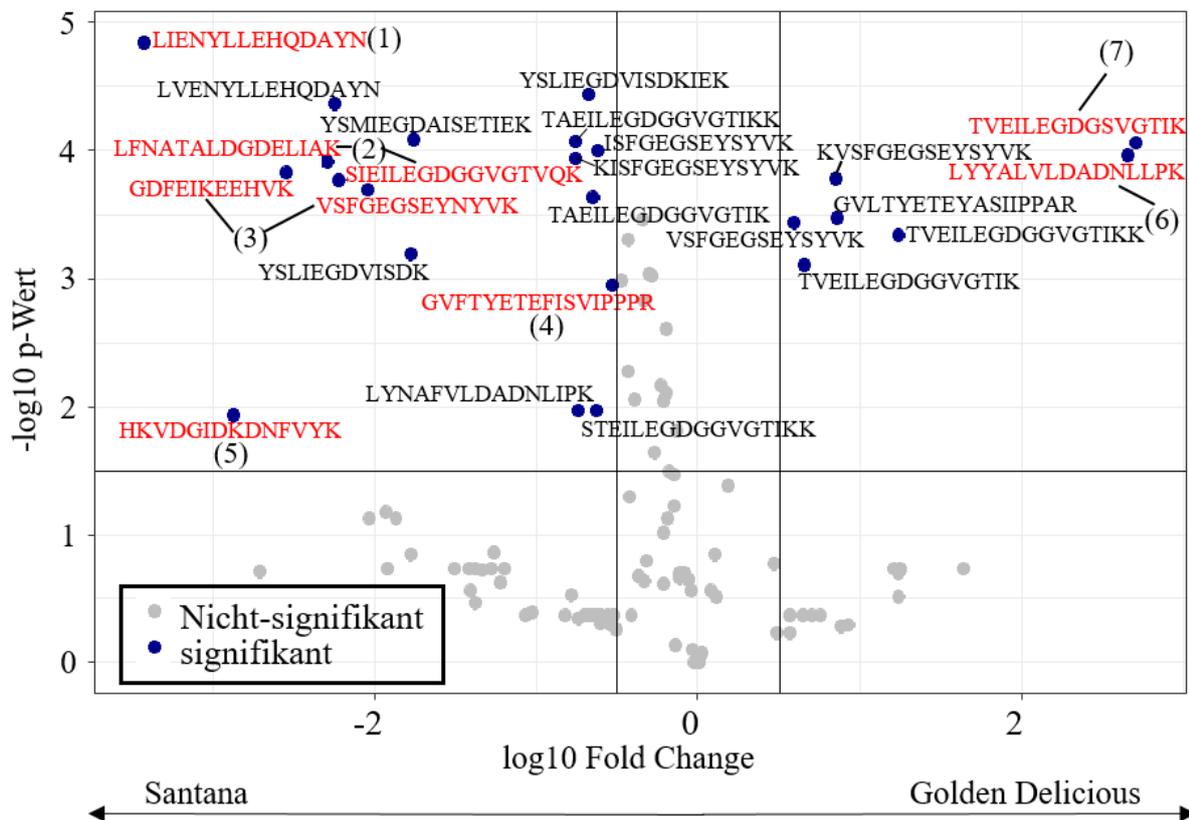
Die Proben aus dem Erntejahr 2018 wiesen ebenfalls eine starke Korrelation der Flavan-3-ol-Gehalte mit dem Mal d 1-Gehalt, mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,8, auf (Abbildung 19). Bis zu einem Mal d 1-Gehalt von 4,6 µg/g FG ('Santana') zeigten alle Genotypen einen niedrigen Flavan-3-ol-Gehalt von unter 50 ppm äq. IS (Abbildung 20). Die Genotypen, die einen höheren Mal d 1-Gehalt aufwiesen, zeigten auch deutlich erhöhte Flavan-3-ol-Gehalte von über 150 ppm äq. IS.

Die Flavan-3-ol-Gehalte waren, wie auch die Gehalte der anderen Polyphenole, vom Genotyp abhängig. Der Vergleich der jeweiligen Konzentrationen der Verbindungen in den untersuchten Erntejahre zeigt kaum Unterschiede. Genotypen mit einem niedrigen Gehalt an Flavan-3-olen (bis 50 ppm äq. IS) im Jahr 2017, zeigten diesen auch im Jahre 2018. Diese Konstanz über beide Jahre im Flavan-3-ol-Gehalt konnte durch die Spearman Rangkorrelation und einem Korrelationskoeffizienten von 0,89 berechnet werden.

## 4.5 Bestimmung spezifischer Peptide und Isoformen mittels LC-MS/MS

Da keine direkte Korrelation zwischen der Verträglichkeit der Genotypen der Kreuzungspopulationen mit den Mal d 1-Gehalten festgestellt werden konnte (Abbildungen 18 und 19) wurde vermutet, dass unterschiedlich reaktive Isoformen der Mal d 1-Proteine von den Genotypen exprimiert werden. Besonders auffällig war dies bei den Sorten 'Santana' und 'Golden Delicious', die im Jahr 2017 ähnliche Mal d 1-Gehalte zeigten aber unterschiedlich gut von Allergikern vertragen wurden (Abbildung 16). Die Mal d 1-Gehalte unterschieden sich 2018 stärker und die unterschiedliche Verträglichkeit wurde bestätigt. Um das Vorliegen verschiedener Mal d 1-Proteine nachzuweisen wurden LC-MS/MS Analysen nach tryptischen Verdau eines Gesamtprotein-Extraktes durchgeführt, der aus Äpfeln der Sorten 'Santana' und 'Golden Delicious' isoliert wurde.

Die LC-MS/MS-Analysen der Peptide, inklusive eines Teils der Probenaufarbeitung wurden am Bayerischen Zentrum für Biomolekulare Massenspektrometrie (BayBioMS) in Freising durchgeführt. Die generierten LC-MS/MS-Daten wurden mit den Sequenzen des Proteoms von *Malus × domestica* verglichen. Diese Proteinsequenzen wurden um 113 bekannte Sequenzen von Mal d 1-Isoform (allelische Varianten) erweitert. Insgesamt konnten 117 der mittels LC-MS/MS gefundenen Sequenzen den Mal d 1-Isoformen zugeordnet werden. Abbildung 21 zeigt deren Häufigkeiten in den Genotypen 'Santana' (links) und 'Golden Delicious' (rechts) dargestellt als Vulkandiagramm. Dabei werden die negativ logarithmischen  $p$ -Werte der Peptide gegen das differentielle Expressionsverhältnis ( $\log_{10}$  Fold Change) aufgetragen, wobei Peptide mit einem  $p$ -Wert  $\leq 0.03$  und einem  $\log_{10}$  Fold Change von  $> 0,5$  bzw.  $< -0,5$  als signifikant definiert werden.



**Abbildung 21 Vulkandiagramm aller identifizierten Peptide der Mal d 1 Isoformen.** Peptide mit einem positiven logarithmischen Fold Change ( $x$ -fach veränderten Häufigkeit, Expressionsverhältnis) sind vermehrt in 'Golden Delicious' zu finden, während Peptide mit einem negativen logarithmischen Fold Change vor allem in 'Santana' exprimiert sind. Peptide, welche einzelnen spezifischen Isoformen bzw. kleineren Isoform-Gruppen zuzuordnen werden konnten, sind rot markiert, allgemeinere unspezifische Peptide sind schwarz dargestellt. 'Santana': (1) Gruppe von Mal d 1.03 Proteinen, (2) CBL94177.1\_Mal d 1.08, (3) Gruppe von Mal d 1.06 Proteinen, (4) CBL94138.1\_Mal d 1.10, (5) XP\_008351173.1\_Mal d 1-ähnliches Protein. 'Golden Delicious': (6) AAS00045.1\_Mal d 1-ähnliches Protein, (7) AAX20977.1\_Mal d 1.06B oder AAS00045.1\_Mal d 1-ähnliches Protein (UniprotKB). Es wurde ein Signifikanzniveau von 3 % berechnet ( $p$ -Wert  $\leq 0.03$ ) (Romer *et al.*, 2020).

Es zeigten sich deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung der Mal d 1-Isoformen bei beiden untersuchten Apfelsorten. So konnten einige Peptide ausschließlich in einer der beiden Sorten identifiziert werden. Einige dieser identifizierten Peptide konnten einzelnen Isoformen oder kleineren Isoformgruppen zugordnet werden (Abbildung 22). So wird das Peptid *LIENYLLEHQDAYN* (1) ausschließlich in 'Santana' exprimiert und ist spezifisch für eine Untergruppe der Isoform Mal d 1.03 ist. Diese Isoformgruppe weist eine Identität der Aminosäuresequenz untereinander von 89,4 % bis 99,4 % auf. Das gefundene Peptid befindet sich im jeweiligen Protein an der Position 146 – 159 und bildet so den Abschluss des Proteins am C-Terminus (Abbildung 23).

Die beiden Peptide *LFNATALDGDELIAK* und *SIEILEGDGGVGTQK* (2) sind nur in der Isoform, Mal d 1.08 zu finden, welche ausschließlich in 'Santana' exprimiert wird (Abbildung 22). Durch die Identifizierung zweier spezifischer Peptide konnte diese Isoform in 'Santana' bestätigt werden. Tabelle 18 listet alle signifikanten Peptide, mit einer höheren Expression in einer der untersuchten Sorten, detailliert auf.

Ebenso können die Peptide *VSFGESEYNYVK* und *GDFEIKKEHVK* (3), die ausschließlich in 'Santana' identifiziert wurden, nur einer kleinen Gruppe an Isoformen zugeordnet werden (Abbildung 22). Diese Gruppe der vier möglichen Mal d 1.06 Isoformen zeigt eine Aminosäureidentität von 96,9 % bis 99,4 %. Die Proteine unterscheiden sich also nur in einer bis maximal fünf Aminosäuren.

Die Peptide *GVFTYETEFISVIPPPR* (4) und *HKVDGIDKDNFVYK* (5) konnten jeweils nur einer einzelnen Isoform zugeordnet werden. *GVFTYETEFISVIPPPR* ist ein Peptid, welches am Anfang der Aminosäuresequenz von Mal d 1.10 an Position 2 – 18 lokalisiert ist (Abbildung 23), während *HKVDGIDKDNFVYK* spezifisch für ein Mal d 1-ähnliches Protein ist (Tabelle 18).

Alle weiteren signifikanten identifizierten Peptide, welche ausschließlich oder in einem deutlich höheren Maße in 'Santana' exprimiert waren, stellten allgemeinere Peptide dar, die mehreren Isoformen und damit keiner speziellen Untergruppe zugeordnet werden konnten. Teilweise handelte es sich hierbei um gleiche Peptidsequenzen, die sich ausschließlich in der tryptischen Schnittstelle unterschieden.

In 'Golden Delicious' wurden im Gesamten nur sieben und somit weniger spezifische signifikante Peptide identifiziert. Zwei Peptide konnten einer spezifischen Isoform zugeordnet werden. Die Peptide *LYYALVLDADNLLPK* (6) (NCBI Protein: AAS00045.1) und *TVEILEGDGSGVTIK* (7) werden zusammen nur in einer einzigen Isoform eines Mal d 1-

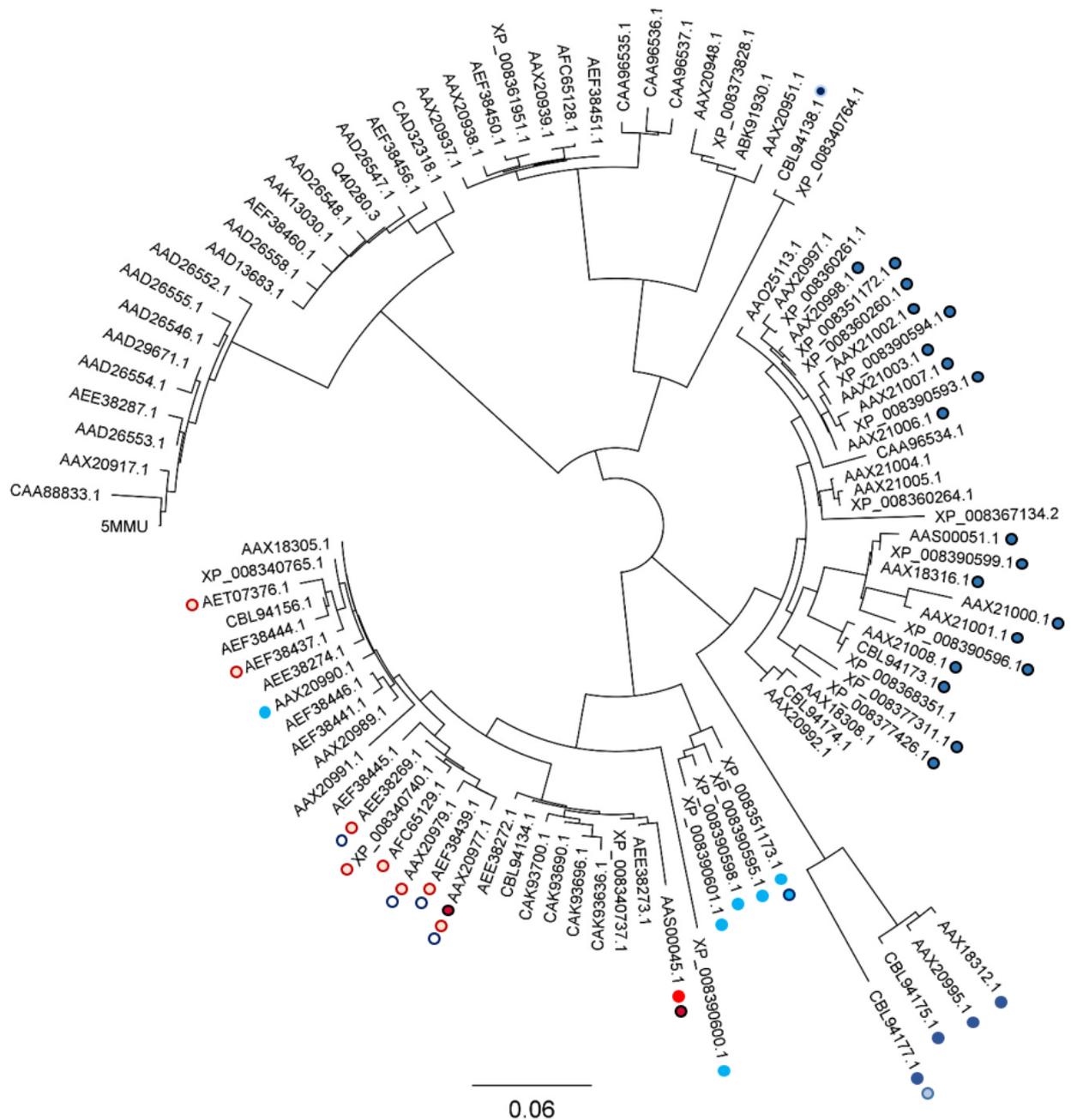
ähnlichen Proteins an Position 19 – 33 und 41 – 55 gefunden (Abbildung 23). Peptid (7) kann ebenfalls von einer weiteren Isoform Mal d 1.06B gebildet werden.

Die weiteren Peptide konnten keinen speziellen Isoformen oder –gruppen zugeordnet werden. Die Peptide *TVEILEGDGGVGTIK* und *TVEILEGDGGVGTIKK* wie auch *KVSFGEGSEYSYVK* und *VSFGEGSEYSYVK* unterscheiden sich ausschließlich an der jeweiligen tryptischen Schnittstelle.

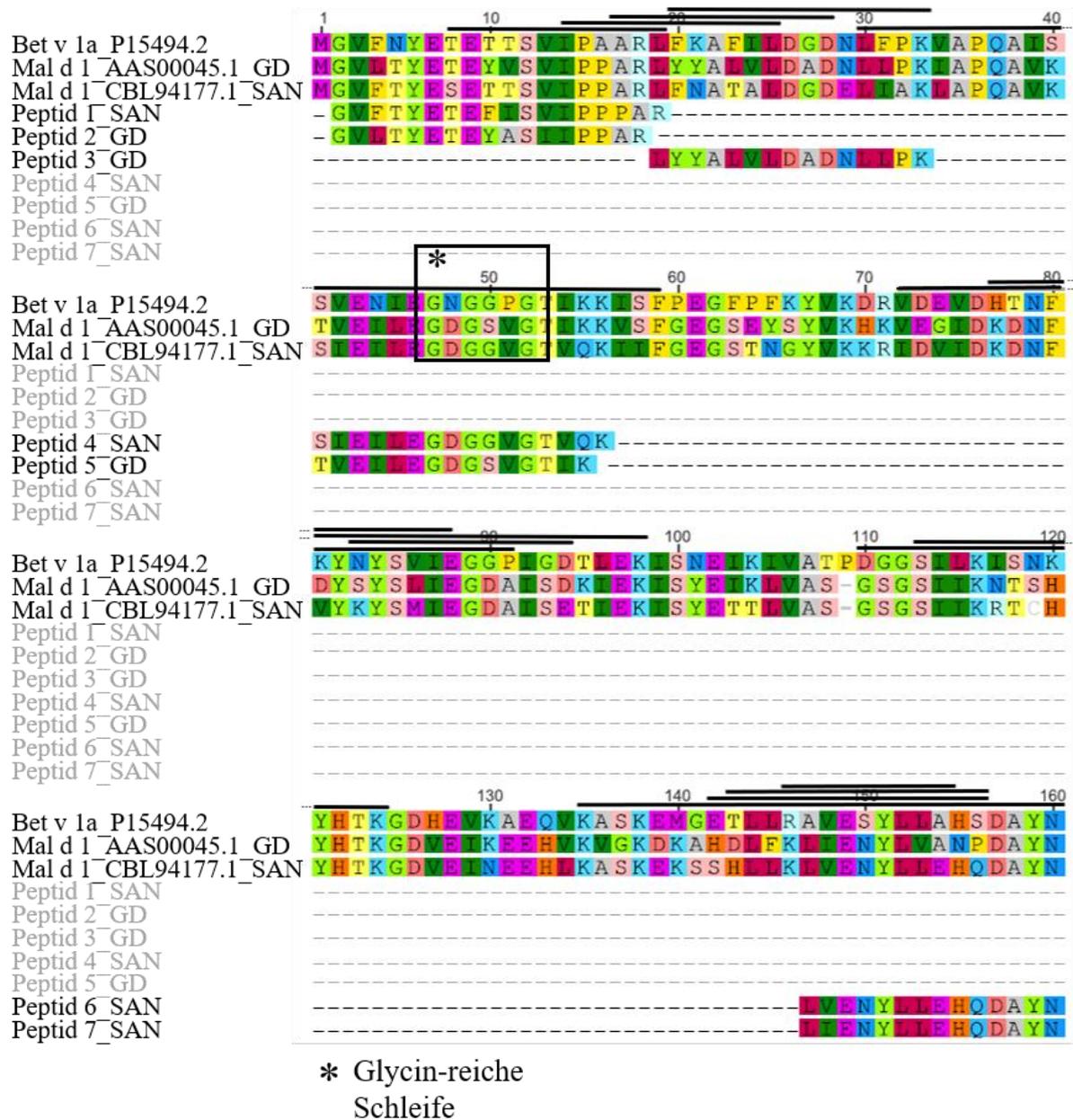
Tabelle 18 Auflistung der identifizierten, signifikanten Peptide

Peptidsequenz	Kultivar	Position	Isoform	*
<i>LIENYLLEHQDAYN</i>	SAN	146 – 159	Gruppe Mal d 1.03	(1)
<i>LFNATALDGDELI AK</i>	SAN	19 – 33	Mal d 1.08 (CBL94177.1)	(2)
<i>SIEILEGDGGVGT VQK</i>		41 – 56	Uniprot	
<i>VSFGEGSEYNYVK</i>	SAN	57 – 69	Gruppe Mal d 1.06	(3)
<i>GDFEIKEEHVK</i>		124 – 134		
<i>GVFTYETEFISVIP PR</i>	SAN	2 – 18	Mal d 1.10 (CBL94138.1)	(4)
			Uniprot	
<i>HKVDGIDKDNFVYK</i>	SAN	70 – 83	Mal d 1-ähnliches Protein (XP_008351173.1) NCBI Protein	(5)
<i>LVENYLLEHQDAYN</i>	SAN	146 – 159	Gruppe Mal d 1.09 und Mal d 1.08 (CBL94177.1)	
			Uniprot	
<i>STEILEGDGGVGT IKK</i>	SAN	41 – 56	-	
<i>TAEILEGDGGVGT IKK</i>	SAN	41 – 56	-	
<i>TAEILEGDGGVGT IK</i>	SAN	41 – 57	-	
<i>KISFGEGSEYSYVK</i>	SAN	56 – 69	-	
<i>ISFGEGSEYSYVK</i>	SAN	57 – 69	-	
<i>YSLIEGDVISDK</i>	SAN	84 - 95	-	
<i>YSLIEGDVISDKIEK</i>	SAN	84 – 98	-	
<i>YSMIEGDAISETIEK</i>	SAN	84 – 98	-	
<i>LYYALVLDADNLLPK</i>	GD	19 – 33	Mal d 1-ähnliches Protein (AAS00045.1) NCBI Protein	(6)
<i>TVEILEGDGSVGT IK</i>	GD	41 – 55	Mal d 1-ähnliches Protein (AAS00045.1) oder Mal d 1.06B (AAX20977.1)	(7)
			NCBI Protein	
<i>GVLTYET EYASIIP PAR</i>	GD	2 – 18	-	
<i>TVEILEGDGGVGT IK</i>	GD	41 – 55	-	
<i>TVEILEGDGGVGT IKK</i>	GD	41 – 56	-	
<i>KVSFGEGSEYSYVK</i>	GD	56 – 69	-	
<i>VSFGEGSEYSYVK</i>	GD	57 – 69	-	

\* Zahlen entsprechen der Nummerierung in Abbildung 21



**Abbildung 22 Phylogenetischer Baum der Isoformen des Mal d 1.** Die Isoformen, deren zugehörige Peptide in signifikanten Mengen vermehrt in 'Santana' gefunden wurden, sind blau markiert: ● *LIENYLLEHQDAYN* (Gruppe Mal d 1.03), ● *SIEILEGDDGGVGTVQK* und *LFNATALDGDDELIAC* (Mal d 1.08), ○ *GDFEIKKEHVK* und *VSFGESEYNYVK* (Gruppe Mal d 1.06), ● *GVFTYETEFISVIPPPR* (Mal d 1.10), ● *HKVDGIDKDNFVYK* (Mal d 1 – ähnliches Protein), ● *LVENYLLEHQDAYN* (Gruppe des Mal d 1.09 und Mal d 1.08), ● *YSLIEGDVISDK*  
 Die Isoformen, deren zugehörige Peptide in signifikanten Mengen vermehrt in 'Golden Delicious' gefunden wurden, sind rot markiert: ● *LYYALVLDADNLLPK* (Mal d 1 – ähnliches Protein), ● *TVEILEGDSVGTIK* Mal d 1 – ähnliches Protein und Mal d 1.06B), ○ *GVLTYETEYASIIIPAR*  
 Der Phylogenetische Baum wurde mit der Software Geneious erstellt (Romer *et al.*, 2020).



**Abbildung 23** Abgleich spezifischer Peptide mit den Proteinsequenzen von Bet v 1 und Mal d 1. Die schwarzen Balken über den Sequenzen symbolisieren bereits identifizierte und beschriebene Epitope des Mal d 1 (IEDB Immune Epitope Database, 2019). Die beiden gezeigten Mal d 1 Isoformen sind jeweils spezifisch für ein Apfelnkultivar. GD = 'Golden Delicious', SAN = 'Santana' (Romer *et al.*, 2020).



## 5 Diskussion

### 5.1 Biosynthese und Reinigung des rMal d 1 in *E. coli*

Die heterologe Expression rekombinanter Proteine ist ein wichtiger Bestandteil in der Proteinanalytik und Biochemie. Dabei wird häufig *E. coli* als geeignetes Expressionssystem, unter anderem bei His<sub>6</sub>-Tag-markierten Proteinen, eingesetzt (Rosano und Ceccarelli, 2014, Rehm und Letzel, 2016). Der His<sub>6</sub>-Tag stellt mit nur sechs Aminosäuren einen sehr kleinen Affinitätsmarker dar, der das Risiko einer sterischen Konformationsänderung reduziert und gerade bei kleinen Proteinen, wie den PR-10-Proteinen, geeignet ist (Rehm und Letzel, 2016). Zudem eignen sich His<sub>6</sub>-Tag markierte Proteine für eine Reinigung aus den Einschlusskörpern (IB) unter denaturierenden Bedingungen wie es in dieser Arbeit durchgeführt wurde (Crowe *et al.*, 1994). Nach der Induktion der Proteinexpression mit IPTG wird ein Teil der Proteine in Form von unlöslichen, fehlgefalteten IBs gebildet. Durch eine Reduktion der Inkubationstemperatur kann die Bildung zwar verringert werden (Rosano und Ceccarelli, 2014), jedoch bleibt ein gewisser Anteil des Zielproteins unlöslich. Durch die Reinigung der rMal d 1 Proteine unter denaturierenden Bedingungen konnte die Ausbeute an Zielprotein ca. verdreifacht werden, da neben den löslichen Proteinen auch mögliche fehlgefaltete Proteine aus den unlöslichen IBs miterfasst werden konnten. Zusätzlich wird durch die Auflösung der dreidimensionalen Struktur und der Auffaltung der Proteine, der His<sub>6</sub>-Tag sterisch freigelegt und so die Reinigung mittels Affinitätschromatographie verbessert (Rehm und Letzel, 2016). Die Effizienz der Reinigung konnte anhand der kontaminationsfreien Elutionsfraktionen im SDS-Gel und durch Western Blot Analyse bestätigt werden. Lediglich eine klare Bande bei der gewünschten Größe von 17,5 kDa für das rMal d 1 war deutlich sichtbar (Abbildung 7).

### 5.2 Bestimmung der Mal d 1 Konzentration in Apfelproben mittels ELISA-Tests

Für die Quantifizierung der Mal d 1-Gehalte unterschiedlicher Apfelsorten und Genotypen der Kreuzungspopulationen wurde ein indirekt kompetitiver ELISA-Test eingesetzt. Diese Methode gilt neben anderen Varianten des ELISA, wie dem Sandwich-ELISA (Ahrzazem *et al.*, 2007, Matthes und Schmitz-Eiberger, 2009, Kiewning und Schmitz-Eiberger, 2014) oder dem direkt kompetitiven ELISA (Karamloo *et al.*, 2001, Marzban *et al.*, 2005, Sancho *et al.*, 2006)

als eine Standardmethode zur Bestimmung von Nahrungsmittelallergenen, insbesondere PR-10 Proteinen (Kurze *et al.*, 2018a, Kurze *et al.*, 2018b, Picchi *et al.*, 2019). Dabei eignet sich der indirekt kompetitive ELISA besonders für kleine Proteine, wie das Mal d 1 (Kizis und Siragakis, 2014). Durch die Detektion des Antigens mit zwei spezifischen Antikörpern kann die Spezifität und die Empfindlichkeit des Nachweises erhöht werden. Für Mal d 1 sind eine Vielzahl von unterschiedlichen Isoformen bekannt, die sich in wenigen Aminosäuren unterscheiden (Son *et al.*, 1999, Gao *et al.*, 2008, Pagliarani *et al.*, 2013). Auch die Zusammensetzung der Isoformen in den unterschiedlichen Genotypen unterscheidet sich stark (Abbildung 21). Um möglichst alle Isoformen zu erfassen und zu quantifizieren, wurde durch die Firma „Davids Biotechnologie GmbH“ ein polyklonaler Antikörper hergestellt, welcher gegen das denaturierte rMal d 1.02 gerichtet war. Polyklonale Antikörper binden an mehrere Epitope des Proteins und können so auch unterschiedliche Isoformen erkennen. Ein Nachweis dieser Kreuzreaktion erfolgte im Zuge einer nachfolgenden Arbeit mittels Western Blot Untersuchungen mit homologen Proteinen aus Birke, Erdbeere und Pflaume. Sowohl Bet v 1 als auch Fra a 1 und Pru d 1 wurden von dem polyklonalen Antikörper erfasst (Romer *et al.*, 2020). Da die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz innerhalb der Isoformen des Mal d 1 größer ist, als zu den homologen Proteinen, kann davon ausgegangen werden, dass eine große Anzahl der Mal d 1 Isoformen detektiert wird.

### 5.2.1 Der Allergengehalt ist abhängig von Genotyp und von Umweltfaktoren

Viele Eigenschaften der Äpfel, wie Aroma und Geschmack, Festigkeit, Farbe oder auch die Nährstoffzusammensetzung, unterscheiden sich stark zwischen den einzelnen Genotypen und Kultivaren (Mehinagic *et al.*, 2006, Nour *et al.*, 2010). So ist es nicht überraschend, dass auch der Mal d 1-Gehalt stark vom Genotyp abhängig ist (Zuidmeer *et al.*, 2006, Matthes und Schmitz-Eiberger, 2009). Dies konnte auch im Zuge dieser Arbeit bestätigt werden. Die Gehalte an Mal d 1 der untersuchten Apfelgenotypen schwankte zwischen 0,1 µg/g FG und 40 µg/g FG. Die meisten Genotypen wiesen jedoch Mal d 1-Konzentrationen in einem Bereich zwischen 0,1 µg/g FG und 10 µg/g FG auf. Damit sind die Unterschiede deutlich größer, als dies bei homologen Proteinen aus anderen Früchten wie Erdbeeren, Pflaumen oder Tomaten ermittelt werden konnte (Kurze *et al.*, 2018a, Kurze *et al.*, 2018b, Picchi *et al.*, 2019).

Am Beispiel der untersuchten Genotypen der Selektionsstufe 2 (Abbildung 11) wurde deutlich, dass, neben der Genotypabhängigkeit, die Umweltbedingungen, einschließlich Klima und Pathogenbefall den Mal d 1-Gehalt beeinflussen. Diese Wirkung zeigte sich bei jedem

Genotyp in unterschiedlichem Maße. Genotypen wie p158, p92, p13 oder p8 wiesen große Varianzen in der Mal d 1-Konzentration über die drei untersuchten Erntejahre auf. Tendenziell war dabei der Allergehalt im Jahr 2018 höher als 2017 und deutlich höher als im Erntejahr 2016.

Ein Vergleich der Wetterdaten der Erntejahre kann Hinweise liefern, die die ansteigenden Mal d 1-Gehalte erklären könnten. Im Jahr 2017 setzte die Apfelblüte, aufgrund der warmen Temperaturen im März, deutschlandweit verhältnismäßig früh ein (SWR Wissen, 2018). Durch einen starken Kälteeinbruch mit Schnee und Frost im April kam es jedoch zu großen Einbußen der Blütenzahlen und Kältestress. Der Sommer hingegen verlief gemäßigt mit warmen, trockenen wie auch kühleren, nassen Abschnitten (Deutscher Wetterdienst, 2017). Der Sommer des Jahres 2018 war wettertechnisch geprägt von sehr hohen Temperaturen und extremer Trockenheit, besonders in der nördlichen Hälfte Deutschlands (Deutscher Wetterdienst, 2018). Diese erhöhten Stressbedingungen während der Zeit der Fruchtentwicklung und -reifung, durch die extremen Wetterbedingungen, steigern die Expression stressinduzierter Proteine. Dennoch scheinen einige Genotypen, wie p78, p40, p141 und p198, von diesen starken externen Bedingungen nicht, oder nur in sehr geringem Maße beeinflusst worden zu sein.

Der genotypabhängige Einfluss der Wetter- und Umweltbedingungen setzt auf dem Weg zu einem allergenarmen, gut verträglichen Apfel, die Analyse und Beobachtung des Mal d 1-Gehaltes über mehrere Erntejahre voraus.

Jedoch treten nicht nur zwischen den verschiedenen Genotypen, sondern oft auch zwischen unterschiedlichen Früchten desselben Baumes Unterschiede in der Expression der Proteine auf (Marzban *et al.*, 2005, Asero *et al.*, 2006, Matthes und Schmitz-Eiberger, 2009). Um diese Schwankungen zu berücksichtigen, wurde in dieser Arbeit für jeden Genotyp eine Mischprobe aus mindestens drei stichprobenartig ausgewählten Früchten aus unterschiedlichen Teilen des Baumes, sowohl der Sonnen- als auch der Schattenseite, generiert.

Weiterhin ist bekannt, dass die Mal d 1-Proteinkonzentration im Laufe der Fruchtreifung in den meisten Genotypen ansteigt (Vieths *et al.*, 1993, Schmitz-Eiberger und Matthes, 2011, Szamos *et al.*, 2011). Der zunehmende Mal d 1-Gehalt könnte eine Reaktion auf vermehrte Stresseinflüsse im Laufe der Fruchtentwicklungszeit sein oder mit der erhöhten Ethylen-Produktion während der Apfelfruchtreifung zusammenhängen (Beuning *et al.*, 2004). Neben biotischen und abiotischen Stressbedingungen konnte auch die Induktion der Genexpression der PR-10 Proteine durch Phytohormone wie Salicylsäure, Jasmonsäure oder Ethylen nachgewiesen werden (Seo *et al.*, 2008). Um Unterschiede aufgrund des Reifestadiums der

Früchte zu vermeiden, wurden alle Früchte pflückreif geerntet und bis zu ihrer Genussreife im Kühllager bei 4 °C gelagert, bevor sie für weitere Probenvorbereitungen verwendet wurden.

Der Einfluss von Ethylen auf die Mal d 1 Expression wird ebenfalls als Erklärung der tendenziell ansteigenden Mal d 1-Konzentration während der Lagerung der klimakterischen Früchte diskutiert (Beuning *et al.*, 2004).

### 5.2.2 Die Lagerungszeit und -bedingung beeinflusst den Allergengehalt

Die Lagerung von Äpfeln gehört im Handel zur gängigen Praxis, um ein ganzjähriges Angebot von Äpfeln zu gewährleisten. Eine Lagerung unter kontrollierter Atmosphäre, wie den ULO-Bedingungen, wird dabei sehr häufig bevorzugt. Die niedrigen Temperaturen, der niedrige Sauerstoffgehalt und der leicht erhöhte CO<sub>2</sub>-Gehalt verlangsamen Stoffwechselfvorgänge, wie die Bildung von Ethylen und somit die weitere Reifung der Früchte (Anese *et al.*, 2020). Allgemeine Fruchteigenschaften, wie die Textur der Frucht und sensorische Parameter, können durch die Lagerungsbedingung über einen langen Zeitraum von mehreren Monaten erhalten werden und ermöglichen so den ganzjährigen Verzehr der Früchten (Afif, 2019).

In Bezug auf die Lagerung der Äpfel wird immer wieder der Einfluss auf den Allergengehalt und die Verträglichkeit der Früchte diskutiert. Dabei wird meist ein längerer Lagerungszeitraum mit einem generellen Anstieg der Mal d 1-Konzentration in Verbindung gebracht (Atkinson *et al.*, 1996, Sancho *et al.*, 2006, Matthes und Schmitz-Eiberger, 2009, Schmitz-Eiberger und Matthes, 2011). Andere allergieauslösenden Lebensmittel wie beispielsweise Haselnüsse mit ihren Bet v 1-homologen Proteine zeigen keine Änderungen im Laufe der Lagerung (Wigotzki *et al.*, 2000).

Der tendenzielle Anstieg der Mal d 1-Konzentration während der Lagerung wird oft mit der Ethylenproduktion während der Reifung erklärt (Beuning *et al.*, 2004). Daher gilt eine möglichst vollständige Unterbrechung des Reifungsvorgangs als Ziel auf der Suche nach der optimalen Lagerungsbedingung. Durch den Einsatz von 1-Methylcyclopropan (1-MCP) während der Lagerung kann die Produktion von Ethylen gehemmt werden (Kolniak-Ostek *et al.*, 2014). Diese Behandlung führte in Studien bereits zu einem reduzierten Mal d 1-Anstieg während der Lagerung im Vergleich zu unbehandelten Früchten (Kiewning und Schmitz-Eiberger, 2014).

Wie schon in früheren Studien beschrieben (Afif, 2019, Korićanac *et al.*, 2019) konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich die Entwicklung des Mal d 1-Gehaltes während der

Lagerungszeit in den untersuchten Genotypen untereinander unterscheidet (Abbildungen 13, 14 und 15). Einige Genotypen zeigten einen klaren Anstieg des Mal d 1-Gehaltes über die Lagerungszeit und damit ähnliche Ergebnisse wie in der Literatur beschrieben. Bei 'Golden Delicious' in 2016 und dem Genotyp p142 in 2017 stieg der Allergengehalt im Laufe der Lagerungszeit auf bis zu 400 % der ursprünglichen Mal d 1-Konzentration zu Beginn der Lagerung an (Abbildungen 13 und 14). Andere Genotypen wie z.B. p17 und p86 aus 2016 oder p158 (2017) zeigten geringere Anstiege im Mal d 1-Gehalt. Jedoch konnte am Beispiel von Genotyp p13 (2016, Abbildung 13) gezeigt werden, dass durchaus auch gegenteilige Effekte auftreten können. Sowohl unter ULO-Bedingungen als auch in der Überlagerung im KL nahm die Mal d 1-Konzentration über die Zeit kontinuierlich auf die Hälfte der Ursprungskonzentration ab. Vergleicht man die Lagerung unter ULO-Bedingungen mit der Überlagerung unter normaler Atmosphäre, konnte kein signifikanter Unterschied in der Entwicklung des Mal d 1-Gehaltes festgestellt werden. Lediglich bei p42 (2016) zeigte eine Lagerung im KL eine konstante Mal d 1-Konzentration, während der Gehalt im ULO-Lager anstieg. Eine Voraussage der Mal d 1-Entwicklung während der Lagerung bei anderen Lagerungsbedingungen ist daher nicht möglich.

Wie sich die unterschiedlichen Entwicklungen der Mal d 1-Gehalte bei der Lagerung letztendlich auf die Verträglichkeit der Äpfel auswirkt, muss weiter untersucht werden. Einige Patienten beschreiben eine bessere Verträglichkeit von frischen Äpfeln im Vergleich zu gelagerten Früchten, jedoch konnte das bisher in keiner Humanstudie eindeutig belegt werden (Vlieg-Boerstra *et al.*, 2011). Eine vergleichende Untersuchung von unterschiedlich gelagerten Äpfeln zeigte jedoch eine signifikant bessere Verträglichkeit der Äpfel nach ULO-Lagerung im Vergleich zu einer Kühllagerung unter normaler Atmosphäre (Bolhaar *et al.*, 2005). Ob sich diese Tendenz auch auf Genotypen mit abfallendem Allergengehalt übertragen lässt, muss in der Zukunft untersucht werden.

### 5.3 Kein direkter Zusammenhang zwischen Verträglichkeit und Mal d 1-Gehalt

Neben der Quantifizierung des Mal d 1-Gehaltes, ist die Durchführung von Humanstudien von großer Wichtigkeit, denn eine direkte Abhängigkeit der Verträglichkeit und des Allergengehalts konnte bisher nicht bestätigt werden (Asero *et al.*, 2006, Vlieg-Boerstra *et al.*, 2011). Auch in der vorliegenden Studie konnte kein direkter Zusammenhang festgestellt

werden. Im Erntejahr 2017 zeigten die Genotypen p36, p29 und 'Golden Delicious', die mittlere Mal d 1-Konzentration aufwiesen in der durchgeführten Humanstudie die stärksten Symptome (Abbildung 16 A). Dabei wurden Genotypen mit höheren Mal d 1-Gehalten, wie p13, p59 oder p22 deutlich besser vertragen. Vergleicht man die beiden etablierten Sorten 'Santana' und 'Golden Delicious', so zeigten diese, trotz der sehr ähnlichen Allergengehalte, deutliche Unterschiede in der Verträglichkeit. Die signifikant bessere Verträglichkeit der Sorte 'Santana', im Vergleich zu 'Golden Delicious' wurde bereits gezeigt (Kootstra *et al.*, 2007). Die Sorte 'Braeburn' löste, trotz deutlich höherem Mal d 1-Gehalt, bei den meisten Patienten nur geringe Symptome, ähnlich der gutverträglichen Sorte 'Santana' aus. In beiden untersuchten Erntejahren konnte kein direkter Zusammenhang der Allergenität und des Mal d 1-Gehaltes festgestellt werden (Abbildung 16).

Wie schon bei anderen untersuchten Genotypen beobachtet (Abbildung 11), zeigten die Genotypen im Erntejahr 2018 tendenziell höhere Mal d 1-Gehalte (Abbildung 16 B), was auf den Einfluss des Anbaujahres mit deren klimatischen Unterschieden auf den Allergengehalt hindeutet. Weitere beeinflussende Faktoren, wie Lagerungszeit oder Reifestadium der Äpfel (Sancho *et al.*, 2006, Schmitz-Eiberger und Matthes, 2011) wurden in dieser Studie konstant gehalten. Trotz des höheren Mal d 1-Gehaltes im Jahr 2018, traten bei den Patienten nach oraler Exposition meist gleichbleibend schwache oder deutlich schwächere Symptome auf als in 2017. Eine mögliche Erklärung liefern die durchgehend warmen Temperaturen in den Sommermonaten des Jahres 2018 (Deutscher Wetterdienst, 2018). Die hitzeempfindlichen Mal d 1-Proteine in den frischen Früchten am Baum können durch erhöhte Sonneneinstrahlung und Hitze bereits denaturieren. Dadurch wird die IgE-Bindung nativer Antikörper der Allergiepazienten reduziert und nur schwache Symptome ausgelöst. Im ELISA-Test werden diese Proteine dank des polyklonalen Antikörpers, gerichtet auf das denaturierte rMal d 1, dennoch detektiert. Lediglich nach Verzehr der sonst gut vertragenen Sorte 'Santana' (Bolhaar *et al.*, 2005, Vlieg-Boerstra *et al.*, 2013) wurden stärkere Allergiesymptome beschrieben.

Neben den Faktoren wie der Abhängigkeit der Verträglichkeit vom Genotyp, natürliche Schwankungen des Mal d 1-Gehaltes innerhalb der Äpfel eines Genotyps (Marzban *et al.*, 2005, Asero *et al.*, 2006), oder Schwankungen desselben Genotyps über mehrere Erntejahre (Vlieg-Boerstra *et al.*, 2011), müssen auch weitere Einflüsse in Betracht gezogen werden.

Zum einen spielen die individuellen Immunreaktionen der Patienten durch spezifische Antikörper eine wichtige Rolle in der Antigenerkennung. So können Antikörper unterschiedlicher Patienten die Isoformen in variierendem Maße erkennen (Bolhaar *et al.*, 2005, Holm *et al.*, 2011, Kitzmüller *et al.*, 2015). Auch die Stärke der Immunreaktion und die

auftretenden Symptome der Patienten können sehr unterschiedlich ausfallen. In dieser Studie traten sowohl ein Anschwellen der Lippen oder Zunge, ein Kribbeln im Mund oder Rachen, wie auch tränende Augen oder eine geschwollene Mundschleimhaut auf. Einige Patienten beschrieben bei mehreren Apfelgenotypen multiple Symptome. Die Variation der Schwere der Symptome der Patienten wurde in Abbildung 16 in Form der Kreisgröße dargestellt. Dabei wird deutlich, dass bei p29 (2017) die Schwankungen der Symptomatik zwischen den einzelnen Patienten sehr groß war, während die Genotypen p185 (2017) und p92 (2018) von allen untersuchten Patienten sehr gut vertragen wurden. Um mögliche Interaktionen mit zusätzlichen Aero-Allergenen und daraus resultierende zusätzliche Reaktionen des Immunsystems zu minimieren, wurde die Studie in beiden Jahren außerhalb der Pollensaison durchgeführt. Jedoch kann aufgrund der Existenz weiterer Apfelallergene aus anderen Proteinfamilien nicht ausgeschlossen werden, dass eine allergische Reaktion der Patienten auf Proteine wie Mal d 2, Mal d 3 oder Mal d 4 ebenfalls in deren Symptomatik involviert sind.

Zur Untersuchung der Verträglichkeit spielt die Wahl des Testsystems in der Humanstudie eine wichtige Rolle. Es konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass eine Analyse der Allergenität von Lebensmitteln, mittels des häufig angewandten Skin-Prick-Tests oft falsch positive oder falsch negative Ergebnisse zeigt und so nur schwer eine explizite Aussage über die Symptome nach einer oralen Exposition getroffen werden kann (Clark und Ewan, 2003, Niggemann *et al.*, 2006, Vlieg-Boerstra *et al.*, 2011). Bei einer Untersuchung des IgE-Antikörper-Titers kann es ebenfalls zu einer erhöhten Fehlerrate in der Voraussage von oralen Symptomen nach Kontakt mit dem Allergen kommen (Clark und Ewan, 2003, Niggemann *et al.*, 2006, Song, 2015). Auch im Zuge der Humanstudie an der Charité wurden zusätzlich zu den Provokationstests auch Blutproben der Patienten auf Antikörper untersucht. Dies führte jedoch zu keinem aussagekräftigen Ergebnis.

Das empfohlene Verfahren in der Diagnose oraler Allergiesyndrome nach Exposition mit Nahrungsmittelallergenen, wie den PR-10-Proteinen, stellt der orale Provokationstest nach dem DBPCFC-Verfahren (*engl. double-blind, placebo-controlled food challenge*) dar (Niggemann *et al.*, 2006). Dieser Placebo-kontrollierte orale Provokationstest kann bei der Diagnose einer Mal d 1-Allergie bei Patienten sehr gut eingesetzt werden (Skamstrup Hansen *et al.*, 2001, Bolhaar *et al.*, 2005, Kollmann *et al.*, 2013).

Das rMal d 1 kann dabei als geschmacks- und geruchsneutrales, gutlösliches Antigen dienen (Kollmann *et al.*, 2013). Bei der Identifizierung allergenarmer Apfel-Genotypen kann das DBPCFC-Verfahren nicht unverändert angewendet werden, da ein Kontrollapfel ohne Allergene nicht realisierbar ist. Für die Beurteilung und Einstufung der Verträglichkeit der

Äpfel wurde daher die Stärke der Symptome nach Verzehr der Genotypen mit den Symptomen der, allgemein gut verträglichen Sorte 'Santana' verglichen.

Die Verträglichkeit der Äpfel ist nicht ausschließlich mit der Konzentration des allergieauslösenden Antigens Mal d 1 gleichzusetzen ist. Jedoch kann durch die Vorselektionierung die Wahrscheinlichkeit erhöht werden, gut verträgliche Genotypen zu identifizieren. Der Provokationstest vorselektierter Genotypen bleibt auf der Suche nach gut verträglichen Kandidaten in einem Selektionsprozess jedoch essenziell.

### 5.4 Starke Abhängigkeit zwischen dem Mal d 1-Gehalt und den Flavan-3-olen

Wie die PR-Proteine, so werden auch sekundäre Pflanzenstoffe, wie die Polyphenole, als Reaktion auf biotischen und abiotischen Stress gebildet (Lattanzio *et al.*, 2006, Agati und Tattini, 2010, Ullah *et al.*, 2017). Zusätzlich konnte in *in vitro* Studien (Bronner und Landry, 1985, Kanda *et al.*, 1998, Tokura *et al.*, 2005) wie auch in mehreren *in vivo* Studien (Akiyama *et al.*, 2000, Enomoto *et al.*, 2006, Zuercher *et al.*, 2010) ein antiallergener Effekt und eine Reduzierung der Allergiesymptome durch die Gabe von Polyphenolextrakten nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit konnten bei der Untersuchung der Polyphenolgehalte der Apfelgenotypen Vertreter von fünf Polyphenolgruppen identifiziert und über Biochanin A als internen Standard relativ quantifiziert werden. Dabei wurden fünf Zimtsäurederivate identifiziert. Die Chlorogensäure gehört dabei zu den wohl bekanntesten Zimtsäurederivate in Äpfeln (Awad *et al.*, 2000, Kahle *et al.*, 2005). Es konnten zwei Isomere der Chlorogensäure ermittelt werden, die sich in der Retentionszeit unterschieden, jedoch dasselbe typische Fragmentierungsmuster aufwiesen. Chlorogensäure weist ein hohes antioxidatives Potential auf und bildet sich vermehrt in mit Apfelschorf oder anderen pilzlichen Erkrankungen infizierten Blättern (Nakatani *et al.*, 2000, Mikulic-Petkovsek *et al.*, 2003).

Bei den Anthocyanen konnten als Hauptkomponente ein Cyanidin-hexosid identifiziert werden. Mit Hilfe der Standardsubstanzen Cyanidin-3-O-glucosid und Cyanidin-3-O-galaktosid wurde versuchte, eine eindeutige Identifizierung zu ermöglichen. Eine Auftrennung der Substanzen bezüglich der Retentionszeit, durch die genutzte Methode, war nicht möglich. Jedoch handelt es sich hierbei vermutlich um das Cyanidin-3-O-galaktosid, welches als Hauptkomponente in rotschaligen und rotfleischigen Äpfeln bereits mehrfach beschrieben

wurde (Vrhovsek *et al.*, 2004, Sadilova *et al.*, 2006, Espley *et al.*, 2019). Zusätzlich konnten auch ein weiteres Hexosid und mehrere Cyanidin-pentoside identifiziert werden. Es konnten keine weiteren Anthocyane wie Pelargonidin-Derivate in Erdbeeren (Garzón und Wrolstad, 2002) oder Delphinidin-Derivate in Granatapfel (Noda *et al.*, 2002) nachgewiesen werden.

Die zu den Flavonolen zählenden Quercetin- und Kaempferolderivate konnten ebenfalls detektiert und quantifiziert werden. Dabei dominieren klar die Quercetinderivate (Hollman und Arts, 2000, Tsao *et al.*, 2003, Boyer und Liu, 2004, Kahle *et al.*, 2005). Quercetin gilt als die Substanz mit einer verhältnismäßig hohen antioxidativen Aktivität, bezogen auf alle Flavonoide (Ververidis *et al.*, 2007). Die beiden detektierten Kaempferol-glycoside konnten in allen Genotypen in nur sehr geringen Mengen von wenigen ppm eq. IS detektiert werden.

Zu den Hauptkomponenten der Polyphenole in Äpfeln gehören, neben der Chlorogensäure, die Flavan-3-ole mit ihren Vertretern Epicatechin, Catechin und den dimeren Strukturen der Proanthocyanidine (Podsędek *et al.*, 2000). Dabei ist besonders die Konzentration von Epicatechin sehr hoch (Podsędek *et al.*, 2000, Manach *et al.*, 2004, Han *et al.*, 2019) was in dieser Arbeit bestätigt wurde (Abbildung 20). Epicatechin machte in allen Genotypen in beiden Jahren mit 38 % - 56 % des gesamten Flavanolgehaltes den größten Anteil aus, gefolgt von Procyanidin B1 mit bis zu 50 %.

Auf der Suche nach allergenarmen Äpfeln und dem mehrfach beschriebenen Zusammenhang zwischen dem Gesamtpolyphenolgehalt und der Verträglichkeit wurden auch in dieser Arbeit mögliche Korrelationen analysiert (Schmitz-Eiberger und Matthes, 2011, Kiewning *et al.*, 2013, Kschonsek *et al.*, 2019b). Die einzelnen Genotypen unterschieden sich sehr stark in ihren Polyphenol-Gehalten (Mainla *et al.*, 2011). Es konnte kein direkter Zusammenhang zwischen dem Mal d 1-Gehalt und der Gesamtpolyphenolkonzentration festgestellt werden (Abbildung 17). Weiterhin wurde keine direkte Korrelation zwischen der Verträglichkeit der Genotypen und dem Gesamtpolyphenolgehalt gefunden. Die Sorte 'Santana' zeigte eine gute Verträglichkeit und wies in beiden Jahren eine der höchsten Gesamtpolyphenolgehalte aller untersuchten Genotypen auf. Jedoch zeigten die Patienten auch nach dem Verzehr von p40 in beiden Jahren kaum Allergiesymptome. Betrachtet man den Gesamtpolyphenolgehalt dieses Genotyps, so ist dieser in beiden Jahren der niedrigste aller gemessenen Proben. Der in beiden Jahren gut verträgliche Genotyp p185, lag im Gesamtpolyphenolgehalt 2017 im oberen Bereich der Konzentration, während er 2018 einen der niedrigsten Gehalte aufwies.

Bei der Betrachtung der einzelnen Polyphenolgruppen stellte sich heraus, dass der Flavan-3-ol-Gehalt eindeutig mit dem Allergengehalt korrelierte (Abbildungen 18 und 19). Genotypen

mit niedrigem Mal d 1-Gehalt zeigten ebenfalls einen niedrigen Gehalt an Flavan-3-olen, während Genotypen mit einem hohen Gehalt des Proteins auch hohe Gehalte an Flavan-3-olen aufwiesen. Dies konnte mit der Berechnung des Korrelationskoeffizienten, ermittelt mit der Spearman Rangkorrelation, von 0,76 in 2017 und 0,8 in 2018 bestätigt werden. Schmitz-Eiberger *et al.* (2003) konnten ebenfalls eine positive Abhängigkeit des Mal d 1-Gehaltes mit dem Gehalt an Catechin nachweisen (Schmitz-Eiberger *et al.*, 2003, Schmitz-Eiberger und Matthes, 2011). Der Flavan-3-ol-Gehalt hatte jedoch keinen Einfluss auf die Konzentration und IgE-Bindungsaffinität von Mal d 1 (Kiewning *et al.*, 2013). Lediglich die Genotypen p29, p36 und die Vergleichssorte 'Santana' im Jahr 2017 passten nicht zu dieser Tendenz. Bei p29 und p36 konnte trotz niedrigerem Mal d 1-Gehalt im Vergleich zu 'Santana' ein höherer Flavan-3-ol-Gehalt gemessen werden. Erste Vermutungen deuteten auf einen Einfluss des Flavan-3-ol-Gehaltes auf die Verträglichkeit hin, da 'Santana' mit geringem Flavan-3-ol-Gehalt deutlich besser vertragen wurde als die beiden Genotypen p29 und p36 mit hohen Konzentrationen. Jedoch konnte diese Vermutung im Weiteren nicht bestätigt werden. Bezüglich der Verträglichkeit deutet einiges darauf hin, dass neben einer geringen Mal d 1-Konzentration auch ein niedriger Gehalt an Flavan-3-olen essenziell ist.

Die positive Korrelation der Mal d 1-Konzentration mit den Flavan-3-ol-Gehalten gibt Hinweise auf eine Protein-Liganden Assoziation wie dies bereits für Bet v 1 und Quercetin-sophorosid (Seutter von Loetzen *et al.*, 2014) oder für unterschiedliche Isoformen des Fra a 1 mit Quercetin-3-O-glucuronid, Myricetin bzw. (+)-Catechin (Casanal *et al.*, 2013b) gezeigt wurde. Bei den Flavan-3-olen könnte es sich somit um die natürlichen Liganden der Mal d 1-Isoformen handeln.

Die Aktivität der PPO mit den beiden katalytischen Reaktionen der Cresolase- und der Catecholase-Aktivität scheint eine wichtige Rolle für die Allergenität des Mal d 1 und anderer homologer Proteine zu spielen. Äpfel mit einer hohen PPO Aktivität wiesen einen niedrigen Mal d 1-Gehalt auf während Äpfel mit einer niedrigen Aktivität des Enzyms, deutlich höhere Konzentrationen an Mal d 1 zeigten (Kiewning *et al.*, 2013). Die Flavan-3-ole Catechin und Epicatechin fungieren als Substrate für die PPO aus Äpfeln (Rocha und Morais, 2001, Garcia *et al.*, 2007). Bei hoher Enzymaktivität werden vermehrt die Flavan-3-ole zu oxidierten Produkten umgesetzt. Diese oxidierten Carbonylverbindungen können, am Beispiel von Pru av 1 aus Kirschen, die Tertiärstruktur und so die Konformation der Epitope verändern (Gruber *et al.*, 2004). Die Konzentration an freien, detektierbaren Flavan-3-olen wird durch diesen Prozess verringert was den ermittelten Ergebnissen und dem direkten Zusammenhang zwischen der Mal d 1-Konzentration und dem Gehalt an Flavan-3-olen entspricht.

## 5.5 Spezifische Peptide und Isoformen des Mal d 1

Die Tatsache, dass Mal d 1, wie viele andere PR-10-Proteine, von einer Vielzahl an Genen kodiert wird, und somit mehrere Isoformen des Proteins existieren, ist bereits seit vielen Jahren bekannt (Swoboda *et al.*, 1995, Gao *et al.*, 2005, Lebel *et al.*, 2010). Für 'Golden Delicious' sind 31 Gene auf unterschiedlichen Chromosomen beschrieben (Pagliarani *et al.*, 2013). Die Expression der einzelnen Gene ist dabei sowohl abhängig von Genotyp (Gao *et al.*, 2008), dem Pflanzenorgan (Marzban *et al.*, 2006, Pagliarani *et al.*, 2013, Zhang *et al.*, 2015), dem Reifungsgrad (Atkinson *et al.*, 1996), wie auch dem Stresseinfluss durch Kälte oder Pathogenbefall (Botton *et al.*, 2008). Jedoch können die für eine allergische Reaktion relevanten Proteinisoformen nicht anhand der Genanalyse untersucht werden (Schenk *et al.*, 2010). Einige Gene zeigen eine starke Variabilität in ihren resultierenden Isoformen. So konnten für das Gen, das Mal d 1.06C kodiert, sechs unterschiedliche allelische Varianten und für das Gen Mal d 1.06B fünf Proteinvarianten in verschiedenen Kultivaren charakterisiert werden (Gao *et al.*, 2008). Dies führt zu einer hohen Anzahl von über 100 bekannten variierenden Aminosäuresequenzen für das Mal d 1. Aufgrund der Diploidie der meisten Äpfel sind dabei jedoch maximal zwei Varianten für jeden Genotyp möglich.

Obwohl über die biologische Funktion vieler PR-10-Proteine noch vieles unklar ist, gibt es über die unterschiedlichen Eigenschaften der Proteine mit deren verschiedenen Isoformen bereits einige Erkenntnisse. Die Änderung einzelner Aminosäuren kann die Bindungseigenschaften der Proteine bezüglich natürlicher Liganden beeinflussen. Bei dem homologen PR-10 Protein aus Birkenpollen, Bet v 1, konnten klare Unterschiede in der Bindungsspezifität und die bindenden Liganden festgestellt werden (Seutter von Loetzen *et al.*, 2015). Auch Untersuchungen des Fra a 1, dem Hauptallergen in Erdbeeren, zeigten, dass Liganden wie Catechin oder Myricetin in die Bindungstasche bestimmter Isoformen des Proteins binden (Casanal *et al.*, 2013b). Zusätzlich werden durch kleine Punktmutationen in der Aminosäuresequenz die physikalischen Eigenschaften wie die pH-Stabilität der Proteine beeinflusst (Machado *et al.*, 2016). Ebenso kann die Allergenität durch die IgE-Bindungskapazität durch solche Mutationen in Epitopregionen herabgesetzt werden (Kofler *et al.*, 2012, Orozco-Navarrete *et al.*, 2019). Dies erfolgt hauptsächlich durch die Änderung der dreidimensionalen Strukturepitope durch Veränderungen der Aminosäuresequenz (Neudecker *et al.*, 2003, Holm *et al.*, 2011). Bet v 1 weist, neben dem linearen T-Zell-Epitop an der Position 142–156 (Jahn-Schmid *et al.*, 2005), ein hochkonserviertes Strukturepitop BV16 auf, welches die Aminosäuren der glycinreichen Schleife zwischen den Faltblattstrukturen  $\beta 2$  und  $\beta 3$  und

weitere konservierte Aminosäuren beinhaltet und so etwa 10 % der Proteinoberfläche einschließt (Spangfort *et al.*, 2003). Analog dazu findet sich in der Mal d 1-Proteinstruktur ebenfalls ein Motiv, welches 13 dieser 16 konservierten Aminosäuren aufweist (Holm *et al.*, 2011, Ahammer *et al.*, 2017) und dessen IgE-Bindungsaffinität durch einzelne Mutationen stark herabgesetzt werden kann (Holm *et al.*, 2011). Schirmer *et al.* (2005) konnte noch weitere Strukturepitope in Allergenen der PR-10 Proteinfamilie nachweisen und nutzte diese Erkenntnisse zur Erklärung der Kreuzreaktivität des Hauptallergens des Selleries, Api g 1 (Schirmer *et al.*, 2005). Jedoch gibt es auch zwischen den Isoformen des Sellerieallergens große Unterschiede in der Bedeutung einzelner IgE-Epitopregionen (Wangorsch *et al.*, 2007).

Da in den Humanstudien einige Genotypen trotz ähnlichem Mal d 1-Gehalt starke Unterschiede in den Symptomen der Patienten aufwiesen, deutete dies auf Unterschiede in der Isoformzusammensetzung der einzelnen Genotypen hin. Um dies zu untersuchen wurden LC-MS/MS Analysen nach tryptischen Verdau der Proteine der beiden Vergleichssorten 'Golden Delicious' und 'Santana' durchgeführt. Die Apfelsorten wiesen in der Humanstudie 2017 trotz ähnlicher Mal d 1-Gehalte, starke Unterschiede in der Verträglichkeit auf (Abbildung 16A). Ähnliche Analysenansätze wurden bereits für die Untersuchung von Bet v 1- und Mal d 1-Isoformen durchgeführt (Swoboda *et al.*, 1995, Helsper *et al.*, 2002, Schenk *et al.*, 2006). Jedoch erfassten diese Analysen nicht gleichzeitig alle möglichen Isoformen. Die hohe strukturelle Ähnlichkeit der Proteine und die dadurch resultierende geringe Wahrscheinlichkeit, die individuellen Peptide detektieren zu können, erschweren die Analyse.

Durch die Analyse der Peptide mittels LC-MS/MS konnten insgesamt 117 Peptide identifiziert werden, die den Sequenzen der Mal d 1-Isoformen zugeordnet werden konnten. Einige dieser Peptide konnten ausschließlich in einer der beiden Sorten identifiziert und teilweise sogar spezifisch einzelnen Isoformen zugeordnet werden (Abbildung 21). Nach dem Abgleich der Position der identifizierten Peptide im Protein mit der Immun Epitop Datenbank IEDB ([www.iebd.org](http://www.iebd.org)) konnten einige Aminosäuresequenzen ermittelt werden, die in bereits beschriebenen Epitopregionen lokalisiert sind (Abbildung 23). So beinhalten die Peptide *SIEILEGDGGVGTQK* ('Santana', Position 41 – 56) und *TVEILEGDGSVGTIK* ('Golden Delicious', Position 41 – 55) die Aminosäuren der Glycin-reichen Schleife (Abbildung 23), welche als Bestandteil des konservierten BV16 Epitops in Bet v 1 bekannt ist (Spangfort *et al.*, 2003, Schirmer *et al.*, 2005). Mutationen der Aminosäuren I44N, L45I und D48N des Mal d 1 führten zur Erhöhung der Oberflächenähnlichkeit zu Bet v 1, wodurch die Ausschüttung von Histamin in Basophilen Aktivierungstests signifikant erhöht wurde (Holm *et al.*, 2011). Somit

scheinen diese Aminosäuren in der Kreuzallergenität zwischen Bet v 1 und Mal d 1 eine bedeutende Rolle zu spielen.

Die Peptide *LIENYLLEHQDAYN* und *LVENYLLEHQDAYN* (beide aus 'Santana', Position 147 – 160) wiesen die konservierten Aminosäuren Y151 und L152 auf, welche in einem Strukturepitop mehrerer Bet v 1-homologen Proteine bereits beschrieben wurden (Schirmer *et al.*, 2005). Zudem konnte auch bei der Untersuchung einzelner Peptide auf ihre IgE-Bindungsaffinität dieser Bereich als Epitop identifiziert werden (Kitzmüller *et al.*, 2015, Gadermaier *et al.*, 2018). Die Position 142 – 156 wurde als relevanteste Epitopregion in Bezug auf die Kreuzreaktion mit Bet v 1-homologen Proteinen beschrieben (Jahn-Schmid *et al.*, 2005).

Ähnliche Ergebnisse lieferten auch die Peptide *GVFTYETEFISVIPPPR* ('Santana', Position 2 – 18) und *GVLTYETEYASHIPPAR* ('Golden Delicious', Position 2 – 18). Diese Peptide tragen an den Positionen G2, V3, E9, und S12 jeweils vier konservierte Aminosäuren, die laut Schirmer *et al.* (2005) in Strukturepitopen des Bet v 1 zu finden sind. Zudem überlappt dieser Bereich des Peptids mit Epitopen, welche in der Immun Epitop Datenbank aufgeführt werden (Geroldinger-Simic *et al.*, 2013, Kitzmüller *et al.*, 2015, IEDB Immune Epitope Database, 2019).

Das Peptid *LYYALVLDADNLLPK* (Position 19 – 33), welches nur in 'Golden Delicious' identifiziert werden konnte, ist in einem Teil des Proteins lokalisiert, welcher bereits mehrfach als Epitopregion beschrieben wurde ([www.iedb.org](http://www.iedb.org)). Ein Grund für die hohe Bindungsaffinität des Peptids zu Antikörpern könnten laut Schirmer *et al.* (2005) die Aminosäuren D27, D29, P33 und K34 sein. Dieser Bereich ist ein wichtiger Bestandteil eines Strukturepitops in Bet v 1 und an der IgE-Antikörpern beteiligt.

Die Kenntnisse über Epitopregionen und konservierte Aminosäuren, die in eine Antikörperbindung involviert sind, können Aufschluss über das allergene Potential der jeweiligen Isoform geben. Da jeder Patient sehr individuell auf einzelne Epitope reagiert, ist neben der Analyse der Peptide, die Durchführung von Humanstudien unerlässlich (Holm *et al.*, 2011, Kitzmüller *et al.*, 2015). Zudem müssen weitere Faktoren wie den Einfluss von Hitze, z.B. durch das Verarbeiten der Lebensmittel, berücksichtigt werden. Dadurch kann, abhängig vom Protein, das allergene Potential verstärkt oder verringert werden (Davis *et al.*, 2001, Verhoeckx *et al.*, 2015). Im Falle der Erdnuss steigt die allergene IgE-Bindung und die Schwere der allergischen Symptome nach dem Rösten um bis auf das 90-fache im Vergleich zu rohen Nüssen an. Grund dafür ist die Bildung von Maillardprodukten der meist hitzestabilen Allergene, z.B. Ara h 1 und Ara h 2 (Maleki *et al.*, 2000) und die Bildung neuer B-Zell-Epitope

(Davis *et al.*, 2001). Bei den hitzelablen PR-10-Proteinen verringert sich das allergene Potential bei der Verarbeitung und Hitzeeinfluss meist, aufgrund der Veränderung der Konformation und einem dadurch resultierenden Verlust der Strukturepitope (Verhoeckx *et al.*, 2015, Kurze *et al.*, 2018a, Kurze *et al.*, 2018b). Dies ermöglicht den Allergiepateinten einen meist symptomfreien Verzehr von prozessierten und erhitzten Apfelprodukten (Bolhaar *et al.*, 2005).

### 5.6 Chancen in der Züchtung

In der konventionellen Züchtung wurden die Sämlinge zunächst ausschließlich nach phänotypischen Merkmalen oder ihres Verhaltens gegenüber Krankheitserregern selektiert. Aufgrund der komplexen, meist multigenen Kontrolle dieser Merkmale, gestaltet sich die Züchtung als sehr zeitintensiv und schwer vorherzusehen (Kumar *et al.*, 2012). Basierend auf der stets wachsenden Anzahl an molekularen Methoden, kann die Selektion bereits zu einem deutlich früheren Zeitpunkt erfolgen (Peil *et al.*, 2011). Die markerbasierte Selektion (MAS – *marker assisted selection*) und die Analyse sogenannter Quantitative Trait Loci (QTL) ermöglicht die Identifizierung bestimmter Genmarker, z.B. für Resistenzen gegenüber Krankheitserregern oder eine rote Fruchtfleischfarbe, nach DNA-Extraktion der Sämlinge (Kumar *et al.*, 2012). Da es sich jedoch bei dem Mal d 1 um eine Genfamilie handelt, bleibt eine markerbasierte Selektion nach dem Allergengehalt schwierig.

Ein weiterer Faktor, der die Effizienz der konventionellen Züchtung von Äpfeln in hohem Maße beeinflusst, ist die Tatsache, dass es etwa 4-10 Jahre dauert bis ein Sämling zum ersten Mal Blüten trägt. Diese Zeitspanne zwischen der Auskeimung bis zur Blüte bezeichnet man als juvenile Phase (Visser, 1964). Daher gab es einige Versuche diese Zeitspanne zu verkürzen. Der Einsatz bestimmter Wurzelunterlagen zeigte erste Ergebnisse (Visser, 1964, Fischer, 1994). Durch eine definierte zusätzlichen Beleuchtungszeit im Gewächshaus konnte diese Phase auf etwa ein Jahr verkürzt werden (Peil *et al.*, 2011). Durch Einbringen eines Blüten-induzierenden Gens aus der Birke konnte die juvenile Phase sogar auf wenige Monate reduziert und im ersten Anbaujahr bereits erste Früchte geerntet werden (Flachowsky *et al.*, 2009, Flachowsky *et al.*, 2011). Diese Methode ermöglicht es, die Züchtungsperioden deutlich zu verkürzen und eine konventionelle Einkreuzung von Zielgenen, wie Krankheitsresistenzen aus Wildapfelformen zu beschleunigen. Aufgrund der Mendelschen Vererbungslehre, entstehen dabei auch nicht-transgene Nachkommen, welche das gewünschte Zielgen enthalten (Flachowsky *et al.*, 2009).

Basierend auf dem geltenden Europäischen Lebensmittelrecht, Verordnung 1831/2003, ist eine Vermarktung transgener Pflanzen nicht zulässig. Da bei diesem beschleunigten Züchtungsansatz von Flachowsky *et al.* (2009) ebenso nicht-transgene Früchte entstehen, könnten Äpfel dieser Art in Zukunft zugelassen werden.

Der Einsatz frühblühender Genotypen kann auch bei der Züchtung allergenarmer Äpfel zu einer Zeitersparnis in den Züchtungsperioden führen. Bei der Suche nach gut verträglichen Genotypen bleibt aufgrund des komplexen Zusammenspiels mehrerer Einflussfaktoren auf die Verträglichkeit, die konventionelle Selektion nach dem Allergengehalt, des Flavan-3-ol-Gehaltes wie auch weitere Fruchtparameter weiterhin von großer Wichtigkeit. Dadurch kann die Wahrscheinlichkeit der Identifizierung geeigneter Kandidaten erhöht werden.



## 6 Literaturverzeichnis

- Afif, A.K.** (2019) Apple storage in ultra-low oxygen cold store *Int. J. Agric. Res. Innov. Technol.*, **9**, 18-22.
- Agarwal, P. und Agarwal, P.K.** (2014) Pathogenesis related-10 proteins are small, structurally similar but with diverse role in stress signaling *Mol. Biol. Rep.*, **41**, 599-611.
- Agati, G. und Tattini, M.** (2010) Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection *New Phytol.*, **186**, 786-793.
- Ahammer, L., Grutsch, S., Kamenik, A.S., Liedl, K.R. und Tollinger, M.** (2017) Structure of the major apple allergen Mal d 1 *J. Agric. Food Chem.*, **65**, 1606-1612.
- Ahammer, L., Grutsch, S. und Tollinger, M.** (2016) NMR resonance assignments of the major apple allergen Mal d 1 *Biomol. NMR Assign.*, **10**, 287-290.
- Ahrazem, O., Jimeno, L., Lopez-Torrejon, G., Herrero, M., Espada, J.L., Sanchez-Monge, R., Duffort, O., Barber, D. und Salcedo, G.** (2007) Assessing allergen levels in peach and nectarine cultivars *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, **99**, 42-47.
- Akiyama, H., Sakushima, J., Taniuchi, S., Kanda, T., Yanagida, A., Kojima, T., Teshima, R., Kobayashi, Y., Goda, Y. und Toyoda, M.** (2000) Antiallergic effect of apple polyphenols on the allergic model mouse *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 1370-1373.
- Andrade, L.B., Oliveira, A.S., Ribeiro, J.K., Kiyota, S., Vasconcelos, I.M., de Oliveira, J.T. und de Sales, M.P.** (2010) Effects of a novel pathogenesis-related class 10 (PR-10) protein from *Crotalaria pallida* Roots with papain inhibitory activity against root-knot nematode *Meloidogyne incognita* *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 4145-4152.
- Anese, R.d.O., Brackmann, A., Thewes, F.R., Schultz, E.E., Ludwig, V., Wendt, L.M., Wagner, R. und Klein, B.** (2020) Impact of dynamic controlled atmosphere storage and 1-methylcyclopropene treatment on quality and volatile organic compounds profile of 'Galaxy' apple *Food Packag. Shelf Life*, **23**, 100443.
- Anthony, M.S., Clarkson, T.B., Hughes, C.L., Jr., Morgan, T.M. und Burke, G.L.** (1996) Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys *J. Nutr.*, **126**, 43-50.
- Asero, R.** (1998) Effects of birch pollen-specific immunotherapy on apple allergy in birch pollen-hypersensitive patients *Clin. Exp. Allergy*, **28**, 1368-1373.
- Asero, R., Marzban, G., Martinelli, A., Zaccarini, M. und Machado, M.L.** (2006) Search for low-allergenic apple cultivars for birch-pollen-allergic patients: is there a correlation between in vitro assays and patient response? *Eur. Ann. Allergy Clin. Immunol.*, **38**, 94-98.
- Atkinson, R.G., Perry, J., Matsui, T., Ross, G.S. und Macrae, E.A.** (1996) A stress-, pathogenesis-, and allergen-related cDNA in apple fruit is also ripening-related *New Zeal. J. Crop Hort.*, **24**, 103-107.
- Ausukua, M., Dublin, I., Echebarria, M.A. und Aguirre, J.M.** (2009) Oral Allergy Syndrome (OAS). General and stomatological aspects *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal*, **14**, e568-572.
- Awad, M.A., de Jager, A. und van Westing, L.M.** (2000) Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: characterisation of variation *Sci. Horti.*, **83**, 249-263.
- Bacon, J.S., Davidson, E.D., Jones, D. und Taylor, I.F.** (1966) The location of chitin in the yeast cell wall *Biochem. J.*, **101**, 36C-38C.
- Bantignies, B., Séguin, J., Muzac, I., Dédaldéchamp, F., Gulick, P. und Ibrahim, R.** (2000) Direct evidence for ribonucleolytic activity of a PR-10-like protein from white lupin roots *Plant Mol. Biol.*, **42**, 871-881.

- Baxter, D.** (2007) Active and passive immunity, vaccine types, excipients and licensing *Occup. Med.*, **57**, 552-556.
- Benevenuto, J., Ferrão, L.F.V., Amadeu, R.R. und Munoz, P.** (2019) How can a high-quality genome assembly help plant breeders? *GigaScience*, **8**.
- Besbes, F., Franz-Oberdorf, K. und Schwab, W.** (2019) Phosphorylation-dependent ribonuclease activity of Fra a 1 proteins *J. Plant Physiol.*, **233**, 1-11.
- Beuning, L., Bowen, J., Persson, H., Barraclough, D., Bulley, S. und Macrae, E.** (2004) Characterisation of Mal d 1-related genes in *Malus* *Plant Mol. Biol.*, **55**, 369-388.
- Biedermann, T., Winther, L., Till, S.J., Panzner, P., Knulst, A. und Valovirta, E.** (2019) Birch pollen allergy in Europe *Allergy*, **74**, 1237-1248.
- Biomay AG** (2020) Recombinant Allergen Shop - Product Description Mal d 1.0108, <https://www.biomay.com/allergen-shop/shop/> (Aufgerufen am: 01. 04. 2020)
- Björkstén, F., Halmepuro, L., Hannuksela, M. und Lahti, A.** (1980) Extraction and properties of apple allergens *Allergy*, **35**, 671-677.
- Bolhaar, S.T., van de Weg, W.E., van Ree, R., Gonzalez-Mancebo, E., Zuidmeer, L., Bruijnzeel-Koomen, C.A., Fernandez-Rivas, M., Jansen, J., Hoffmann-Sommergruber, K., Knulst, A.C. und Gilissen, L.J.** (2005) In vivo assessment with prick-to-prick testing and double-blind, placebo-controlled food challenge of allergenicity of apple cultivars *J. Allergy Clin. Immunol.*, **116**, 1080-1086.
- Botton, A., Lezzer, P., Dorigoni, A., Barcaccia, G., Ruperti, B. und Ramina, A.** (2008) Genetic and environmental factors affecting allergen-related gene expression in apple fruit (*Malus domestica* L. Borkh) *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 6707-6716.
- Boyer, J. und Liu, R.H.** (2004) Apple phytochemicals and their health benefits *Nutr. J.*, **3**, 5.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Bravo, L.** (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance *Nutr. Rev.*, **56**, 317-333.
- Breitenbach, M., Ferreira, F., Jilek, A., Swoboda, I., Ebner, C., Hoffmann-Sommergruber, K., Briza, P., Scheiner, O. und Kraft, D.** (1996) Biological and immunological importance of Bet v 1 isoforms *Adv. Exp. Med. Biol.*, **409**, 117-126.
- Breiteneder, H. und Mills, E.N.C.** (2005) Molecular properties of food allergens *J. Allergy Clin. Immunol.*, **115**, 14-23.
- Breiteneder, H., Pettenburger, K., Bito, A., Valenta, R., Kraft, D., Rumpold, H., Scheiner, O. und Breitenbach, M.** (1989) The gene coding for the major birch pollen allergen Betv1, is highly homologous to a pea disease resistance response gene *Embo J.*, **8**, 1935-1938.
- Broide, D.H.** (2001) Molecular and cellular mechanisms of allergic disease *J. Allergy Clin. Immunol.*, **108**, S65-71.
- Bronner, C. und Landry, Y.** (1985) Kinetics of the inhibitory effect of flavonoids on histamine secretion from mast cells *Agents and actions*, **16**, 147-151.
- Brouns, F., Theuwissen, E., Adam, A., Bell, M., Berger, A. und Mensink, R.P.** (2012) Cholesterol-lowering properties of different pectin types in mildly hypercholesterolemic men and women *Eur. J. Clin. Nutr.*, **66**, 591-599.
- Bucher, X., Pichler, W.J., Dahinden, C.A. und Helbling, A.** (2004) Effect of tree pollen specific, subcutaneous immunotherapy on the oral allergy syndrome to apple and hazelnut *Allergy*, **59**, 1272-1276.
- Bufe, A., Spangfort, M.D., Kahlert, H., Schlaak, M. und Becker, W.M.** (1996) The major birch pollen allergen, Bet v 1, shows ribonuclease activity *Planta*, **199**, 413-415.

- Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft** (2019) BMLE Statistik Pro-Kopf-Verbrauch von Obst, <https://www.bmel-statistik.de/ernaehrung-fischerei/versorgungsbilanzen/obst-gemuese-zitrusfruechte-schalen-und-trockenobst/> (Aufgerufen am: 31. 10. 2019)
- Bundessortenamt** (2019) Gesamtliste der Apfelsorten, Stand Januar 2019.
- Burton, D.R., Roitt, I.M., Delves, P.J. und Martin, S.J.** (2017) *Roitt's Essential Immunology* 13. Aufl. John Wiley and Sons (Hoboken, New Jersey)
- Carrillo, J.A., Zafrilla, M.P. und Marhuenda, J.** (2019) Cognitive function and consumption of fruit and vegetable polyphenols in a young population: Is there a relationship? *Foods*, **8**.
- Casnal, A., Zander, U., Dupeux, F., Valpuesta, V. und Marquez, J.A.** (2013a) Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the strawberry allergens Fra a 1E and Fra a 3 in the presence of catechin *Acta Cryst. F*, **69**, 510-514.
- Casnal, A., Zander, U., Munoz, C., Dupeux, F., Luque, I., Botella, M.A., Schwab, W., Valpuesta, V. und Marquez, J.A.** (2013b) The strawberry pathogenesis-related 10 (PR-10) Fra a proteins control flavonoid biosynthesis by binding to metabolic intermediates *J. Biol. Chem.*, **288**, 35322-35332.
- Chadha, P. und Das, R.H.** (2006) A pathogenesis related protein, AhPR10 from peanut: an insight of its mode of antifungal activity *Planta*, **225**, 213-222.
- Chapman, M.D., Pomes, A., Breiteneder, H. und Ferreira, F.** (2007) Nomenclature and structural biology of allergens *J. Allergy Clin. Immunol.*, **119**, 414-420.
- Chung, W.S.F., Meijerink, M., Zeuner, B., Holck, J., Louis, P., Meyer, A.S., Wells, J.M., Flint, H.J. und Duncan, S.H.** (2017) Prebiotic potential of pectin and pectic oligosaccharides to promote anti-inflammatory commensal bacteria in the human colon *FEMS Microbiol. Ecol.*, **93**.
- Chye, M.L., Zhao, K.J., He, Z.M., Ramalingam, S. und Fung, K.L.** (2005) An agglutinating chitinase with two chitin-binding domains confers fungal protection in transgenic potato *Planta*, **220**, 717-730.
- Clark, A.T. und Ewan, P.W.** (2003) Interpretation of tests for nut allergy in one thousand patients, in relation to allergy or tolerance *Clin. Exp. Allergy*, **33**, 1041-1045.
- Constant, S., Pfeiffer, C., Woodard, A., Pasqualini, T. und Bottomly, K.** (1995) Extent of T cell receptor ligation can determine the functional differentiation of naive CD4+ T cells *J. Exp. Med.*, **182**, 1591-1596.
- Coombs, R.R.A. und Gell, P.G.H.** (1963) The classification of allergic reactions underlying disease. In: *Clinical Aspects of Immunology* (Gell, P.G.H. und Coombs, R.R.A. ed.), **2. Aufl.** F. A. Davis Company (Philadelphia)
- Crowe, J., Dobeli, H., Gentz, R., Hochuli, E., Stüber, D. und Henco, K.** (1994) 6xHis-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification. In: *Protocols for Gene Analysis* (Harwood, A.J. ed.), Humana Press (Totowa, NJ)
- D'Amato, G., Cecchi, L., Bonini, S., Nunes, C., Annesi-Maesano, I., Behrendt, H., Liccardi, G., Popov, T. und van Cauwenberge, P.** (2007) Allergenic pollen and pollen allergy in Europe *Allergy*, **62**, 976-990.
- Damialis, A., Traidl-Hoffmann, C. und Treudler, R.** (2019) Climate change and pollen allergies. In: *Biodiversity and Health in the Face of Climate Change* (Marselle, M. et al. ed.), Springer International Publishing (Cham)
- Davis, P.J., Smales, C.M. und James, D.C.** (2001) How can thermal processing modify the antigenicity of proteins? *Allergy*, **56 Suppl 67**, 56-60.

- de Groot, H., de Jong, N.W., Vuijk, M.H. und Gerth van Wijk, R.** (1996) Birch pollinosis and atopy caused by apple, peach, and hazelnut; comparison of three extraction procedures with two apple strains *Allergy*, **51**, 712-718.
- Deutscher Allergie- und Asthmabund (DAAB)** (2020) Babys Allergierisiko senken, Toleranz fördern - Allergien vorbeugen, <https://www.daab.de/allergien/wichtig-zu-wissen/babys-allergie-risiko/allergiepravention/> (Aufgerufen am: 07. 01. 2020)
- Deutscher Wetterdienst** (2017) *Pressemitteilung*: Deutschlandwetter im Jahr 2017 (29.12.2017), DWD-Pressestelle, Offenbach, [https://www.dwd.de/DE/presse/pressemitteilungen/pressemitteilungen\\_node.html](https://www.dwd.de/DE/presse/pressemitteilungen/pressemitteilungen_node.html)
- Deutscher Wetterdienst** (2018) *Pressemitteilung*: Deutschlandwetter im Jahr 2018 (28.12.2018), DWD-Pressestelle, Offenbach, [https://www.dwd.de/DE/presse/pressemitteilungen/pressemitteilungen\\_node.html](https://www.dwd.de/DE/presse/pressemitteilungen/pressemitteilungen_node.html)
- Diaz-Sanchez, D., Garcia, M.P., Wang, M., Jyrala, M. und Saxon, A.** (1999) Nasal challenge with diesel exhaust particles can induce sensitization to a neoallergen in the human mucosa *J. Allergy Clin. Immunol.*, **104**, 1183-1188.
- Duan, N., Bai, Y., Sun, H., Wang, N., Ma, Y., Li, M., Wang, X., Jiao, C., Legall, N., Mao, L., Wan, S., Wang, K., He, T., Feng, S., Zhang, Z., Mao, Z., Shen, X., Chen, X., Jiang, Y., Wu, S., Yin, C., Ge, S., Yang, L., Jiang, S., Xu, H., Liu, J., Wang, D., Qu, C., Wang, Y., Zuo, W., Xiang, L., Liu, C., Zhang, D., Gao, Y., Xu, Y., Xu, K., Chao, T., Fazio, G., Shu, H., Zhong, G.-Y., Cheng, L., Fei, Z. und Chen, X.** (2017) Genome re-sequencing reveals the history of apple and supports a two-stage model for fruit enlargement *Nat. Commun.*, **8**, 249.
- Dubois, A.E., Pagliarani, G., Brouwer, R.M., Kollen, B.J., Dragsted, L.O., Eriksen, F.D., Callesen, O., Gilissen, L.J., Krens, F.A., Visser, R.G., Smulders, M.J., Vlieg-Boerstra, B.J., Flokstra-de Blok, B.J. und van de Weg, W.E.** (2015) First successful reduction of clinical allergenicity of food by genetic modification: Mal d 1-silenced apples cause fewer allergy symptoms than the wild-type cultivar *Allergy*, **70**, 1406-1412.
- Egger, C., Focke, M., Bircher, A.J., Scherer, K., Mothes-Luksch, N., Horak, F. und Valenta, R.** (2008) The allergen profile of beech and oak pollen *Clin. Exp. Allergy*, **38**, 1688-1696.
- Ekramoddoullah, A.K.M.** (2004) Physiology and molecular biology of a family of pathogenesis-related PR-10 proteins in conifers *J. Crop Improv.*, **10**, 261-280.
- El Gueddari, N.E., Rauchhaus, U., Moerschbacher, B. und Deising, H.** (2002) Developmentally regulated conversion of surface-exposed chitin to chitosan in cell walls of plant pathogenic fungi *New Phytol.*, **156**, 103-112.
- Enomoto, T., Nagasako-Akazome, Y., Kanda, T., Ikeda, M. und Dake, Y.** (2006) Clinical effects of apple polyphenols on persistent allergic rhinitis: A randomized double-blind placebo-controlled parallel arm study *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.*, **16**, 283-289.
- Eriksson, N.E., Formgren, H. und Svenonius, E.** (1982) Food hypersensitivity in patients with pollen allergy *Allergy*, **37**, 437-443.
- Espley, R.V., Leif, D., Plunkett, B., McGhie, T., Henry-Kirk, R., Hall, M., Johnston, J.W., Punter, M.P., Boldingh, H., Nardoza, S., Volz, R.K., O'Donnell, S. und Allan, A.C.** (2019) Red to brown: An elevated anthocyanic response in apple drives ethylene to advance maturity and fruit flesh browning *Front. Plant Sci.*, **10**, 1248-1248.
- FAO GM Foods Platform** (2020) Food and Agriculture Organization of the United Nations, <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/gm-foods-platform/en/> (Aufgerufen am: 27. 01. 2020)

- FAOSTAT Statistical Database** (2019) Food and Agriculture Organization of the United Nations, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> (Aufgerufen am: 16. 10. 2019)
- FDA U.S. Food and Drug Administration** (2020) Food from new plant varieties, <https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/food-new-plant-varieties> (Aufgerufen am: 27. 01. 2020)
- Fernandes, H., Michalska, K., Sikorski, M. und Jaskolski, M.** (2013) Structural and functional aspects of PR-10 proteins *Febs J.*, **280**, 1169-1199.
- Ferreira, F., Hirtenlehner, K., Jilek, A., Godnik-Cvar, J., Breiteneder, H., Grimm, R., Hoffmann-Sommergruber, K., Scheiner, O., Kraft, D., Breitenbach, M., Rheinberger, H.J. und Ebner, C.** (1996) Dissection of immunoglobulin E and T lymphocyte reactivity of isoforms of the major birch pollen allergen Bet v 1: potential use of hypoallergenic isoforms for immunotherapy *The Journal of experimental medicine*, **183**, 599-609.
- Fischer, C.** (1994) Shortening of the juvenile period in apple breeding. In: *Progress in Temperate Fruit Breeding: Proceedings of the Eucarpia Fruit Breeding Section Meeting held at Wädenswil/Einsiedeln, Switzerland from August 30 to September 3, 1993* (Schmidt, H. und Kellerhals, M. ed.), Springer Netherlands (Dordrecht)
- Flachowsky, H., Hanke, M.V., Peil, A., Strauss, S.H. und Fladung, M.** (2009) A review on transgenic approaches to accelerate breeding of woody plants *Plant Breeding*, **128**, 217-226.
- Flachowsky, H., Le Roux, P.M., Peil, A., Patocchi, A., Richter, K. und Hanke, M.V.** (2011) Application of a high-speed breeding technology to apple (*Malus x domestica*) based on transgenic early flowering plants and marker-assisted selection *New Phytol.*, **192**, 364-377.
- Franz-Oberdorf, K., Eberlein, B., Edelmann, K., Hücherig, S., Besbes, F., Darsow, U., Ring, J. und Schwab, W.** (2016) Fra a 1.02 Is the most potent isoform of the Bet v 1-like allergen in strawberry fruit *J. Agric. Food Chem.*, **64**, 3688-3696.
- Fritsch, R., Bohle, B., Vollmann, U., Wiedermann, U., Jahn-Schmid, B., Krebitz, M., Breiteneder, H., Kraft, D. und Ebner, C.** (1998) Bet v 1, the major birch pollen allergen, and Mal d 1, the major apple allergen, cross-react at the level of allergen-specific T helper cells *J. Allergy Clin. Immunol.*, **102**, 679-686.
- FRUMATIS** (2019) Fruit Reproduction Material Information System: EU variety register [https://ec.europa.eu/food/plant/plant\\_propagation\\_material/plant\\_variety\\_catalogues\\_databases\\_en](https://ec.europa.eu/food/plant/plant_propagation_material/plant_variety_catalogues_databases_en) (Aufgerufen am: 19. 11. 2019)
- Gadermaier, E., Marth, K., Lupinek, C., Campana, R., Hofer, G., Blatt, K., Smiljkovic, D., Roder, U., Focke-Tejkl, M., Vrtala, S., Keller, W., Valent, P., Valenta, R. und Flicker, S.** (2018) Isolation of a high-affinity Bet v 1-specific IgG-derived ScFv from a subject vaccinated with hypoallergenic Bet v 1 fragments *Allergy*, **73**, 1425-1435.
- Gajhede, M., Osmark, P., Poulsen, F.M., Ipsen, H., Larsen, J.N., Joost van Neerven, R.J., Schou, C., Lowenstein, H. und Spangfort, M.D.** (1996) X-ray and NMR structure of Bet v 1, the origin of birch pollen allergy *Nat. Struct. Biol.*, **3**, 1040-1045.
- Galli, S.J., Tsai, M. und Piliponsky, A.M.** (2008) The development of allergic inflammation *Nature*, **454**, 445-454.
- Gao, L.** (2019) Structure analysis of a pathogenesis-related 10 protein from *Gardenia jasminoides* *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, **242**, 042005.
- Gao, Z., van de Weg, E.W., Matos, C.I., Arens, P., Bolhaar, S.T., Knulst, A.C., Li, Y., Hoffmann-Sommergruber, K. und Gilissen, L.J.** (2008) Assessment of allelic diversity in intron-containing Mal d 1 genes and their association to apple allergenicity *BMC Plant Biol.*, **8**, 116.

- Gao, Z.S., van de Weg, W.E., Schaart, J.G., Schouten, H.J., Tran, D.H., Kodde, L.P., van der Meer, I.M., van der Geest, A.H., Kodde, J., Breiteneder, H., Hoffmann-Sommergruber, K., Bosch, D. und Gilissen, L.J.** (2005) Genomic cloning and linkage mapping of the Mal d 1 (PR-10) gene family in apple (*Malus domestica*) *Theor. Appl. Genet.*, **111**, 171-183.
- Garcia, A., Wichers, J.H. und Wichers, H.J.** (2007) Decrease of the IgE-binding by Mal d 1, the major apple allergen, by means of polyphenol oxidase and peroxidase treatments *Food Chem.*, **103**, 94-100.
- Garzón, G.A. und Wrolstad, R.E.** (2002) Comparison of the stability of pelargonidin-based anthocyanins in strawberry juice and concentrate *J. Food Sci.*, **67**, 1288-1299.
- Geroldinger-Simic, M., Kinaciyan, T., Nagl, B., Baumgartner-Durchschlag, U., Huber, H., Ebner, C., Lidholm, J., Bartel, D., Vieths, S., Jahn-Schmid, B. und Bohle, B.** (2013) Oral exposure to Mal d 1 affects the immune response in patients with birch pollen allergy *J. Allergy Clin. Immunol.*, **131**, 94-102.
- Geroldinger-Simic, M., Zelniker, T., Aberer, W., Ebner, C., Egger, C., Greiderer, A., Prem, N., Lidholm, J., Ballmer-Weber, B.K., Vieths, S. und Bohle, B.** (2011) Birch pollen-related food allergy: clinical aspects and the role of allergen-specific IgE and IgG4 antibodies *J. Allergy Clin. Immunol.*, **127**, 616-623.
- Gilfillan, A.M. und Rivera, J.** (2009) The tyrosine kinase network regulating mast cell activation *Immunol. Rev.*, **228**, 149-169.
- Gilissen, L.J., Bolhaar, S.T., Matos, C.I., Rouwendal, G.J., Boone, M.J., Krens, F.A., Zuidmeer, L., Van Leeuwen, A., Akkerdaas, J., Hoffmann-Sommergruber, K., Knulst, A.C., Bosch, D., Van de Weg, W.E. und Van Ree, R.** (2005) Silencing the major apple allergen Mal d 1 by using the RNA interference approach *J. Allergy Clin. Immunol.*, **115**, 364-369.
- Ginter, E. und Simko, V.** (2012) Plant polyphenols in prevention of heart disease *Bratisl. Lek. Listy*, **113**, 476-480.
- Gonzalez, H., Hagerling, C. und Werb, Z.** (2018) Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression *Genes Dev.*, **32**, 1267-1284.
- Gruber, P., Vieths, S., Wangorsch, A., Nerkamp, J. und Hofmann, T.** (2004) Maillard reaction and enzymatic browning affect the allergenicity of Pru av 1, the major allergen from cherry (*Prunus avium*) *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 4002-4007.
- Haka, J., Niemi, M.H., Iljin, K., Reddy, V.S., Takkinen, K. und Laukkanen, M.L.** (2015) Isolation of Mal d 1 and Api g 1 - specific recombinant antibodies from mouse IgG Fab fragment libraries - Mal d 1-specific antibody exhibits cross-reactivity against Bet v 1 *BMC Biotechnol.*, **15**, 34.
- Han, M., Li, G., Liu, X., Li, A., Mao, P., Liu, P. und Li, H.** (2019) Phenolic profile, antioxidant activity and anti-proliferative activity of crabapple fruits *Hortic. Plant J.*, **5**, 155-163.
- Han, Y., Kim, J. und Ahn, K.** (2012) Food allergy *Korean J. Pediatr.*, **55**, 153-158.
- Härtl, K., Denton, A., Franz-Oberdorf, K., Hoffmann, T., Spornraft, M., Usadel, B. und Schwab, W.** (2017) Early metabolic and transcriptional variations in fruit of natural white-fruited *Fragaria vesca* genotypes *Sci. Rep.*, **7**, 45113.
- Heldt, H.W. und Piechulla, B.** (2015) 18 - Die Phenylpropanoide umfassen eine Vielzahl pflanzlicher Spezialmetabolite und Zellwandbestandteile. In: *Pflanzenbiochemie* ed.), **5** Springer Spektrum (Berlin, Heidelberg)
- Helsper, J.P.F.G., Gilissen, L.J.W.J., van Ree, R., America, A.H.P., Cordewener, J.H.G. und Bosch, D.** (2002) Quadrupole time-of-flight mass spectrometry: A method to study the actual expression of allergen isoforms identified by PCR cloning *J. Allergy Clin. Immunol.*, **110**, 131-138.

- Hemmings, O., Kwok, M., McKendry, R. und Santos, A.F.** (2018) Basophil activation test: Old and new applications in allergy *Curr. Allergy Asthma Rep.*, **18**, 77-77.
- Henzgen, M., Vieths, S., Reese, I., Erdmann, S., Fuchs, T., Jäger, L., Kleine-Tebbe, J., Lepp, U., Niggemann, B., Saloga, J., Vieluf, I., Zuberbier, T. und Werfel, T.** (2005) Nahrungsmittelallergien durch immunologische Kreuzreaktionen *Allergo J.*, **14**, 48-59.
- Hilt, P., Schieber, A., Yildirim, C., Arnold, G., Klaiber, I., Conrad, J., Beifuss, U. und Carle, R.** (2003) Detection of phloridzin in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) by HPLC-PDA-MS/MS and NMR spectroscopy *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 2896-2899.
- Hoffmann-Sommergruber, K.** (2002) Pathogenesis-related (PR)-proteins identified as allergens *Biochem. Soc. Trans.*, **30**, 930-935.
- Hoffmann-Sommergruber, K., Pfeifer, S. und Bublin, M.** (2015) Applications of molecular diagnostic testing in food allergy *Curr. Allergy Asthma Rep.*, **15**, 56.
- Hoffmann-Sommergruber, K., Sancho, A.I. und Gilissen, L.J.W.J.** (2007) Identifying fruit, nut and vegetable cultivars with low allergen levels and effects of post-harvest treatments. In: *Managing Allergens in Food* (Mills, C. et al. ed.), Woodhead Publishing
- Holderbaum, D., Kon, T., Kudo, T. und Guerra, M.** (2010) Enzymatic browning, polyphenol oxidase activity, and polyphenols in four apple cultivars: Dynamics during fruit development *Hort Sci.*, **45**, 1150-1154.
- Hollman, P.C.H. und Arts, I.C.W.** (2000) Flavonols, flavones and flavanols – nature, occurrence and dietary burden *J. Sci. Food Agric.*, **80**, 1081-1093.
- Holm, J., Ferreras, M., Ipsen, H., Wurtzen, P.A., Gajhede, M., Larsen, J.N., Lund, K. und Spangfort, M.D.** (2011) Epitope grafting, re-creating a conformational Bet v 1 antibody epitope on the surface of the homologous apple allergen Mal d 1 *J. Biol. Chem.*, **286**, 17569-17578.
- Holton, T.A. und Cornish, E.C.** (1995) Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis *Plant Cell*, **7**, 1071-1083.
- IEDB Immune Epitope Database** (2019) National Institute of Allergy and Infectious Diseases, [https://www.iedb.org/result\\_v3.php?cookie\\_id=1ee70a](https://www.iedb.org/result_v3.php?cookie_id=1ee70a) (Aufgerufen am: 16. 10. 2019)
- Jacob, T., von Loetzen, C.S., Reuter, A., Lacher, U., Schiller, D., Schobert, R., Mahler, V., Vieths, S., Rösch, P., Schweimer, K. und Wöhrl, B.M.** (2019) Identification of a natural ligand of the hazel allergen Cor a 1 *Sci. Rep.*, **9**, 8714.
- Jahn-Schmid, B., Radakovics, A., Luttkopf, D., Scheurer, S., Vieths, S., Ebner, C. und Bohle, B.** (2005) Bet v 1142-156 is the dominant T-cell epitope of the major birch pollen allergen and important for cross-reactivity with Bet v 1-related food allergens *J. Allergy Clin. Immunol.*, **116**, 213-219.
- Jain, S., Kumar, D., Jain, M., Chaudhary, P., Deswal, R. und Sarin, N.B.** (2012) Ectopic overexpression of a salt stress-induced pathogenesis-related class 10 protein (PR10) gene from peanut (*Arachis hypogaea* L.) affords broad spectrum abiotic stress tolerance in transgenic tobacco *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, **109**, 19-31.
- Kahle, K., Kraus, M. und Richling, E.** (2005) Polyphenol profiles of apple juices *Molecular nutrition & food research*, **49**, 797-806.
- Kanda, T., Akiyama, H., Yanagida, A., Tanabe, M., Goda, Y., Toyoda, M., Teshima, R. und Saito, Y.** (1998) Inhibitory effects of apple polyphenol on induced histamine release from RBL-2H3 cells and rat mast cells *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1284-1289.
- Karamloo, F., Scheurer, S., Wangorsch, A., May, S., Haustein, D. und Vieths, S.** (2001) Pyr c 1, the major allergen from pear (*Pyrus communis*), is a new member of the Bet v 1 allergen family *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, **756**, 281-293.

- Kashyap, R.R. und Kashyap, R.S.** (2015) Oral allergy syndrome: An update for stomatologists *J. Allergy*, **2015**, 543928-543928.
- Kellerhals, M., Ladner, J., Lorenz, B. und Rusterholz, P.** (2003) Befruchtung der Obstsorten *Eidgenössische Forschungsanstalt, Wädenswil*, Flugschrift Nr. 30.
- Kiewning, D. und Schmitz-Eiberger, M.** (2014) Effects of long-term storage on Mal d 1 content of four apple cultivars with initial low Mal d 1 content *J. Sci. Food Agric.*, **94**, 798-802.
- Kiewning, D., Wollseifen, R. und Schmitz-Eiberger, M.** (2013) The impact of catechin and epicatechin, total phenols and PPO activity on the Mal d 1 content in apple fruit *Food Chem.*, **140**, 99-104.
- Kinaciyan, T., Nagl, B., Faustmann, S., Frommlet, F., Kopp, S., Wolkersdorfer, M., Wöhrl, S., Bastl, K., Huber, H., Berger, U. und Bohle, B.** (2018) Efficacy and safety of 4 months of sublingual immunotherapy with recombinant Mal d 1 and Bet v 1 in patients with birch pollen-related apple allergy *J. Allergy Clin. Immunol.*, **141**, 1002-1008.
- Kirchhoff, E., Scherz, H. und Senser, F.** (2009) *Der kleine Souci, Fachmann, Kraut - Lebensmitteltabellen für die Praxis 4. Aufl.* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart
- Kitzmüller, C., Zulehner, N., Roulias, A., Briza, P., Ferreira, F., Fae, I., Fischer, G.F. und Bohle, B.** (2015) Correlation of sensitizing capacity and T-cell recognition within the Bet v 1 family *J. Allergy Clin. Immunol.*, **136**, 151-158.
- Kizis, D. und Siragakis, G.** (2014) *Food allergen testing - Molecular, immunochemical and chromatographic techniques 1. Aufl.* Wiley (West Sussex)
- Kofler, S., Asam, C., Eckhard, U., Wallner, M., Ferreira, F. und Brandstetter, H.** (2012) Crystallographically mapped ligand binding differs in high and low IgE binding isoforms of birch pollen allergen bet v 1 *J. Mol. Biol.*, **422**, 109-123.
- Koistinen, K.M., Soininen, P., Venalainen, T.A., Hayrinen, J., Laatikainen, R., Perakyla, M., Tervahauta, A.I. und Karenlampi, S.O.** (2005) Birch PR-10c interacts with several biologically important ligands *Phytochemistry*, **66**, 2524-2533.
- Kollmann, D., Geroldinger-Simic, M., Kinaciyan, T., Huber, H., Ebner, C., Lidholm, J. und Bohle, B.** (2013) Recombinant Mal d 1 is a reliable diagnostic tool for birch pollen allergen-associated apple allergy *J. Allergy Clin. Immunol.*, **132**, 1008-1010.
- Kolniak-Ostek, J., Wojdyło, A., Markowski, J. und Siucińska, K.** (2014) 1-Methylcyclopropene postharvest treatment and their effect on apple quality during long-term storage time *Eur. Food Res. Technol.*, **239**, 603-612.
- Kombrink, E., Schröder, M. und Hahlbrock, K.** (1988) Several "pathogenesis-related" proteins in potato are 1,3-beta-glucanases and chitinases *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 782-786.
- Kootstra, H.S., Vlieg-Boerstra, B.J. und Dubois, A.E.** (2007) Assessment of the reduced allergenic properties of the Santana apple *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, **99**, 522-525.
- Kopac, P., Rudin, M., Gentinetta, T., Gerber, R., Pichler, C., Hausmann, O., Schnyder, B. und Pichler, W.J.** (2012) Continuous apple consumption induces oral tolerance in birch-pollen-associated apple allergy *Allergy*, **67**, 280-285.
- Korićanac, A., Miletić, N., Popović, B., Mitrović, O., Lukić, M., Pešaković, M. und Tomić, J.** (2019) The effect of ULO and NA storage on changes in the quality of apple fruit (*Malus domestica* Borkh.) during shelf life *Agronomy*, **10**, 25.
- Krath, B.N., Eriksen, F.D., Pedersen, B.H., Gilissen, L.J.W.J., Van De Weg, W.E. und Dragsted, L.O.** (2009) Development of hypo-allergenic apples: silencing of the major allergen Mal d 1 gene in 'Elstar' apple and the effect of grafting *J. Hort. Sci.*, **84**, 52-57.

- Kschonsek, J., Dietz, A., Wiegand, C., Hipler, U.-C. und Böhm, V.** (2019a) Allergenicity of apple allergen Mal d 1 as effected by polyphenols and polyphenol oxidase due to enzymatic browning *LWT - Food Sci. Technol.*, **113**, 108289.
- Kschonsek, J., Wiegand, C., Hipler, U.-C. und Böhm, V.** (2019b) Influence of polyphenolic content on the in vitro allergenicity of old and new apple cultivars: A pilot study *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, **58**, 30-35.
- Kubatka, P., Kapinova, A., Kello, M., Kruzliak, P., Kajo, K., Vybohova, D., Mahmood, S., Murin, R., Viera, T., Mojzis, J., Zulli, A., Pec, M., Adamkov, M., Kassayova, M., Bojkova, B., Stollarova, N. und Dobrota, D.** (2016) Fruit peel polyphenols demonstrate substantial anti-tumour effects in the model of breast cancer *Eur. J. Nutr.*, **55**, 955-965.
- Kumar, S., Bink, M.C.A.M., Volz, R.K., Bus, V.G.M. und Chagné, D.** (2012) Towards genomic selection in apple (*Malus ×domestica* Borkh.) breeding programmes: Prospects, challenges and strategies *Tree Genet. Genomes*, **8**, 1-14.
- Kurze, E., Kock, V., Lo Scalzo, R., Olbricht, K. und Schwab, W.** (2018a) Effect of the strawberry genotype, cultivation and processing on the Fra a 1 allergen content *Nutrients*, **10**.
- Kurze, E., Lo Scalzo, R., Campanelli, G. und Schwab, W.** (2018b) Effect of tomato variety, cultivation, climate and processing on Sola l 4, an allergen from *Solanum lycopersicum* *PLOS ONE*, **13**, e0197971.
- Landete, J.M.** (2011) Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health *Food Res. Int.*, **44**, 1150-1160.
- Langen, U., Schmitz, R. und Steppuhn, H.** (2013) Häufigkeit allergischer Erkrankungen in Deutschland: Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1). *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, **56**, 698-706.
- Lattanzio, V., Lattanzino, V.M.T. und Cardinali, A.** (2006) Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. In: *Phytochemistry: Advances in Research* ed.), **661** (Kerala, India)
- Lebel, S., Schellenbaum, P., Walter, B. und Maillot, P.** (2010) Characterisation of the *Vitis vinifera* PR10 multigene family *BMC Plant Biol.*, **10**, 184.
- Lebensmittelinformationsverordnung LMIV (EU) Nr. 1169/2011 des Europäischen Parlaments und des Rates** (25. Oktober 2011) Artikel 21, Anhang 2, *in Kraft getreten: 13. Dezember 2014*
- Legrand, M., Kauffmann, S., Geoffroy, P. und Fritig, B.** (1987) Biological function of pathogenesis-related proteins: Four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 6750-6754.
- Liu, J.-J. und Ekramoddoullah, A.K.M.** (2006) The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: Their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses *Physiol. Mol. Plant P.*, **68**, 3-13.
- Liu, R.H., Liu, J. und Chen, B.** (2005) Apples prevent mammary tumors in rats *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 2341-2343.
- Lotan, T., Ori, N. und Fluhr, R.** (1989) Pathogenesis-related proteins are developmentally regulated in tobacco flowers *Plant Cell*, **1**, 881-887.
- MacGlashan, D., Jr.** (2010) Expression of CD203c and CD63 in human basophils: relationship to differential regulation of piecemeal and anaphylactic degranulation processes *Clin. Exp. Allergy*, **40**, 1365-1377.
- Machado, Y., Freier, R., Scheiblhofer, S., Thalhamer, T., Mayr, M., Briza, P., Grutsch, S., Ahammer, L., Fuchs, J.E., Wallnoefer, H.G., Isakovic, A., Kohlbauer, V., Hinterholzer, A., Steiner, M., Danzer, M., Horejs-Hoeck, J., Ferreira, F., Liedl,**

- K.R., Tollinger, M., Lackner, P., Johnson, C.M., Brandstetter, H., Thalhamer, J. und Weiss, R.** (2016) Fold stability during endolysosomal acidification is a key factor for allergenicity and immunogenicity of the major birch pollen allergen *J. Allergy Clin. Immunol.*, **137**, 1525-1534.
- Maeda-Yamamoto, M., Inagaki, N., Kitaura, J., Chikumoto, T., Kawahara, H., Kawakami, Y., Sano, M., Miyase, T., Tachibana, H., Nagai, H. und Kawakami, T.** (2004) O-methylated catechins from tea leaves inhibit multiple protein kinases in mast cells *J. Immunol.*, **172**, 4486-4492.
- Mainla, L., Moor, U., Karp, K. und Püssa, T.** (2011) The effect of genotype and rootstock on polyphenol composition of selected apple cultivars in Estonia *Zemdirbyste*, **98**, 63-70.
- Maleki, S.J., Chung, S.Y., Champagne, E.T. und Raufman, J.P.** (2000) The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins *J. Allergy Clin. Immunol.*, **106**, 763-768.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. und Jimenez, L.** (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability *Am. J. Clin. Nutr.*, **79**, 727-747.
- Markovic-Housley, Z., Degano, M., Lamba, D., von Roepenack-Lahaye, E., Clemens, S., Susani, M., Ferreira, F., Scheiner, O. und Breiteneder, H.** (2003) Crystal structure of a hypoallergenic isoform of the major birch pollen allergen Bet v 1 and its likely biological function as a plant steroid carrier *J. Mol. Biol.*, **325**, 123-133.
- Marshall, J.S., Warrington, R., Watson, W. und Kim, H.L.** (2018) An introduction to immunology and immunopathology *Allergy Asthma Clin. Immunol.*, **14**, 49-49.
- Marzban, G., Mansfeld, A., Herndl, A., Jäger, S., Stoyanova, M.E., Hemmer, W., Katinger, H. und Laimer, M.** (2006) Direct evidence for the presence of allergens in Rosaceae fruit tree pollen *Aerobiologia*, **22**, 237-245.
- Marzban, G., Puehringer, H., Dey, R., Brynda, S., Ma, Y., Martinelli, A., Zaccarini, M., van der Weg, E., Housley, Z., Kolarich, D., Altmann, F. und Laimer, M.** (2005) Localisation and distribution of the major allergens in apple fruits *Plant Sci.*, **169**, 387-394.
- Matthes, A. und Schmitz-Eiberger, M.** (2009) Apple (*Malus domestica* L. Borkh.) allergen Mal d 1: effect of cultivar, cultivation system, and storage conditions *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 10548-10553.
- McBride, J.K., Cheng, H., Maleki, S.J. und Hurlburt, B.K.** (2019) Purification and characterization of pathogenesis related class 10 panallergens *Foods*, **8**.
- Medzhitov, R. und Janeway, C.A.** (1997) Innate immunity: impact on the adaptive immune response *Curr. Opin. Immunol.*, **9**, 4-9.
- Mehinagic, E., Royer, G., Symoneaux, R., Jourjon, F. und Prost, C.** (2006) Characterization of odor-active volatiles in apples: Influence of cultivars and maturity stage *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 2678-2687.
- Mertens-Talcott, S.U., Talcott, S.T. und Percival, S.S.** (2003) Low concentrations of quercetin and ellagic acid synergistically influence proliferation, cytotoxicity and apoptosis in MOLT-4 human leukemia cells *J. Nutr.*, **133**, 2669-2674.
- Mikulic-Petkovsek, M., Usenik, V. und Stampar, F.** (2003) The role of chlorogenic acid in the resistance of apples to apple scab (*Venturia inaequalis* (Cooke) G. Wind. Aderh.) *Res. Rep. Biotech. Fac. Univ. Ljubljana*, **81**, 233-242.
- Mills, E.N., Sancho, A.I., Rigby, N.M., Jenkins, J.A. und Mackie, A.R.** (2009) Impact of food processing on the structural and allergenic properties of food allergens *Molecular nutrition & food research*, **53**, 963-969.

- Mogensen, J.E., Wimmer, R., Larsen, J.N., Spangfort, M.D. und Otzen, D.E.** (2002) The major birch allergen, Bet v 1, shows affinity for a broad spectrum of physiological ligands *J. Biol. Chem.*, **277**, 23684-23692.
- Moraes, A.H., Asam, C., Almeida, F.C.L., Wallner, M., Ferreira, F. und Valente, A.P.** (2018) Structural basis for cross-reactivity and conformation fluctuation of the major beech pollen allergen Fag s 1 *Sci. Rep.*, **8**, 10512.
- Munoz, C., Hoffmann, T., Escobar, N.M., Ludemann, F., Botella, M.A., Valpuesta, V. und Schwab, W.** (2010) The strawberry fruit Fra a allergen functions in flavonoid biosynthesis *Mol. Plant*, **3**, 113-124.
- Nakatani, N., Kayano, S.-i., Kikuzaki, H., Sumino, K., Katagiri, K. und Mitani, T.** (2000) Identification, quantitative determination, and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in prune (*Prunus domestica* L.) *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 5512-5516.
- Naoumkina, M.A., Zhao, Q., Gallego-Giraldo, L., Dai, X., Zhao, P.X. und Dixon, R.A.** (2010) Genome-wide analysis of phenylpropanoid defence pathways *Mol. Plant Pathol.*, **11**, 829-846.
- Neudecker, P., Lehmann, K., Nerkamp, J., Haase, T., Wangorsch, A., Fötisch, K., Hoffmann, S., Rösch, P., Vieths, S. und Scheurer, S.** (2003) Mutational epitope analysis of Pru av 1 and Api g 1, the major allergens of cherry (*Prunus avium*) and celery (*Apium graveolens*): Correlating IgE reactivity with three-dimensional structure *Biochem. J.*, **376**, 97-107.
- Neudecker, P., Schweimer, K., Nerkamp, J., Scheurer, S., Vieths, S., Sticht, H. und Rosch, P.** (2001) Allergic cross-reactivity made visible: solution structure of the major cherry allergen Pru av 1 *J. Biol. Chem.*, **276**, 22756-22763.
- Nicolas, J.J., Richard-Forget, F.C., Goupy, P.M., Amiot, M.J. und Aubert, S.Y.** (1994) Enzymatic browning reactions in apple and apple products *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **34**, 109-157.
- Niggemann, B., Erdmann, S., Fuchs, T., Henzgen, M., Jäger, L., Kleine-Tebbe, J., Lepp, U., Raithel, M., Reese, I., Saloga, J., Vieluf, I., Vieths, S., Zuberbier, T., Werfel, T. und DGAKI, A.G.N.d.** (2006) Standardisierung von oralen Provokationstests bei Nahrungsmittelallergien *Allergo J.*, **15**, 262-270.
- Noda, Y., Kaneyuki, T., Mori, A. und Packer, L.** (2002) Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 166-171.
- Nour, V., Trandafir, I. und Ionica, M.E.** (2010) Compositional characteristics of fruits of several apple (*Malus domestica* Borkh.) cultivars *Not. Bot. Horti. Agrobot. Cluj-Napoca*, **38**.
- Orozco-Navarrete, B., Kaczmarek, Z., Dupeux, F., Garrido-Arandia, M., Pott, D., Perales, A.D., Casanal, A., Marquez, J.A., Valpuesta, V. und Merchante, C.** (2019) Structural bases for the allergenicity of Fra a 1.02 in strawberry fruits *J. Agric. Food Chem.*
- Padmavati, M., Sakthivel, N., Thara, K.V. und Reddy, A.R.** (1997) Differential sensitivity of rice pathogens to growth inhibition by flavonoids *Phytochemistry*, **46**, 499-502.
- Pagliarani, G., Paris, R., Arens, P., Tartarini, S., Ricci, G., Smulders, M.M. und van de Weg, W.E.** (2013) A qRT-PCR assay for the expression of all Mal d 1 isoallergen genes *BMC Plant Biol.*, **13**, 51.
- Pagliarani, G., Paris, R., Iorio, A.R., Tartarini, S., Del Duca, S., Arens, P., Peters, S. und van de Weg, E.** (2012) Genomic organisation of the Mal d 1 gene cluster on linkage group 16 in apple *Mol. Breeding*, **29**, 759-778.
- Parker, J.D., Akinbami, L.J. und Woodruff, T.J.** (2009) Air pollution and childhood respiratory allergies in the United States *Environ. Health Perspect.*, **117**, 140-147.

- Pearce, F.L., Befus, A.D. und Bienenstock, J.** (1984) Mucosal mast cells: Effect of quercetin and other flavonoids on antigen-induced histamine secretion from rat intestinal mast cells *J. Allergy Clin. Immunol.*, **73**, 819-823.
- Peil, A., Kellerhals, M., Höfer, M. und Flachowsky, H.** (2011) Apple breeding - from the origin to genetic engineering *Fruit, Veg. Cereal Sci. Biotech.*, **5 Special Issue 1**, 118-138.
- Perez, A., Vilanova, S., Cañizares, J., Pascual, L., Blanca, J., Díez, M.J., Prohens, J. und Pico, B.** (2012) Application of Genomic Tools in Plant Breeding *Current genomics*, **13**, 179-195.
- Picchi, V., Lo Scalzo, R., Kurze, E., Fibiani, M., Vangdal, E. und Schwab, W.** (2019) Impact of year of harvest, genotype and cultivation method on bioactives and Pru d 1 allergen content in plums *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 1-13.
- Platts-Mills, T.A.** (2015) The allergy epidemics: 1870-2010 *J. Allergy Clin. Immunol.*, **136**, 3-13.
- Podsedek, A., Wilska-Jeszka, J., Anders, B. und Markowski, J.** (2000) Compositional characterisation of some apple varieties *Eur. Food Res. Technol.*, **210**, 268-272.
- Puehringer, H.M., Zinoecker, I., Marzban, G., Katinger, H. und Laimer, M.** (2003) MdAP, a novel protein in apple, is associated with the major allergen Mal d 1 *Gene*, **321**, 173-183.
- Rehm, H. und Letzel, T.** (2016) *Der Experimentator - Proteinbiochemie Proteomics 7. Aufl.* Springer Spektrum (Heidelberg)
- Ricci, G., Dondi, A., Belotti, T., Baldi, E., Tartarini, S., Paris, R., Pagliarani, G., Serafini-Fracassini, D., Casadio, R., Giannetti, A. und Masi, M.** (2010) Allergenicity of different apple cultivars assessed by means of skin prick test and sensitisation to recombinant allergens Mal d 1 and Mal d 3 in a group of Italian apple-allergic patients *Int. J. Food Sci. Technol.*, **45**, 1517-1523.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. und Paganga, G.** (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids *Free Radic Biol Med*, **20**, 933-956.
- Ring, J.** (2005) *Allergy in Practice 1. Aufl.* Springer-Verlag (Berlin, Heidelberg)
- Ring, L., Yeh, S.Y., Hucherig, S., Hoffmann, T., Blanco-Portales, R., Fouche, M., Villatoro, C., Denoyes, B., Monfort, A., Caballero, J.L., Munoz-Blanco, J., Gershenson, J. und Schwab, W.** (2013) Metabolic interaction between anthocyanin and lignin biosynthesis is associated with peroxidase FaPRX27 in strawberry fruit *Plant Physiol*, **163**, 43-60.
- Rink, L., Kruse, A. und Haase, H.** (2015) *Immunologie für Einsteiger 2. Aufl.* Springer Spektrum (Heidelberg)
- Rocha, A.M.C.N. und Morais, A.M.M.B.** (2001) Characterization of polyphenoloxidase (PPO) extracted from 'Jonagored' apple *Food Control*, **12**, 85-90.
- Romer, E., Chebib, S., Bergmann, K.-C., Plate, K., Becker, S., Ludwig, C., Meng, C., Fischer, T., Dierend, W. und Schwab, W.** (2020) Tiered approach for the identification of Mal d 1 reduced, well tolerated apple genotypes *Sci. Rep.*, **10**, 9144.
- Rosano, G.L. und Ceccarelli, E.A.** (2014) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges *Front. Microbiol.*, **5**, 172.
- Rossen, R.D. und Birdsall, H.H.** (2012) 11 - Allergy and Immunology. In: *Medical Secrets* (Harward, M.P. ed.), **5. Aufl.** Mosby (Saint Louis)
- RSCB Protein Data Bank** (2020) Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, <http://www.rcsb.org/structure/5MMU> (Aufgerufen am: 09. 01. 2020)
- Rühmer, T.** (2014) Anforderungen an neue Apfelsorten - Was darf man in Zukunft erwarten *Haidegger Perspektiven*, **1**, 3-6.

- Sadilova, E., Stintzing, F.C. und Carle, R.** (2006) Chemical quality parameters and anthocyanin pattern of red-fleshed Weirouge apples *J. Appl. Bot. Food Qual.*, **80**, 82-87.
- Sanchez-Monge, R., Blanco, C., Diaz-Perales, A., Collada, C., Carrillo, T., Aragoncillo, C. und Salcedo, G.** (1999) Isolation and characterization of major banana allergens: identification as fruit class I chitinases *Clin. Exp. Allergy*, **29**, 673-680.
- Sancho, A.I., Foxall, R., Browne, T., Dey, R., Zuidmeer, L., Marzban, G., Waldron, K.W., van Ree, R., Hoffmann-Sommergruber, K., Laimer, M. und Mills, E.N.** (2006) Effect of postharvest storage on the expression of the apple allergen Mal d 1 *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 5917-5923.
- Sansavini, S., Donati, F., Costa, F. und Tartarini, S.** (2004) Advances in apple breeding for enhanced fruit quality and resistance to biotic stresses: New varieties for the European market *J. Fruit Ornament. Plant Res.*, **12**, 13-52.
- Santos-Sánchez, N.F., Salas-Coronado, R., Hernández-Carlos, B. und Villanueva-Canongo** (2019) Shikimic acid pathway in biosynthesis of phenolic compounds. In *Plant Physiological Aspects of Phenolic Compounds* (Soto-Hernández, M. ed: IntechOpen.
- Saraste, M., Sibbald, P.R. und Wittinghofer, A.** (1990) The P-loop-a common motif in ATP- and GTP-binding proteins *Trends Biochem. Sci.*, **15**, 430-434.
- Schenk, M.F., Cordewener, J.H., America, A.H., Van't Westende, W.P., Smulders, M.J. und Gilissen, L.J.** (2009) Characterization of PR-10 genes from eight *Betula* species and detection of Bet v 1 isoforms in birch pollen *BMC Plant Biol.*, **9**, 24.
- Schenk, M.F., Gilissen, L.J., Esselink, G.D. und Smulders, M.J.** (2006) Seven different genes encode a diverse mixture of isoforms of Bet v 1, the major birch pollen allergen *BMC genomics*, **7**, 168.
- Schenk, M.F., Gilissen, L.J., Smulders, R.J. und America, T.H.** (2010) Mass spectrometry and pollen allergies *Expert Rev. Proteomic*, **7**, 627-630.
- Schirmer, T., Hoffmann-Sommergrube, K., Susani, M., Breiteneder, H. und Markovic-Housley, Z.** (2005) Crystal structure of the major celery allergen Api g 1: molecular analysis of cross-reactivity *J. Mol. Biol.*, **351**, 1101-1109.
- Schmitz-Eiberger, M. und Matthes, A.** (2011) Effect of harvest maturity, duration of storage and shelf life of apples on the allergen Mal d 1, polyphenoloxidase activity and polyphenol content *Food Chem.*, **127**, 1459-1464.
- Schmitz-Eiberger, M., Weber, V., Treutter, D., Baab, G. und Lorenz, J.** (2003) Bioactive components in fruits from different apple varieties *J. Appl. Bot. Food Qual.*, **77**, 167-171.
- Schulenburg, K., Feller, A., Hoffmann, T., Schecker, J.H., Martens, S. und Schwab, W.** (2016) Formation of beta-glucogallin, the precursor of ellagic acid in strawberry and raspberry *J. Exp. Bot.*, **67**, 2299-2308.
- Scudellari, M.** (2017) News Feature: Cleaning up the hygiene hypothesis *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **114**, 1433-1436.
- Seo, P.J., Lee, A.K., Xiang, F. und Park, C.M.** (2008) Molecular and functional profiling of Arabidopsis pathogenesis-related genes: insights into their roles in salt response of seed germination *Plant Cell Physiol.*, **49**, 334-344.
- Seutter von Loetzen, C., Hoffmann, T., Hartl, M.J., Schweimer, K., Schwab, W., Rosch, P. und Hartl-Spiegelhauer, O.** (2014) Secret of the major birch pollen allergen Bet v 1: identification of the physiological ligand *Biochem. J.*, **457**, 379-390.
- Seutter von Loetzen, C., Jacob, T., Hartl-Spiegelhauer, O., Vogel, L., Schiller, D., Sporlein-Guttler, C., Schobert, R., Vieths, S., Hartl, M.J. und Rosch, P.** (2015)

- Ligand recognition of the major birch pollen allergen Bet v 1 is isoform dependent *PLOS ONE*, **10**, e0128677.
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J.V. und Mann, M.** (2006) In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes *Nat. Protoc.*, **1**, 2856-2860.
- Sicherer, S.H. und Sampson, H.A.** (2010) Food allergy *J. Allergy Clin. Immunol.*, **125**, S116-S125.
- Singh, A., Holvoet, S. und Mercenier, A.** (2011) Dietary polyphenols in the prevention and treatment of allergic diseases *Clin. Exp. Allergy*, **41**, 1346-1359.
- Sinha, M., Singh, R.P., Kushwaha, G.S., Iqbal, N., Singh, A., Kaushik, S., Kaur, P., Sharma, S. und Singh, T.P.** (2014) Current overview of allergens of plant pathogenesis related protein families *Sci. World J.*, **2014**, 543195.
- Skamstrup Hansen, K., Vieths, S., Vestergaard, H., Skov, P.S., Bindslev-Jensen, C. und Poulsen, L.K.** (2001) Seasonal variation in food allergy to apple *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, **756**, 19-32.
- Slimestad, R., Fossen, T. und Verheul, M.J.** (2008) The flavonoids of tomatoes *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 2436-2441.
- Somkuti, J., Houska, M. und Smeller, L.** (2011) Pressure and temperature stability of the main apple allergen Mal d1 *Eur. Biophys. J.*, **40**, 143-151.
- Somssich, I.E., Schmelzer, E., Kawalleck, P. und Hahlbrock, K.** (1988) Gene structure and in situ transcript localization of pathogenesis-related protein 1 in parsley *Mol. Gen. Genet.*, **213**, 93-98.
- Son, D.Y., Scheurer, S., Hoffmann, A., Haustein, D. und Vieths, S.** (1999) Pollen-related food allergy: cloning and immunological analysis of isoforms and mutants of Mal d 1, the major apple allergen, and Bet v 1, the major birch pollen allergen *Eur. J. Nutr.*, **38**, 201-215.
- Song, T.W.** (2015) Diagnostic decision points of specific IgE titers in patients with food allergy: Are they appropriate in all clinical settings? *Allergy Asthma Immunol. Res.*, **7**, 309-311.
- Spangfort, M.D., Mirza, O., Ipsen, H., Van Neerven, R.J., Gajhede, M. und Larsen, J.N.** (2003) Dominating IgE-binding epitope of Bet v 1, the major allergen of birch pollen, characterized by X-ray crystallography and site-directed mutagenesis *J. Immunol.*, **171**, 3084-3090.
- Spengler, R.N.** (2019) Origins of the apple: The role of megafaunal mutualism in the domestication of Malus and Rosaceous trees *Front. Plant Sci.*, **10**.
- Statistisches Bundesamt** (2018) Pressemitteilung Nr. 358 vom 21. September 2018, [https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2018/09/PD18\\_358\\_412.html](https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2018/09/PD18_358_412.html) (Aufgerufen am: 18. 02. 2020)
- Stintzi, A., Heitz, T., Prasad, V., Wiedemann-Merdinoglu, S., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Legrand, M. und Fritig, B.** (1993) Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens *Biochimie*, **75**, 687-706.
- Strachan, D.P.** (1989) Hay fever, hygiene, and household size *BMJ*, **299**, 1259-1260.
- Sung, S.K., Jeong, D.H., Nam, J., Kim, S.H., Kim, S.R. und An, G.** (1998) Expressed sequence tags of fruits, peels, and carpels and analysis of mRNA expression levels of the tagged cDNAs of fruits from the Fuji apple *Mol. Cells*, **8**, 565-577.
- Swoboda, I., Jilek, A., Ferreira, F., Engel, E., Hoffmann-Sommergruber, K., Scheiner, O., Kraft, D., Breiteneder, H., Pittenauer, E., Schmid, E. und et al.** (1995) Isoforms of Bet v 1, the major birch pollen allergen, analyzed by liquid chromatography, mass spectrometry, and cDNA cloning *J. Biol. Chem.*, **270**, 2607-2613.

- SWR Wissen** (2018) Apfelblüte - Der Liveticker 2017, <https://www.swr.de/wissen/apfelbluete/Archiv-Der-Liveticker-2017,article-sw-20040.html> (Aufgerufen am: 11.03. 2020)
- Szamos, J., Takacs, K., Szabo, E.E., Kovacs, E. und Gelencser, E.** (2011) Purification of natural Mal d 1 and Mal d 2 allergens and monitoring of their expression levels during ripening in Golden Delicious apple *Food Res. Int.*, **44**, 2674-2678.
- Tahara, S.** (2007) A journey of twenty-five years through the ecological biochemistry of flavonoids *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 1387-1404.
- Tan, H., Chen, W., Liu, Q., Yang, G. und Li, K.** (2018) Pectin oligosaccharides ameliorate colon cancer by regulating oxidative stress- and inflammation-activated signaling pathways *Front. Immunol.*, **9**, 1504-1504.
- Tokura, T., Nakano, N., Ito, T., Matsuda, H., Nagasako-Akazome, Y., Kanda, T., Ikeda, M., Okumura, K., Ogawa, H. und Nishiyama, C.** (2005) Inhibitory effect of polyphenol-enriched apple extracts on mast cell degranulation in vitro targeting the binding between IgE and FcERI *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 1974-1977.
- Treutter, D.** (2006) Significance of flavonoids in plant resistance: a review *Environ. Chem. Lett.*, **4**, 147-157.
- Tsao, R., Yang, R., Young, J.C. und Zhu, H.** (2003) Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC) *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 6347-6353.
- Uehara, M., Sato, K., Abe, Y. und Katagiri, M.** (2001) Sequential IgE epitope analysis of a birch pollen allergen (Bet v1) and an apple allergen (Mal d1) *Allergol. Int.*, **50**, 57-62.
- Ullah, C., Unsicker, S.B., Fellenberg, C., Constabel, C.P., Schmidt, A., Gershenzon, J. und Hammerbacher, A.** (2017) Flavan-3-ols are an effective chemical defense against rust infection *Plant Physiol*, **175**, 1560-1578.
- van Loon, L.C.** (1985) Pathogenesis-related proteins *Plant Mol. Biol.*, **4**, 111-116.
- van Loon, L.C., Pierpoint, W.S., Boller, T. und Conejero, V.** (1994) Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins *Plant Mol. Biol. Rep.*, **12**, 245-264.
- van Loon, L.C. und van Kammen, A.** (1970) Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' and 'Samsun NN': II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus *Virology*, **40**, 199-211.
- Vanek-Krebitz, M., Hoffmann-Sommergruber, K., Laimer da Camara Machado, M., Susani, M., Ebner, C., Kraft, D., Scheiner, O. und Breiteneder, H.** (1995) Cloning and sequencing of Mal d 1, the major allergen from apple (*Malus domestica*), and its immunological relationship to Bet v 1, the major birch pollen allergen *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **214**, 538-551.
- Vassilopoulou, E.V., Zuidmeer, L., Akkerdaas, J., Rigby, N., Moreno, F.J., Papadopoulos, N.G., Saxoni-Papageorgiou, P., Mills, C. und van Ree, R.** (2007) Optimized techniques for the extraction of grape allergens appropriate for in vivo and in vitro testing and diagnosis *Molecular nutrition & food research*, **51**, 360-366.
- Vegro, M., Eccher, G., Populin, F., Sorgato, C., Savazzini, F., Pagliarani, G., Tartarini, S., Pasini, G., Curioni, A., Antico, A. und Botton, A.** (2016) Old apple (*Malus domestica* L. Borkh) varieties with hypoallergenic properties: An integrated approach for studying apple allergenicity *J. Agric. Food Chem.*, **64**, 9224-9236.
- Velasco, R., Zharkikh, A., Affourtit, J., Dhingra, A., Cestaro, A., Kalyanaraman, A., Fontana, P., Bhatnagar, S.K., Troggio, M., Pruss, D., Salvi, S., Pindo, M., Baldi, P., Castelletti, S., Cavaiuolo, M., Coppola, G., Costa, F., Cova, V., Dal Ri, A., Goremykin, V., Komjanc, M., Longhi, S., Magnago, P., Malacarne, G., Malnoy, M., Micheletti, D., Moretto, M., Perazzolli, M., Si-Ammour, A., Vezzulli, S., Zini,**

- E., Eldredge, G., Fitzgerald, L.M., Gutin, N., Lanchbury, J., Macalma, T., Mitchell, J.T., Reid, J., Wardell, B., Kodira, C., Chen, Z., Desany, B., Niazi, F., Palmer, M., Koepke, T., Jiwan, D., Schaeffer, S., Krishnan, V., Wu, C., Chu, V.T., King, S.T., Vick, J., Tao, Q., Mraz, A., Stormo, A., Stormo, K., Bogden, R., Ederle, D., Stella, A., Vecchietti, A., Kater, M.M., Masiero, S., Lasserre, P., Lespinasse, Y., Allan, A.C., Bus, V., Chagné, D., Crowhurst, R.N., Gleave, A.P., Lavezzo, E., Fawcett, J.A., Proost, S., Rouzé, P., Sterck, L., Toppo, S., Lazzari, B., Hellens, R.P., Durel, C.-E., Gutin, A., Bumgarner, R.E., Gardiner, S.E., Skolnick, M., Egholm, M., Van de Peer, Y., Salamini, F. und Viola, R. (2010) The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.) *Nat. Genet.*, **42**, 833.
- Verhoeckx, K.C.M., Vissers, Y.M., Baumert, J.L., Faludi, R., Feys, M., Flanagan, S., Herouet-Guicheney, C., Holzhauser, T., Shimojo, R., van der Bolt, N., Wichers, H. und Kimber, I. (2015) Food processing and allergenicity *Food Chem. Toxicol.*, **80**, 223-240.
- Verordnung (EG) Nr. 1830/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates (22. September 2003) in Kraft getreten: 7. November 2003
- Ververidis, F., Trantas, E., Douglas, C., Vollmer, G., Kretzschmar, G. und Panopoulos, N. (2007) Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health *Biotechnol. J.*, **2**, 1214-1234.
- Vieths, S., Hoffmann, A., Holzhauser, T., Muller, U., Reindl, J. und Haustein, D. (1998) Factors influencing the quality of food extracts for in vitro and in vivo diagnosis *Allergy*, **53**, 65-71.
- Vieths, S., Jankiewicz, A., Schoning, B. und Aulepp, H. (1994) Apple allergy: the IgE-binding potency of apple strains is related to the occurrence of the 18-kDa allergen *Allergy*, **49**, 262-271.
- Vieths, S., Scheurer, S. und Ballmer-Weber, B. (2002) Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **964**, 47-68.
- Vieths, S., Schöning, B. und Jankiewicz, A. (1993) Occurrence of IgE binding allergens during ripening of apple fruits *Food Agric. Immunol.*, **5**, 93-105.
- Visser, T. (1964) Juvenile phase and growth of apple and pear seedlings *Euphytica*, **13**, 119-129.
- Vlieg-Boerstra, B.J., van de Weg, W.E., van der Heide, S., Kerkhof, M., Arens, P., Heijerman-Pepelman, G. und Dubois, A.E. (2011) Identification of low allergenic apple cultivars using skin prick tests and oral food challenges *Allergy*, **66**, 491-498.
- Vlieg-Boerstra, B.J., van de Weg, W.E., van der Heide, S., Skypala, I., Bures, P., Ballmer-Weber, B.K., Hoffmann-Sommergruber, K., Zauli, D., Ricci, G. und Dubois, A.E.J. (2013) Additional indications for the low allergenic properties of the apple cultivars Santana and Elise *Plant Foods Hum. Nutr.*, **68**, 391-395.
- Vrhovsek, U., Rigo, A., Tonon, D. und Mattivi, F. (2004) Quantitation of polyphenols in different apple varieties *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 6532-6538.
- Walter, M.H., Liu, J.W., Wunn, J. und Hess, D. (1996) Bean ribonuclease-like pathogenesis-related protein genes (Ypr10) display complex patterns of developmental, dark-induced and exogenous-stimulus-dependent expression *Eur. J. Biochem.*, **239**, 281-293.
- Wang, N., Jiang, S., Zhang, Z., Fang, H., Xu, H., Wang, Y. und Chen, X. (2018) *Malus sieversii*: the origin, flavonoid synthesis mechanism, and breeding of red-skinned and red-fleshed apples *Hortic. Res.*, **5**, 70.
- Wangorsch, A., Ballmer-Weber, B.K., Rösch, P., Holzhauser, T. und Vieths, S. (2007) Mutational epitope analysis and cross-reactivity of two isoforms of Api g 1, the major celery allergen *Mol. Immunol.*, **44**, 2518-2527.

- Webber, C.M. und England, R.W.** (2010) Oral allergy syndrome: a clinical, diagnostic, and therapeutic challenge *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, **104**, 101-108.
- Whyte, A.R., Schafer, G. und Williams, C.M.** (2017) The effect of cognitive demand on performance of an executive function task following wild blueberry supplementation in 7 to 10 years old children *Food Funct.*, **8**, 4129-4138.
- Wigotzki, M., Steinhart, H. und Paschke-Kratzin, A.** (2000) Influence of varieties, storage and heat treatment on IgE-binding proteins in hazelnuts (*Corylus avellana*) *Food Agric. Immunol.*, **12**, 217-229.
- Williams, C.M. und Galli, S.J.** (2000) The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease *J. Allergy Clin. Immunol.*, **105**, 847-859.
- Worm, M., Jappe, U., Kleine-Tebbe, J., Schäfer, C., Reese, I., Saloga, J., Treudler, R., Zuberbier, T., Waßmann, A., Fuchs, T., Dölle, S., Raithel, M., Ballmer-Weber, B., Niggemann, B. und Werfel, T.** (2014) Nahrungsmittelallergie infolge immunologischer Kreuzreaktivitäten mit Inhalationsallergenen *Allergo J.*, **23**, 16-31.
- Wu, K.-H., Ho, C.-T., Chen, Z.-F., Chen, L.-C., Whang-Peng, J., Lin, T.-N. und Ho, Y.-S.** (2018) The apple polyphenol phloretin inhibits breast cancer cell migration and proliferation via inhibition of signals by type 2 glucose transporter *J. Food Drug Anal.*, **26**, 221-231.
- Wu, L., Ma, N., Jia, Y., Zhang, Y., Feng, M., Jiang, C.-Z., Ma, C. und Gao, J.** (2017) An ethylene-induced regulatory module delays flower senescence by regulating cytokinin content *Plant Physiol.*, **173**, 853-862.
- Wu, Z., Lian, J., Han, Y., Zhou, N., Li, X., Yang, A., Tong, P. und Chen, H.** (2016) Crosslinking of peanut allergen Ara h 2 by polyphenol oxidase: digestibility and potential allergenicity assessment *J. Sci. Food Agric.*, **96**, 3567-3574.
- Wüthrich, B. und Hofer, T.** (1984) Nahrungsmittelallergie: das »Sellerie-Beifuß-Gewürz-Syndrom«: Assoziation mit einer Mangofrucht-Allergie? *Deut. Med. Wochenschr.*, **109**, 981-986.
- Yamamoto, M., Torikai, S. und Oeda, K.** (1997) A major root protein of carrots with high homology to intracellular pathogenesis-related (PR) proteins and pollen allergens *Plant Cell Physiol.*, **38**, 1080-1086.
- Yazdanbakhsh, M., Kremsner, P.G. und van Ree, R.** (2002) Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis *Science*, **296**, 490-494.
- Zhang, C.-x., Tian, Y. und Cong, P.-h.** (2015) Proteome analysis of pathogen-responsive proteins from apple leaves induced by the Alternaria blotch *Alternaria alternata* *PLOS ONE*, **10**, e0122233.
- Ziska, L. und Caulfield, F.** (2000) Rising CO<sub>2</sub> and pollen production of common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*), a known allergy-inducing species: Implications for public health *Aust. J. Plant Physiol.*, **27**, 893-898.
- Zubini, P., Zambelli, B., Musiani, F., Ciurli, S., Bertolini, P. und Baraldi, E.** (2009) The RNA hydrolysis and the cytokinin binding activities of PR-10 proteins are differently performed by two isoforms of the Pru p 1 peach major allergen and are possibly functionally related *Plant Physiol.*, **150**, 1235-1247.
- Zuercher, A.W., Holvoet, S., Weiss, M. und Mercenier, A.** (2010) Polyphenol-enriched apple extract attenuates food allergy in mice *Clin. Exp. Allergy*, **40**, 942-950.
- Zuidmeer, L., van Leeuwen, W.A., Kleine Budde, I., Breiteneder, H., Ma, Y., Mills, C., Sancho, A.I., Meulenbroek, E.J., van de Weg, E., Gilissen, L., Ferreira, F., Hoffmann-Sommergruber, K. und van Ree, R.** (2006) Allergenicity assessment of apple cultivars: hurdles in quantifying labile fruit allergens *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **141**, 230-240.



## 7 Anhang

### 7.1 Mal d 1-Gehalte Selektionsstufe 1

**Anhang 1 Mal d 1-Gehalte aller Genotypen der Selektionsstufe 1 aus 2016** Konzentrationen in  $\mu\text{g/g}$  Frischgewicht (FG) ermittelt mit dem indirekten kompetitiven ELISA. \* Standardabweichung (SD)

2016					
Genotyp	c[ $\mu\text{g/g}$ FG]	SD*	Genotyp	c[ $\mu\text{g/g}$ FG]	SD*
1_76	3.184	1.241	25_190	23.217	5.384
2_27	4.114	0.619	26_36	0.543	0.152
2_31	12.817	3.577	26_62	0.679	0.420
2_66	6.279	1.362	26_149	8.537	2.379
2_75	5.639	2.657	26_170	11.367	0.762
2_152	3.376	1.089	26_171	27.125	7.731
2_180	2.453	0.601	26_187	1.287	0.247
2_189	2.386	0.530	27_27	28.904	3.092
2_190	8.151	0.713	27_38	19.699	3.567
2_193	4.899	1.235	27_81	0.554	0.344
3_21	5.037	1.406	27_108	6.180	0.482
3_31	5.320	1.434	27_153	7.538	0.735
3_58	5.356	0.801	28_2	16.551	3.335
3_107	5.369	0.719	28_41	8.770	0.562
3_124	3.135	1.339	28_78	1.658	0.464
4_45	3.543	0.661	28_83	1.350	0.341
4_69	8.826	1.457	28_93	2.484	0.711
4_123	2.379	0.343	29_184	6.136	2.536
8_87	8.846	3.747	31_36	2.370	0.407
8_141	10.539	1.275	31_42	4.855	1.252
9_33	4.695	1.257	31_46	4.023	1.260
9_85	13.560	1.926	31_59	4.745	0.756
10_37	2.238	0.605	31_74	1.379	0.259
10_39	3.260	1.604	31_75	3.320	0.591
10_178	3.897	0.909	31_96	5.896	0.933
11_133	1.970	0.708	31_112	13.722	4.108
11_191	9.171	2.547	31_119	2.253	0.583
12_7	5.474	1.429	31_139	15.796	2.373
14_8	3.156	2.001	31_162	4.341	0.536
14_149	3.608	1.225	31_179	4.338	0.364
16_164	0.376	0.197	31_180	6.126	0.526
16_175	4.058	0.903	32_4	4.823	0.298
16_192	1.270	0.382	32_20	11.694	3.133
16_195	6.020	0.812	32_22	2.560	0.469
17_33	2.143	0.640	32_82	2.755	0.527
17_51	6.625	0.855	32_85	7.019	1.038
17_60	3.229	0.946	32_104	26.040	2.027
17_102	29.953	6.884	32_134	7.937	1.745
17_162	5.299	0.496	32_145	3.076	1.076
18_42	4.297	0.905	33_11	1.850	0.564
18_48	11.697	1.967	33_23	2.987	0.611
18_52	8.056	0.363	33_24	6.257	1.136
18_71	23.203	4.024	33_27	3.597	0.536
18_106	8.681	2.269	33_28	3.345	0.662
18_116	11.818	0.524	33_39	22.462	3.621
18_130	2.389	0.684	33_50	6.914	1.109

<b>2016</b>					
<b>Genotyp</b>	<b>c[µg/g FG]</b>	<b>SD*</b>	<b>Genotyp</b>	<b>c[µg/g FG]</b>	<b>SD*</b>
18_131	16.996	1.871	33_84	6.090	0.552
18_135	3.137	1.215	33_92	6.600	1.338
18_142	2.444	0.434	33_143	5.343	1.628
18_145	2.722	0.633	33_156	8.248	1.168
18_153	6.084	0.171	34_73	10.920	1.057
18_165	1.274	0.478	34_90	14.559	1.418
18_179	3.176	0.494	35_54	13.081	1.822
19_15	8.139	2.315	35_85	4.081	1.134
19_20	0.333	0.290	35_92	14.177	1.715
19_49	12.135	4.023	35_96	9.062	1.452
19_69	0.254	0.129	35_100	6.381	1.015
19_70	2.406	0.708	35_134	0.709	0.242
19_128	3.523	0.410	35_135	2.538	0.633
19_137	9.999	3.533	36_39	17.137	1.925
19_168	4.572	0.542	36_90	8.310	1.047
19_191	4.574	1.235	37_25	2.569	0.370
20_32	19.255	4.114	74_2	6.162	1.592
20_45	2.626	0.634	74_198	13.789	2.576
20_75	4.178	1.354	74_203	2.370	0.333
20_88	3.173	0.565	74_204	1.433	0.472
20_98	3.482	0.623	75_33	8.106	1.088
20_104	0.749	0.184	75_59	2.396	1.064
20_135	0.856	0.101	89_7	20.912	2.044
20_161	3.954	1.279	89_59	5.326	1.248
21_16	5.873	0.500	89_96	2.413	0.604
21_20	6.789	1.135	89_172	7.448	1.149
21_55	0.643	0.195	89_173	9.245	1.287
21_73	2.110	0.517	90_14	2.638	0.351
21_87	10.042	2.304	91_178	8.183	0.901
21_93	2.597	1.284	92_173	0.702	0.402
21_96	2.099	0.367	94_61	8.948	1.029
21_150	9.960	4.088	96_70	10.146	1.866
21_153	6.525	0.335	96_80	4.767	0.686
21_163	5.553	1.079	96_112	3.914	0.562
22_28	4.122	0.838	96_139	23.239	5.806
22_42	0.543	0.236	97_99	5.207	0.543
22_70	1.910	0.783	102_77	0.130	0.038
22_138	5.719	3.597	102_159	1.270	0.444
22_166	12.891	1.850	103_41	1.355	0.643
23_45	11.947	2.517	104_37	0.344	0.451
23_49	7.153	1.819	105_38	4.816	0.270
23_135	9.538	2.202	105_100	6.218	0.517
24_26	0.913	0.232	105_156	1.114	0.246
24_30	0.980	0.240	106_11	5.733	1.600
24_168	2.806	1.201	106_18	1.764	0.510
24_177	24.354	3.264	106_37	8.701	1.309
24_184	5.736	1.088	106_48	3.780	0.528
25_22	3.936	0.531	106_85	7.475	3.116
25_25	4.739	0.213	106_92	12.045	1.075
25_39	20.586	2.920	107_7	6.681	2.334
25_61	6.732	0.625	107_87	1.703	0.142
25_64	2.546	0.806	107_116	1.594	0.365
25_74	2.997	0.551	107_177	6.448	1.427
25_178	2.666	0.764			

**Anhang 2 Mal d 1-Gehalte aller Genotypen der Selektionsstufe 1 aus 2017** Konzentrationen in  $\mu\text{g/g}$  Frischgewicht (FG) ermittelt mit dem indirekten kompetitiven ELISA. \* Standardabweichung (SD)

2017					
Genotyp	c[ $\mu\text{g/g}$ FG]	SD*	Genotyp	c[ $\mu\text{g/g}$ FG]	SD*
5_61	11.013	3.084	43_69	5.975	0.757
10_178	9.407	0.388	43_90	5.384	0.662
12_33	0.384	0.159	44_26	5.315	0.540
14_85	5.095	1.054	46_71	7.495	0.781
17_78	13.453	1.198	46_123	6.164	1.138
17_93	13.802	1.360	47_49	6.943	0.921
20_12	9.565	0.792	47_68	13.009	0.846
21_19	12.003	1.284	48_24	5.196	1.999
23_18	7.604	0.920	49_131	0.703	0.060
24_24	0.687	0.123	50_55	6.617	1.340
25_3	5.396	0.954	50_63	10.689	0.923
25_128	7.781	0.914	51_95	13.246	2.507
25_135	7.115	0.699	52_93	15.060	2.567
25_157	3.980	0.399	52_114	10.463	0.847
28_24	5.266	0.223	52_147	5.826	0.627
30_151	0.700	0.061	53_53	6.231	0.389
31_180	6.088	0.887	53_59	8.684	0.500
32_116	6.965	2.076	53_93	10.451	0.861
32_150	7.137	2.199	53_103	12.413	1.286
33_37	3.265	0.724	53_114	4.235	0.361
33_91	10.482	0.617	53_122	8.448	0.878
33_94	21.392	3.395	53_128	1.001	0.092
34_51	10.616	1.201	55_77	12.410	1.076
34_125	7.805	1.493	55_131	4.946	0.406
35_96	9.646	1.014	56_35	2.406	0.664
35_144	13.188	0.912	59_10	0.999	0.047
36_33	4.747	1.084	59_12	5.956	0.545
40_50	5.638	0.919			

## 7.2 Mal d 1-Gehalte Selektionsstufe 2

**Anhang 3 Mal d 1-Gehalte der Genotypen der Selektionsstufe 2** der Erntejahre 2016, 2017 und 2018. Konzentrationen in  $\mu\text{g/g}$  Frischgewicht (FG) ermittelt mit dem indirekten kompetitiven ELISA. \* Standardabweichung (SD)

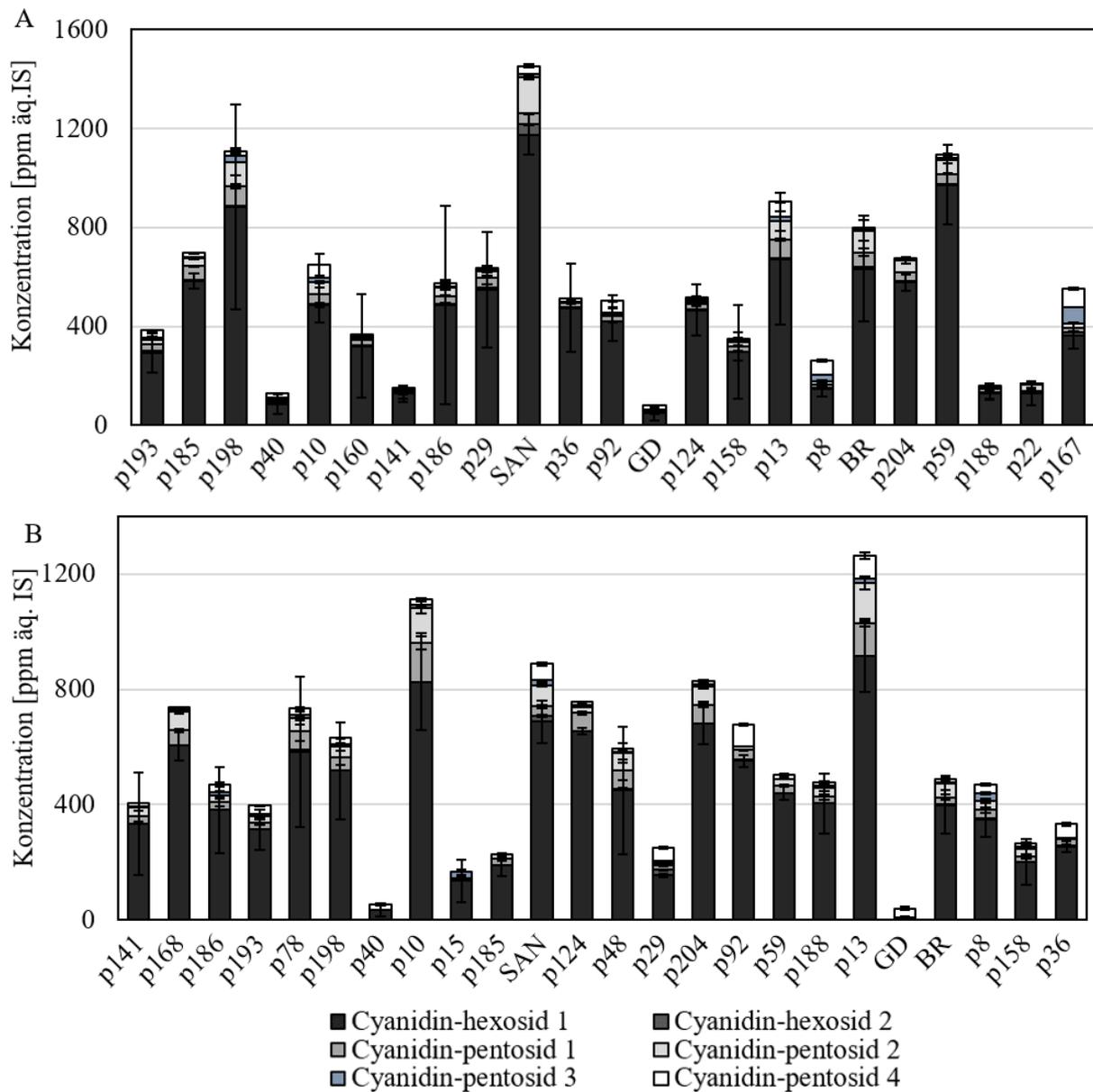
Genotyp	2016		2017		2018	
	c [ $\mu\text{g/g}$ FG]	SD*	c [ $\mu\text{g/g}$ FG]	SD*	c [ $\mu\text{g/g}$ FG]	SD*
p 1	7,018	0,419				
p 2	2,260	0,690				
p 3			4,882	0,595		
p 4	4,443	0,697	21,711	3,864		
p 6	7,864	0,564	0,289	0,075		
p 7	3,785	0,988	8,204	1,089		
p 8	2,188	0,316	5,700	1,554	12,837	1,167
p 9	3,805	0,560				
p 10	1,334	0,407	0,594	0,172	2,000	0,143
p 11	2,941	0,182				
p 12	3,843	0,838				
p 13	3,473	0,690	5,526	1,297	10,100	0,907

Genotyp	2016		2017		2018	
	c [µg/g FG]	SD*	c[µg/g FG]	SD*	c[µg/g FG]	SD*
p 14	7,969	1,251				
p 15			0,311	0,111	2,055	0,454
p 17	1,287	0,191				
p 18	4,117	0,610	6,923	0,827		
p 19	7,115	1,572				
p 20	1,603	0,378	4,789	0,946		
p 21	5,793	2,229	7,740	2,313		
p 22	1,679	0,451	8,285	1,178		
p 23	3,526	0,528	6,185	1,114		
p 25	6,149	0,752	8,805	1,159		
p 26	4,295	0,911	8,530	0,902		
p 27	7,173	1,688	9,766	0,858		
p 28	4,277	0,957	2,567	0,561		
p 29	0,284	0,252	1,973	0,469	7,608	0,337
p 31			13,211	1,292		
p 33	3,930	1,155				
p 34	5,249	1,223	16,079	0,700		
p 35			9,809	0,907		
p 36	1,561	0,496	1,625	0,078	15,292	1,922
p 39			3,095	0,729		
p 40	0,796	0,176	0,495	0,311	1,447	0,192
p 42	3,307	0,964	9,416	1,022		
p 45	4,368	0,655	3,733	0,973		
p 46			8,545	1,083		
p 47	1,819	0,764	12,027	1,535		
p 48			2,712	0,894	6,322	0,748
p 49			6,673	0,871		
p 50			6,111	0,606		
p 55			14,265	2,367		
p 56	2,861	0,393	12,348	2,089		
p 57			2,647	1,379		
p 58	2,221	1,162	6,281	0,748		
p 59	2,751	0,883	7,076	0,636	8,664	1,096
p 61			5,669	0,536		
p 62			9,099	0,649		
p 63			9,676	1,096		
p 65	2,281	0,635	9,802	2,890		
p 67			4,662	1,091		
p 71			4,040	0,565		
p 74	3,857	1,009				
p 75			4,656	0,932		
p 76			0,802	0,315		
p 77			7,412	1,404		
p 78	0,431	0,060	0,338	0,058	0,822	0,062
p 86			10,411	1,323		
p 89	4,684	0,490	14,039	0,524		
p 92	3,038	0,328	2,945	0,207	8,506	1,244
p 93	5,121	0,460	5,216	0,118		
p 97	1,635	0,695	18,273	1,554		
p 101	5,534	0,581	6,371	1,260		
p 102	3,152	0,669	3,987	1,406		
p 104	6,176	0,959				
p 105	5,096	1,282	21,174	0,829		
p 106	3,491	0,385				
p 107	4,478	0,663	0,574	0,106		
p 108			4,013	0,430		

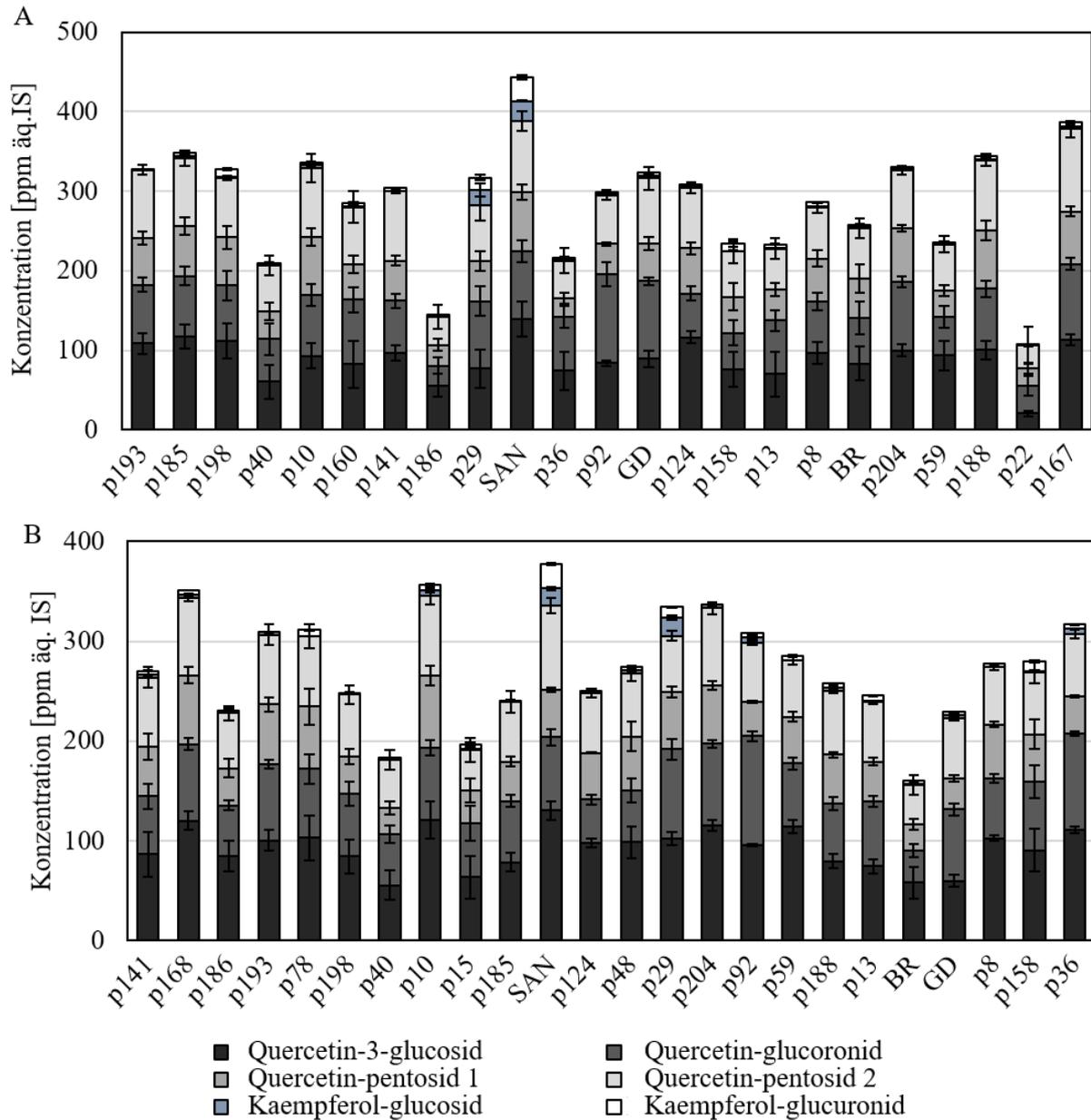
Genotyp	2016		2017		2018	
	c [µg/g FG]	SD*	c[µg/g FG]	SD*	c[µg/g FG]	SD*
p 110	1,654	0,983	5,791	0,755		
p 111	1,572	0,462	5,610	1,279		
p 116	1,393	0,417	1,084	0,238		
p 118	2,868	0,446				
p 120	0,886	0,191	4,413	0,621		
p 124	1,880	0,297	4,036	0,606	4,681	0,201
p 125	0,561	0,101	1,225	0,813		
p 126	1,180	0,160	7,991	1,043		
p 127	2,275	0,490				
p 128	2,012	0,563	2,088	0,673		
p 129	0,946	0,105	6,749	1,551		
p 131	0,659	0,233				
p 134	3,045	1,380	10,184	1,490		
p 135	1,978	0,406	21,903	0,873		
p 136	6,702	1,082				
p 141	0,583	0,088	0,707	0,188	0,331	0,017
p 142	13,690	1,269	18,432	5,151		
p 143			33,053	5,238		
p 144	4,676	0,530	5,324	0,879		
p 145	1,941	0,362	5,511	0,898		
p 146	1,527	0,237				
p 147	3,844	1,318	1,709	0,156		
p 149	9,068	1,453	0,691	0,076		
p 150	0,966	0,341	5,860	2,168		
p 151	7,710	0,686	11,152	0,102		
p 152	6,360	1,699	2,402	0,896		
p 153	1,457	0,333	18,547	3,591		
p 154	1,100	0,596	11,738	0,599		
p 155	7,639	1,052	0,882	0,096		
p 156	1,569	0,309				
p 157	1,143	0,310	10,909	0,795		
p 158	0,666	0,093	4,990	0,938	13,698	1,108
p 159	4,720	0,623	9,489	1,000		
p 160	0,375	0,281	0,597	0,211		
p 161	1,331	0,293	0,813	0,164		
p 162	2,257	0,847	3,201	0,300		
p 163	13,146	3,100	1,918	0,483		
p 165	7,679	3,944	23,085	2,415		
p 167	10,496	0,511	18,638	1,671		
p 168					0,484	0,158
p 169	24,684	2,514	10,782	0,226		
p 170	9,080	1,161				
p 172	1,950	0,787	4,035	0,666		
p 173	3,536	1,117				
p 174	4,369	1,662				
p 176	4,809	1,184	8,448	0,752		
p 177	12,363	3,879	15,021	2,946		
p 179			3,236	0,407		
p 180	4,256	1,155	9,281	0,685		
p 181	1,677	0,456	2,750	0,589		
p 182	7,527	1,601				
p 183	38,936	6,763	7,288	0,714		
p 184			2,856	0,351		
p 185	0,209	0,000	0,356	0,207	2,133	0,192
p 186	1,019	0,158	1,534	0,315	0,623	0,181
p 187	3,810	1,873	9,957	1,280		

Genotyp	2016		2017		2018	
	c [µg/g FG]	SD*	c[µg/g FG]	SD*	c[µg/g FG]	SD*
p 188	2,279	0,411	6,206	0,701	9,737	0,938
p 189	0,385	0,186	3,643	0,404		
p 190	8,024	1,491	5,990	0,402		
p 191			13,785	1,001		
p 192	3,754	0,829	5,689	0,778		
p 193	0,409	0,247	0,295	0,190	0,685	0,113
p 194	0,144	0,139	5,731	1,100		
p 195	4,454	0,125	6,171	0,343		
p 196	1,682	0,154	3,128	0,245		
p 197	10,468	0,730	20,476	1,402		
p 198	1,694	0,471	0,474	0,195	0,860	0,074
p 199			9,774	0,307		
p 200	1,799	0,436	26,223	1,673		
p 201	0,416	0,231	5,284	1,285		
p 202	2,463	0,882	4,299	0,594		
p 203	4,413	0,497	6,722	0,729		
p 204	0,440	0,198			8,364	0,367
p 205	4,724	0,561	7,864	0,269		
p 206	3,573	0,387	3,213	0,858		
p 208	5,863	1,094	25,547	2,784		
p 209	5,346	1,385	11,864	3,097		
p 210	2,528	0,685				

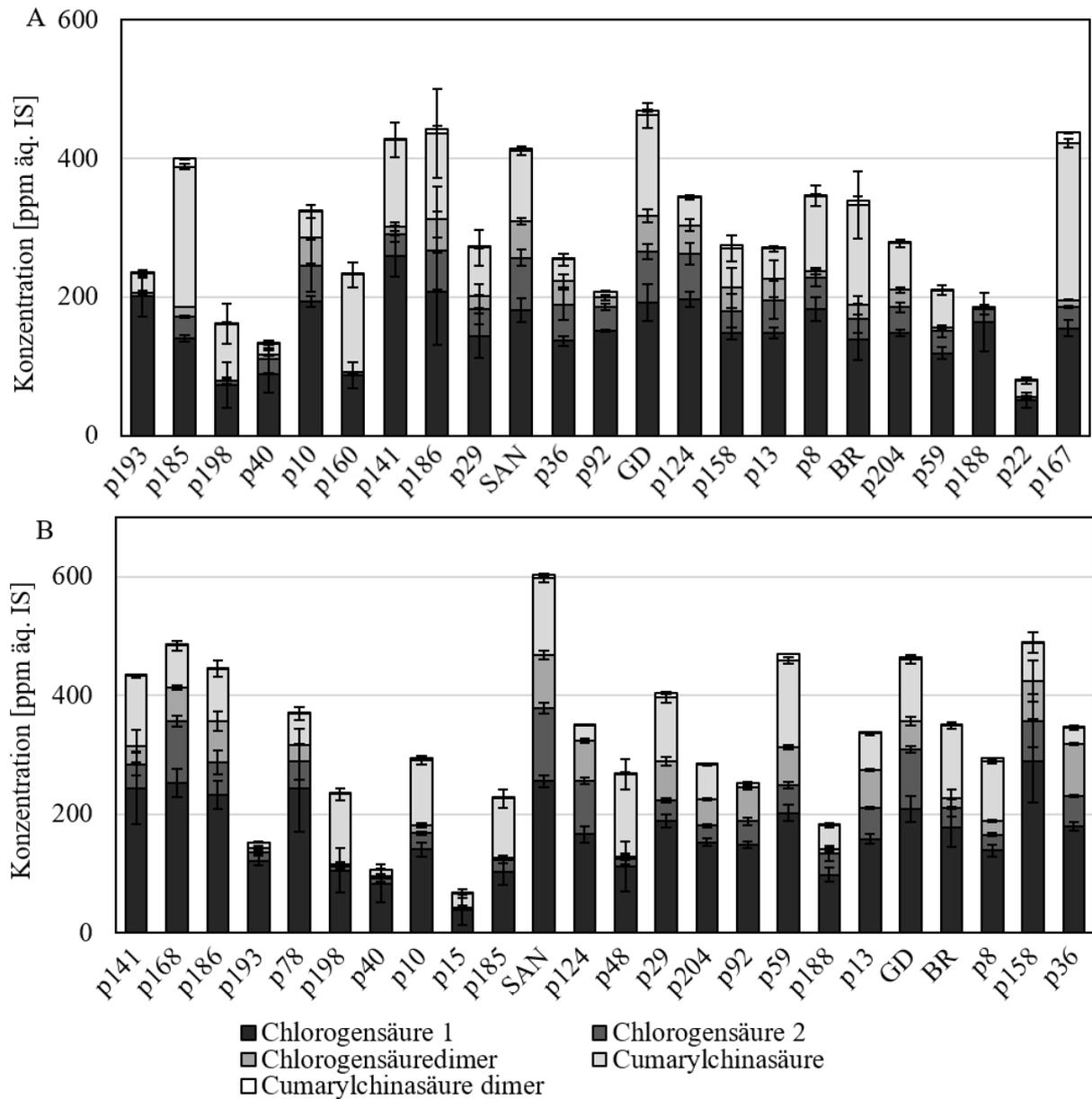
### 7.3 Konzentrationen weiterer Polyphenolgruppen



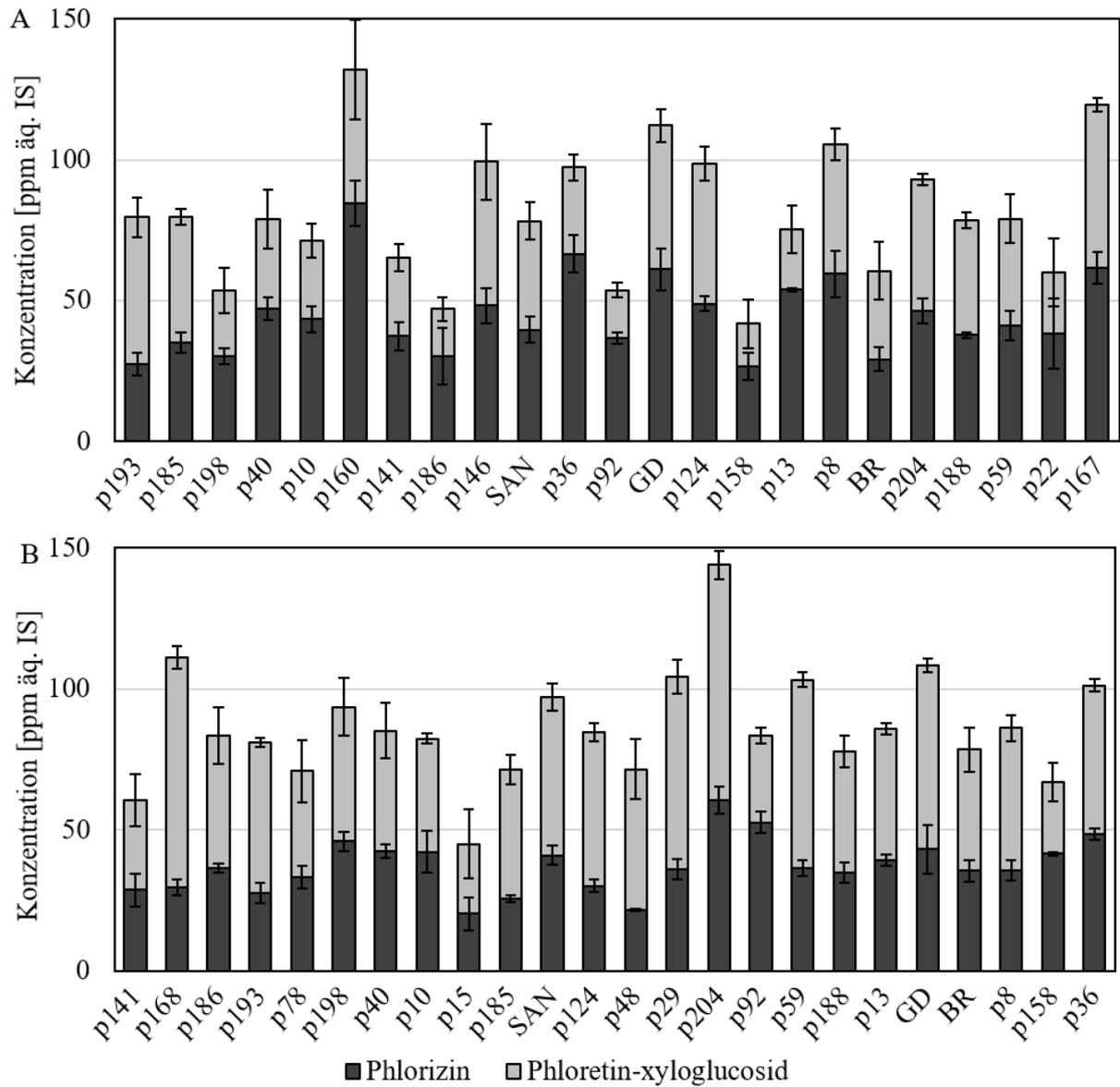
**Anhang 4 Ergebnisse der Anthocyane 2017 (A) und 2018 (B)** Die Genotypen sind in beiden Jahren jeweils nach aufstiegender Mal d 1-Gehalt sortiert.



**Anhang 5 Ergebnisse der Flavonole aus 2017 (A) und 2018 (B)** Die Genotypen sind in beiden Jahren jeweils nach aufstiegenderem Mal d 1-Gehalt sortiert.



**Anhang 6 Ergebnisse der Zimtsäurederivate aus 2017 (A) und 2018 (B)** Die Genotypen sind in beiden Jahren jeweils nach aufstiegender Mal d 1-Gehalt sortiert.



**Anhang 7 Ergebnisse der Dihydrochalkone aus 2017 (A) und 2018 (B)** Die Genotypen sind in beiden Jahren jeweils nach aufsteigendem Mal d 1-Gehalt sortiert.