



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
Professur für Biotechnologie der Naturstoffe

# Quantifizierung Bet v 1-homologer Proteine in Erdbeeren, Tomaten und Pflaumen

Elisabeth Kurze

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt 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: Prof. Dr. Wilfried Schwab  
Prof. Dr. Michael Rychlik

Die Dissertation wurde am 06.11.2018 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 18.02.2019 angenommen.



## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den Personen danken, ohne deren Mitwirkung, Unterstützung und Hilfe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Wilfried Schwab für die Überlassung des Projektes sowie die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren. Ich danke ihm für seine Unterstützung und ausdauernde Betreuung während der gesamten Zeit, seine zahlreichen Anregungen, die wertvollen Denkanstöße und konstruktive Kritik sowie gewissenhafte Durchsicht meiner Manuskripte.

Prof. Dr. Harald Luksch sowie Prof. Dr. Michael Rychlik danke ich für die Mitarbeit in der Prüfungskommission. Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Karl-Heinz Engel, dass er die Funktion als Mentor übernommen hat.

Allen Kooperationspartnern des „Favor-DeNonDe-Projektes“ möchte ich für die gute Zusammenarbeit während der gesamten Zeit danken.

Ein herzliches Dankeschön gilt weiterhin allen Kollegen der BiNa-Arbeitsgruppe für das tolle Arbeitsklima, die stetige Hilfsbereitschaft, lustigen Betriebsausflüge und Unternehmungen. An dieser Stelle möchte ich besonders Katja, Kate und Guangxin für die hervorragende Atmosphäre in unserem Büro danken. Ihr hattet stets ein offenes Ohr, auch für persönliche Gespräche, und habt immer mit mir gefühlt, wenn ein Experiment nicht funktionierte, und versucht neue Lösungsansätze und Ideen zu finden. Auch Emilia und Annika danke ich für die tolle Zeit im Labor und die netten Gespräche an der Café-Bar.

Der größte Dank ist an die Menschen gerichtet, die mir in meinem ganzen Leben immer zur Seite stehen, mich in jeder Lebenslage unterstützen, mir in schwierigen Zeiten Kraft und Hoffnung geben, mich stets ermutigen, nie aufzugeben und immer meine Ziele und Träume zu verfolgen:

Meine Eltern und meine Schwester

Mein Mann Thomas



## Publikationen

Die vorliegende Arbeit wurde von Mai 2015 bis Oktober 2018 an der Professur für Biotechnologie der Naturstoffe unter der Leitung von Prof. Dr. Wilfried Schwab am Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München angefertigt.

Die Dissertation entstand im Rahmen des EU-Projektes „Favor-DeNonDe - Trocknen, Säfte und Marmeladen von Bio-Obst und Gemüse: was passiert mit gewünschten und unerwünschten Verbindungen?“, gefördert durch das Bundesprogramm Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft (BÖLN).

## Originalartikel

**Kurze, Elisabeth;** Lo Scalzo, Roberto; Campanelli, Gabrielle; Schwab, Wilfried (2018) Effect of tomato variety, cultivation, climate and processing on Sola l 4, an allergen from *Solanum lycopersicum*. *PLoS One*, 13(6): e0197971

**Kurze, Elisabeth;** Kock, Vanessa; Lo Scalzo, Roberto; Olbricht, Klaus; Schwab, Wilfried (2018) Effect of the Strawberry Genotype, Cultivation and Processing on the Fra a 1 Allergen Content. *Nutrients*, 10(7). pii: E857

Picchi, Valentina; Lo Scalzo, Roberto; **Kurze, Elisabeth;** Fibiani, Marta; Vangdal, Eivind; Schwab, Wilfried (2018) Impact of year of harvest, genotype and cultivation method on bioactives and Pru d 1 allergen content in plums. (*eingereicht beim International Journal of Food Sciences and Nutrition*)

## Vorträge

**Kurze, Elisabeth;** Schwab, Wilfried: Konfitüren, Säfte und Trocknung biologisch angebauter Lebensmittel: Was geschieht mit Allergenen während der Verarbeitung?

14. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau vom 7. – 10. März 2017 in Freising

Tagungsband „Beiträge zur 14. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau – Ökologischen Landbau weiterdenken: Verantwortung übernehmen, Vertrauen stärken“ vom 7. – 10. März 2017 in Freising

**Kurze, Elisabeth;** Schwab, Wilfried: Bet v 1-homologous allergens in fruits and vegetables: Influence of cultivation and processing on the allergen content

Forschungsseminar Lebensmittelchemie 8. Mai 2017 in Freising

## Poster

**Kurze, Elisabeth;** Schwab, Wilfried: Bet v 1-homologe Allergene in Äpfeln, Erdbeeren, Pflaumen und Tomaten: Einfluss von Anbau und Verarbeitung der Lebensmittel auf den Allergengehalt  
12. Deutscher Allergiekongress vom 5. – 7. Oktober in Wiesbaden (2. Posterpreis)

## Weitere Veröffentlichungen

Franz-Oberdorf, Katrin; Eberlein, Bernadette; Edelmann, Kathrin; Bleicher, Philip; **Kurze, Elisabeth;** Helm, Dominic; Olbricht, Klaus; Darsow, Ulf; Ring, Johannes; Schwab, Wilfried (2017) White-fruited strawberry genotypes are not per se hypoallergenic. *Food Research International*, 100, 748-756.

# Inhaltsverzeichnis

Danksagung.....	I
Publikationen.....	III
Inhaltsverzeichnis.....	V
Abbildungs- & Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
Zusammenfassung.....	XI
Summary.....	XIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Lebensmittelallergien, Symptome und Diagnose.....	1
1.2 Molekulare Mechanismen einer allergischen Reaktion.....	3
1.3 Therapiemöglichkeiten von Nahrungsmittelallergien.....	7
1.4 Klassifizierung von Lebensmittelallergenen.....	7
1.5 Bet v 1-homologe Nahrungsmittelallergene.....	10
1.5.1 Bet v 1 aus <i>Betula verrucosa</i> .....	12
1.5.2 Erdbeerallergen Fra a 1.....	14
1.5.3 Tomatenallergen Sola l 4.....	16
1.5.4 Pflaumenallergen Pru d 1.....	17
1.6 Detektion und Kennzeichnung von Lebensmittelallergenen.....	18
1.7 Lebensmittel aus konventionellem und ökologischem Anbau.....	19
1.8 Verarbeitung von Lebensmitteln und Auswirkungen auf den Allergengehalt.....	21
2 Ziele der Arbeit.....	23
3 Methodenüberblick.....	25
4 Diskussion.....	27
4.1 Proteinbiochemie und thermische Stabilität rekombinanter Proteine.....	27
4.1.1 Sequenzidentität und Strukturhomologie von PR-10 Proteinen.....	27
4.1.2 Rekombinante PR-10 Proteine als potentielle Marker für <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Tests.....	29
4.1.3 Thermische Stabilität von rekombinantem Sola l 4.02 und Fra a 1.02.....	30
4.2 Der Gehalt Bet v 1-homologer Proteine ist von der Sorte abhängig.....	31
4.2.1 Analyse verschiedener Sorten hinsichtlich ihres PR-10 Proteingehaltes.....	32
4.2.2 Zusammenhang zwischen Fruchtfarbe und Allergenmenge.....	33
4.3 Einfluss von Verarbeitung, Anbau und saisonaler Effekte auf den Allergengehalt.....	36
5 Schlussfolgerung & Ausblick.....	39
6 Literaturverzeichnis.....	41
7 Publikationen.....	53
7.1 Publikation I.....	53
7.2 Publikation II.....	54
7.3 Publikation III.....	55

Anhang I - Publikationen .....	57
Publikation I.....	57
Publikation II .....	81
Publikation III .....	105
Anhang II – Ergänzungsmaterial.....	XV
Anhang III .....	XIX
Lebenslauf .....	XXI



# Abbildungs- & Tabellenverzeichnis

## Abbildungen

Abbildung 1: Allergische Reaktionen .....	4
Abbildung 2: Mechanismus einer allergischen Reaktion vom Typ I .....	6
Abbildung 3: Dreidimensionale Struktur von bekannten Vertretern aus den Proteinfamilien der Prolamine, Cupine, Profiline und Bet v 1-homologen Proteine .....	9
Abbildung 4: Proteinstruktur des Hauptbirkenpollenallergens Bet v 1 .....	13
Abbildung 5: Proteinstruktur des Erdbeerallergens Fra a 1e .....	15
Abbildung 6: Proteinsequenzalignment von Bet v 1 und homologen PR-10 Proteinen .....	27
Abbildung 7: Dreidimensionale Proteinstrukturmodelle Bet v 1 und homologe PR-10 Proteinen .....	28

## Tabellen

Tabelle 1: Allergene der Bet v 1-Proteinfamilie .....	11
Tabelle 2: Bekannte Allergene aus <i>Solanum lycopersicum</i> .....	17
Tabelle 3: Vergleich des konventionellen und ökologischen Landbaus .....	20

## Ergänzungsmaterial

Abbildung S 1: Gehalt des Bet v 1-homologen Proteins Pru d 1 in verschiedenen Pflaumensorten .....	XV
Abbildung S 2: Gehalt des Bet v 1-homologen Proteins Mal d 1 in verschiedenen Apfelsorten (Herkunft Estland) .....	XVI
Abbildung S 3: Gehalt des Bet v 1-homologen Proteins Mal d 1 in verschiedenen Apfelsorten (Herkunft Norwegen) .....	XVII



# Abkürzungsverzeichnis

## Physikalische und chemische Einheiten

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
Å	Ångström
Da	Dalton
g	Gramm
k	Kilo
min	Minute
ppm	<i>parts per million</i>

## Sprachliche Vereinfachungen

bzw.	beziehungsweise
et al.	„et alii“ - und andere
z.B.	zum Beispiel

## Weitere Abkürzungen

Api g 1	Allergen aus <i>Apium graveolens</i>
Ara h 1	Allergen aus <i>Arachis hypogaea</i>
Ara h 2	Allergen aus <i>Arachis hypogaea</i>
<i>B. verrucosa</i>	<i>Betula verrucosa</i>
Bet v 1	Allergen aus <i>Betula verrucosa</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure ( <i>complementary desoxyribonucleic acid</i> )
Cor a 1	Allergen aus <i>Corylus avellana</i>
Dau c 1	Allergen aus <i>Daucus carota</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAST	Enzym-Allergo-Sorbent-Test
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
Equ c 1	Allergen aus <i>Equus caballus</i>
<i>F.</i>	<i>Fragaria</i>

<i>F. chiloensis</i>	<i>Fragaria chiloensis</i>
<i>F. moschata</i>	<i>Fragaria moschata</i>
<i>F. nilgerrensis</i>	<i>Fragaria nilgerrensis</i>
<i>F. vesca</i>	<i>Fragaria vesca</i>
<i>F. × ananassa</i>	<i>Fragaria × ananassa</i>
<i>F. × vescana</i>	<i>Fragaria × vescana</i>
Fab	<i>fragment of antigen binding</i>
Fc	<i>constant fragment</i>
FcεRI	hochaffiner Rezeptor für Fc-Region von Immunglobulin E
FcεRII	niedrigaffiner Rezeptor für Fc-Region von Immunglobulin E
Fel d 1	Allergen aus <i>Felis domesticus</i>
<i>fra a 1</i>	Gen, welches <i>Fra a 1</i> kodiert
<i>Fra a 1</i>	Allergen aus <i>Fragaria × ananassa</i>
<i>Fra a 3</i>	Allergen aus <i>Fragaria × ananassa</i>
<i>Fra a 4</i>	Allergen aus <i>Fragaria × ananassa</i>
FW	Frischgewicht ( <i>fresh weight</i> )
His <sub>6</sub>	Hexahistidin
IB	Einschlusskörper ( <i>inclusion bodies</i> )
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMAC	immobilisierte Metallionen-affinitätschromatografie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IUIS	Internationale Union immunologischer Gesellschaften ( <i>International Union of Immunological Societies</i> )
LB	Kulturmedium ( <i>Lysogeny Broth</i> )
LTP	Lipidtransferprotein ( <i>lipid transfer protein</i> )
<i>M. domestica</i>	<i>Malus domestica</i>
Mal d 1	Allergen aus <i>Malus domestica</i>
Mal d 2	Allergen aus <i>Malus domestica</i>
Mal d 3	Allergen aus <i>Malus domestica</i>
MHC	Haupthistokompatibilitäts-Komplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
NMR	kernmagnetische Resonanz ( <i>nuclear magnetic resonance</i> )

OAS	orales Allergiesyndrom	RAST	Radio-Allergo-Sorbent-Test
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )	RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
pH	pons hydrogenium	SDAP	Structural Database of Allergenic Proteins
Phl p 3	Allergen aus <i>Phleum pratense</i>	SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese ( <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
Phl p 7	Allergen aus <i>Phleum pratense</i>		
PR	Pathogenese-assoziierte Proteine ( <i>pathogenesis-related proteins</i> )		
<i>P. domestica</i>	<i>Prunus domestica</i>	<i>S. lycopersicum</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>
Pru ar 3	Allergen aus <i>Prunus armeniaca</i>	<i>sola l 4</i>	Gen, welches Sola l 4 kodiert
Pru av 1	Allergen aus <i>Prunus avium</i>	Sola l 4	Allergen aus <i>Solanum lycopersicum</i>
Pru av 3	Allergen aus <i>Prunus avium</i>	Sola l 6	Allergen aus <i>Solanum lycopersicum</i>
<i>pru d 1</i>	Gen, welches Pru d 1 kodiert	Sola l 7	Allergen aus <i>Solanum lycopersicum</i>
Pru d 1	Allergen aus <i>Prunus domestica</i>	TCR	T-Zellrezeptor
Pru d 3	Hauptallergen aus <i>Prunus domestica</i>	T <sub>H</sub>	T-Helferzelle
Pru p 3	Allergen aus <i>Prunus persica</i>	w/v	Masse/Volumen Verhältnis
Pyr c 1	Allergen aus <i>Pyrus communis</i>	WHO	Weltgesundheitsorganisation ( <i>World Health Organization</i> )
qPCR	quantitative Echtzeit- Polymerasekettenreaktion ( <i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i> )		

## Zusammenfassung

Die Häufigkeit allergischer Erkrankungen, insbesondere von Lebensmittelallergien, hat in den letzten Jahren stark zugenommen. Vor allem in Nord- und Mitteleuropa lösen allergene Proteine aus Pollen und Nahrungsmitteln aus der Familie der Bet v 1-Homologen eine Immunglobulin (Ig) E-vermittelte allergische Sofortreaktion vom Typ I aus. Das Hauptbirkenpollenallergen Bet v 1 zählt zu den Pathogenese-assoziierten Proteinen (*pathogenesis-related*, PR), welche von der Pflanze als Abwehrmechanismus bei Pathogenbefall, Verwundung oder Umweltveränderungen gebildet werden. Bis heute ist die Funktion von PR-10 Proteinen noch nicht vollständig geklärt. Strukturähnliche Proteine, die Bet v 1-Homologen, kommen in einer Vielzahl verschiedener Obst- und Gemüsesorten vor, sodass bei etwa 90% der Birkenpollenallergiker auch allergische Reaktionen nach dem Verzehr von rohem Obst und Gemüse auftreten. Da Antikörper gegen Bet v 1 auch mit strukturähnlichen Pflanzenallergenen anderen Ursprungs reagieren, werden häufig Kreuzreaktionen ausgelöst.

Die Bestimmung und Kennzeichnung von Allergenen ist heute zu einem wichtigen Bestandteil der Lebensmittelsicherheit geworden. Ziel der Arbeit war es, Bet v 1-homologe Allergene in Erdbeeren, Tomaten und Pflaumen sowie verarbeiteten Produkten mittels eines selbst konzipierten, indirekten kompetitiven ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) zu quantifizieren. Der Einfluss der Sorte, der Anbaubedingung, der Trocknungsmethode sowie saisonaler Schwankungen wurde analysiert und beurteilt.

Der Sola 14-Gehalt von 23 untersuchten Tomatensorten variierte signifikant und lag im Bereich zwischen 0,24 und 1,71 µg Sola 14/g Frischgewicht (*fresh weight*, FW). Dabei zeigten die Sorten Rugantino und Rhianna niedrigere Werte verglichen zu Farbini und Bambello. Das Trocknen von Tomaten im Ofen, in der Sonne und durch Gefriertrocknung führte zu einem deutlichen Rückgang. Thermische Behandlung und der Wasserverlust führte zur Instabilität des Proteins. Untersuchungen der Hitzeinstabilität von rekombinantem Sola 14.02 bestätigten die Ergebnisse für das native Protein in getrockneten Tomatenproben. Es ließ sich keine Korrelation zwischen Farbe und Allergenmenge feststellen. Konventioneller oder ökologischer Anbau hatten einen geringen Einfluss, während saisonale Effekte, welche von Jahr zu Jahr schwanken, eine stärkere Auswirkung auf den Sola 14-Gehalt zeigten.

Bei 20 untersuchten Genotypen reifer Erdbeeren variierte der Fra a 1-Gehalt signifikant von 0,67 bis 3,97 µg/g FW. Entgegen der Hypothese, dass weiße Erdbeeren von Allergikern besser vertragen werden und diese geringere Mengen an Allergenen enthalten, wurden in reifen Früchten von roten, weißen und gelben Erdbeeren ähnliche Fra a 1-Gehalte detektiert, sodass auch hier keine Korrelation von Fra a 1 mit der Farbe ermittelt werden konnte. Im Vergleich zu frischen Erdbeeren enthielten ofen- und sonnengetrocknete Früchte aufgrund der thermischen Behandlung während der Verarbeitung geringfügig niedrigere Mengen. Rekombinantes Fra a 1.02 degradierte nach 10-minütiger Hitzebehandlung bei 100 °C. Der Genotyp bestimmte deutlich den Fra a 1-Gehalt in Erdbeeren, wobei Kultivierungsbedingungen keinen Einfluss hatten. Auch saisonale Effekte waren gering.

Von den Pflaumensorten Jubileum, Reeves und Victoria aus Norwegen wurden der Ascorbinsäure- und Polyphenolgehalt, die Polyphenoloxidaseaktivität, die antioxidative Kapazität sowie die Pru d 1-Allergenmenge bestimmt. Diese Qualitätsparameter sowie der Gehalt sekundärer Metabolite in Pflaumen variierte stark zwischen den Proben der Jahre 2015 und 2016 und war zudem von der Sorte abhängig, während die Anbaubedingungen einen geringen Einfluss hatten. Der Phenolgehalt korrelierte signifikant mit der antioxidativen Kapazität. Weiterhin konnte ein Zusammenhang zwischen dem Pru d 1-Gehalt und dem Gehalt an Flavan-3-olen festgestellt werden, sodass diese Klasse von Phenolen den Allergengehalt in Pflaumen entscheidend zu beeinflussen scheint.

All diese Ergebnisse erweitern das Wissen über den Allergengehalt verschiedener Tomaten-, Erdbeer- und Pflaumensorten. Damit können durch Identifizierung von Sorten mit niedrigem Gehalt der Bet v 1-homologen Allergene neue Ansätze für die Züchtung hypoallergener Früchte geboten werden. Zusätzlich müssen weitere Untersuchungen mit betroffenen Patienten durchgeführt werden, um die Lebensmittelsicherheit und die Lebensqualität von Birkenpollenallergikern mit Kreuzallergien zu verbessern.

## Summary

The prevalence of allergic diseases, particularly of food allergies, has increased dramatically in recent years. Especially in Northern and Central Europe allergenic proteins of the Bet v 1-homologous family, present in pollen, fruits and vegetables, trigger an immunoglobulin (Ig) E-mediated type I immediate allergic reaction. The major birch pollen allergen Bet v 1 belongs to the pathogenesis-related (PR) proteins and is produced by the plant as a defense response reaction in abiotic and biotic stress conditions such as pathogen attack, wounding or environmental changes. The physiological function of PR-10 proteins is not fully understood yet. Structurally related proteins, including Bet v 1 homologs, are found in a variety of different fruits and vegetables. About 90% of patients suffering from birch pollen allergy develop allergic reactions after the consumption of raw fruits and vegetables leading to birch pollen-related food allergies. Cross-reactivity occurs because antibodies against Bet v 1 recognize similar protein structures (epitopes) from different plant origins.

The detection and labeling of allergens in food has become an important issue of food safety today. The aim of the work was to quantify Bet v 1-homologous allergens in tomatoes, strawberries and plums as well as in processed food products by developing an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The influence of variety, cultivation condition and drying method on the allergen content should be evaluated.

The Sola l 4 content of 23 tomato cultivars varied significantly between 0.24 and 1.71  $\mu\text{g Sola l 4/g}$  fresh weight (FW). The varieties Rugantino and Rhianna showed lower values compared to Farbini and Bambello with higher concentrations. Drying of tomato fruits in the oven, in the sun and by freeze-drying led to a significant decrease in Sola l 4 amount. Thermal treatment and the loss of water resulted in the instability of the protein. Investigation of the heat instability of recombinant Sola l 4.02 confirmed the results for the native protein in dried tomato samples. No correlation was observed between fruit color and the allergen levels. Conventional and organic farming had little impact, while seasonal effects varying from year to year, showing a greater impact on the Sola l 4 content.

Among the 20 strawberry genotypes, the Fra a 1 content of mature fruits varied significantly between 0.67 to 3.97  $\mu\text{g/g FW}$ . Contrary to the hypothesis that patients suffering from birch pollen allergy tolerate white strawberries containing lower levels of Fra a 1 allergen, similar levels of Fra a 1 were detected in mature fruits of red, white, and yellow strawberry varieties. No correlation of Fra a 1 with the fruit color could be determined. In comparison to fresh strawberries, oven and sun-dried fruits contain slightly lower amounts due to the thermal treatment during the drying process. Recombinant Fra a 1.02 degraded after 10 minutes of heat treatment at 100 °C. In conclusion, the Fra a 1 content in strawberries was clearly determined by the genotype, whereby cultivation conditions had no influence. Seasonal effects were minor.

In the plum varieties Jubileum, Reeves and Victoria from Norway the ascorbic acid and polyphenol content, polyphenol oxidase activity, antioxidant capacity and the Pru d 1 allergen content were determined. These quality parameters and the content of secondary metabolites in plums varied

significantly between the samples of the two years 2015 and 2016. Furthermore, the parameters were also dependent on the variety, while growing conditions had minor influence. The phenol content correlated significantly with the antioxidant capacity. Moreover, the Pru d 1 content correlated with the content of flavan-3-ols. These phenolic compounds seemed to have a determining influence on the allergen content in plums.

These results contribute to the knowledge about the allergen content of various tomatoes, strawberries and plums. The identification of varieties with low content of Bet v 1-homologous allergens provide new opportunities for breeding hypoallergenic fruits. In addition, further investigations together with birch pollen allergic patients affected by cross-reactivity are needed to potentially improve the food safety and quality of life.



# 1 Einleitung

## 1.1 Lebensmittelallergien, Symptome und Diagnose

Die Hintergründe, warum bestimmte Stoffe wie Pollen, Tierhaare, Nahrungsmittel oder Arzneistoffe bei Menschen im Laufe ihres Lebens allergische Reaktionen auslösen, sind bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Wissenschaftliche Untersuchungen deuten jedoch darauf hin, dass eine Kombination aus veränderten Lebensgewohnheiten (Ernährung, Beruf, Belastung des Wohnraums, Chemikalien im Haushalt), Umweltbelastungen durch Luftverschmutzung von Industrie- und Autoabgasen, klimatischen Veränderungen (Beeinflussung der Flora und Fauna innerhalb geografischer Regionen) und der Rückgang parasitärer Erkrankungen und die damit verbundene Unterforderung des Immunsystems eine Rolle bei der Entstehung einer Allergie spielen könnten (Jenerowicz et al., 2012). Auch die Hygiene- bzw. Dreck- und Urwaldhypothese wird bei der Frage nach den Ursachen zur Entstehung von Allergien immer wieder diskutiert. So können durch Infektionen im Kindesalter bestimmte Immunzellen des menschlichen Abwehrsystems stimuliert werden und damit der Entwicklung von Allergien entgegenwirken (Wills-Karp et al., 2001). Ein geringeres Auftreten von allergischen Erkrankungen ist in Ländern mit vergleichsweise schlechteren hygienischen Bedingungen zu beobachten (Romagnani, 2004).

Der Kinderarzt Clemens von Pirquet erwähnte bereits im Jahr 1906 erstmals den Begriff „Allergie“ (von Pirquet, 1906). Seinen Beobachtungen zufolge führte die Exposition des Körpers gegenüber einer Substanz zur Produktion von Antikörpern, die eine Veränderung der spezifischen Reaktivität gegenüber diesem Stoff induzierte. Vom Griechischen für *allos* (anders) und *ergia* (Tätigkeit) abgeleitet, entstand der Begriff Allergie (Igea, 2013).

Das Immunsystem, welches aus einer natürlichen (angeborenen) und einer adaptiven (erworbenen) Immunität besteht, schützt den menschlichen Körper vor Viren, Bakterien, Pilzen, Parasiten, körperfremden Substanzen und entarteten Zellen (Kaufmann, 2012). Als Überempfindlichkeit oder Hypersensitivität wird dabei die Reaktion des menschlichen Körpers auf prinzipiell harmlose Substanzen bezeichnet (Galli et al., 2008). Ausgelöst durch den wiederholten Kontakt mit Antigenen, welche nicht im Zusammenhang mit Krankheitserregern stehen, führt diese Form der adaptiven Immunantwort zu schwerwiegenden Erkrankungen. Die Einteilung erfolgt in vier Typen von Überempfindlichkeitsreaktionen, wobei die klassische Allergie der Sofortreaktion vom Typ I zuzuordnen ist (Gell & Coombs, 1963). Allergien, welche von Proteinen ausgelöst werden und die häufigste Form einer Überempfindlichkeit darstellen, sind zu einem weltweiten Gesundheitsproblem geworden und betreffen mittlerweile einen Großteil der Bevölkerung. In den vergangenen Jahren kam es vor allem in Westeuropa, Nordamerika und Australasien zu einem drastischen Anstieg der Häufigkeit atopischer Erkrankungen (Kay, 2001). An den Symptomen wie Asthma, allergischer Rhinokonjunktivitis, Hautausschlag oder Juckreiz leiden Schätzungen zufolge 20% der Weltbevölkerung (Johansson et al., 2004).

Der Verzehr von Nahrungsmitteln wie Milch, Eiern, Erdnüssen oder Fisch ruft bei einem Teil der Bevölkerung milde aber auch zum Teil schwere oder sogar lebensbedrohliche Symptome hervor. Etwa 5% der Erwachsenen und rund 8% der Kinder sind von einer Lebensmittelallergie betroffen, mit

steigender Prävalenz (Sicherer & Sampson, 2014). Die Lebensmittelintoleranz, welche von einer Allergie abzugrenzen ist, beschreibt eine abnormale physiologische Antwort auf ein Lebensmittel oder einen Lebensmittelzusatz, welche beispielsweise auf einem Enzymdefekt beruht und kein Resultat einer immunvermittelten Reaktion ist (Ortolani & Pastorello, 2006). Allergien werden häufig durch die acht Nahrungsmittel Milch, Ei, Getreideprodukte (Gluten), Soja, Erdnüsse, Nüsse (Haselnüsse, Walnüsse), Fisch oder Meeresfrüchte verursacht (Verhoeckx et al., 2015). Die Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization*, WHO) und die Internationale Union immunologischer Gesellschaften (*International Union of Immunological Societies*, IUIS) haben insgesamt über 900 Allergene sowohl tierischen als auch pflanzlichen Ursprungs gelistet ([www.allergen.org](http://www.allergen.org)).

Vor allem in Nord- und Mitteleuropa sowie in Nordamerika stellen Allergene aus Birkenpollen die häufigste Ursache allergischer Reaktionen dar (Visco et al., 1996). In Finnland, Österreich und Schweden sind 98% der Birkenpollenallergiker gegen Bet v 1, das Hauptbirkenpollenallergen, sensibilisiert und bilden spezifische IgE-Antikörper (Movérare et al., 2002). Häufig treten Kreuzreaktionen von Inhalationsallergenen, wie Gräser- oder Baumpollen, mit Nahrungsmittelallergenen auf, sodass 70% der gegen Bet v 1-sensibilisierten Allergiker folglich auch mit allergischen Symptomen nach dem Verzehr diverser Früchte und Gemüse reagieren (Vieths et al., 2002). Die Ursache des als Pollen-assoziierte Lebensmittelallergie bezeichneten Phänomens sind pflanzliche Lebensmittelallergene z.B. aus Haselnuss, Mandel, Apfel, Pfirsich oder Kirsche, welche dem Birkenpollenallergen Bet v 1 ähneln (Gruber et al., 2004). Die Symptome der Kreuzallergien, welche nach dem Nahrungsmittelkontakt auftreten, können sich hinsichtlich des körperlichen und zeitlichen Auftretens sowie der Ausprägung sehr stark unterscheiden (Amlot et al., 1987). Eine milde Form des oralen Allergiesyndroms (OAS) äußert sich in Form von Jucken und Anschwellen der Lippen, der Zunge oder des Halses (Ausucua et al., 2009; Mari et al., 2005). Allergische Reaktionen, welche die Haut oder die Schleimhäute betreffen, äußern sich mit Juckreiz, Hautrötungen, Schnupfen oder Bindehautentzündung. Auch der respiratorische Trakt (Atemwege, Lunge) kann betroffen sein und ruft Asthma oder Heiserkeit hervor. Bauchschmerzen, Übelkeit sowie Erbrechen oder Diarrhö treten bei allergischen Reaktion auf, welche den Magen-Darm-Bereich bzw. Gastrointestinaltrakt betreffen. Die am weitaus gefährlichste Form der allergischen Reaktion betrifft das kardiovaskuläre System, wobei ein anaphylaktischer Schock und Kreislaufversagen mit Todesfolge auftreten können (Sampson, 2005).

Um eine Lebensmittelallergie zu diagnostizieren, können, beruhend auf Anamnese und körperlichen Untersuchungen, durch Haut-, Blut- oder Provokationstests die Auslöser identifiziert werden (Boyce et al., 2011). Beim Pricktest werden Tropfen der zu testenden Allergenlösung entweder als käuflicher Extrakt oder in natürlicher Form auf die Haut aufgebracht und mit einer Lanzette in die Haut gestochen. Nach der Reaktion von einigen Minuten gibt die Quaddelbildung Hinweis auf eine mögliche Sensibilisierung. Im Labor kann Blutserum von betroffenen Patienten untersucht werden. Die Gesamt-IgE-Menge sowie die Menge allergenspezifischer IgE-Antikörper kann Aufschluss über das Nahrungsmittel geben, welches potentiell eine IgE-vermittelte Immunantwort auslöst. Bei der oralen Provokation, welche stets unter ärztlicher Aufsicht oder in Kliniken durchgeführt wird, werden zunächst

geringe Mengen eines Nahrungsmittels, das Auslöser der Allergie zu sein scheint, aufgenommen. Der Test wird, mit Steigerung der Menge, fortgesetzt, bis es zum Erscheinen allergischer Reaktionen kommt. Dabei wird zwischen Sofortreaktionen und Spätreaktionen von bis zu 48 Stunden nach der Verabreichung des Nahrungsmittels unterschieden.

Obwohl sich die Methoden zur Bestimmung allergischer Erkrankungen in den letzten Jahren stetig verbessert haben, ist die Kennzeichnung von Allergenen auf Verpackungen und auf loser Ware für die Lebensmittelsicherheit von entscheidender Bedeutung. Für betroffene Patienten ist bei einer Diagnose einer Nahrungsmittelallergie die Meidung des allergieauslösenden Lebensmittels unumgänglich. Die Forschung und Aufklärung über die biochemische und dreidimensionale Struktur, die immunologischen Eigenschaften und Identifikation von Epitopen, sowie die physiologische Funktion der Allergene ist Voraussetzung für die Kennzeichnung von allergieauslösenden Substanzen und dient der Verbesserung der Prävention, Diagnostik und Therapie von Lebensmittelallergien.

## 1.2 Molekulare Mechanismen einer allergischen Reaktion

Antikörper zählen zur Proteinfamilie der Immunglobuline (Haurowitz, 1969). Bezüglich ihrer Größe, des Molekulargewichtes sowie ihrer Struktur und Funktion lassen sich Antikörper in die fünf Klassen IgA, IgD, IgE, IgG und IgM untergliedern (Schütt & Bröker, 2011). Die entscheidende Funktion dieser Moleküle liegt darin, mit sehr hoher Spezifität sowie Affinität Antigene verschiedenster Substanzklassen wie Proteine, Lipide, Kohlenhydrate, Nukleinsäuren oder Kunststoffe zu erkennen und zu binden und folglich immunologische Mechanismen auszulösen. Ihre flexible Y-förmige Struktur ist aus insgesamt vier Polypeptidketten aufgebaut, wobei jeweils zwei identische schwere und zwei leichte Ketten über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Janeway, 2001). Jede Kette besteht aus einer variablen und einer konstanten Domäne. Die Gelenkregion verbindet den Fab- (*fragment of antigen binding*) mit dem Fc- (*constant fragment*) Teil. Jeder Antikörper besitzt zwei identische Antigenbindungsstellen, welche durch die hypervariablen Domänen der schweren und der leichten Kette gebildet werden. Diese Aminosäurekette ist so gefaltet, dass sich die Bindungsstelle für ein ganz bestimmtes Antigen ausbildet. Die Antigen-Antikörper-Bindung ist reversibel und beruht auf der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophoben Wechselwirkungen, van-der-Waals-Kräften und elektrischen Ladungen. Die Fc-Region übernimmt die biologische Effektorfunktion (Schütt & Bröker, 2011).

Allergische Reaktionen können, je nach Art der Reaktion des Immunsystems, vier verschiedenen Allergietypen (Abbildung 1) zugeordnet werden (Gell & Coombs, 1963, Emmrich & Liebe, 2011).

- Die Typ-I-Reaktion, auch Sofortreaktion oder IgE-vermittelte Allergie genannt, liegt bei rund 90% aller Allergieformen vor und umfasst allergisches Asthma, Heuschnupfen, Nahrungsmittel- und Insektengiftallergien. Die Ursache ist eine erhöhte Bildung von IgE-Antikörpern, welche gegen ein bestimmtes Allergen gerichtet sind. Die auf Mastzellen lokalisierten IgE-Antikörper erkennen bei Kontakt das Allergen, worauf es zur Ausschüttung von Mediatoren (Histamin) kommt. Der Mechanismus der Typ-I-Reaktion wird im Folgenden genauer beschrieben.

- Die Typ-II-Allergie beschreibt eine zytotoxische IgE-vermittelte Reaktion, bei der das Immunsystem Antikörper als Reaktion auf Zellstrukturen bestimmter Körperzellen bildet. Das Antigen bindet an Zellen, welche im Folgenden durch Makrophagen erkannt und phagozytiert werden. Es können schwerwiegende Reaktionen bei Blutgruppenunverträglichkeiten auftreten.
- Die Typ-III-Allergie beschreibt die Ablagerung von zu Immunkomplexen zusammengelagerten Allergenen und Antikörpern in Geweben oder Blutgefäßen, wodurch Gefäßentzündungen die Folge sind.
- Bei der Typ-IV-Reaktion werden keine Antikörper benötigt. Das von Makrophagen präsentierte Allergen wird von T-Lymphozyten erkannt. Diese Form der Abwehrreaktion verläuft nach dem Allergenkontakt langsam ab, weshalb es auch als Spätreaktion bezeichnet wird. Beispiele sind die allergische Kontaktdermatitis gegen nickelhaltigen Ohrschmuck.

Allergieform	Induktion durch	Reaktionsmechanismus	Symptome
Typ I Sofortreaktion	Pollen Nahrungsmittel Tierhaare	<p>Antigen (löslich) → Mastzelle mit spezifischen IgE → Degranulation Histaminfreisetzung</p>	Asthma Heuschnupfen
Typ II Zytotoxische Reaktion	Medikamente	<p>Antigen (zellgebunden) → Komplementaktivierung → Phagozytose</p>	Medikamenten- Hämolyse
Typ III Immunkomplexreaktion	Blutseren bakterielle Strukturen	<p>Antigen (löslich) → IgG → Blutgefäß Immunkomplexbildung</p>	Serumkrankheit Alveolitis
Typ IV Spätreaktion	Kontaktallergene	<p>Antigen → T-Zelle → Monozyt → Zytokine Chemokine</p>	Kontaktallergien

**Abbildung 1: Allergische Reaktionen**

Überblick über die nach Coombs und Gell eingeteilten allergischen Reaktionen: Typ I – allergische Sofortreaktion; Typ II – zytotoxische Reaktion; Typ III – allergische Immunkomplexreaktion; Typ IV - Spätreaktion (Abbildung nach Emmrich & Liebe, 2011)

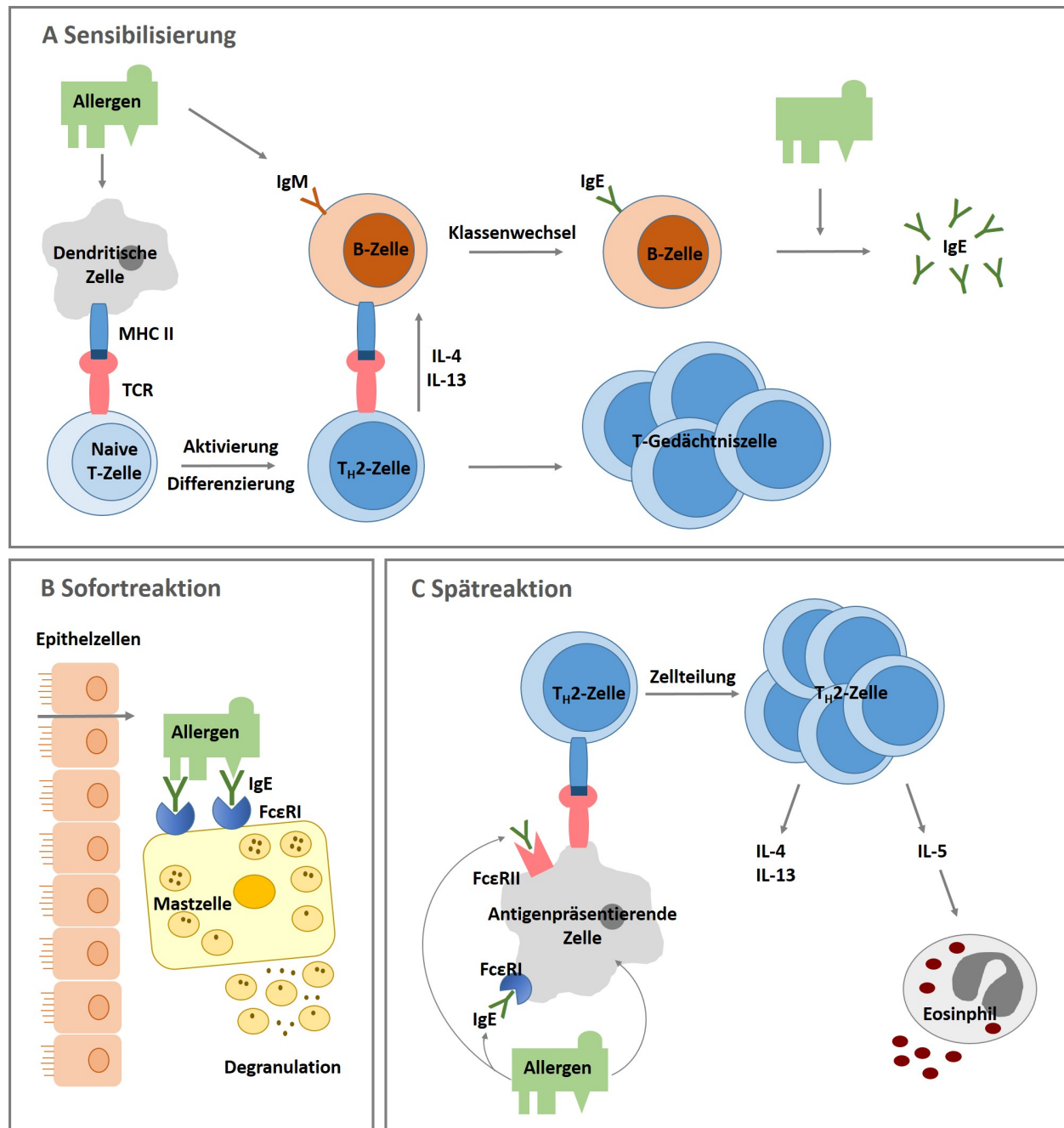
Für die Initialisierung der Typ I-Reaktion ist zunächst eine primäre Sensibilisierung erforderlich, welche anschließend zur Produktion allergenspezifischer IgE-Antikörper führt (Abbildung 2A). Beim Erstkontakt mit z.B. Pollen, welcher symptomlos verläuft, dringen geringste Mengen eines Allergens durch die Schleimhautoberfläche in die Epithelzellen ein (Renkonen et al., 2009). Das Antigen wird von

antigenpräsentierenden Zellen, den dendritischen Zellen, erkannt, aufgenommen und in Peptide gespalten. Vom Haupthistokompatibilitäts-Komplex des Typs II (*major histocompatibility complex*, MHC II) gebunden, werden diese Peptide auf der Zelloberfläche präsentiert (Guermontprez et al., 2002). Dieser Vorgang wird als Antigenpräsentation bezeichnet. Dendritische Zellen wandern in die Lymphknoten und präsentieren T-Lymphozyten die auf der Zelloberfläche befindlichen MHC II-Peptid Komplexe, sodass die antigenspezifische Immunantworten initiiert wird (Schütt & Bröker, 2011). Naive CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten erkennen mittels T-Zell-Rezeptoren den MHC II-Peptid Komplex. Durch die Auslösung einer Signaltransduktionskaskade kommt es zur Produktion von Cytokinen und zur Differenzierung von naiven T-Zellen zu T-Helferzellen (T<sub>H</sub>-Zellen). Die Cytokine Interleukin 12 (IL-12) und IL-4 stimulieren jeweils die Differenzierung von T<sub>H</sub>-Zellen zu T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen (Constant et al., 1995; Zhou et al. 2003). Die Freisetzung der durch T<sub>H</sub>2-Zellen produzierten Interleukine IL-4 und IL-13 bewirkt eine Immunglobulin-Klassenwechsel von IgM- zu IgE-produzierenden B-Zellen (Niederberger et al., 2002; Valenta, 2002). Die Sensibilisierung führt zur Bildung von B-Gedächtniszellen sowie allergenspezifischen T-Gedächtniszellen. Bei wiederholtem Allergenkontakt kommt es zur erhöhten Produktion allergenspezifischer IgE-Antikörper durch B-Gedächtniszellen (Valenta, 2002). IgE werden mittels spezifischer Rezeptoren auf Mastzellen, Basophilen, Monozyten, dendritische Zellen und B-Zellen geladen. Der FcεRI Rezeptor auf der Oberfläche von Effektorzellen (Mastzellen, basophile Granulozyten) ist ein hochaffiner Oberflächenrezeptor für die Fc-Domäne der IgE (Turner & Kinet, 1999).

Während der Sofortreaktion (Abbildung 2B) kommt es schließlich auf der Oberfläche der Effektorzellen zur Quervernetzung der an den FcεRI Rezeptor gebundenen IgE-Antikörper mit dem Antigen (Gould & Sutton, 2008). Innerhalb weniger Minuten führt die Degranulierung der Effektorzellen zur Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren. Mastzellen sezernieren sowohl bereits gebildete Mediatoren, wie Histamin oder Tryptase, aber synthetisieren auch neu gebildete Lipidmediatoren wie Leukotrien C<sub>4</sub> oder Prostaglandin D<sub>2</sub> und Cytokine wie TNF-α (Broide, 2001). Diese Entzündungsmediatoren verursachen dann eine Erweiterung der Blutgefäße, eine erhöhte Flüssigkeitssekretion, führen zur verstärkten Peristaltik des Gastrointestinaltraktes und einer Verringerung des Atemwegsdurchmessers, sodass lokale allergische Symptome wie Anschwellen von Schleimhäuten im Nasen-Rachen-Raum, Bronchialkrämpfen oder Beschwerden des Magen-Darm-Traktes auftreten (Galli et al., 2008). Weiterhin können diese Mediatoren auch die Aktivierung von Leukozyten initiieren, welche die späte Phase einer allergischen Reaktion einleiten.

Bei Patienten, welche von chronischem Asthma oder atopischer Dermatitis betroffen sind, können allergische Symptome auch nach einigen Stunden oder einem Tag nach der Allergenexposition auftreten, was als Spätreaktion bezeichnet wird (Abbildung 2C) (Cieslewicz et al., 1999). Dabei kommt es nach dem Antigenkontakt zur Bindung von IgE an antigen-präsentierende Zellen, wie B-Zellen, dendritische Zellen oder Monozyten über FcεRI- und FcεRII-Rezeptoren und zur Aktivierung von allergenspezifischen T<sub>H</sub>2-Zellen (Valenta, 2002). Nach deren Zellteilung werden proinflammatorische Mediatoren wie IL-4, IL-5 oder IL-13 freigesetzt. Das von T<sub>H</sub>2- Zellen freigesetzte Cytokin IL-5

stimuliert die Aktivierung von Eosinophilen und die Ausschüttung von Mediatoren, Chemokinen und proinflammatorischen Cytokinen (Larché et al., 2006).



**Abbildung 2: Mechanismus einer allergischen Reaktion vom Typ I**

(A) Sensibilisierung: Der initiale Kontakt mit einem Allergen führt zur Produktion von antigen-spezifischen IgE und T-Gedächtniszellen; (B) Sofortreaktion: Durch die Quervernetzung von IgE mit dem Antigen auf der Oberfläche von Mastzellen kommt es zur Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren durch Degranulation; (C) Spätreaktion: T-Gedächtniszellen werden durch Antigene aktiviert und proliferieren. Proinflammatorische Cytokine wie IL-, IL-5 oder IL-14 werden gebildet, wodurch Eosinophile inflammatorische Mediatoren ausschütten. FcεRI – hochaffiner IgE-Rezeptor; FcεRII – niedrigaffiner IgE-Rezeptor; Ig – Immunglobulin; IL – Interleukin; MHC – Haupthistokompatibilitäts-Komplex des Typs II; TCR – T-Zellrezeptor; T<sub>H</sub> – T-Helferzelle (Abbildung nach Valenta, 2002)

### 1.3 Therapiemöglichkeiten von Nahrungsmittelallergien

Ist eine Nahrungsmittelallergie durch orale Provokationstests mit Doppelblind- und Placebokontrollen diagnostiziert worden, ist die einzige effektive Möglichkeit die Meidung des auslösenden Allergens (Allergenkarenz) (Berin, 2014). Bis heute gibt es keine anerkannte Therapiemethode für die Heilung von Allergien. Die medikamentöse Therapieform durch Notfall-Medikamente, bestehend aus schnell absorbierbarem Antihistaminikum, Adrenalin und Glukokortikosteroid, können Patienten, welche schwere anaphylaktische Reaktionen zeigen, in Notfällen helfen (Lepp et al., 2002). Die Verabreichung von Antiallergika bei unbeabsichtigtem Kontakt kann die Symptome einer allergischen Reaktion kurzzeitig lindern, kann andererseits aber auch mit Nebenwirkungen wie Müdigkeit oder Kopfschmerz einhergehen (Dretzke et al., 2013). Die Hyposensibilisierung, auch spezifische Immuntherapie genannt, befasst sich mit den Ursachen einer Allergie, wobei es durch eine allmähliche subkutane oder sublinguale Verabreichung des jeweiligen Nahrungsmittels zur Gewöhnung an das Allergen kommen soll. Dadurch soll die überempfindliche Reaktion des Immunsystems bei täglichem Kontakt mit dem Allergen vermieden werden (Cavkaytar et al., 2014). Allergische Reaktionen sowie im Extremfall ein anaphylaktischer Schock sind die Nachteile dieser Behandlungsmethode (Wood et al., 2013).

Der Einsatz von rekombinanten Allergenen, Hypoallergenen oder Allergenfragmenten könnte ein vielversprechender Ansatz zu Verbesserung der spezifischen Immuntherapie sein (Ferreira et al., 2014). In den vergangenen Jahren wurden eine Vielzahl wichtiger Allergene pflanzlichen und tierischen Ursprungs kloniert, sequenziert und exprimiert sowie deren dreidimensionale Proteinstruktur und Epitope für B- und T-Zell-Erkennung aufgeklärt (Chapman et al., 2000). Von vielen Allergenen sind sowohl hyperallergene als auch hypoallergene Isoformen bekannt (Wagner et al., 2008; Franz-Oberdorf et al., 2016; Son et al., 1999). Diese Isoformen können sich in den IgE-Bindungseigenschaften unterscheiden, wobei einige Proteinformen höhere bzw. niedrigere IgE-Bindungsreaktivitäten aufweisen und zum Teil keine oder nur milde Symptome auslösen (Ferreira et al., 1996). Die zahlreichen Mechanismen der allergen-spezifischen Immuntherapie sind zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vollständig aufgeklärt (Akdis & Akdis, 2014). Weitere immunologische Effekte, wie z.B. die Aktivierung allergen-spezifischer T-Lymphozyten oder ein Klassenwechsel hin zu IgG-Immunglobulinen durch die Verringerung der IgE-vermittelten Reaktivität, können dennoch auftreten (Purohit et al., 2008). Immuntherapie führt nicht immer zu einer Verbesserung der Symptomatik, da auch allergen-spezifische IgG-Antikörper zu einer Verstärkung der IgE-induzierten Immunantwort führen können (Denépoux et al., 2000). Die Identifizierung und Herstellung von Hypoallergenen ist daher von großer Bedeutung.

### 1.4 Klassifizierung von Lebensmittelallergenen

Antigene, welche eine IgE-vermittelte Immunantwort auslösen, werden als Allergene bezeichnet, wobei Pollen, Lebensmittel oder Tierhaare zahlreiche allergene Proteine beinhalten (Zhuang & Dreskin, 2013). Doch welche strukturellen oder funktionellen Eigenschaften machen ein Protein zu einem Allergen? In den letzten Jahrzehnten wurden entscheidende Fortschritte auf dem Gebiet der Allergenforschung im Bereich der molekularen, biochemischen, strukturellen und immunologischen Charakterisierung von

zahlreichen Allergenen erzielt sowie rekombinante Proteine immunologisch relevanter Allergene gewonnen (Chapman et al., 2000).

Allergene Proteine können nach ihren Gemeinsamkeiten und bestimmten Eigenschaften klassifiziert werden. Nach ihrer Herkunft lassen sich Allergene pflanzlichen und tierischen Ursprungs unterscheiden. Insgesamt sind 170 Lebensmittel bekannt, welche IgE-vermittelte Reaktionen auslösen. Jedoch sind nur acht Lebensmittel, darunter Weizen, Soja, Erdnüsse, Nüsse, Eier, Milch, Fisch und Meeresfrüchte, für die Mehrheit aller Lebensmittelallergien verantwortlich (Burks et al., 2012). Die WHO und die IUIS benennen Allergene gemäß folgenden Nomenklaturregeln, welche auf der Klassifizierung nach ihrer botanischen oder zoologischen Herkunft beruhen (<http://www.allergen.org/>) (Chapman et al., 2007):

- die ersten drei Buchstaben bezeichnen die Gattung
- gefolgt vom ersten Buchstaben der Art der Allergenquelle und
- einer Nummer, welche die chronologische Reifensequenz der Allergenisolierung widerspiegelt.

In diesem Zusammenhang soll als Beispiel das Hauptapfelallergen des Kulturapfels *Malus domestica* (*M. domestica*) Mal d 1 genannt werden.

Für den Menschen spielen Allergene aus Pflanzen vor allem in Form von Pollen und deren Verbreitung in der Luft sowie Nahrungsmittelallergene, welche in Gemüse, Obst oder Nüssen enthalten sind, eine wichtige Rolle (Popescu, 2015). Eine Sensibilisierung kann entweder durch das Nahrungsmittelallergen selbst (primär) oder durch strukturell verwandte inhalative Allergene (sekundär) hervorgerufen werden. Meist erfolgt die primäre IgE-Sensibilisierung durch inhalative Pollenallergene, sodass es im Folgenden zu Kreuzreaktionen mit Nahrungsmittelallergenen kommen kann (Hauser et al., 2008). Dies wird als Pollen-assoziierte Nahrungsmittelallergie beschrieben.

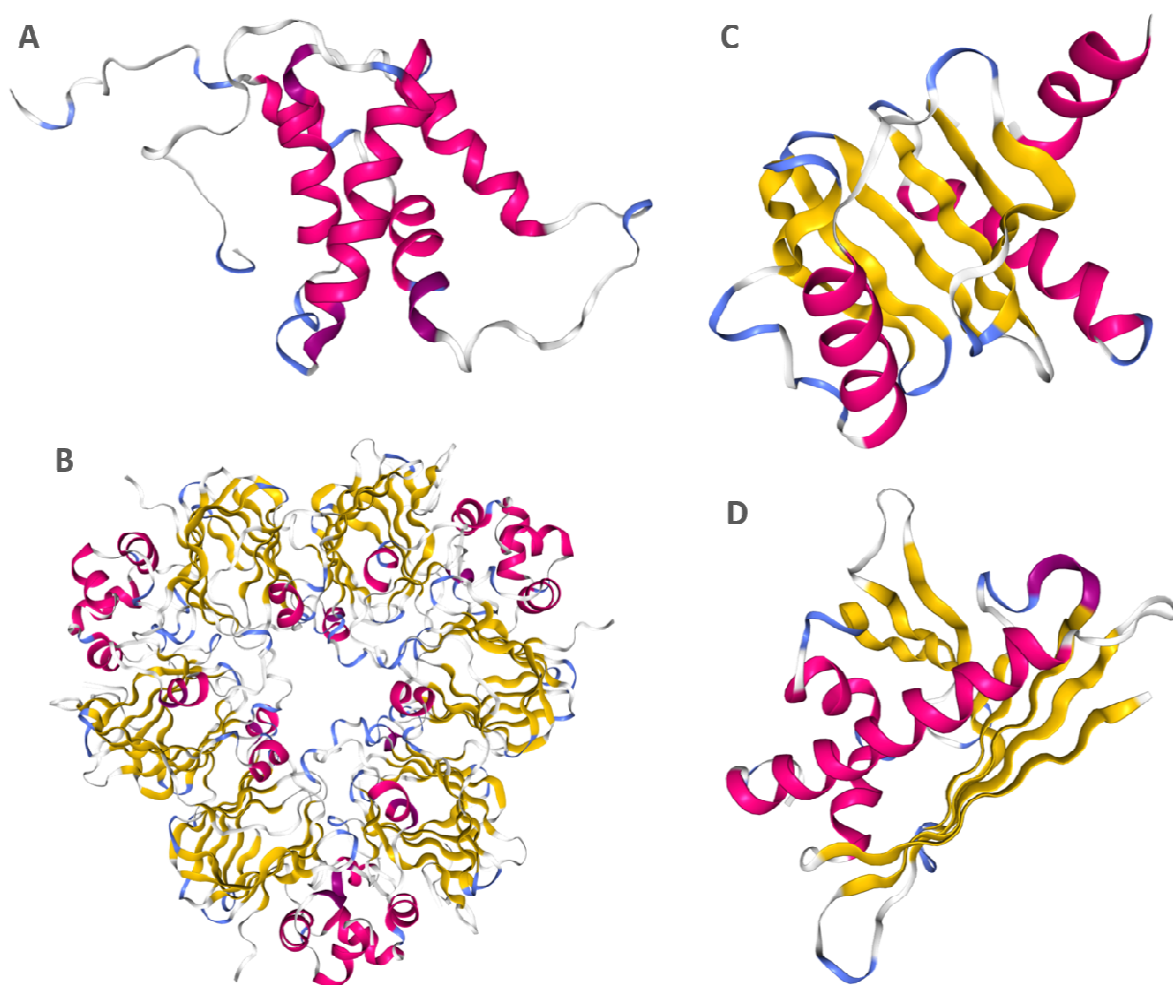
Die Verteilung von wichtigen Baum- oder Gräserpollenallergenen, welche den Ordnungen *Fagales*, *Scrophulariales*, *Coniferales* und *Poaceae* angehören, ermöglicht eine geografische Einordnung (Mothes et al., 2004). In Nord- und Mitteleuropa sowie in Nordwest-Afrika, Ostasien und auf dem amerikanischen Kontinent sind Bäume der Ordnung *Fagales* wie Birke, Erle, Hasel, Eiche oder Kastanie weit verbreitet, welche Hauptauslöser für Frühjahrsallergie sind (Hauser et al., 2011). Im Mittelmeerraum sowie in Südafrika, Australien und Amerika ist der Olivenbaum heimisch und spielt, zur Familie der *Oleaceae* gehörend, eine wichtige Rolle als Quelle von Pollenallergenen (Rodríguez et al., 2001). Kiefern, Zypressen und Zeder zählen zur Ordnung *Coniferales* und sind für allergische Reaktionen in Nord- und Südamerika, Australien, Neuseeland und im mediterranen Raum verantwortlich (Mothes et al., 2004). Neben den Baumpollenallergenen wird auch Pollen aus Gräsern, den *Poaceae*, welche ein Viertel aller allergenen Pollen ausmachen, eine allergologische Relevanz zugeschrieben (Radauer & Breiteneder, 2006).

Neben der taxonomischen Klassifizierung können Allergene auch hinsichtlich ihrer Zugehörigkeit zu Proteinfamilien eingeordnet werden. Die zahlreichen Informationen zum Namen und der Quelle eines Allergens sowie molekulare Eigenschaften wie Proteinsequenzen und Isoformen, biologische Funktionen, IgE-Epitope und klinische Daten sind in webbasierten Datenbanken wie Allergome (<http://www.allergome.org>) oder *Structural Database of Allergenic Proteins* (SDAP,



<http://fermi.utmb.edu/>) hinterlegt (Mari et al., 2006; Ivanciuc et al., 2003). Diese Fülle an Informationen zeigt, dass allergene Proteine gemeinsame Eigenschaften aufweisen und nach bestimmten Charakteristika klassifiziert werden können (Breiteneder & Radauer, 2004; Radauer & Breiteneder, 2007). Die AllFam-Datenbank (<http://www.meduniwien.ac.at/allfam/>) enthält 1042 Allergene, wobei eine direkte Zuordnung in die entsprechende Proteinfamilie erfolgt. Bisher können 959 Allergene 151 AllFam-Familien zugeordnet werden. Die Pfam-Datenbank (Pfam 32.0, <https://pfam.xfam.org/>) umfasst insgesamt 17929 Proteinfamilien, wobei sich Allergene nur einem Bruchteil von 1,3% aller Proteinfamilien mit definierten strukturellen und funktionellen Eigenschaften zuordnen lassen (Radauer et al., 2008).

Pflanzenallergene sind, taxonomisch gesehen, über zahlreiche Spezies verteilt. Ihre Zuordnung bezüglich ihrer molekularen Eigenschaften und Proteinstrukturen ist jedoch auf wenige Proteinfamilien beschränkt. So können 65% der Allergene pflanzlichen Ursprungs den Proteinfamilien der Prolamine, der Cupine, der Profiline sowie den Bet v 1-verwandten Proteinen zuordnet werden (Jenkins et al., 2005). Die dreidimensionale Struktur der Allergene, welche den verschiedenen Proteinfamilien angehören, unterscheidet sich hinsichtlich ihres Faltungsmusters (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Dreidimensionale Struktur von bekannten Vertretern aus den Proteinfamilien der Prolamine, Cupine, Profiline und Bet v 1-homologen Proteine**

(A) Das Prolamin Ara h 6 aus Erdnuss *Arachis hypogaea* (1W2Q); (B) Das Cupin Gly m 6 aus Sojabohnen *Glycine max* (1FXZ); (C) Das Profilin Bet v 2 der Europäischen Weißbirke *Betula verrucosa* (1CQA); (D) Das Bet v 1-homologe Allergen Pru av 1 aus Kirsche *Prunus avium* (1E09);  $\beta$ -Faltblattstrukturen sind in gelb dargestellt;  $\alpha$ -Helices sind in rot gekennzeichnet; Darstellungen aus Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org>)

Prolamine, wie das Erdnussallergen Ara h 6, bestehen aus rein  $\alpha$ -helikalen Strukturen (Abbildung 3A) (Lehmann et al., 2006), wohingegen Cupine, Profilin und Bet v 1-homologe Proteine aus  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblattstrukturen zusammengesetzt sind (Abbildung 3B,C,D) (Seutter von Loetzen et al., 2012; Neudecker et al., 2001; Fedorov et al., 1997; Dunwell et al., 2000). Die Proteinstruktur des Graspollenallergen Phl p 3 aus *Phleum pratense* besteht hingegen nur aus  $\beta$ -Faltblättern (Schweimer et al., 2008).

Für den Großteil der Allergene ist eine Vielzahl biologischer Rollen bekannt. Molekulare Funktionen, wie Peptidaseaktivität, die Bindung von Metallionen, Lipid- oder Aktinbindung aber auch die Mitwirkung an biologischen Prozessen oder zellulären Komponenten wurden beschrieben (Sinha et al., 2014; Radauer et al., 2008). Die biologische Funktion vieler Bet v 1-verwandter Allergene ist jedoch noch ungeklärt, sodass nur allgemein eine Rolle im Abwehrmechanismus der Pflanze gegenüber abiotischen und biotischen Stressfaktoren angenommen wird (Hoffmann-Sommergruber, 2000).

### 1.5 Bet v 1-homologe Nahrungsmittelallergene

Mit ihrem Abwehrsystem reagieren Pflanzen auf abiotische und biotische Stressfaktoren mit der Induktion von Effektoren, Rezeptoren, protektiven Molekülen und verschiedenen Signalkaskaden (Jain & Kumar, 2015). Im Prozess der pflanzlichen Abwehr werden häufig Pathogenese-assoziierte Proteine induziert. PR-Proteine stellen eine wichtige Quelle von Allergenen pflanzlichen Ursprungs dar, welche in der Lage sind, IgE-vermittelte Immunantworten auszulösen (Hoffmann-Sommergruber, 2000). Basierend auf der Aminosäuresequenz, ihren biologischen Eigenschaften in der Pflanze sowie den serologischen Aktivitäten können PR-Proteine in 17 Familien unterteilt werden (Agarwal & Agarwal, 2014). Die Induktion von *pr*-Genen wird durch unterschiedliche Faktoren hervorgerufen. Pathogenbefall durch Viren, Bakterien oder Pilze, Verwundung pflanzlicher Organe oder die Anwendung von Chemikalien ruft die Synthese von PR-Proteinen hervor (Breiteneder & Ebner, 2000). Weiterhin haben sich ändernde Umweltfaktoren wie Hitze oder Kälte, Feuchtigkeit oder Trockenheit sowie die Bodenbeschaffenheit einen Einfluss (Ebrahim et al., 2011). PR-Proteine können jedoch auch in einigen Organen oder während bestimmter Entwicklungsstadien konstitutiv exprimiert werden (Bai et al., 2014; Agarwal & Agarwal, 2014). Die Funktionen von PR-Proteinen in der Pflanze sind vielseitig und reichen von antifungal (Hejgaard et al., 1991), antibakteriell, antiviral über insektizid bis hin zu nematizid (Edreva, 2005).

Die Familie der PR-10 Proteine, auch als Bet v 1-Homologe bezeichnet, ist im Pflanzenreich weit verbreitet, was eine wichtige physiologische Funktion vermuten lässt (Fernandes et al., 2013). Durch diverse Stresssituationen wird die Expression spezieller Gene induziert, sodass eine mögliche Funktion in der pflanzlichen Abwehr angenommen wird, obwohl die genaue biologische Funktion unklar bleibt. Bet v 1-verwandte Vertreter, welche diverse Pollen- und Nahrungsmittelallergene umfassen, sind besonders zahlreich in den Pflanzenfamilien *Rosaceae*, *Fabaceae*, *Fagales* und *Apiaceae* vertreten und kommen in Äpfeln, Erdbeeren, Kirschen, Aprikosen oder Pfirsichen sowie in Erdnüssen, Haselnüssen oder Soja sowie in Sellerie und Karotten vor (Hauser et al., 2008). Tabelle 1 gibt einen Überblick der bisher identifizierten Allergene der Bet v 1-Familie. Durch die Homologie zum

Hauptbirkenpollenallergen Bet v 1 leiden Birkenpollenallergiker deshalb oft auch an Pollen-assoziierten Lebensmittelallergien (Kreuzallergie) (Erdmann et al., 2005).

**Tabelle 1: Allergene der Bet v 1-Proteinfamilie**

Allfam-Datenbank AF069; Stand: Oktober 2018 (www.meduniwien.ac.at/allfam)

Allergen	Quelle	Art der Exposition	Aminosäuren	Identität zu Bet v 1.0101 [%] <sup>1</sup>	Uniprot	Anzahl Isoformen <sup>2</sup>
<b>Act c 8</b>	Kiwi Gold ( <i>Actinidia chinensis</i> )	Nahrung	159	49,4	D1YSM4	1
<b>Act d 11</b>	Kiwi Grün ( <i>Actinidia deliciosa</i> )	Nahrung	150	17,4	P85524	1
<b>Act d 8</b>	Kiwi ( <i>Actinidia deliciosa</i> )	Nahrung	157	49,4	D1YSM5	1
<b>Aln g 1</b>	Schwarzerle ( <i>Alnus glutinosa</i> )	Inhalation	160	81,2	P38948	1
<b>Api g 1</b>	Sellerie ( <i>Apium graveolens</i> )	Nahrung	154	40	P49372	2
<b>Ara h 8</b>	Erdnuss ( <i>Arachis hypogaea</i> )	Nahrung	157	46,2	Q6VT83	2
<b>Bet pl PR-10</b>	Japanische Weißbirke ( <i>Betula platphylla</i> )	Inhalation	-	-	-	-
<b>Bet v 1</b>	Hängebirke ( <i>Betula verrucosa</i> )	Inhalation	160	100	P15494	27
<b>Car b 1</b>	Hainbuche ( <i>Carpinus betulus</i> )	Inhalation	160	73,1	P38949	16
<b>Cas s 1</b>	Edelkastanie ( <i>Castanea sativa</i> )	Inhalation	159	58,8	B7TWE3	1
<b>Cor a 1</b>	Gemeine Hasel ( <i>Corylus avellana</i> )	Inhalation, Nahrung	160	72,5	Q08407	10
<b>Dau c 1</b>	Karotte ( <i>Daucus carota</i> )	Nahrung	154	38,9	O04298	7
<b>Fag s 1</b>	Rotbuche ( <i>Fagus sylvatica</i> )	Inhalation	160	65,6	B7TWE6	1
<b>Fra a 1</b>	Erdbeere ( <i>Fragaria × ananassa</i> )	Nahrung	160	53,8	Q3T923	2
<b>Gly m 4</b>	Sojabohne ( <i>Glycine max</i> )	Nahrung	158	46,2	P26987	1
<b>Jug r 5</b>	Echte Walnuss ( <i>Juglans regia</i> )	Nahrung	-	-	-	-
<b>Mal d 1</b>	Kulturapfel ( <i>Malus domestica</i> )	Nahrung	159	55	P43211	24
<b>Mor a PR-10</b>	Weiß Maulbeere ( <i>Morus alba</i> )	Nahrung	-	-	-	-
<b>Mor b PR-10</b>	Japanische Maulbeere ( <i>Morus bombycis</i> )	Nahrung	-	-	-	-
<b>Ost c 1</b>	Europäische Hopfenbuche ( <i>Ostrya carpinifolia</i> )	Inhalation	160	74,4	E2GL17	1
<b>Pru ar 1</b>	Aprikose ( <i>Prunus armeniaca</i> )	Nahrung	160	60	O50001	1
<b>Pru av 1</b>	Süßkirsche ( <i>Prunus avium</i> )	Nahrung	160	59,4	O24248	4
<b>Pru p 1</b>	Pfirsich ( <i>Prunus persica</i> )	Nahrung	160	59,4	Q2I6V8	3
<b>Pyr c 1</b>	Birne ( <i>Pyrus communis</i> )	Nahrung	159	56,3	O65200	1
<b>Que a 1</b>	Amerikanische Weiß-Eiche ( <i>Quercus alba</i> )	Inhalation	159	58,1	B6RQS1	4
<b>Rub i 1</b>	Himbeere ( <i>Rubus idaeus</i> )	Nahrung	Fragment	-	Q0Z8U9	1
<b>Sola 14</b>	Tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	Nahrung	160	44,4	K4CWC5	2
<b>Vig r 1</b>	Mungbohne ( <i>Vigna radiata</i> )	Nahrung	155	42,5	Q2VU97	1
<b>Vig r 6</b>	Mungbohne ( <i>Vigna radiata</i> )	Nahrung	155	25,6	Q9ZWP8	1

<sup>1</sup> Proteinsequenzalignment (<https://www.uniprot.org/align>)

<sup>2</sup> Bekannte Isoformen, welche auf cDNA-Ebene nachgewiesen wurden ([www.allergen.org](http://www.allergen.org))

PR-10 Proteine werden von multiplen Genen kodiert, die durch Duplikation und Rekombination während der Evolution entstanden sind (Schenk et al., 2009). Sequenzanalysen zeigten, dass das aus zwei Exons bestehende *pr-10* Gen von einem Intron an Basenpaarposition 76-359 unterbrochen wird. Der offene Leserahmen umfasst 465 bis 480 Basenpaare (Wen et al., 1997). In der Pflanze treten daher komplexe Gemische multipler molekularer Formen eines Allergens auf. Isoallergene oder Isoformen

einer Spezies weisen zudem IgE-Kreuzreaktivitäten auf und müssen Sequenzidentität von mehr als 67% besitzen (Chapman et al., 2007). Für zahlreiche PR-10 Proteine wie Cor a 1, Bet v 1 oder Mal d 1 sind verschiedene Isoallergene bekannt (Schenk et al., 1994; Swoboda et al., 1995; Son et al., 1999).

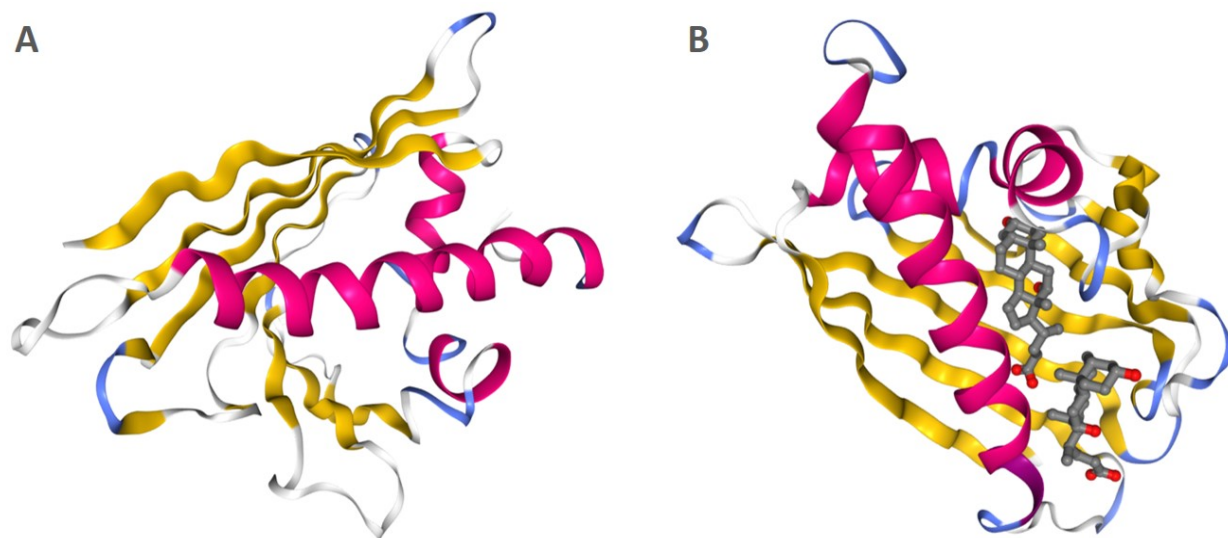
Vertreter der PR-10 Familie bestehen somit aus 153-160 Aminosäuren und haben ein Molekulargewicht von etwa 17 kDa und einem im sauren liegenden isoelektrischen Punkt (Seutter von Loetzen et al., 2012). Durch Aufklärung der dreidimensionalen Struktur mittels Röntgenkristallografie und kernmagnetischer Resonanz- (*nuclear magnetic resonance*, NMR) Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass die Proteine der Bet v 1-Familie aus einer siebensträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblattstruktur mit zwei kurzen V-förmigen  $\alpha$ -Helices und einer langen C-terminalen  $\alpha$ -Helix bestehen (Abbildung 3D) (Fernandes et al., 2013). Ein konserviertes Strukturelement der intrazellulär vorkommenden Proteine ist die glycinreiche P-Schleife mit dem Sequenzmotiv GXGGXGXXK an den Aminosäurepositionen 47-55 (Jain & Kumar, 2015). Auch bei ATP- und GTP-bindenden Proteinen wurde dieses Motiv nachgewiesen (Saraste et al., 1990). Die Sekundärstrukturelemente von PR-10 Proteinen formen einen hydrophoben Hohlraum, der eine wichtige physiologische Funktion besitzen könnte, wie beispielsweise die Bindung hydrophober Liganden (Neudecker et al., 2001).

### 1.5.1 Bet v 1 aus *Betula verrucosa*

Baumpollenallergien werden vor allem von Bäumen der Ordnungen *Fagales*, *Lamiales*, *Pinales* und *Proteales* hervorgerufen und stellen für den Großteil der Bevölkerung ein enormes Gesundheitsproblem dar (Asam et al., 2015). Vor allem die durch die Luft verbreiteten Pollen der Europäischen Weißbirke *Betula verrucosa* (*B. verrucosa*) stellen eine Hauptquelle pflanzlicher Allergen dar. Bislang wurden fünf Allergene aus unterschiedlichen Proteinklassen identifiziert: Bet v 1, Bet v 2, Bet v 4, Bet v 6 und Bet v 7 (Spiric et al., 2015). Das Hauptbirkenpollenallergen Bet v 1 gilt als Hauptauslöser für Typ I Allergien und betrifft weltweit rund 100 Millionen Patienten, hauptsächlich in Nord- und Zentraleuropa sowie in Nordamerika (Gieras et al., 2011). 1983 wurde dieses Allergen erstmals isoliert und immunologisch analysiert (Ipsen & Lowenstein, 1983). Bezogen auf den Gesamtproteinanteil wird der Anteil an Bet v 1 in Pollen auf über 20% geschätzt (Schenk et al., 2009). Einige Jahre später, 1989, wurde der kodierende Bereich identifiziert und als eines der ersten für ein Allergen kodierenden Gene kloniert (Breiteneder et al., 1989). Im Jahr 1996 erfolgte die Aufklärung der dreidimensionalen Proteinstruktur (Gajhede et al., 1996). Mit einem Molekulargewicht von 17,5 kDa besteht Bet v 1 aus einem siebensträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt, welches sich um die 25 Aminosäure-lange C-terminale  $\alpha$ -Helix windet (Abbildung 4A).

Für Bet v 1 existieren 18 Isoallergene und Varianten, die auf der Nukleinsäure- und Proteinebene jedoch stark voneinander abweichen (Swoboda et al., 1995; Spiric et al., 2015). Der Begriff Isoallergen ist mit einer Sequenzidentität von über 67%, der Begriff Variante mit einer Sequenzidentität von über 90% definiert (Radauer et al., 2014). Trotz einer sehr ähnlichen Proteinkonformation kann sich die IgE-Bindungsaktivität und Allergenität von Bet v 1-Isoformen unterscheiden, sodass hyperallergene sowie hypoallergene Formen existieren (Ferreira et al., 1996; Kahlert et al., 2008; Wagner et al., 2008). Die

Vernetzung von zwei membrangebundenen IgE-Antikörpern auf der Oberfläche von B-Lymphozyten mit den entsprechenden Antigenen stellt ein wichtiges Ereignis bei der Typ I-Allergie dar, wobei die Erkennung von zwei Epitopen ermöglicht werden muss (Schöll et al., 2005). Bei kleineren Allergenen, wie Bet v 1, könnte die gleichzeitige Erkennung und Bindung von zwei IgE Molekülen an ein monomeres Protein eingeschränkt werden, wobei für rekombinante Bet v 1-Präparationen auch Dimere sowie Tetramere eine Quervernetzung von IgE auslösen können. Oligomere wurde auch für Phl p 7 (Verdino et al., 2002), Equ c 1 (Lascombe et al., 2000) oder Ara h 1 (Maleki et al., 2000b) gefunden. Die Stabilisierung von Bet v 1-Dimeren erfolgt über Cysteinbrückenbindungen (Kofler et al., 2014).



**Abbildung 4: Proteinstruktur des Hauptbirkenpollenallergens Bet v 1**

(A) Schematische Darstellung der dreidimensionalen Proteinstruktur (1BV1); (B) Bindung von zwei Deoxycholatmolekülen im hydrophoben Hohlraum (1FM1);  $\beta$ -Faltblattstrukturen sind in gelb dargestellt;  $\alpha$ -Helices sind in rot gekennzeichnet; Ligand ist in grau dargestellt; Darstellung aus Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org>)

Trotz zahlreicher Untersuchungen zur Aufklärung der physiologischen Funktion von PR-10 Proteinen ist diese bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt (Fernandes et al., 2013). Für einige Bet v 1-homologe Proteine aus der gelben Lupine, Pfeffer, Baumwolle oder Reis wurde Ribonukleaseaktivität nachgewiesen (Filipenko et al., 2013), welche auch für Bet v 1 in *in vitro*-Experimenten gezeigt wurde (Bufer et al., 1996). Strukturell lässt sich diese Funktion mit dem Motif der P-Schleife erklären, welches auch in Nukleotidbindepoteinen vorkommt (Bantignies et al., 2000). Die Ausbildung eines hydrophoben Hohlraumes sowie die Ähnlichkeit zum humanen MLN64 Cholesterintransporter legt eine weitere Funktion von PR-10 Proteinen als Transporter nahe (Fernandes et al., 2013). Bindungsstudien zeigten, dass Bet v 1 mit zahlreichen physiologischen Liganden aus den Klassen der Phytosteroide, Fettsäuren oder Cytokinine Interaktionen eingehen kann (Mogensen et al., 2002). Die hypoallergene Isoform Bet v 1.0107 kann zwei Moleküle Deoxycholat im Y-förmigen Hohlraum binden (Abbildung 4B) (Marković-Housley et al., 2003). Durch die strukturelle Ähnlichkeit von Deoxycholat zu den ubiquitär vorkommenden Phytohormonen der Brassinosteroide könnte eine biologische Funktion als Hormontransporter angenommen werden. Auch glykosylierte Flavonoide, wie Quercetin-3-O-sophorosid, können an Bet v 1 binden, wobei die Erkennung des Liganden isoformspezifisch ist (Seutter von Loetzen

et al., 2015; Seutter von Loetzen et al., 2014). Trotz der Vielzahl an Erkenntnissen über mögliche Funktionen konnte den PR-10 Proteinen bislang keine bestimmte physiologische Rolle zugeordnet werden.

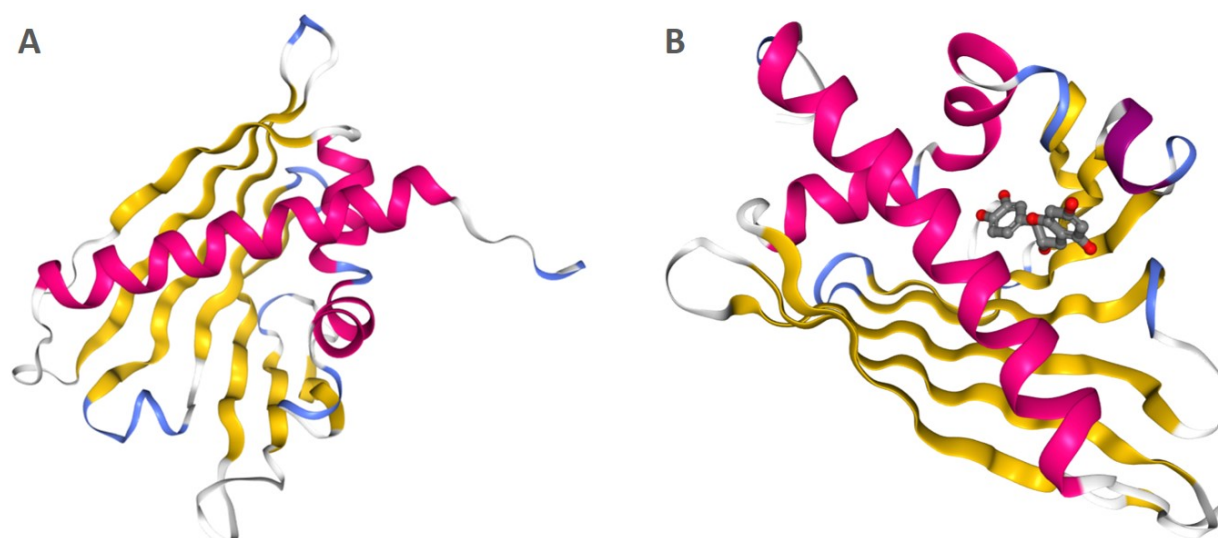
Zwischen 50-90% der gegen Bet v 1-sensibilisierten Patienten zeigen eine IgE-vermittelte Kreuzreaktivität auf Bet v 1-homologe Lebensmittelallergene (Vieths et al., 2002). Häufig äußert sich diese Reaktion mit mildereren Symptomen des OAS, welche auf die Mundhöhle beschränkt sind (Zuidmeer et al., 2006). Der Grund für Kreuzallergien liegt in der Eigenschaft von allergen-spezifischen IgE-Molekülen, auch strukturähnliche Allergene anderen Ursprungs zu erkennen und zu binden (Ebner et al., 1995). Das kreuzreagierende Allergen ist zum Allergen, welches die primäre Sensibilisierung hervorgerufen hat, homolog und weist auf dessen Moleküloberfläche ähnliche konformationelle Epitope mit Übereinstimmung von lokalen Sequenzmotiven sowie dreidimensionalen Proteinstrukturen zur IgE-Bindung auf (McClain, 2017). Bet v 1 und das Hauptallergen der Kirsche Pru av 1 weisen trotz ähnlicher 3D-Struktur nur eine Aminosäuresequenzidentität von 59% auf (Neudecker et al., 2001) und ungeachtet einer geringen Sequenzidentität von Bet v 1 zum Hauptsellerieallergen Api g 1 von nur 40% ist die dreidimensionale Struktur sehr ähnlich (Schirmer et al., 2005). Kreuzallergien können auch zwischen phylogenetisch entfernten Spezies wie Birke und Kiwi auftreten (Gall et al., 1994). Auch bei Allergenen anderer Proteinfamilien treten Kreuzallergien auf, wie zwischen dem Profilin Bet v 2 und homologen Proteinen aus diversen Obst- und Gemüsesorten (Wensing et al., 2002).

### 1.5.2 Erdbeerallergen Fra a 1

Die Erdbeere (*Fragaria*, *F.*) zählt zur Pflanzenfamilie der *Rosaceae*, wozu auch Brombeeren, Äpfel, Birnen, Pflaumen, Kirschen, Aprikose und Mandeln zählen (Rodriguez et al., 2000). Die Gattung umfasst zahlreiche Arten, wie die Gartenerdbeere *F. × ananassa*, die Walderdbeere *F. vesca* oder die Chileerdbeere *F. chiloensis*, wobei die genetische Diversität der Arten von diploid bis decaploid reicht (Hummer et al., 2011). Die Farbe reifer Früchte von *F. × ananassa* schwankt von hell-orangerot bis dunkel purpurrot, wobei auch einige Sorten von *F. vesca* gelbe oder weiße Früchte tragen (Deng & Davis, 2001). Wilde Sorten haben zudem ein intensiveres Aroma als kultivierte Sorten, das mit dem unterschiedlichen Gehalt aromatischer Verbindungen begründet werden kann (Ulrich et al., 2007). Aufgrund der kleinen Fruchtgröße, verglichen zu *F. × ananassa*, sind Sorten der Gattung *F. vesca* kaum von kommerzieller Bedeutung (Ulrich & Olbricht, 2013).

Erdbeeren sind eine wichtige Quelle von essentiellen Nährstoffen, Mineralien und sekundären Pflanzenstoffen (Afrin et al., 2016; Tulipani et al., 2011). Laut der Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation FAO ([www.fao.org](http://www.fao.org)) betrug die weltweite Produktion von Erdbeeren im Jahr 2016 über 9 Millionen Tonnen. Ihr gesundheitsfördernder Effekt liegt in der Verringerung des Risiko für Krebs und kardiovaskuläre Erkrankungen (Seeram et al., 2006; Basu et al., 2010). Dennoch enthalten diese Erdbeerfrüchte auch allergene Proteine, wie Fra a 4 aus der Familie der Profiline, das Lipidtransferprotein (LTP) Fra a 3 und das PR-10 Protein Fra a 1 (Zuidmeer et al., 2006; Franz-Oberdorf et al., 2016). In Nordeuropa berichten etwa 30% der Bevölkerung von einer Überempfindlichkeit

gegenüber Erdbeeren, wobei aber vor allem Birkenpollenallergiker allergische Reaktionen nach dem Verzehr von Erdbeeren zeigen (Eriksson et al., 2004). Das Vorhandensein eines Bet v 1-homologen Proteins in Erdbeeren wurde 2004 von Karlsson et al. nachgewiesen (Karlsson et al., 2004). Da PR-10 von multiplen Genen kodiert werden, wurden in mehreren Studien immer wieder neue *Fra a*-Gene aus *F. × ananassa* und *F. vesca* identifiziert (Musidłowska-Persson et al., 2007; Muñoz et al., 2010; Hyun & Kim, 2011; Franz-Oberdorf et al., 2016). Die bislang identifizierten 30 *Fra a*-Proteine werden von 39 Gensequenzen kodiert, wobei sich aus den abgeleiteten Aminosäuresequenzen ein phylogenetischer Baum mit vier Gruppen ergibt (Ishibashi et al., 2018). Das Expressionslevel der Gene unterscheidet sich zwischen den verschiedenen Organen der Erdbeerpflanze und ist auf Wachstumsphasen begrenzt, sodass die Lokalisation der *Fra a*-Isoformen unterschiedlich ist (Muñoz et al., 2010; Ishibashi et al., 2018). Weiterhin sind Unterschiede zwischen den Isoformen bezüglich ihrer Aktivierung von Basophilen festgestellt worden (Franz-Oberdorf et al., 2016). Basierend auf den Ergebnissen der quantitativen Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (*quantitative real-time polymerase chain reaction*, qPCR) wurde *Fra a* 1.02 als Hauptisoform identifiziert. Verglichen zu dieser Isoform weisen die anderen Proteine Sequenzidentitäten zwischen 74,5-97,5% auf, die Übereinstimmung zu Bet v 1 beträgt zwischen 54-59,6%. Durch Aufklärung der dreidimensionalen Proteinstruktur mittels NMR konnte die Zugehörigkeit zur Familie der PR-10 Proteine nachgewiesen und bestätigt werden (Abbildung 5A) (Seutter von Loetzen et al., 2012). Der Hohlraum mit einem Volumen von 2500 Å<sup>3</sup> ist, verglichen zu Bet v 1 oder Pru av 1 mit einem Volumen von 1600 Å<sup>3</sup>, deutlich größer (Neudecker et al., 2001).



**Abbildung 5: Proteinstruktur des Erdbeerallergens *Fra a* 1e**

(A) Schematische Darstellung der dreidimensionalen Proteinstruktur (2LPX); (B) Bindung von (+)-Catechin an die Isoform *Fra a* 1.03a im hydrophoben Hohlraum (C494);  $\beta$ -Faltblattstrukturen sind in gelb dargestellt;  $\alpha$ -Helices sind in rot gekennzeichnet; Ligand ist in grau dargestellt; Darstellung aus Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org>)

Proteomanalysen von roten und weißen Erdbeeren zeigten, dass in Früchten mit farblosem Phänotyp sowohl Enzyme des Flavonoidbiosyntheseweges wie Chalconsynthase, Chalconisomerase und Flavanone-3-Hydroxylase als auch *Fra a* 1 herunterreguliert waren und das Enzym Thioredoxin zum Schutz vor oxidativem Stress hochreguliert war (Alm et al., 2007). Für das Bet v 1-homologe *Fra a* 1-

Allergen wurde deshalb angenommen, dass es eine regulatorische Funktion während der Biosynthese des roten Erdbeerfarbstoffes Pelargonidin-3-*O*-glukosid einnimmt (Hjernø et al., 2006; Muñoz et al., 2010). *In vitro* konnte die Bindung von natürlichen Flavonoiden an Fra a-Proteine gezeigt werden (Casañal et al., 2013). Allerdings zeigten die Isoformen verschiedene Spezifitäten und Affinitäten gegenüber ihren Liganden. Die Isoform Fra a 1.03a, von Casañal et al. als Fra a 3 bezeichnet, bindet (+)-Catechin (Abbildung 5B). Durch die Bindung von Metaboliten der Flavonoidbiosynthese könnte das PR-10 Protein Fra a 1 aus Erdbeeren eine Rolle im Sekundärmetabolismus spielen. Weißen Erdbeeren wird die Eigenschaft zugeschrieben von Allergikern besser toleriert zu werden (Hjernø et al., 2006). Basophile Aktivierungstests mit Proteinextrakten von roten und weißen Erdbeeren zeigten jedoch, dass farblose Früchte nicht grundsätzlich hypoallergen sind (Franz-Oberdorf et al., 2017).

### 1.5.3 Tomatenallergen Sola 1 4

Die Familie der Nachtschattengewächse *Solanaceae* umfasst wichtige Kulturpflanzen wie Kartoffeln, Tomaten, Paprika, Gurken und Kürbis (Logemann & Giebelmann, 2016). Tomaten (*Solanum lycopersicum*, *S. lycopersium*) zählen weltweit zu den am häufigsten angebauten und beliebtesten Gemüsesorten (Asero, 2013). Der Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation FAO ([www.fao.org](http://www.fao.org)) zufolge wurden im Jahr 2016 weltweit über 177 Millionen Tonnen Tomaten geerntet. Die Vielfalt und Diversität an Tomaten ist enorm. Das Sortenregister umfasst über 3800 unterschiedliche Sorten, welche nach Farbe, Form, Wuchsform und Verwendung in Gruppen unterteilt werden können ([www.tomatenwelt.de](http://www.tomatenwelt.de)). Die Fruchtfarbe variiert von rot über pink bis hin zu orange und gelb. Die Form kann rund, herzförmig oder länglich sein, wobei die Früchte einer spanischen Landrasse sogar ein Gewicht von bis zu 1 kg erreichen können (Cebolla-Cornejo et al., 2013). Allein in Europa werden mehr als 500 verschiedene Sorten angebaut (Bredemeijer et al., 2002; Bauchet & Causse, 2012).

Trotz ihres gesundheitsfördernden Effektes durch den hohen Gehalt an Carotinoiden wie dem Lycopin, welche das Krebsrisiko senken können, lösen die Früchte jedoch auch in vielen Fällen allergische Reaktionen aus (Giovannucci, 1999). Die Häufigkeit von Tomatenallergien reicht von etwa 1,5% der Bevölkerung Nordeuropas und bis zu 16% in Italien, wovon meistens Birkenpollenallergiker betroffen sind (Foetisch et al., 2001). Es bestehen geografische Unterschiede in der Sensibilisierung von Patienten, welches zum einen mit dem regionalen Vorkommen von kreuzreagierenden Allergenen aber auch mit Ernährungsgewohnheiten begründet werden kann (Larramendi et al., 2008; Dölle et al., 2011a). Die Symptome einer immunologischen Reaktion nach dem Verzehr von Tomaten können die Haut betreffen aber auch zum OAS, Rhinitis oder Bauchschmerzen führen (Schwarz et al., 2011). Die Isolierung von Allergenen aus Tomaten begann bereits 1966 (Bleumink et al., 1966). In den folgenden Jahrzehnten wurden unterschiedliche allergene Proteine in Tomaten identifiziert und charakterisiert. In der Allfam-Datenbank sind mittlerweile sieben Tomatenallergene aus verschiedenen Proteinfamilien gelistet (Tabelle 2).



**Tabelle 2: Bekannte Allergene aus *Solanum lycopersicum***  
 Allfam-Datenbank Stand: Oktober 2018 (www.meduniwien.ac.at/allfam)

Allergen	Proteinfamilie	Aminosäuren	Molekulargewicht [kDa]	Uniprot	Anzahl Isoformen
Sola 1 1	Profilin	131	14,3	Q93YG7	1
Sola 1 2	Glykosidhydrolase	553	61,3	Q547Q0	2
Sola 1 3	Prolamin	114	11,5	P93224	1
Sola 1 4	Bet v 1-homologe	160	17,9	K4CWC5	2
Sola 1 5	Cyclophilin	171	17,9	P21568	1
Sola 1 6	Prolamin	94	9,8	K4BBD9	1
Sola 1 7	Prolamin				

Im Jahr 2015 wurde das Vorkommen eines PR-10 Proteins in Tomaten durch Klonierung zweier Gene, welche für die Isoformen eines Bet v 1-homologen Allergens kodieren, bestätigt (Wangorsch et al., 2015). Sola 1 4.01 und Sola 1 4.02 weisen zueinander eine Sequenzidentität von 81% auf, zu Bet v 1 jeweils 44% bzw. 42,5%. Wie auch bereits für Isoformen von Bet v 1 beschrieben (Kofler et al., 2012; Schenk et al., 2006), zeigte Sola 1 4.02 eine stärkere immunologische Aktivität, sodass Unterschiede in der IgE-Reaktivität zwischen den Isoformen angenommen werden können. Untersuchungen ergaben, dass das allergene Potential von Tomaten von der Sorte abhängig ist (Dölle et al., 2011b; Dölle et al., 2011a).

Durch die Vielzahl an verfügbaren Tomatensorten könnte es möglich sein, Genotypen zu identifizieren, in denen der Gehalt an Sola 1 4 ausreichend niedrig ist, sodass diese für die Züchtung neuer Sorten ein interessanter Ansatzpunkt sein könnten. So wäre es denkbar, dass Patienten mit einer Birkenpollenallergie ausgewählte Tomatensorten tolerieren können.

#### 1.5.4 Pflaumenallergen Pru d 1

Die Gattung *Prunus* umfasst zahlreiche Obstarten aus der Familie *Rosaceae*, darunter Kirschen (*Prunus avium*), Pfirsiche (*Prunus persica*), Aprikosen (*Prunus armeniaca*) sowie Pflaumen (*Prunus domestica*, *P. domestica*) (Pastorello et al., 1994). Deutschland, die USA, Rumänien, Bulgarien sowie Serbien sind die Länder mit der höchsten Produktion der Kultur- oder Europäischen Pflaume (Neumüller, 2011). Unzählige Sorten der hexaploiden Frucht mit großer Diversität in Größe, Form, Geschmack und Farbe, welche von grün über gelb bis hin zu rot oder violett reicht, sind bekannt (Treutter et al., 2012). Pflaumen sind eine wichtige Quelle von Polyphenolen (Mubarak et al., 2012a). Der Gehalt an phenolischen Substanzen bestimmt nicht nur den Geschmack, sondern auch die Farbe der Frucht (Slimestad et al., 2009). Durch ihre antifungale Wirkung dienen Phenole auch als Schutzmechanismus für die Pflanze. Der gesundheitsfördernde Effekt von Obst ist auf den Gehalt an Phenolen zurückzuführen, welche antikanzerogene, antimikrobielle, antiallergische, antimutagene, entzündungshemmende und antioxidative Wirkung haben (Nunes et al., 2008).

Birkenpollenallergiker zeigen eine hohe Prävalenz des OAS beim Verzehr von Obst und Gemüse, darunter auch Pflaumen (Ortolani et al., 1989; Pastorello et al., 1994). Etwa 21% der Bevölkerung Nordeuropas berichten von einer Überempfindlichkeit gegenüber Pflaumen (Eriksson et al., 2004). In

Japan zeigen sogar 40% der Patienten mit Birkenpollenallergie OAS beim Verzehr von Pflaumen (Gotoda et al., 2001). Als Hauptallergen der Europäischen Pflaume *P. domestica* wurde das 9 kDa große Pru d 3, welches den LTP angehört und den PR-14 Proteinen zuzuordnen ist, identifiziert (Pastorello et al., 2001). Durch strukturell konservierte und kreuzreagierende IgE-Epitope kommt es häufig zu Reaktionen mit anderen Früchten aus der Familie der Rosengewächse, welche durch die Allergene Mal d 3 aus Apfel, Pru ar 3 aus Aprikose oder Pru p 3 aus Pfirsich hervorgerufen werden (Borges et al., 2008). Vor allem im mediterranen Raum kommt es zu schweren allergischen Symptomen verursacht durch LTP (Andersen et al., 2011). Das Vorkommen eines Bet v 1-homologen Allergens in Pflaumen wurde im Jahr 2009 durch Klonierung des *pr-10* Gen bestätigt (El-kereamy et al., 2009). Basierend auf der Aminosäuresequenz zeigt Pru d 1 die höchste Identität von über 97% zum Hauptallergen der Kirsche Pru av 1, die Identität zu Bet v 1 beträgt etwa 60%. Weiterhin wurde das Gen des PR-5 Proteins, ein Allergen aus der Familie der Thaumatin-ähnlichen Protein in der Pflaume charakterisiert (El-kereamy et al., 2011).

### 1.6 Detektion und Kennzeichnung von Lebensmittelallergenen

In den vergangenen Jahren wurde ein deutlicher Anstieg in der Häufigkeit von Nahrungsmittelallergien, besonders unter Kindern, verzeichnet (Sicherer & Sampson, 2014). Durch die Sensibilisierung der Bevölkerung, sich über Lebensmittelallergene zu informieren, hat auch das Thema der Allergen Kennzeichnung an Bedeutung zugenommen. Die Liste der in tierischen und pflanzlichen Lebensmitteln identifizierten allergieauslösenden Proteine ist in den vergangenen Jahren auf 880 angestiegen (Pomés et al., 2018). Nur durch eine allergenfreie Ernährung lassen sich die Symptome einer Nahrungsmittelallergie, welche oft auch fatale gesundheitliche Folgen haben kann, vermeiden (Sicherer & Sampson, 2014). Versteckte Allergene in Lebensmitteln, welche bereits in niedrigsten Mengen vorhanden sind, können dennoch zum Teil schwerwiegende Symptome bei Allergikern hervorrufen (van Hengel, 2007). Bereits 100 µg des Erdnussallergens lösen in sensibilisierten Patienten milde Symptome aus, 200 µg können schwere allergische Reaktionen hervorrufen (Stephan & Vieths, 2004). Als Schwellenwert wird die geringste Menge einer Substanz bezeichnet, die beim sensibilisierten Patienten eine allergische Reaktion mit Symptomen wie Reizung der Schleimhäute oder Atemwege, Hautirritationen oder Beschwerden des Magen-Darm-Traktes hervorruft, wobei dies immer vom Betroffenen abhängig ist (Richter et al., 2009; Vieths et al., 2006). Eine Festlegung von generellen Schwellenwerten ist daher schwierig, sodass Höchstwerte im Bereich von 0,01-0,001% in Abhängigkeit vom jeweiligen Allergen in einem Lebensmittel festgelegt wurden (Vieths et al., 2006). Für die Lebensmittelsicherheit sind Verbraucher deshalb auf eine exakte Allergen Kennzeichnung durch den Hersteller angewiesen. Seit 2011 ist in allen europäischen Mitgliedsstaaten die Kennzeichnung folgender allergieauslösenden Substanzen auf Verpackungen und loser Ware laut der Europäischen Lebensmittel- Informationsverordnung verpflichtend: glutenhaltige Getreide (Weizen, Roggen, Gerste, Hafer), Ei, Milch, Erdnüsse, Baumnüsse (z.B. Mandeln, Haselnüsse, Walnüsse), Krustentiere, Fisch, Soja, Sesamsamen, Schwefeldioxid und Sulfite, Sellerie, Senf, Weichtiere (z.B. Schnecken oder Muscheln) und Lupine (Europäisches Parlament und Rat der Europäischen Union, 2011).

Um versteckte Allergene zu detektieren und zu quantifizieren, ist die Entwicklung von sensitiven und spezifischen analytischen Methoden notwendig. Als Nachweismethode dienen häufig immunologische Tests, welche das Allergen selbst detektieren, oder Desoxyribonukleinsäure- (*deoxyribonucleic acid* DNA) basierte Techniken zum Nachweis von Nukleinsäurefragmenten (Poms et al., 2004). Bei Protein-basierten Methoden, welche Radio-Allergo-Sorbent-Test (RAST), Enzym-Allergo-Sorbent-Test (EAST), Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) mit Immunoblotting und ELISA umfassen, wird die einzigartige Eigenschaft von Antikörpern genutzt, spezifisch ein Allergen in einem heterologen Gemisch zu erkennen und zu binden. DNA-basierte Methoden beruhen auf der Amplifikation und Detektion spezifischer DNA-Sequenzen oder kodierender Regionen durch Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR). Der Nachweis von DNA ist jedoch nur eine indirekte Methode, da die Moleküle, welche die allergische Reaktion auslösen, Proteine sind. Zum Nachweis des Haselnussallergens Cor a 1 wird PCR angewandt, wobei die Detektionsgrenze bei 0,001% (10 ppm) liegt (Holzhauser et al., 2000). Auch die qPCR kann zur DNA-basierten Detektion des Allergens Ara h 2 aus Erdnuss dienen (Stephan & Vieths, 2004). Eine Kombination aus Molekularbiologie und serologischen Methoden stellt der PCR-ELISA dar. Dabei wird ein PCR-Produkt mittels ELISA-Technik durch sequenzspezifische Hybridisierung detektiert (Holzhauser et al., 2002). Der Nachweis von Allergenen mittels Massenspektrometrie basiert auf der Analyse der Aminosäuresequenz (Röder & Weber, 2016). 2004 wurde erstmals das Haupterdnussallergen Ara h 1 mittels Massenspektrometrie nachgewiesen (Shefcheck & Musser, 2004). Auf Grund des Zeitaufwandes sowie der hohen Gerätekosten findet diese Technik derzeit nur im Bereich der Forschung und Entwicklung Anwendung.

## 1.7 Lebensmittel aus konventionellem und ökologischem Anbau

Lebensmittel, welche aus ökologischem Anbau oder ökologischer Tierhaltung stammen, sind in Deutschland zu einem vielfach nachgefragten Produkt geworden, sodass die Nachfrage an Bio-Produkten in den vergangenen Jahren stetig gestiegen ist und mittlerweile mehr Bio-Lebensmittel konsumiert als produziert werden (Gerber, 2012). Allein in Deutschland wurden im Jahr 2017 mit Bio-Lebensmitteln und Getränken rund 10 Milliarden Euro umgesetzt (Moewius et al., 2018). Entscheidende Kriterien für den Verbraucher sind die regionale Herkunft mit transparenten Produktionsprozessen, eine verbesserte Produktqualität ökologischer Produkte, welche zu einer gesünderen Ernährung beiträgt sowie das Verantwortungsbewusstsein gegenüber den natürlichen Ressourcen und dem Umweltschutz (Rimbach et al., 2015). Entsprechend den Verordnungen der Europäischen Union sowie bundesweiten Richtlinien dient ökologischer Landbau vordergründig der Nachhaltigkeit und fördert zudem auch den Boden-, Gewässer-, Arten- sowie Tierschutz (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL), 2018).

Tabelle 3 stellt die konventionelle der ökologischen Pflanzenproduktion gegenüber und gibt eine Zusammenfassung der wichtigsten Unterschiede. Die Auswertung von 343 Studien belegte, dass sich die Qualität von Bio-Produkten gegenüber konventionell angebauten Lebensmitteln signifikant unterscheidet

(Barański et al., 2014). Bio-Lebensmittel zeichnen sich durch eine durchschnittlich niedrigere Schadstoffbelastung mit Pestiziden und einen niedrigeren Gehalt am giftigem Schwermetall Cadmium aus, was zum Teil mit den Rechtsvorschriften der ökologischen Landwirtschaft verbunden ist. Der Gehalt an Polyphenolen, wie Phenolsäuren, Anthocyanen, Flavonolen oder Flavonen, welchen eine gesundheitsfördernde Funktion zugeschrieben wird, war in ökologisch angebauten Obst und Gemüse höher. Durch längere Reifezeiten und abiotische Faktoren wie Temperatur, Wasserverfügbarkeit, Sonneneinstrahlung und eine geringere Stickstoffdüngung wird der Anteil sekundärer Pflanzenstoffe beeinflusst (Ramakrishna & Ravishankar, 2011). Weiterhin wird eine höhere Trockenmasse durch langsames Wachstum, ein erhöhter Gehalt an Vitamin C sowie anderen Mineralien verzeichnet (Heaton, 2001). Eine geringere Produktionseffizienz und die damit einhergehenden höheren Preise der Produkte für den Verbraucher sind Nachteile ökologischer Landwirtschaft (Forman & Silverstein, 2012).

**Tabelle 3: Vergleich des konventionellen und ökologischen Landbaus**  
(Tauscher et al., 2003)

	Landbau	
	konventionell	ökologisch
<b>Anbau &amp; Fruchtfolge</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Anbau von Getreide im Wechsel mit Raps, Mais, Futterpflanzen, enge Fruchtfolge</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>vielseitige Fruchtfolge, hoher Leguminosenanteil</li> </ul>
<b>Bodenbearbeitung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>intensiv, einarbeiten von Ernterückständen und Gründüngung</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>schonend, Bodenruhe, höhere Aktivität von Bodenmikroorganismen</li> </ul>
<b>Biodiversität</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>gering</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>hoch</li> </ul>
<b>Kreisläufe</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>überbetrieblich</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>innerbetrieblich</li> </ul>
<b>Betriebsführung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>viehlose Betriebe</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Futteranbau zur Viehhaltung</li> </ul>
<b>Produktion</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>biologisch/chemisch-technologisch für maximalen Produktmenge</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>biologisch/ökologisch für hohe Qualität des Erzeugnisses</li> </ul>
<b>Düngung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Richtlinien entsprechend Dünge-Verordnung</li> <li>Einsatz von leicht-löslichem mineralischem Stickstoffdünger</li> <li>Einsatz von Wachstumsregulatoren</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Stickstoff-Fixierung durch Symbiose</li> <li>Einsatz von mineralischem Ergänzungsdünger</li> <li>Stickstoffmenge auf 170 kg N/ha begrenzt</li> <li>Verbot von Wachstumsregulatoren</li> </ul>
<b>Pflanzenschutz</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Richtlinien entsprechend Pflanzenschutzmittelgesetz</li> <li>Einsatz chemisch-synthetischer Pflanzenschutzmittel mit vorgeschriebenen Höchstmengen und Schwellenwerten</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>biologische Pflanzenschutzmittel, chemische Mittel auf Naturstoffbasis</li> <li>hohe Diversität, biologischer Pflanzenschutz und natürliche Unkrautregulierung für Systemstabilisierung</li> </ul>
<b>Ökologie</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Nutzung zur Verfügung stehender Ressourcen</li> <li>Anwendung gentechnischer Methoden</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Schonung nicht erneuerbarer Ressourcen</li> <li>kein Einsatz gentechnischer Methoden</li> </ul>

Doch wie wirkt sich konventioneller bzw. ökologischer Anbau auf den Allergengehalt in Obst und Gemüse aus? Einzelne Studien mit Äpfeln und Tomaten zeigten dazu verschiedene Ergebnisse. Matthes et al. belegte, dass Äpfel aus ökologischem Anbau überwiegend niedrigere Mal d 1-Allergengehalte als Produkte aus konventionellem Anbau aufweisen (Matthes & Schmitz-Eiberger, 2009). In der Analyse von Marzban et al. gab es jedoch keine Unterschiede im Allergengehalt bei Äpfeln aus unterschiedlichem Anbau (Marzban et al., 2005). Untersuchungen mit alten Landrasse-Tomaten und Pflanzen aus ökologischem Anbau zeigten deutlich weniger Hautreaktionen der alten Landrasse-Sorten (Dölle et al., 2011a; Dölle et al., 2011b). Andere Studien belegten wiederum, dass Tomaten aus ökologischem Anbau höhere Allergengehalte als konventionelle Produkte aufwiesen (Słowianek et al., 2016). Eine eindeutige

Aussage über den Einfluss der Anbaubedingungen auf den Allergengehalt lässt sich aus diesen Studien somit nicht ableiten.

## 1.8 Verarbeitung von Lebensmitteln und Auswirkungen auf den Allergengehalt

Die Schritte in der Lebensmittelverarbeitung können sowohl aus thermischen Prozessen durch Einwirkung trockener (Ofenröstung, Ölröstung, Infrarothitze, Einfrieren) oder feuchter Hitze (Backen, Kochen, Blanchieren, Dämpfen, Pasteurisieren) als auch nicht-thermischen Vorgängen ( $\gamma$ -Bestrahlung, Keimung, Mahlen, Fermentierung, Hochdruck-Verarbeitung, Ultraschall, Filtration) bestehen (Sathe et al., 2005). Zu den positiven Effekten der thermischen Behandlung von Lebensmitteln gehören zum einen die Inaktivierung von Krankheitserregern, natürlich vorkommender Toxine und anderer schädlicher Bestandteile, die verlängerte Haltbarkeit, eine verbesserte Verdaubarkeit und Bioverfügbarkeit von Nährstoffen sowie verbesserte Verträglichkeit, Geschmack, Geruch und Textur (van Boekel et al., 2010). Thermische Verarbeitung verbessert den Nährwert von Tomaten durch Erhöhung des Lycopingehaltes und der gesamten antioxidativen Aktivität (Dewanto et al., 2002). Jedoch können auch unerwünschte Effekte, wie der Verlust bestimmter Nährstoffe, die Bildung von toxischen Verbindungen (Acrylamid, Furan oder Acrolein) oder von Verbindungen mit negativen Auswirkungen auf die Textur, die Farbe oder die Geschmackswahrnehmung auftreten. Zudem können allergene Proteine in Lebensmitteln durch diese Prozesse derart beeinflusst werden, dass sich ihre Sekundär- und Tertiärstruktur verändert und somit konformationelle Epitope zerstört, maskiert oder freigelegt werden (Rahaman et al., 2016). Fermentation oder enzymatische Hydrolyse als biochemische Behandlungsmethoden betreffen die Primärsequenz und nehmen Einfluss auf lineare Epitope.

In Abhängigkeit von den biochemischen Eigenschaften des Proteins unterscheidet sich der Einfluss der Verarbeitungstechnik auf das jeweilige Allergen. Bet v 1-homologe Allergene der PR-10 Familie weisen sehr oft Instabilität gegenüber thermischer Behandlung und Enzymen des Verdauungstraktes auf (Vieths et al., 2002). Kreuzreagierende Allergene aus Obst und Gemüse, welches erhitzt oder gekocht wurde, lösen daher keine direkten Symptome aus, sodass verarbeitete Produkte von Patienten meist toleriert werden (Bohle et al., 2006). Die Thermostabilität der PR-10 Allergene verschiedener Spezies unterscheiden sich jedoch. Api g 1 aus Sellerie ist weitaus stabiler als Mal d 1, da auch nach über einer Stunde bei 100 °C die Allergenität gleich blieb (Ballmer-Weber et al., 2002). Die Proteinfaltung von rekombinantem Mal d 1 findet bereits ab einer Temperatur von 55 °C statt und ist zudem noch druckabhängig (Somkuti et al., 2011). Rekombinantes Pru av 1 aus Kirsche zeigt eine Schmelztemperatur von 66 °C, wobei sich das Protein nach Abkühlung in dieselbe Konformation zurückfalten kann (Gruber et al., 2004). Die An- oder Abwesenheit von Kohlenhydraten spielt für die Allergenität eine entscheidende Rolle. Dennoch konnte für das extrem labile Mal d 1 sowie für Api g 1 beim Erhitzen von Proteinextrakten nach 30 min ein verbleibendes IgE-Bindungspotential nachgewiesen werden (Vieths et al., 1998). Das Haselnussallergen Cor a 1 zeigt Hitzebeständigkeit bei 100 °C für 90 min, wobei steigende Temperaturen bis 185 °C die IgE-Bindungsaktivität deutlich verringern (Wigotzki et al., 2010). Die Röstung von Haselnüssen bei 140 °C senkt die Allergenität nach 20 min (Müller et al., 2000).

Bei den hitze- und proteasestabilen Allergenen der LTP wie Pru p 3, Mal d 3 oder Pru av 3 lösen thermische Verarbeitungsschritte keinen Effekt auf die Allergenität aus (Sánchez-Monge et al., 1999; Scheurer et al., 2004). Vor allem in Südeuropa kommt es zu LTP-vermittelten Allergien mit schwerwiegenden Symptomen, sodass auch erhitzte oder gekochte Produkte allergische Reaktionen verursachen (Mothes-Luksch et al., 2017). Pru p 3 enthält acht Cysteinreste und bildet vier stabilisierende Disulfidbrücken, welche zu einer hohen Stabilität gegenüber Hitze und enzymatischem Verdau beitragen (Toda et al., 2011). Maillard-Modifikationen des LTP Mal d 3 konservieren die IgE-Bindungskapazität trotz extremer Temperaturbehandlung (Sancho et al., 2005). Allerdings sind auch Studien bekannt, bei denen durch thermale Verarbeitung wie Rösten ein Anstieg der allergenen Eigenschaften der Erdnussallergene Ara h 1 und Ara h 2 hervorgerufen wird (Maleki et al., 2000a; Maleki et al., 2003). Weiterhin kann durch Bildung von stabilen Dimeren, Bindung von Liganden, posttranslationalen Proteinmodifikationen (Glykosylierung) oder Interaktionen mit Matrixkomponenten die Stabilität von Allergenen beeinflusst werden (Pekar et al., 2018).

## 2 Ziele der Arbeit

Da Lebensmittelallergien in den vergangenen Jahren zu einem weltweiten Gesundheitsproblem geworden sind, ist die Detektion und Quantifizierung von allergenen Proteinen in Nahrungsmitteln von großem Interesse. Vor allem verschiedene Obst- und Gemüsesorten lösen immer häufiger allergische Reaktionen im Zusammenhang mit Birkenpollenallergien aus. Welche Faktoren, genomischen, biotischen oder abiotischen Ursprungs, jedoch die Expression der Allergene der Familie der PR-10 Proteine beeinflussen, ist noch unklar.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Bestimmung des Gehaltes der Bet v 1-homologen Proteine in Tomaten, Erdbeeren und Pflaumen. Nach der Entwicklung einer immunologischen Methode (indirekter kompetitiver ELISA) zur Quantifizierung der PR-10 Proteine Sola l 4, Fra a 1 sowie Pru d 1 konnten in verschiedenen Sorten sowie verarbeiteten Produkten die Allergenmengen untersucht und bewertet werden. Neben dem Einfluss der Sorte sollten die Effekte des konventionellen und ökologischen Anbaus, von jahreszeitlich sich ändernden Umweltfaktoren sowie der Verarbeitungstechnik (Trocknung durch Ofen, Sonne, Gefriertrocknung) analysiert und beurteilt werden.

Durch molekularbiologische Methoden, wie Ribonukleinsäure- (*ribonucleic acid*, RNA) Isolation, komplementäre Desoxyribonukleinsäure- (*complementary desoxyribonucleic acid*, cDNA) Synthese, PCR und Klonierung, war es möglich, rekombinante Proteine in *Escherichia coli* (*E. coli*) zu produzieren und zu reinigen. Im Folgenden wurden diese dann für die Synthese polyklonaler Antikörper durch Injektion in Kaninchen verwendet. Mit der Etablierung von drei ELISA-Methoden zur Detektion von Sola l 4, Fra a 1 und Pru d 1 sowie Optimierung der Proteinextraktion aus Tomaten, Erdbeeren und Pflaumen konnte der Gehalt der PR-10 Proteine ermittelt werden. Ein weiteres Ziel bestand in der Untersuchung der thermischen Stabilität der rekombinanten Proteine.





### 3 Methodenüberblick

Zur Klonierung der *pr-10* Gene, welche die Proteine Sola l 4.02 aus Tomate bzw. Pru d 1 aus Pflaume kodieren, wurde zunächst aus Früchten von *S. lycopersicum* Kultivar Lyterno sowie aus den Blättern von *P. domestica* Kultivar Opal die Gesamt-RNA isoliert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Über ortsgerichtete Mutagenese wurde eine Punktmutation im Bereich der *Bg/III*-Stelle innerhalb des *pru d 1*-Gens eingefügt. Die Aminosäuresequenz von Pru d 1 blieb jedoch erhalten. Die entsprechenden Gene *sola l 4.02* und *pru d 1* wurden durch das Anfügen von 5' bzw. 3' terminalen *SphI/Bg/III* Restriktionsschnittstellen in den Expressionsvektor pQE70 kloniert, sodass sich die Plasmide pQE70 *sola l 4.02* und pQE70 *pru d 1* ergaben. Das Plasmidkonstrukt pQE70 *fra a 1.02* wurde in Vorarbeit von Katrin Franz-Oberdorf kloniert. Nach Verifizierung der Sequenz durch Sequenzierung erfolgte die Transformation des Bakterienstammes *E. coli* BL21(DE3)pLysS und die Zellkultivierung in einem Liter Lysogeny Broth (LB) Medium mit entsprechenden Antibiotika. Nach Induktion der Genexpression mittels Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) wurde die Kultur bei 18 °C über Nacht schüttelnd inkubiert und die Zellen durch Zentrifugation geerntet. Die Proteinreinigung erfolgte nach dem Prinzip der immobilisierte Metallionenaffinitätschromatografie (IMAC), wobei das jeweilige Fusionsprotein einen C-terminalem His<sub>6</sub>- (Hexahistidin) tag, kodiert vom pQE70-Vektor, trägt. Die Qualität und Quantität der Proteinpräparationen wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot überprüft. Anschließend konnten spezifische polyklonale Antikörper, welche gegen die rekombinanten Proteine Sola l 4.02, Pru d 1 bzw. Fra 1.02 gerichtet waren, von der Firma Davids Biotechnologie GmbH, Regensburg durch aufeinanderfolgende Immunisierung von Kaninchen hergestellt und affinitätschromatografisch gereinigt werden.

Zur Detektion Bet v 1-homologer Proteine in Tomaten, Erdbeeren und Pflaumen wurde jeweils ein indirekter kompetitiver ELISA entwickelt. Das Prinzip beruht auf der Konkurrenzreaktion zwischen immobilisiertem rekombinanten Protein und freiem Allergen in der zu untersuchenden Probe um die Bindungsstellen des spezifischen polyklonalen Antikörpers. Nach der Optimierung verschiedener ELISA-Parameter (Beschichtungskonzentration, Bereich der Standardkurve, Inkubationszeit und -temperatur, Primär-/Sekundärantikörperkonzentration) wurde eine sigmoidale Standardkurve erhalten. Basierend auf dieser Standardkurve, in welcher definierte Mengen an freiem rekombinanten Protein zugegeben wurden, konnte die Konzentration in den unbekanntem Fruchtproben ermittelt werden.

Die Extraktion der Proteine aus Tomaten und Pflaumen wurde nach dem Protokoll von Björkstén et al. (Björkstén et al., 1980) durchgeführt. Für Erdbeeren wurde eine abgewandelte Form, basierend auf dem Protokoll von Vassilopoulou et al. angewandt (Vassilopoulou et al., 2007). Nach der Optimierung der Proteinextraktion (Verhältnis w/v, Inkubationszeit, Temperatur, Dialyse) wurden verschiedene Sorten sowie getrocknete Früchte aus konventionellem bzw. ökologischem Anbau auf deren Allergengehalt mittels ELISA analysiert.



## 4 Diskussion

### 4.1 Proteinbiochemie und thermische Stabilität rekombinanter Proteine

Birkenpollenallergiker in Nord- und Mitteleuropa leiden häufig an Kreuzreaktionen nach dem Verzehr von Erdbeeren, Pflaumen und Tomaten (Eriksson et al., 2004). In den vergangenen Jahren wurden in diesen Lebensmitteln die Bet v 1-homologen Allergene Fra a 1, Pru d 1 und Sola l 4 identifiziert (Karlsson et al., 2004; El-kereamy et al., 2009; Wangorsch et al., 2015). Voraussetzung für die Quantifizierung von Bet v 1-homologen Proteinen in Früchten ist die Produktion rekombinanter Proteine, welche als Referenzprotein im ELISA dienen. Als Expressionssystem findet häufig *E. coli* Anwendung, seltener eukaryotische Systeme wie Hefe- oder Säugerzellen (Lorenz et al., 2001). In *in vitro*-Tests (Immunoblot, Basophiler Aktivierungstest, ELISA) sowie Haut-Diagnostiktests werden rekombinante Proteine wie beispielweise Ara h 1, Bet v 1, Dau c 1, Fel d 1 oder Mal d 1 eingesetzt, da sie vergleichbare immunologische IgE-Bindungseigenschaften wie die natürlich vorkommenden Allergenvarianten besitzen (Chapman et al., 2000; Erdmann et al., 2005). *In vivo* erfüllen Allergene biologische Funktionen als Enzyme, Enzyminhibitoren oder Strukturproteine (Bufe et al., 1996; Maleki et al., 2003; Asturias et al., 1999). Jedoch ist dies für die IgE-Bindung und Auslösung der Immunantwort nicht entscheidend.

#### 4.1.1 Sequenzidentität und Strukturhomologie von PR-10 Proteinen

Ausgangspunkt für die Optimierung der Expressions- und der Proteinreinigungsmethode war *E. coli* BL21(DE3)pLysS pQE70 *fra a 1.02 / pru d 1 / sola l 4.02*, welches die Produktion der rekombinanten Proteine Fra a 1.02, Pru d 1 und Sola l 4.02 mit C-terminaler His<sub>6</sub>-Markierung ermöglichte. Durch die relativ hohe Sequenzidentität von 42,5% für Sola l 4.02, 53,8% für Fra a 1.02 und 59,4% für Pru d 1 bezogen auf Bet v 1.0101, können IgE-Antikörper, welche nach der primären Sensibilisierung auf Bet v 1 gebildet wurden, homologe Proteinstrukturen erkennen und binden (Hauser et al., 2008). Bet v 1 und dessen Homologe umfassen insgesamt 160 Aminosäuren, wovon 54 Positionen in allen vier Sequenzen identisch sind und zusätzlich 54 Positionen ähnliche Aminosäuren beinhalten (Abbildung 6).

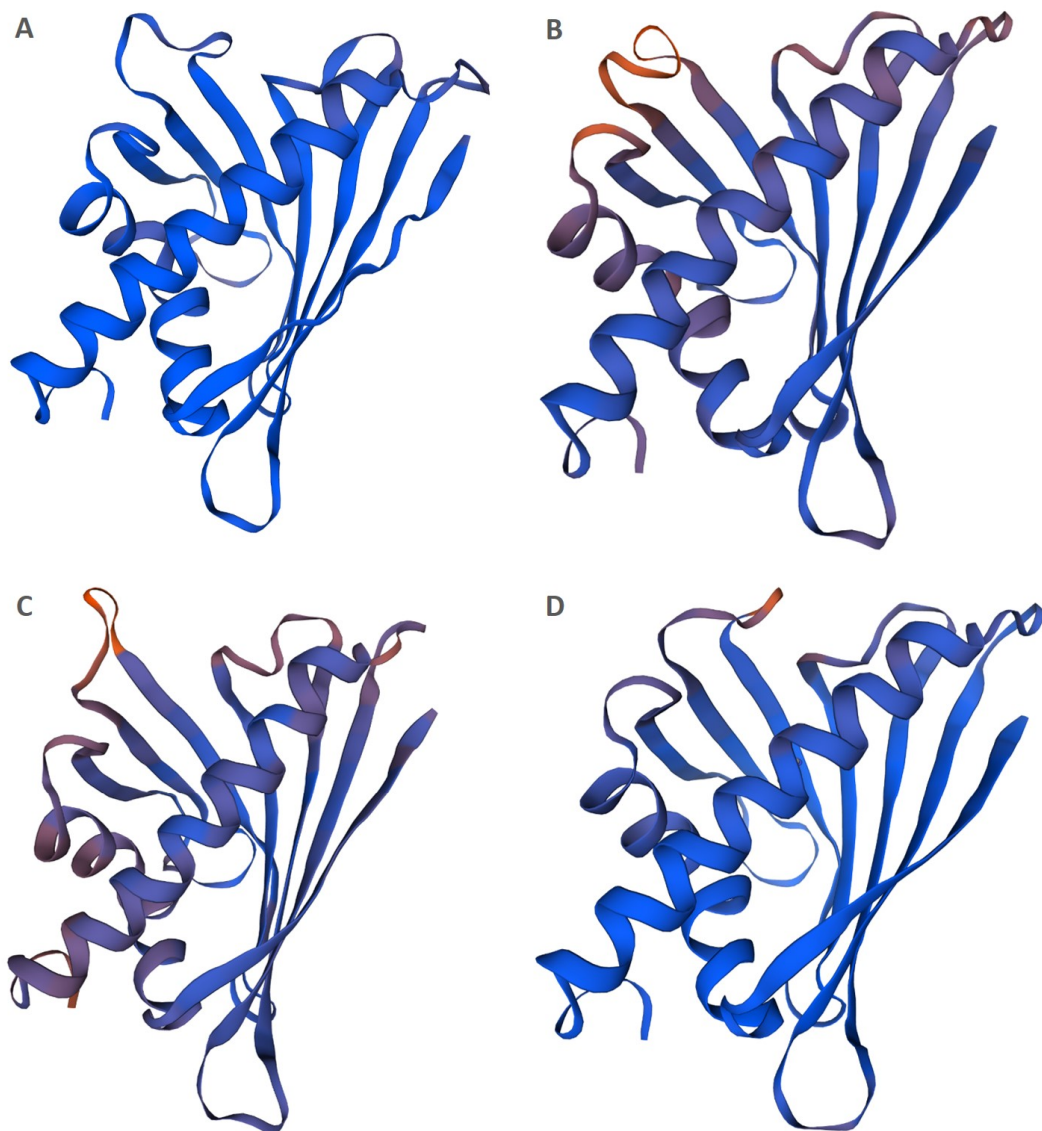
Bet v 1.0101 P15494	MGVFN <del>Y</del> ETETTSVIPAARL <del>F</del> KAFILDG <del>N</del> LF <del>P</del> KVAPQAISSVENIE <del>G</del> NGGPGTIKKISFP 60
Fra a 1.02 Q3T923	MGVYTYENEFTSDIPAPK <del>L</del> FAFVLDADN <del>L</del> IPK <del>I</del> APQAVKCAE <del>I</del> LE <del>G</del> DGGPGTIKKITFG 60
Pru d 1 B5KVN9	MGVFTYESEFTSEIPPPR <del>L</del> FAFVLDADN <del>L</del> V <del>P</del> KIAPQAIKHSE <del>I</del> LE <del>G</del> DGGPGTIKKITFG 60
Sola l 4.02 K4CWC4	MGVNTFTHESTTTTIAPTR <del>L</del> FKGLVLD <del>F</del> DSL <del>V</del> PKLLSHDVKSIE <del>I</del> V <del>E</del> GDGGAGS <del>I</del> KQMFV 60
	.: : : .: . : : . : : .:
Bet v 1.0101 P15494	EGFPFKYV <del>K</del> DRVDEVDHTNFKYNSVIE <del>G</del> GPIGDTLEKISNEIKIVATPD <del>G</del> GSILKISNK 120
Fra a 1.02 Q3T923	EGSHYGYV <del>K</del> HKIHSIDKENHTYSYSLIE <del>G</del> DALSDNIEKIDYETKLVSAPHGGTVIKTTSK 120
Pru d 1 B5KVN9	EGSQYGYV <del>K</del> HKIDSIDKENHSYSYTLIE <del>G</del> DALGDNLEKISYETKLVASPSGGSIK <del>S</del> ISH 120
Sola l 4.02 K4CWC4	EGGPIKYL <del>K</del> HKIHVIDDKNLVTKYSLIE <del>G</del> DVLDGKLESIAYDV <del>K</del> FEEAGDGGCVCKITTE 120
	: . . . : . : : . . . : . : : : : : : : : : . .
Bet v 1.0101 P15494	YHTKGDHEVKAEQVKASKEMGETLLRAVE <del>S</del> YLLAHS <del>D</del> AYN 160
Fra a 1.02 Q3T923	YHTKGDVEI <del>K</del> EEHVKAGKEKASHL <del>F</del> KLIEGYLKDHPSEYN 160
Pru d 1 B5KVN9	YHTKGDVEI <del>K</del> EEHVKAGKEKASN <del>L</del> FKLIE <del>T</del> YLGKHPDAYN 160
Sola l 4.02 K4CWC4	YHTKGDHVVSEEEHNVGK <del>G</del> KAIDL <del>F</del> KAIEAYLLANPSVYA 160
	.: . . . : : : : .

**Abbildung 6: Proteinsequenzalignment von Bet v 1 und homologen PR-10 Proteinen**

Bet v 1.0101 (P15494) aus *Betula verrucosa*; Fra a 1.02 (Q3T923) aus *Fragaria × ananassa*; Pru d 1 (B5KVN9) aus *Prunus domestica*; Sola l 4.02 (K4CWC4) aus *Solanum lycopersicum*; identische Aminosäuren sind grau hinterlegt; ähnliche Aminosäuren sind mit einem Punkt gekennzeichnet; die Glycin-reiche Schleife ist durch einen grünen Rahmen gekennzeichnet

Somit wird eine Sequenzidentität von 33,8% erreicht. Das konservierte Motiv von PR-10 Proteinen, die Glycin-reiche Schleife, befindet sich zwischen den Positionen Glu47 und Glu52 (Abbildung 6).

Neben der Homologie auf der Ebene der Proteinsequenz zeigen auch Vorhersagemodelle zur dreidimensionalen Tertiärstruktur (Swiss Modell <https://swissmodel.expasy.org/>) sehr hohe Übereinstimmung (Abbildung 7). Die lange C-terminale  $\alpha$ -Helix sowie die Ausbildung eines Hohlraumes durch Anordnung des siebensträngigen  $\beta$ -Faltblattes sind gemeinsame Merkmale von PR-10 Proteinen (Fernandes et al., 2013). Die homologe Proteinstruktur legt nahe, dass strukturähnliche PR-10 Proteine Kreuzreaktionen auslösen können. Basophile Aktivierungstests mit Seren von Birkenpollenallergikern könnten Aufschluss darüber geben, in welchem Ausmaß die rekombinanten Proteine Fra a 1.02, Pru d 1 und Sola l 4.02 eine Aktivierung von Basophilen auslösen. Studien zeigten bereits, dass Fra a-Isoformen unterschiedliche allergene Potentiale besitzen (Franz-Oberdorf et al., 2016). Zukünftig könnten so neue Marker für immunologische Tests entstehen.



**Abbildung 7: Dreidimensionale Proteinstrukturmodelle Bet v 1 und homologe PR-10 Proteinen**  
 (A) Bet v 1 (P15494) aus *Betula verrucosa*; (B) Sola l 4.02 (K4CWC4) aus *Solanum lycopersicum*; (C) Fra a 1.02 (Q3T923) aus *Fragaria × ananassa*; (D) Pru d 1 (B5KVN9) aus *Prunus domestica*; Proteinstrukturmodelle erstellt mit Swiss Model (<https://swissmodel.expasy.org/>)

#### 4.1.2 Rekombinante PR-10 Proteine als potentielle Marker für *in vitro* und *in vivo* Tests

Während das rSola l 4.02, welches aus der löslichen Proteinfraction unter nativen Bedingungen gereinigt wurde, nur in einer monomeren Proteinform mit einem Molekulargewicht von 18 kDa vorlag, wurde für rSola l 4.02, gereinigt aus Einschlusskörpern (*inclusion bodies*, IB) unter denaturierenden Bedingungen mit 8 M Harnstoff, eine dimere Form mit einer Größe von 36 kDa gefunden (Publikation I Abbildung 1). Cysteinreste an den Aminosäurepositionen 113 sowie 115 in der Sola l 4.02-Sequenz sind für die Ausbildung von stabilen Disulfidbrücken verantwortlich, welche unter reduzierenden Bedingungen durch Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol wieder gespalten werden können. Beide Cysteinreste liegen in dem  $\beta$ 7-Faltblatt. Faltet sich rSola l 4.02 bereits während der Translation korrekt und liegt als lösliches Protein vor, könnte sich eine intramolekulare Disulfidbrücke ausbilden, welche zur Stabilisierung des Proteins beiträgt. Faltet sich rSola l 4.02 während der Proteinbiosynthese falsch und wird anschließend unter denaturierenden Bedingungen aus IB gereinigt, liegt das Protein zunächst in einer linearen Kette vor. Während des Rückfaltungsprozesses könnten sich zwei Moleküle zusammenlagern und zwei benachbarte intermolekulare Cysteinbrücken ausbilden. Ebenso ist in der Fra a 1.02-Sequenz ein Cysteinrest an Position 41 zu finden, jedoch wurden mittels SDS-PAGE keine Dimere identifiziert. Dass Allergene der PR-10 Proteinfamilie als Dimere existieren, wurde für Bet v 1 belegt (Bufe et al., 1996; Kaul et al., 2003; Schöll et al., 2005). Trotz eines fehlenden Cysteinrestes in der Isoform Bet v 1.0101 kommt es zur Bildung von Dimeren, wobei der Mechanismus nicht aufgeklärt ist. Aminosäureposition 5 scheint jedoch eine entscheidende Rolle bei der Dimerbildung zu spielen (Kofler et al., 2014). Das Haupterdnussallergen Ara h 1 existiert sogar als Trimer bzw. Oligomer (Maleki et al., 2000b; van Boxtel et al., 2006). Für die Auslösung der Allergie-Signalkaskade ist eine Quervernetzung von IgE-Molekülen auf der Oberfläche der Effektorzelle nötig, sodass durch Polymerisierung auch kleine allergene Proteine dazu in der Lage sind (Gould & Sutton, 2008).

Rekombinante Proteine in ihrer löslichen Form unter nativen Bedingungen zu reinigen stellt den einfachsten Weg zur Gewinnung reiner Proteine dar (Lorenz et al., 2001). Kommt es während der bakteriellen Transkription und Proteinbiosynthese zu einem Ungleichgewicht und somit zur Überforderung der Faltungsmaschinerie, kann sich der Anteil an löslichem Protein verringern und zur Bildung von Proteinaggregaten führen, welche als fehlgefaltete oder inaktive Translationsprodukten in IB abgelagert werden (Wurm et al., 2018). Je nach Expressions- und Kultivierungsbedingungen können mehr als 50% des rekombinanten Zielproteins in IB abgelagert werden, wobei deren Reinheit mit bis zu 90% sehr hoch ist (Lilie et al., 1998). Dennoch können IB-Proteine zu einem interessanten Produkt werden, da sie ähnliche Sekundärstrukturen wie native Proteine aufweisen (Singh & Panda, 2005). Ist der Anteil an löslichem Protein gering, können rekombinante Proteine auch aus IB unter denaturierenden Bedingungen durch Verwendung von Harnstoff oder Guanidiniumchlorid gereinigt und z.B. mittels Dialyse rückgefaltet werden (Lilie et al., 1998). Neben der Reinigung unter nativen Bedingungen wurden rSola l 4.02 und rFra a 1.02 auch aus IB gereinigt und hinsichtlich der IgG-Bindungskapazität mittels Western Blot mit rSola l 4.02 und rFra a 1.02 aus der löslichen Fraktion verglichen (Publikation I Abbildung 1B, Abbildung 2, Supp S1; Publikation II Abbildung 1). Zur Produktion der spezifischen

polyklonalen Antikörper wurden lösliches rSola l 4.02 bzw. rFra a 1.02 mittels IMAC gereinigt, durch SDS-PAGE verifiziert und die entsprechende Proteinbande ausgeschnitten. Von der Firma Davids Biotechnologie GmbH, Regensburg, wurden die Proteine anschließend aus dem Gelstück eluiert und zur Immunisierung von Kaninchen verwendet. Die spezifischen polyklonalen Antikörper, welche gegen rSola l 4.02 bzw. rFra a 1.02 gerichtet waren, erkannten Proteine aus beiden Fraktionen, sodass entscheidende Antigenepitope zur IgG-Bindung vorhanden blieben. Die Sekundär- und Tertiärstruktur von rBet v 1a, gereinigt unter denaturierenden Bedingungen, zeigte Korrelation zur nativen Form, wobei die Mutante rBet v 1a<sub>S112P/R145P</sub> ausschließlich in der unlöslichen Fraktion als fehlgefaltetes Protein zu finden war (Husslik et al., 2015). Weiterhin war die Bindung von IgE aus Seren von Birkenpollenallergikern nur an rBet v 1a und nicht an die Mutante möglich. Das rekombinante Pyr c 1, das PR-10 Protein aus Birne *Pyrus communis*, gereinigt unter denaturierenden Bedingungen, wurde im Western Blot, Basophilen Test und EAST untersucht, wobei ähnliche allergene Eigenschaften wie zum natürlichen Allergen beschrieben wurden (Karamloo et al., 2001). IgE-Antikörper aus Seren von Birnenallergikern erkennen auch das aus IB gereinigte und rückgefaltete rPyr c 1.

Rekombinante Proteine sind oftmals hinsichtlich ihrer strukturellen und immunologischen Eigenschaften vergleichbar mit nativen Allergenen und bieten daher für eine Vielzahl an *in vitro* und *in vivo* Tests eine potentielle Alternative (Lorenz et al., 2001; Chapman et al., 2000). Die Proteine rSola l 4.02, rFra a 1.02 und rPru d 1 wurden als Referenzsubstanzen für *in vitro* Methoden wie ELISA und Immunoblots eingesetzt. Weitere Studien sind nötig, um in Zukunft diese rekombinanten Proteine möglicherweise auch für Basophile Aktivierungstests sowie für *in vivo* Tests (Hautpricktest) anzuwenden, um beispielsweise daraus hypoallergene Isoformen weiterzuentwickeln (Tschepp & Breiteneder, 2017; Kahlert et al., 2008).

#### 4.1.3 Thermische Stabilität von rekombinantem Sola l 4.02 und Fra a 1.02

Die Stabilität von Allergenen der Familie der PR-10 Proteine der *Rosaceae* ist für den Verlauf einer allergischen Reaktion von entscheidender Bedeutung. Durch die Instabilität gegenüber Hitze und Proteasen des Verdauungstraktes, tritt bei Birkenpollenallergikern, die zusätzlich von einer Pollen-assoziierten Lebensmittelallergie betroffen sind, häufig das OAS auf (Vieths et al., 2002). Dabei sind die Symptome meist lokal auf den Mund- und Rachenbereich begrenzt und verglichen zu schweren Allergiesymptomen, welche durch hitze- und proteasestabile LTP ausgelöst werden, eher mild (Andersen et al., 2011; Sánchez-Monge et al., 1999; Scheurer et al., 2004). Die thermische Stabilität und die IgG-Bindungskapazität von rSola l 4.02 (lösliche Proteinfraction) sowie rFra a 1.02 (lösliche und unlösliche Fraktion) wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht (Publikation I Abbildung 2; Publikation II Abbildung 1). Wurden die rekombinanten Proteine bei 99 °C erhitzt, waren nach 10-minütiger Inkubationszeit keine oder geringe Veränderungen in der IgG-Bindung zu detektieren. Bei längeren Erhitzungsphasen ab 20 min kam es zur Degradation der Proteine und zur Zerstörung von Antigenepitopen, sodass ein vollständiger Verlust der IgG-Bindung nach 60 min zu verzeichnen war. Das Protein rPru av 1 zeigt ein ähnliches Verhalten gegenüber thermischer Behandlung, wobei es zur

Degradation des Proteins erst nach Erhitzung für 60 min bei 100 °C in Anwesenheit von Glukose kam (Gruber et al., 2004). Weiterhin ist die An- oder Abwesenheit bestimmter Kohlenhydrate für die Stabilität dieses Proteins von Bedeutung. Thermale Transitionskurven zeigten, dass es zur Entfaltung von rPru av 1 ab einer Temperatur von 66 °C kam, wobei sich rPru av 1 nach Abkühlen auch wieder vollständig rückfalten konnte (Gruber et al., 2004). Das Protein rMal d 1 entfaltete sich bereits ab einer Temperatur von 55 °C, was die extreme Sensitivität des Apfelallergens gegenüber Hitze unterstrich (Somkuti et al., 2011). Native PR-10 Proteine und deren rekombinante Varianten zeigten unterschiedliche Eigenschaften gegenüber Temperatur, pH und Denaturierung (Bollen et al., 2010). Die Temperaturstabilität von Proteinextrakten von vier verschiedenen Erdbeersorten Elsanta, Florika, Snow White und Yellow Wonder wurde mittels indirektem kompetitivem ELISA untersucht (Publikation II Abbildung 4). Dabei war ein zum Teil signifikanter Anstieg des Fra a 1-Gehaltes nach dem Erhitzen für 10 min bei 70 °C bzw. 80 °C zu verzeichnen. Die Änderung der Proteinstruktur durch thermischen Einfluss könnte zur Präsentation zusätzlicher linearer Epitope führen, an welche der spezifische Antikörper binden kann. Weiterhin kommen in Erdbeerextrakten eine Vielzahl an Isoformen vor, welche der polyklonale Antikörper erkennen und binden kann. Die Stabilität von Allergenen in Proteinextrakten kann möglicherweise auch durch die Zusammensetzung der Matrix beeinflusst werden. Eine Erhitzung von Apfelextrakten für 30 min bei 100 °C führte nicht zur Reduktion der Immunreaktivität (Vieths et al., 1998). Stabilisierende Effekte durch Kohlenhydrate oder Ligandenbindung in den hydrophoben Hohlraum sind wahrscheinlich. Allergene in erhitzten oder gekochten Nahrungsmitteln verlieren *in vitro* ihre IgE-Bindungsfähigkeit und somit die Fähigkeit, die Freisetzung von Mediatoren auszulösen. Allerdings können native Proteine Bet v 1-spezifische T-Zellen dennoch aktivieren und diese zur Cytokinproduktion anregen (Bohle et al., 2006). Der Verzehr von gekochten Nahrungsmitteln, welche Birkenpollen-verwandte Lebensmittelallergene enthalten, löst *in vivo* keine IgE-vermittelten Symptome wie OAS aus, jedoch kann es zum Auftreten atopischer Ekzeme kommen, welche durch eine T-Zell-vermittelte Spätreaktion hervorgerufen werden (Bohle, 2007). Die thermische Behandlung beeinflusst die Tertiärstruktur der Allergene, nicht aber die Primärstruktur, sodass T-Zell-Epitope erhalten bleiben. Die IgE-Kreuzreaktivität ist von der T-Zell-Kreuzreaktivität unabhängig.

#### **4.2 Der Gehalt Bet v 1-homologer Proteine ist von der Sorte abhängig**

Voraussetzung für die enorme Sortenvielfalt verschiedenster Kultur- und Nutzpflanzen ist die genetische Vielfalt, welche in der Landwirtschaft und im Gartenbau zur Züchtung neuer Sorten dient (Beckmann & Reinke, 2014). Diversität gibt es nicht nur hinsichtlich phänotypischer Merkmale, wie Form oder Größe, Reifezeitpunkt oder Anbauregionen von Obst- und Gemüsesorten. Weiterhin können sich Sorten auch in Bezug auf ihre Inhaltsstoffe wie primäre und sekundäre Pflanzenstoffe unterscheiden, welche die Farbe, das Aroma, den Geschmack und den Nährwert von Lebensmitteln bestimmen (Hounsome et al., 2008). Auch der Gehalt von Bet v 1-homologen Proteinen und die Allergenität von Äpfeln, Tomaten, Kirschen und Pfirsichen ist von der Sorte abhängig (Matthes & Schmitz-Eiberger, 2009; Dölle et al., 2011a; Primavesi et al., 2006; Brenna et al., 2004). Birkenpollenallergien stehen mit

einer Reihe von allergischen Reaktionen auf Obst- und Gemüsearten sowie Nüssen im Zusammenhang (Vieths et al., 2002). Dabei sind Patienten auf Grund der regionalen Verteilung von Pollenallergenen gegen verschiedene allergene Proteine sensibilisiert (Larramendi et al., 2008). Tomaten, Erdbeeren und Pflaumen sind wichtige Quellen einer Vielzahl allergener Proteine (Vieths et al., 2002). So werden die schweren Symptome einer Lebensmittelallergie in Südeuropa häufig durch Proteine der Klasse der LTP wie Sola l 6, Sola l 7, Fra a 3 oder Pru d 3 ausgelöst (Martín-Pedraza et al., 2016; Zuidmeer et al., 2006; Pastorello et al., 2001). Dennoch ist auch der Anteil betroffener Patienten in Nordeuropa, welche meist gegen Bet v 1 sensibilisiert sind und mit dessen homologen Allergenen kreuzreagieren, groß. 31% der Bevölkerung nordeuropäischer Länder berichten von einer Überempfindlichkeit nach dem Verzehr von Erdbeeren, 29% von Reaktionen auf Tomaten und 21% der gegen Bet v 1-sensibilisierten Patienten von Reaktionen auf Pflaumen (Eriksson et al., 2004).

#### **4.2.1 Analyse verschiedener Sorten hinsichtlich ihres PR-10 Proteingehaltes**

Zur Quantifizierung der Bet v 1-homologen Proteine Sola l 4, Fra a 1 sowie Pru d 1 wurde ein indirekter kompetitiver ELISA unter Verwendung von spezifischen polyklonalen Antikörpern entwickelt. Da für Fra a 1 und Sola l 4 verschiedene Isoformen bekannt sind, kann dies auch für Pru d 1 angenommen werden, sodass durch die Verwendung eines polyklonalen Antikörpers verschiedene Isoformen detektiert werden können. 23 Tomatensorten, 20 Erdbeersorten, und verschiedene Pflaumensorten, welche sich in Farbe, Form und Fruchtgröße unterschieden, wurden hinsichtlich ihres Sola l 4-, Fra a 1-, und Pru d 1-Gehaltes analysiert (Publikation I Abbildung 3; Publikation II Abbildung 2; Publikation III Abbildung 2; Abbildung S 1). Es zeigte sich, dass der Gehalt am jeweiligen PR-10 Protein in der Frucht von der Art bzw. von der Sorte abhing und weiterhin keine Korrelation zwischen Allergengehalt und Fruchtfarbe zu finden war. Da alle untersuchten Sorten der Tomaten, Erdbeeren bzw. Pflaumen jeweils am gleichen Standort (Gärtnerei Böck GmbH, München (Gewächshaus); Hansabred GmbH, Dresden (Freiland); Versuchsanlage der Technischen Universität München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan, Freising) angebaut wurden, waren die Einflüsse abiotischer und biotischer Faktoren vergleichbar.

Der Sola l 4-Gehalt in den untersuchten Tomatensorten variierte signifikant zwischen 0,24 und 1,7  $\mu\text{g}$  Sola l 4/g FW, wobei Rugantino und Rhianna Sorten mit den niedrigsten und Farbini und Bambello Sorten mit den höchsten Mengen des Bet v 1-homologen Proteins waren (Publikation I Abbildung 3). Der Fra a 1-Gehalt in Erdbeeren unterschied sich ebenfalls signifikant zwischen den Arten und Sorten und lag im Bereich zwischen 0,67 und 3,97  $\mu\text{g}$  Fra a 1/g FW (Publikation II Abbildung 2). In den Genotypen Leigong und Grotta del Vento wurden die niedrigsten und in Florika und Wurzburg die höchsten Mengen des Bet v 1-homologen Proteins detektiert. Trotz unterschiedlicher Extraktionsmethoden, welche sich nur in der Konzentration der Zusammensetzung der Pufferkomponenten unterschieden, wurde in beiden Früchte ähnliche Mengen der PR-10 Proteine detektiert. Der Pru d 1-Gehalt in Pflaumen lag im Bereich von 1,48 bis 26,54  $\mu\text{g}$  Pru d 1/g FW, wobei ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den Sorten festgestellt wurden (Abbildung S 1). Die drei Sorten Saint Catherine, Hanita und Toppigant wiesen mit über 20  $\mu\text{g}$  Pru d 1/g FW die höchsten Pru d 1-Gehalte auf, wobei die Mehrheit der untersuchten



Pflaumenproben zwischen 1,48 und 9,04 µg Pru d 1/g FW enthielten. Auch der Allergehalt in Äpfeln variiert stark und ist kultivarabhängig. Studien zeigten, dass der Mal d 1-Gehalt je nach Sorte von 1,3 bis 20,1 µg/g FW schwanken kann (Matthes & Schmitz-Eiberger, 2009), wobei auch Wertebereiche von 3,8 bis 72,5 µg/g FW (Sancho et al., 2006) und 0,84 bis 33,17 µg Mal d 1/g FW (Marzban et al., 2005) gefunden wurden. Zur Detektion des Hauptapfelallergens Mal d 1 wurde im vorliegenden Projekt ein weiterer indirekter kompetitiver ELISA mit einem spezifischen polyklonalen Mal d 1-Antikörper entwickelt, um den Einfluss der Sorte und der Anbaubedingung zu untersuchen. Äpfel aus Estland und Norwegen zeigten, in Abhängigkeit von der Sorte, unterschiedliche Mal d 1-Gehalte. Dabei ist der Gehalt dieses PR-10 Proteins verglichen zu Tomaten, Erdbeeren und Pflaumen deutlich höher und liegt im Bereich von 3,6 bis 97,2 µg Mal d 1/g FW (Abbildung S 2, Abbildung S 3). Der große Anteil von 45% der Birkenpollenallergiker, welche von einer Überempfindlichkeit nach dem Verzehr von Äpfeln berichten, kann mit dem höheren Gehalt an Mal d 1 begründet werden (Eriksson et al., 2004). Viele der untersuchten Apfelsorten zeigen signifikante Unterschiede im Mal d 1-Gehalt zwischen den beiden Jahren 2016 und 2017. Der Einfluss von konventionellem bzw. ökologischem Anbau ist jedoch nur für einige Sorten von signifikantem Einfluss.

#### 4.2.2 Zusammenhang zwischen Fruchtfarbe und Allergenmenge

Die Farbpalette von reifen Tomaten reicht von weiß und gelb über orange, rot bis hin zu grün, braun, lila und schwarz (Beckmann & Reinke, 2014). Verantwortlich für die rote Farbe der Tomaten ist vor allem das Lycopin (Brandt et al., 2006). Anhand der vorliegenden ELISA-Ergebnisse lässt sich jedoch kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Sola l 4-Menge und Farbe erkennen (Publikation I Abbildung 3). In roten Früchte wurden sowohl niedrige (Rugantino, Seviocard) aber auch höhere (Monterey, Supersweet) Sola l 4-Gehalte nachgewiesen. Auch orangefarbige Tomatenfrüchte enthalten hohe (Farbini, Bambello), mittlere (Operino) und niedrige (Orama) Sola l 4-Mengen. Die rein grüne Limetto-Tomate als auch Indigo Rose mit grünem Fruchtfleisch und schwarzer Schale sind Sorten mit niedrigerem Gehalt. Jedoch kann von zwei untersuchten grünen Sorten kein genereller Rückschluss auf eine tendenziell niedrigere Menge des PR-10 Proteins getroffen werden. Es ist dennoch möglich, dass Sola l 4 eine biologische Funktion z.B. im Transport von Metaboliten des Sekundärmetabolismus einnimmt, welche in die hydrophobe Tasche des Proteins binden. Aufschluss darüber könnten Bindungsstudien mit bereits bekannten Liganden für Bet v 1 und Fra a 1 geben (Kofler et al., 2012; Casañal et al., 2013).

In der Gattung *Fragaria*, welche mehrere Arten wie z. B. *F. × ananassa*, *F. × vescana*, *F. vesca*, *F. moschata*, *F. chiloensis* oder *F. nilgerrensis* umfasst, ist eine hohe Diversität in Bezug auf Farbe (rot, gelb, weiß), Größe und Aroma der Früchte sowie Ploidiegrad (diploid bis decaploid) zu finden (Franz-Oberdorf et al., 2017). Fra a 1 wird eine Rolle in der Flavonoidbiosynthese zugeschrieben (Hjernø et al., 2006; Casañal et al., 2013). Eine Proteomanalyse wies darauf hin, dass sich rote und weiße Sorten unter anderem auch in der Fra a 1-Menge unterscheiden und Allergiekranke darüber berichten, dass weiße Erdbeeren besser toleriert werden (Alm et al., 2007; Hjernø et al., 2006). Die Ergebnisse der ELISA-Untersuchungen zeigen jedoch, dass weiße Erdbeeren nicht generell einen niedrigeren Fra a 1-Gehalt,

verglichen zu roten Früchten, aufweisen (Publikation II Abbildung 2). Die Fra a 1-Menge von weißen Kultivaren variiert von 0,67 bis 2,13  $\mu\text{g/g}$  FW, die der roten von 0,78 bis 3,97  $\mu\text{g/g}$  FW. Sorten mit roten Früchten der Art *F. × ananassa* zeigen sehr ähnliche Fra a 1-Menge zwischen 0,84 und 1,17  $\mu\text{g/g}$  FW, mit Ausnahme der weißen Sorte Snow White mit signifikant höheren Werten von 2,13  $\mu\text{g/g}$  FW. Durch Kreuzung von Kulturerdbeeren mit Walderdbeeren können sich Nähr- und Inhaltsstoffe, wie Sekundärmetabolite, aber auch allergene Proteine verändern, sodass auch die Züchtung eine entscheidende Rolle zu spielen scheint (Tulipani et al., 2011). Snow White entstand aus der Kreuzung chilenischer Landrassen von *F. chiloensis*. Auch die weiße *F. chiloensis*-Sorte Lucida Perfecta zeigt höhere Werte verglichen zu *F. × ananassa*-Sorten. *F. chiloensis*-Erdbeeren werden in der Züchtung eingesetzt, da sie durch ihre Widerstandsfähigkeit gegen Krankheiten und Frost als besonders resistent gelten (Darrow, 1966). Die Synthese von PR-10 Proteinen ist mit dem Abwehrsystem der Pflanze verbunden, sodass Stressfaktoren wie Pathogene aber auch Hitze oder Kälte die Genexpression initiieren können (Agarwal & Agarwal, 2014; Jain & Kumar, 2015). Die Art *F. × vescana*, zu welcher die Sorte Florika mit der höchsten Fra a 1-Menge von 3,97  $\mu\text{g/g}$  FW zählt, ist aus der Kreuzung von *F. × ananassa* ( $2n = 8x$ ) und *F. vesca* ( $2n = 2x$ ) hervorgegangen und besitzt einen zehnfachen Chromosomensatz ( $2n = 10x$ ).

Die Vielfalt an Pflaumensorten unterschiedlicher Form, Größe, Farbe und Geschmack ist enorm (Treutter et al., 2012). Gelbe, grüne, rote, bis hin zu violetten oder dunkelblauen Sorten sind bekannt, wobei die Unterschiede durch den Gehalt an gesundheitsfördernden phenolischen Verbindungen entstehen (Mubarak et al., 2012b; Slimestad et al., 2009). Neben den Ergebnissen zur Sortenabhängigkeit des Pru d 1-Gehaltes (Publikation III Abbildung 2, Abbildung S 1), welche auch für Tomaten, Erdbeeren und Äpfel nachgewiesen wurde, zeigen die Untersuchungen zum Allergengehalt der Pflaumensorten Jubileum, Reeves und Victoria aus Norwegen eine Korrelation der Allergenmenge mit dem Gehalt an Flavan-3-olen sowie der Polyphenoloxidaseaktivität (Publikation III). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein niedriger Pru d 1-Gehalt mit einem hohem Flavan-3-ol Gehalt in Verbindung steht. Durch oxidative Reaktionen von Phenolen, welche die Fähigkeit besitzen, an Proteine zu binden, sind hohe Polyphenolgehalte mit einer niedrigen Allergenität verbunden (Rudeschko et al., 1995). Auch für das Hauptapfelallergen Mal d 1 wurde ein Zusammenhang zwischen Phenolgehalt, Polyphenoloxidaseaktivität und Allergengehalt festgestellt (Schmitz-Eiberger & Matthes, 2011; Kiewning et al., 2013b). Ebenso zeigte rPru av 1 eine Verringerung des allergenen Potentials in Anwesenheit von Polyphenolen, wie Epicatechin, Catechin oder Quercetin, in Kombination mit der Polyphenoloxidase Tyrosinase (Gruber et al., 2004). Zusammen mit den Ergebnissen der ELISA-Untersuchung der 23 verschiedenen Sorten (Abbildung S 1) könnte eine Analyse der Polyphenol-Zusammensetzung dieser Sorten den Zusammenhang zwischen Allergenmenge und Flavan-3-ol Gehalt bzw. anderer Sekundärmetabolite weiterführend untersuchen.

Hautpricktests mit Tomaten unterschiedlicher Reifegrade zeigten, dass unreife grüne Früchte geringere Hautreaktionen als rote reife Früchte hervorrufen (Dölle et al., 2011b). Auch die grünen Sorten Limetto und Indigo Rose zeigten im ELISA vergleichsweise niedrige Sola l 4-Mengen. Während der Fruchtreife

von Erdbeeren ändert sich die Zusammensetzung von phenolischen Verbindungen, vor allem von Anthocyanen, aber auch von *Fra a 1*, sodass die Verbindung von Allergenkonzentration und Sekundärmetabolismus bekräftigt werden kann (Aaby et al., 2012; Tulipani et al., 2011). Während der Fruchtreifung steigt die Genexpression von *Fra a 1.02*. Für *Fra a 1.01* und *Fra a 1.03* wurde keine Veränderung während des Reifeprozesses gefunden (Muñoz et al., 2010). Der Mal d 1-Gehalt in Äpfeln ist ebenfalls mit dem Reifungsprozess verbunden und kann auch noch während der Lagerung des Obstes ansteigen (Hsieh et al., 1995; Sancho et al., 2006; Kiewning & Schmitz-Eiberger, 2014; Schmitz-Eiberger & Matthes, 2011; Matthes & Schmitz-Eiberger, 2009). Quantitative PCR-Analysen mit Tomaten und Pflaumen unterschiedlicher Reifestadien könnten aufklären, ob möglicherweise ein Zusammenhang zwischen der Expression der *Sola l 4*- und *Pru d 1*-Gene und der Fruchtentwicklung besteht.

Die allergische Reaktion ist ein komplexer Mechanismus, welcher nicht nur von einer Allergenisoform ausgelöst werden kann, sondern sich auch von Patient zu Patient unterscheidet und verschiedene Symptome hervorruft. PR-10 Proteine werden von einer Genfamilie kodiert, sodass es möglich ist, dass neben den bereits identifizierten Isoformen für *Sola l 4* und *Fra a 1* auch für *Pru d 1* noch weitere Isoformen existieren. *Fra a 1*-Isoformen besitzen unterschiedliche Potentiale, Basophile zu aktivieren (Franz-Oberdorf et al., 2016). Auch die Isoform *Sola l 4.02* wies eine höhere immunologische Aktivität im Vergleich zu *Sola l 4.01* auf (Wangorsch et al., 2015). Ergebnisse von Immunoblots und Basophilen Aktivierungstests zeigten, dass Patienten verschieden starke Reaktionen auf Tomaten zeigen (Dölle et al., 2011a). Grund dafür ist die individuelle IgE-Antikörperspezifität und die Erkennung mehrerer Isoformen von unterschiedlichen IgE-Antikörpern im Blutserum. Basophile Aktivierungstests deuteten darauf hin, dass das allergene Potential weißer Sorten mit denen der roten Sorten vergleichbar ist (Franz-Oberdorf et al., 2017). Auch die ELISA-Daten zeigen, dass nur einige weiße Erdbeeren einen niedrigeren *Fra a 1*-Gehalt als rote Erdbeeren aufweisen, aber nicht generell niedrige Mengen an *Fra a 1* haben (Publikation II Abbildung 2).

Durch die enorme Vielfalt an Tomaten, Erdbeeren und Pflaumen ist es möglich, mittels der entwickelten ELISA-Methoden im ersten Schritt Sorten zu identifizieren, deren Gehalt an *Sola l 4*, *Fra a 1* bzw. *Pru d 1* gering ist. Ausgewählte Kultivare könnten dann als Ausgangspunkt für die Züchtung allergenarmer Sorten dienen, welche von betroffenen Allergikern toleriert werden könnten und mit einer verringerten Symptomatik verbunden sind. Zusätzliche Untersuchungen wie Immunotest, Hautpricktest oder Verkostungen durch Allergiker müssten durchgeführt werden, um den niedrigen PR-10 Proteingehalt in bestimmten Sorten zu bestätigen, wobei die individuelle Reaktion von Patient zu Patient unterschiedlich sein kann. In Lebensmitteln sind jedoch auch noch weitere als Allergene wirkenden Proteine enthalten, welche zu anderen Proteinfamilien als der PR-10 Familie zählen, und ebenfalls allergische Symptome auslösen können. Für einige Apfelsorten konnte eine geringe Menge mehrerer Allergene Mal d 1, Mal d 2 sowie Mal d 3 festgestellt werden, welche sowohl in der Schale als auch im Fruchtfleisch enthalten sind (Vegro et al., 2016). Neben dem Vorkommen Bet v 1-homologer Proteine in Früchten, können auch Pollen PR-10 Proteine enthalten, welche dann durch Wind oder Insekten verbreitet

werden und über die Nasenschleimhaut in den Körper gelangt und so ebenfalls allergische Symptome auslösen (Patiwael et al., 2010; Marzban et al., 2006).

### 4.3 Einfluss von Verarbeitung, Anbau und saisonaler Effekte auf den Allergengehalt

Die Verarbeitung von Lebensmitteln kann deren Eigenschaften in positiver aber auch negativer Form beeinflussen (van Boekel et al., 2010; Rahaman et al., 2016). So können durch mechanische Behandlung (Waschen, Schälen, Schneiden, Mahlen), thermische Prozesse wie Kochen oder Trocknung durch Hitze, sowie Fermentationsprozesse auch die allergenen Eigenschaften von Lebensmittelallergenen verändert werden (Besler et al., 2001; Sathe et al., 2005). Untersuchungen zeigten, dass sich durch Einwirkung von Hitze konformationelle Epitopstrukturen der Proteine verändern, lineare Epitope aber meist erhalten bleiben (Davis & Williams, 1998; Verhoeckx et al., 2015). Die Allergenität kann somit zum einen gesenkt aber auch verstärkt werden oder unverändert bleiben (Vieths et al., 1998; Maleki et al., 2003; Sancho et al., 2005). Getrocknete Tomaten, Pflaumen und Erdbeeren zählen zu wichtigen Produkten der Lebensmittelindustrie und werden als getrocknete Früchte angeboten sowie in Müsli verarbeitet. LTP gelten als Hauptauslöser von Tomaten-, Pflaumen- und Erdbeerallergien und rufen, bedingt durch ihre Hitze- und Proteaseresistenz, schwere Allergiesymptome hervor, sodass sowohl frische Früchte als auch verarbeitete Produkte allergische Reaktionen auslösen (Pravettoni et al., 2009; Pastorello et al., 2001; Zuidmeer et al., 2006). Dabei wird die immunologische Aktivität aufrechterhalten (Martín-Pedraza et al., 2016; Scheurer et al., 2004). Im Gegensatz dazu zeichnen sich Bet v 1-homologe Proteine durch ihre Hitzeinstabilität und Proteasesensibilität aus (Vieths et al., 2002). Somit können Birkenpollenallergiker, welche zusätzlich auch Kreuzreaktionen auf Früchte der Familie der *Rosaceae* wie Äpfel, Kirschen, Pfirsich, Pflaumen oder Erdbeere und Gemüse zeigen, erhitzte bzw. verarbeitete Produkte vertragen. PR-10 Proteine, wie Mal d 1 oder Pru av 1, verlieren nach thermischer Behandlung ihre Allergenität (Vieths et al., 1998; Gruber et al., 2004).

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Trocknung, des konventionellen bzw. ökologischen Anbaus sowie saisonaler Effekte auf den Gehalt der PR-10 Proteine Sola l 4 und Fra a 1 in Tomaten und Erdbeeren untersucht. Dazu wurden die Tomatensorten Perbruzzo und SAAB, welche für den Anbau in Mittelitalien geeignet sind, sowie *F. × ananassa* Asia, eine besonders resistente Sorte gegen Wurzelkrankheiten, ausgewählt. In ofen-, sonnen- und gefriergetrockneten Tomaten wurde in beiden Sorten beim Vergleich mit den jeweiligen frischen Proben eine signifikante Abnahme der Sola l 4-Menge festgestellt (Publikation I Abbildung 4). Die Abnahme des Fra a 1-Gehaltes in getrockneten Erdbeeren war verglichen zu frischen Früchten der Sorte Asia geringer als bei Tomaten, wobei dennoch signifikante Unterschiede ermittelt werden konnten (Publikation II Abbildung 3A). In Übereinstimmung mit nativen Allergenen zeigten auch die rekombinanten Proteine rSola l 4.02 und rFra a 1.02 Instabilität gegenüber Hitze (Publikation I Abbildung 2; Publikation II Abbildung 1). Durch den Trocknungsprozess im Ofen und in der Sonne und der damit verbundenen Hitzeeinwirkung werden Proteine denaturiert. Auch der damit einhergehende Wasserverlust, welcher ebenfalls bei der schonenden Gefrier Trocknungsmethode zur Erhaltung der Proteinstruktur ohne Einwirkung von Hitze auftritt, kann zu einer Instabilität der Proteine

führen. Bei der Herstellung des rekombinanten Sola l 4.02 konnte dieses Protein, im Gegensatz zu Fra a 1.02 und Pru d 1, nach dem Lyophilisieren nicht wieder in Lösung gebracht werden. Bei PR-10 Proteinen handelt es sich um intrazelluläre, lösliche zytosolische Proteine (Fernandes et al., 2013).

Für Tomaten der Sorte SAAB wurden im Jahr 2016 zum Teil signifikant höhere Sola l 4-Mengen detektiert als im Jahr 2015, wobei konventioneller bzw. ökologischer Anbau keine Auswirkungen zeigten und zwischen den drei Trocknungsmethoden ebenfalls keine wesentlichen Unterschiede erkennbar waren (Publikation I Abbildung 5A). Ofen- und sonnengetrocknete Perbruzzo-Tomaten zeigten 2016 höhere Sola l 4-Gehalte als im Jahr zuvor (Publikation I Abbildung 5B). Auch für diesen Genotyp war die Anbaubedingung für den PR-10 Gehalt nicht entscheidend. Im Jahr 2015 ergaben sich für Perbruzzo keine Unterschiede zwischen den Trocknungsmethoden, jedoch im darauffolgenden Jahr 2016.

In gefriergetrockneten Erdbeeren wurden ähnliche Fra a 1-Wert wie in frischen Asia-Früchten detektiert, wobei nur zwei von acht ofen- und sonnengetrockneten Asia-Proben signifikant niedrigere Mengen des PR-10 Proteins enthielten (Publikation II Abbildung 3A). Lyophilisierte Früchte zeigten weder Signifikanzen des Anbaus noch von saisonalen Einflüssen (Publikation II Abbildung 3B). Hingegen wurden für ofengetrocknete Proben jahresabhängige sowie kultivierungsbedingte Einflüsse festgestellt. Dagegen zeigten sonnengetrocknete Asia-Erdbeeren keine Effekte des Anbaus, jedoch saisonaler Unterschiede mit höheren Fra a 1-Menge im Jahr 2016. Auch für das PR-10 Protein aus Möhren Dau c 1 wurde festgestellt, dass die Anbaubedingung eher eine untergeordnete Rolle spielt und vielmehr die Sorte für die Allergenmenge entscheidend ist (Jansen et al., 2006). Die Sortenabhängigkeit des Gehaltes von PR-10 Proteinen konnte in der vorliegenden Arbeit für Tomaten, Erdbeeren, Pflaumen und Äpfel ebenfalls bestätigt werden.

Ökologischer und konventioneller Pflanzenanbau unterscheiden sich vor allem hinsichtlich der Anwendung von Pestiziden (Fungizide, Insektizide, Herbizide), der Düngemenge (Stickstoffeintrag) sowie der Produktionsmenge (Tabelle 3; Publikation II Supp. Table S2). Ökologisch erzeugte Lebensmittel enthalten verglichen zu Produkten aus konventionellem Anbau höhere Nährstoffwerte, verbesserte sensorische Qualität und gesundheitsfördernde bioaktive Komponenten (Słowianek et al., 2016; Ramakrishna & Ravishankar, 2011). Allerdings ist durch die geringe Düngemenge und den damit verbundenen Stickstoffeintrag ein geringerer Proteingehalt in ökologischen Produkten nachweisbar (Magkos et al., 2003). Jedoch ist die Pflanze im ökologischen Anbau vermehrt biotischen und abiotischen Stressfaktoren ausgesetzt, was zur gesteigerten Synthese von PR-10 Proteinen als Antwort auf Stressbedingungen führen kann (Agarwal & Agarwal, 2014). Pathogene, wie Pilze, können einen Anstieg von PR-10 Proteinen auslösen. Der arbuskuläre Mykorrhizapilz *Glomus mosseae* löst eine Induktion von Allergen-kodierenden Genen in Tomaten aus, welche jedoch nicht unbedingt mit einer erhöhten Allergenität einhergehen muss (Schwarz et al., 2011). Die Infektion der Pflaumensorte Veeblue mit dem Braunfäuleerreger *Monilinia fructicola* löst eine verstärkte Expression des *pr-10* Genes aus, welches für Pru d 1 kodiert (El-kereamy et al., 2009). Der Befall von Äpfeln durch *Erwinia amylovora*, Auslöser der Feuerbrandkrankheit von Kernobst der *Rosaceae*, führt zu einem Anstieg der Mal d 1 Proteinmenge (Mayer et al.). Auch durch den Schimmelpilz *Aureobasidium pullulans*, welcher als Antagonist zum

Feuerbrand-Erreger eingesetzt wird, wird bei Koinfektion ein Anstieg im Allergengehalt induziert. Ebenso wurde in Reis ein Anstieg in der Transkriptmenge eines *pr-10* Genes nach Infektion mit *Magnaporthe grisea* hervorgerufen (McGee et al., 2001). Allerdings kann auch die Applikation von Chemikalien als Stressfaktor angesehen werden und die Induktion von *pr*-Genen hervorrufen (Loon, 1983). Pestizide, eingesetzt in der konventionellen Produktion, können daher auch eine Reaktion in der Pflanze hervorrufen (Castro et al., 2005; Castro et al., 2008).

Wetterbedingungen wie Temperatur, Feuchtigkeit oder Trockenheit, die Bodenbeschaffenheit (Salzstress) oder das Licht beeinflussen das Wachstum der Pflanzen aber auch das Wachstum von Mikroorganismen und nehmen somit eine entscheidende Wirkung auf die Expression von *pr-10* Genen (Jain & Kumar, 2015). In Abhängigkeit vom Genotyp und von den Umwelteinflüssen, welche von Jahr zu Jahr schwanken können, kann sich die Zusammensetzung von Inhaltsstoffen, wie Vitamin C-Gehalt, Phenolen aber auch von Allergenen ändern (Tulipani et al., 2011). Vor allem in getrockneten Tomaten (SAAB, Perbruzzo) waren deutliche Unterschiede zwischen 2015 und 2016 erkennbar. Für die Anbauregion Monsampolo del Tronto zeigten die meteorologischen Daten, dass die durchschnittliche Temperatur in Jahr 2016 geringer war und zudem deutlich mehr Niederschlag gemessen wurde als im Jahr zuvor. Dies kann auch das Wachstum von Pilzen sowie anderen Pathogenen, vor denen sich die Pflanze schützen muss, beeinflussen. Jedoch müssten deutlich mehr Daten über mehrere Jahre gesammelt werden, um den Einfluss von Wetterbedingungen genauer zu analysieren. In der Erdbeersorte Asia waren geringe Unterschiede zwischen den Jahren festgestellt wurden. Auch das PR-10 Protein aus Mais (*Zea mays*) wird durch abiotische Stimuli wie Salizylsäure, Kupferchlorid, Kälte, Dunkelheit oder Verwundung beeinflusst (Xie et al., 2010).

Neben den genannten Faktoren nehmen auch das Reifestadium und die Lagerbedingungen von Früchten einen entscheidenden Einfluss auf den Gehalt an PR-10 Proteinen. Der Apfel ist neben der Haselnuss der Hauptauslöser von Kreuzreaktionen auf Birkenpollen (Eriksson et al., 2004; Geroldinger-Simic et al., 2011). Erst kürzlich wurde die dreidimensionale Proteinstruktur des Hauptallergens des Kulturapfels *M. domestica* aufgeklärt (Ahammer et al., 2017). Zahlreiche Studien belegen, dass der Mal d 1-Gehalt während der Lagerung der Früchte ansteigt (Hsieh et al., 1995; Sancho et al., 2006; Schmitz-Eiberger & Matthes, 2011; Kiewning et al., 2013a; Kiewning & Schmitz-Eiberger, 2014). Beeinflusst durch die Lagerzeit und Lagertemperatur sowie die atmosphärische Zusammensetzung von Kohlendioxid und Sauerstoff steigt der Allergengehalt von Äpfeln an. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um den Zusammenhang zwischen der Menge an PR-10 Proteinen in Tomaten, Erdbeeren und Pflaumen und der Reifung oder Lagerung genauer zu erforschen.

## 5 Schlussfolgerung & Ausblick

Vor allem in Nordeuropa reagieren Birkenpollenallergiker durch kreuzreagierende Antikörper, welche sich nach der primären Sensibilisierung mit Birkenpollen gebildet haben, häufig auch auf Allergene aus Früchten aus der Familie der *Rosaceae*, verschiedenen Gemüsearten und Nüssen (Vieths et al., 2002). Bislang sind allerdings nur einige Lebensmittelallergene strukturell und funktionell charakterisiert worden und Methoden zur Quantifizierung des Allergengehaltes nur für einige Nahrungsmittelallergene beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wurden die pflanzlichen PR-10 Allergene aus Erdbeere, Tomate und Pflaume untersucht. Fra a 1, Sola l 4 und Pru d 1 sind Homologe des Hauptallergens der Birkenpollen Bet v 1. Mit der Entwicklung von quantitativen Methoden zur Bestimmung des Allergengehaltes können Früchte- und Gemüsesorten analysiert und Genotypen mit geringem Allergengehalt identifiziert werden, sodass sich neue Ansätze für die Züchtung hypoallergener Sorten ergeben. Für die drei untersuchten Lebensmittel hat sich gezeigt, dass der Gehalt an Bet v 1-homologen Proteinen entscheidend von der Sorte abhängt und zum Teil stark variiert. Wie allerdings ein Allergiker ausgewählte Kultivare tolerieren würde, muss zukünftig durch Hautpricktests mit Extrakten und direkter Verkostung genauer untersucht werden. Basophile Aktivierungstests mit den rekombinanten Proteinen aber auch von ausgewählten Fruchtextrakten mit niedrigem PR-10 Gehalt könnten in *in vitro* Tests Aufschlüsse über das allergene Potential geben. Die Auswirkungen und Symptome einer allergischen Reaktion unterscheiden sich von Patient zu Patient, was der individuellen Antikörperspezifität auf verschiedene Allergenisoformen zuzuschreiben ist. Wie sich die Züchtungsergebnisse jedoch auf andere Qualitätsmerkmale, wie z.B. Gehalt sekundärer Metabolite oder den Geschmack auswirken, muss ebenfalls beachtet werden. Der Effekt der Anbaubedingung von Tomaten- und Erdbeerpflanzen auf den Sola l 4- bzw. Fra a 1-Gehalt war unwesentlich oder geringfügig. Vielmehr spielen saisonale Variationen eine wichtigere Rolle. Die rekombinanten Proteine rSola l 4.02 und Fra a 1.02 verhalten sich gegenüber thermischer Behandlung ähnlich, da verstärkte Hitzeeinwirkung zur Degradation der Proteine und zum Verlust der Antikörperbindungskapazität führt. Da der Proteinfamilie der Bet v 1-Homologen eine mögliche Rolle in der Bindung von Liganden in der durch die dreidimensionale Proteinstruktur geformten hydrophoben Tasche zugeschrieben wird, können Bindungsstudien weitere Einblicke in die mögliche Funktion dieser PR-10 Proteine geben.





## 6 Literaturverzeichnis

- Aaby, K., Mazur, S., Nes, A., & Skrede, G. (2012). Phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits: Composition in 27 cultivars and changes during ripening. *Food Chem*, *132*, 86-97.
- Afrin, S., Gasparri, M., Forbes-Hernandez, T. Y., Reboredo-Rodriguez, P., Mezzetti, B., Varela-López, A., Giampieri, F., & Battino, M. (2016). Promising health benefits of the strawberry: A focus on clinical studies. *J Agr Food Chem*, *64*, 4435-4449.
- Agarwal, P., & 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.
- Ahammer, L., Grutsch, S., Kamenik, A. S., Liedl, K. R., & Tollinger, M. (2017). Structure of the major apple allergen Mal d 1. *J Agr Food Chem*, *65*, 1606-1612.
- Akdis, M., & Akdis, C. A. (2014). Mechanisms of allergen-specific immunotherapy: Multiple suppressor factors at work in immune tolerance to allergens. *J Allergy Clin Immunol*, *133*(3), 621-631.
- Alm, R., Ekefjård, A., Krogh, M., Häkkinen, J., & Emanuelsson, C. (2007). Proteomic variation is as large within as between strawberry varieties. *J Proteome Res*, *6*, 3011-3020.
- Amlot, P. L., Kemeny, D. M., Zachary, C., Parkes, P., & Lessof, M. H. (1987). Oral allergy syndrome (OAS): Symptoms of IgE-mediated hypersensitivity to foods. *Clin Allergy*, *17*(1), 33-42.
- Andersen, M. B., Hall, S., & Dragsted, L. O. (2011). Identification of European allergy patterns to the allergen families PR-10, LTP, and profilin from *Rosaceae* fruits. *Clin Rev Allerg Immunol*, *41*(1), 4-19.
- Asam, C., Hofer, H., Wolf, M., Aglas, L., & Wallner, M. (2015). Tree pollen allergens - An update from a molecular perspective. *Allergy*, *70*(10), 1201-1211.
- Asero, R. (2013). Tomato allergy: Clinical features and usefulness of current routinely available diagnostic methods. *J Investig Allergol Clin Immunol*, *23*(1), 37-42.
- Asturias, J. A., Gómez-Bayón, N., Arilla, C., Martínez, A., Palacios, R., Sánchez-Gascón, F., & Martínez, J. (1999). Molecular characterization of American cockroach tropomyosin (*Periplaneta americana* allergen 7), a cross-reactive allergen. *J Immunol*, *162*(7), 4342-4348.
- Ausucua, M., Dublin, I., Echebarria, M. A., & Aguirre, J. M. (2009). Oral allergy syndrome (OAS). General and stomatological aspects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, *14*(11), e568-e572.
- Bai, X., Long, J., He, X., Li, S., & Xu, H. (2014). Molecular cloning and characterization of pathogenesis-related protein family 10 gene from spinach (*SoPR10*). *Biosci Biotechnol Biochem*, *78*(5), 780-786.
- Ballmer-Weber, B. K., Hoffmann, A., Wüthrich, B., Lüttkopf, D., Pompei, C., Wangorsch, A., Kästner, M., & Vieths, S. (2002). Influence of food processing on the allergenicity of celery: DBPCFC with celery spice and cooked celery in patients with celery allergy. *Allergy*, *57*(3), 228-235.
- Bantignies, B., Séguin, J., Muzac, I., Dédaldéchamp, F., Gulick, P., & Ibrahim, R. (2000). Direct evidence for ribonucleolytic activity of a PR-10-like protein from white lupin roots. *Plant Mol Biol*, *42*(6), 871-881.
- Barański, M., Średnicka-Tober, D., Volakakis, N., Seal, C., Sanderson, R., Stewart, G. B., Benbrook, C., Biavati, B., Markellou, E., Giotis, C., Gromadzka-Ostrowska, J., Rembiałkowska, E., Skwarło-Sońta, K., Tahvonen, R., Janovská, D., Niggli, U., Nicot, P., & Leifert, C. (2014). Higher antioxidant and lower cadmium concentrations and lower incidence of pesticide residues in organically grown crops: A systematic literature review and meta-analyses. *Br J Nutr*, *112*(5), 794-811.
- Basu, A., Rhone, M., & Lyons, T. J. (2010). Berries: Emerging impact on cardiovascular health. *Nutr Rev*, *68*(3), 168-177.
- Bauchet, G., & Causse, M. (2012). Genetic diversity in tomato (*Solanum lycopersicum*) and its wild relatives. In M. Çalişkan (Ed.), *Genetic diversity in plants*. (pp. 133-162). Vienne, AUT : IN-TECH Education and Publishing.
- Beckmann, J., & Reinke, D. (2014). Biodiversität von Kulturpflanzen: Über die Entstehung und heutige Bedeutung der Kulturpflanzenvielfalt. ProSpecieRara Deutschland gGmbH
- Berin, M. C. (2014). Future therapies for IgE-mediated food allergy. *Curr Pediatr Rep*, *2*(2), 119-126.
- Besler, M., Steinhart, H., & Paschke, A. (2001). Stability of food allergens and allergenicity of processed foods. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, *756*(1-2), 207-228.
- Björkstén, F., Halmepuro, L., Hannuksela, M., & Lahti, A. (1980). Extraction and properties of apple allergens. *Allergy*, *35*(8), 671-677.

- Bleumink, E., Berrens, L., & Young, E. (1966) Studies on the atopic allergen in ripe tomato fruits. I. Isolation and identification of the allergen. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 30(2), 132-45.
- Bohle, B. (2007). The impact of pollen-related food allergens on pollen allergy. *Allergy*, 62(1), 3-10.
- Bohle, B., Zwölfer, B., Heratizadeh, A., Jahn-Schmid, B., Antonia, Y. D., Alter, M., Keller, W., Zuidmeer, L., van Ree, R., Werfel, T., & Ebner, C. (2006). Cooking birch pollen-related food: Divergent consequences for IgE- and T cell-mediated reactivity *in vitro* and *in vivo*. *J Allergy Clin Immunol*, 118(1), 242-249.
- Bollen, M. A., Wichers, H. J., Helsper, J. P. F. G., Savelkoul, H. F. J., & van Boekel, M. A. J. S. (2010). Thermodynamic characterization of the PR-10 allergens Bet v 1, Api g 1 and Dau c 1 and pH-dependence of nApi g 1 and nDau c 1. *Food Chem*, 119(1), 241-248.
- Borges, J.-P., Barre, A., Culerrier, R., Granier, C., Didier, A., & Rougé, P. (2008). Lipid transfer proteins from *Rosaceae* fruits share consensus epitopes responsible for their IgE-binding cross-reactivity. *Biochem Biophys Res Commun*, 365(4), 685-690.
- Boyce, J. A., Assa'ad, A., Burks, A. W., Jones, S. M., Sampson, H. A., Wood, R. A., Plaut, M., Cooper, S. F., Fenton, M. J., Arshad, S. H., Bahna, S. L., Beck, L. A., Byrd-Bredbenner, C., Camargo, C. A., Eichenfield, L., Furuta, G. T., Hanifin, J. M., Jones, C., Kraft, M., Levy, B. D., Lieberman, P., Lucciolli, S., McCall, K. M., Schneider, L. C., Simon, R. A., Simons, F. E. R., Teach, S. J., Yawn, B. P., & Schwanger, J. M. (2011). Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: Summary of the NIAID-sponsored expert panel report. *Nutr Res*, 31(1), 61-75.
- Brandt, S., Pék, Z., Barna, É., Lugasi, A., & Helyes, L. (2006). Lycopene content and colour of ripening tomatoes as affected by environmental conditions. *J Sci Food Agric*, 86(4), 568-572.
- Bredemeijer, G. M. M., Cooke, R. J., Ganal, M. W., Peeters, R., Isaac, P., Noordijk, Y., Rendell, S., Jackson, J., Röder, M. S., Wendehake, K., Dijcks, M., Amelaine, M., Wickaert, V., Bertrand, L., & Vosman, B. (2002). Construction and testing of a microsatellite database containing more than 500 tomato varieties. *Theor Appl Genet*, 105(6-7), 1019-1026.
- Breiteneder, H., & Ebner, C. (2000). Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *J Allergy Clin Immunol*, 106(1 Pt 1), 27-36.
- Breiteneder, H., Pettenburger, K., Bito, A., Valenta, R., Kraft, D., Rumpold, H., Scheiner, O., & Breitenbach, M. (1989). The gene coding for the major birch pollen allergen Bet v 1, is highly homologous to a pea disease resistance response gene. *EMBO J*, 8(7), 1935-1938.
- Breiteneder, H. & Radauer, C. (2004). A classification of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol*, 113(5), 821-30.
- Brenna, O. V., Pastorello, E. A., Farioli, L., Pravettoni, V., & Pompei, C. (2004). Presence of allergenic proteins in different peach (*Prunus persica*) cultivars and dependence of their content on fruit ripening. *J Agric Food Chem*, 52(26), 7997-8000.
- Broide, D. H. (2001). Molecular and cellular mechanisms of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*, 108(2 Suppl), S65-S71.
- Bufe, A., Spangfort, M. D., Kahlert, H., Schlaak, M., & Becker, W.-M. (1996). The major birch pollen allergen, Bet v 1, shows ribonuclease activity. *Planta*, 199(3), 413-415.
- Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) (2018). Ökologischer Landbau in Deutschland.
- Burks, A. W., Tang, M., Sicherer, S., Muraro, A., Eigenmann, P. A., Ebisawa, M., Fiocchi, A., Chiang, W., Beyer, K., Wood, R., Hourihane, J., Jones, S. M., Lack, G., & Sampson, H. A. (2012). ICON: Food allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 129(4), 906-920.
- Casañal, A., Zander, U., Muñoz, C., Dupeux, F., Luque, I., Botella, M. A., Schwab, W., Valpuesta, V., & Marquez, J. A. (2013). The strawberry pathogenesis-related 10 (PR-10) Fra a proteins control flavonoid biosynthesis by binding to metabolic intermediates. *J Biol Chem*, 288(49), 35322-35332.
- Castro, A. J., Carapito, C., Zorn, N., Magné, C., Leize, E., van Dorsselaer, A., & Clément, C. (2005). Proteomic analysis of grapevine (*Vitis vinifera* L.) tissues subjected to herbicide stress. *J Exp Bot*, 56(421), 2783-2795.
- Castro, A. J., Saladin, G., Bézier, A., Mazeyrat-Gourbeyre, F., Baillieul, F., & Clément, C. (2008). The herbicide flumioxazin stimulates pathogenesis-related gene expression and enzyme activities in *Vitis vinifera*. *Physiol Plant*, 134(3), 453-463.
- Cavkaytar, O., Akdis, C. A., & Akdis, M. (2014). Modulation of immune responses by immunotherapy in allergic diseases. *Curr Opin Pharmacol*, 17, 30-37.
- Cebolla-Cornejo, J., Roselló, S., & Nuez, F. (2013). Phenotypic and genetic diversity of Spanish tomato landraces. *Sci Hort*, 162, 150-164.

- Chapman, M. D., Pomés, A., Breiteneder, H., & Ferreira, F. (2007). Nomenclature and structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol*, *119*(2), 414-420.
- Chapman, M. D., Smith, A. M., Vailes, L. D., Arruda, L. K., Dhanaraj, V., & Pomés, A. (2000). Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*, *106*(3), 409-418.
- Cieslewicz, G., Tomkinson, A., Adler, A., Duez, C., Schwarze, J., Takeda, K., Larson, K. A., Lee, J. J., Irvin, C. G., & Gelfand, E. W. (1999). The late, but not early, asthmatic response is dependent on IL-5 and correlates with eosinophil infiltration. *J Clin Invest*, *104*(3), 301-308.
- Constant, S., Pfeiffer, C., Woodard, A., Pasqualini, T., & Bottomly, K. (1995). Extent of T cell receptor ligation can determine the functional differentiation of naive CD4<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med*, *182*(5), 1591-1596.
- Darrow, G. M. (1966). *The Strawberry: History, Breeding and Physiology*. New York: Holt, Rinehart & Winston.
- Davis, P. J., & Williams, S. C. (1998). Protein modification by thermal processing. *Allergy*, *53*(46 Suppl), 102-105.
- Denépoux, S., Eibensteiner, P. B., Steinberger, P., Vrtala, S., Visco, V., Weyer, A., Kraft, D., Banchereau, J., Valenta, R., & Lebecque, S. (2000). Molecular characterization of human IgG monoclonal antibodies specific for the major birch pollen allergen Bet v 1. Antiallergen IgG can enhance the anaphylactic reaction. *FEBS Lett*, *465*(1), 39-46.
- Deng, C., & Davis, T. M. (2001). Molecular identification of the yellow fruit color (*c*) locus in diploid strawberry: A candidate gene approach. *Theor Appl Genet*, *103*(2-3), 316-322.
- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K. K., & Liu, R. H. (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J Agric Food Chem*, *50*(10), 3010-3014.
- Dölle, S., Lehmann, K., Schwarz, D., Weckwert, W., Scheler, C., George, E., Franken, P., & Worm, M. (2011a). Allergenic activity of different tomato cultivars in tomato allergic subjects. *Clin Exp Allergy*, *41*(11), 1643-1652.
- Dölle, S., Schwarz, D., Lehmann, K., Weckwerth, W., George, E., Worm, M., & Franken, P. (2011b). Tomato allergy: Impact of genotype and environmental factors on the biological response. *J Sci Food Agric*, *91*(12), 2234-2240.
- Dretzke, J., Meadows, A., Novielli, N., Huissoon, A., Fry-Smith, A., & Meads, C. (2013). Subcutaneous and sublingual immunotherapy for seasonal allergic rhinitis: A systematic review and indirect comparison. *J Allergy Clin Immunol*, *131*(5), 1361-1366.
- Dunwell, J.M., Khuri, S., & Gane, P.J. (2000). Microbial relatives of the seed storage proteins of higher plants: Conservation of structure and diversification of function during evolution of the cupin superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev*, *64*(1), 153-179.
- Ebner, C., Hirschwehr, R., Bauer, L., Breiteneder, H., Valenta, R., Ebner, H., Kraft, D., & Scheiner, O. (1995). Identification of allergens in fruits and vegetables: IgE cross-reactivities with the important birch pollen allergens Bet v 1 and Bet v 2 (birch profilin). *J Allergy Clin Immunol*, *95*(5 Pt 1), 962-969.
- Ebrahim, S., Usha, K., & Singh, B. (2011). Pathogenesis related (PR) proteins in plant defense mechanism. In A. Mendez-Vilas (Ed.), *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advance 2* (pp. 1043-1054). Badajoz, Spanien: Formatex Research Center.
- Edreva, A. (2005). Pathogenesis-related proteins: Research progress in the last 15 years. *Gen Appl Plant Physiology*, *31*(1-2), 105-124.
- El-kereamy, A., El-sharkawy, I., Ramamoorthy, R., Taheri, A., Errampalli, D., Kumar, P., & Jayasankar, S. (2011). *Prunus domestica* pathogenesis-related protein-5 activates the defense response pathway and enhances the resistance to fungal infection. *PLoS One*, *6*(3), e17973.
- El-kereamy, A., Jayasankar, S., Taheri, A., Errampalli, D., & Paliyath, G. (2009). Expression analysis of a plum pathogenesis related 10 (PR10) protein during brown rot infection. *Plant Cell Rep*, *28*(1), 95-102.
- Emmrich, J., & Liebe, S. (2011). Nahrungsmittelallergien. In *Der Gastroenterologe* (6: pp. 427-439). Heidelberg: Springer
- Erdmann, S. M., Sachs, B., Schmidt, A., Merk, H. F., Scheiner, O., Moll-Slodowy, S., Sauer, I., Kwiecien, R., Maderegger, B., & Hoffmann-Sommergruber, K. (2005). *In vitro* analysis of birch-pollen-associated food allergy by use of recombinant allergens in the basophil activation test. *Int Arch Allergy Immunol*, *136*(3), 230-238.

- Eriksson, N. E., Möller, C., Werner, S., Magnusson, J., Bengtsson, U., & Zolubas, M. (2004). Self-reported food hypersensitivity in Sweden, Denmark, Estonia, Lithuania, and Russia. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 14(1) 70-79.
- Europäisches Parlament und Rat der Europäischen Union (2011). *Verordnung (EU) Nr. 1169/2011 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 25. Oktober 2011 betreffend die Information der Verbraucher über Lebensmittel und zur Änderung der Verordnungen (EG) Nr. 1924/2006 und (EG) Nr. 1925/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates und zur Aufhebung der Richtlinie 87/250/EWG der Kommission, der Richtlinie 90/496/EWG des Rates, der Richtlinie 1999/10/EG der Kommission, der Richtlinie 2000/13/EG des Europäischen Parlaments und des Rates, der Richtlinien 2002/67/EG und 2008/5/EG der Kommission und der Verordnung (EG) Nr. 608/2004 der Kommission* Text von Bedeutung für den EWR.
- Fedorov, A. A., Ball, T., Mahoney, N. M., Valenta, R., & Almo S. C. (1997). The molecular basis for allergen cross-reactivity: Crystal structure and IgE-epitope mapping of birch pollen profiling. *Structure*, 5(1), 33-45.
- Fernandes, H., Michalska, K., Sikorski, M., & Jaskolski, M. (2013). Structural and functional aspects of PR-10 proteins. *FEBS J*, 280(5), 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., & 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. *J Exp Med*, 183(2), 599-609.
- Ferreira, F., Wolf, M., & Wallner, M. (2014). Molecular approach to allergy diagnosis and therapy. *Yonsei Med J*, 55(4), 839-852.
- Filipenko, E. A., Kochetov, A. V., Kanayama, Y., Malinovsky, V. I., & Shumny, V. K. (2013). PR-proteins with ribonuclease activity and plant resistance against pathogenic fungi. *Russ J Genet.: Applied Research*, 3(6), 474-480.
- Foetisch, K., Son, D. Y., Altmann, F., Aulepp, H., Conti, A., Hausteil, D., & Vieths, S. (2001). Tomato (*Lycopersicon esculentum*) allergens in pollen-allergic patients. *Eur Food Res Technol*, 213(4-5), 259-266.
- Forman, J., Silverstein, J., Committee on Nutrition, Council on Environmental Health, American Academy of Pediatrics. (2012). Organic foods: Health and environmental advantages and disadvantages. *Pediatrics*, 130(5), e1406-15.
- Franz-Oberdorf, K., Eberlein, B., Edelmann, K., Bleicher, P., Kurze, E., Helm, D., Olbricht, K., Darsow, U., Ring, J., & Schwab, W. (2017). White-fruited strawberry genotypes are not *per se* hypoallergenic. *Food Res Int*, 100(Pt 1), 748-756.
- Franz-Oberdorf, K., Eberlein, B., Edelmann, K., Hücherig, S., Besbes, F., Darsow, U., Ring, J., & 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(18), 3688-3696.
- Gajhede, M., Osmark, P., Poulsen, F. M., Ipsen, H., Larsen, J. N., van Neerven, R. J. J., Schou, C., Løwenstein, H., & Spangfort, M. D. (1996). X-ray and NMR structure of Bet v 1, the origin of birch pollen allergy. *Nat Struct Biol*, 3(12), 1040-1045.
- Gall, H., Kalveram, K.-J., Forck, G., & Sterry, W. (1994). Kiwi fruit allergy: A new birch pollen-associated food allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 94(1), 70-76.
- Galli, S. J., Tsai, M., & Piliponsky, A. M. (2008). The development of allergic inflammation. *Nature*, 454(7203), 445-454.
- Gell, P. G. H., & Coombs R. R. A. (1963). *Clinical Aspects of Immunology*. Oxford: Blackwell Scientific Publications Ltd.
- Gerber, A., & (2012). *Nachgefragt: 28 Antworten zum Stand des Wissens rund um Öko-Landbau und Bio-Lebensmittel*. Berlin: Bund Ökologische Lebensmittelwirtschaft e.V.
- Geroldinger-Simic, M., Zelniker, T., Aberer, W., Ebner, C., Egger, C., Greiderer, A., Prem, N., Lidholm, J., Ballmer-Weber, B. K., Vieths, S., & Bohle, B. (2011). Birch pollen-related food allergy: Clinical aspects and the role of allergen-specific IgE and IgG<sub>4</sub> antibodies. *J Allergy Clin Immunol*, 127(3), 616-622.e1.
- Gieras, A., Cejka, P., Blatt, K., Focke-Tejkl, M., Linhart, B., Flicker, S., Stoecklinger, A., Marth, K., Drescher, A., Thalhamer, J., Valent, P., Majdic, O., & Valenta, R. (2011). Mapping of conformational IgE epitopes with peptide-specific monoclonal antibodies reveals simultaneous binding of different

- IgE antibodies to a surface patch on the major birch pollen allergen, Bet v 1. *J Immunol*, 186(9), 5333-5344.
- Giovannucci, E. (1999). Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: Review of the epidemiologic literature. *J Natl Cancer Inst*, 91(4), 317-331.
- Gotoda, H., Maguchi, S., Kawahara, H., Terayama, Y., & Fukuda, S. (2001). Springtime pollinosis and oral allergy syndrome in Sapporo. *Auris Nasus Larynx*, 28, S49-S52.
- Gould, H. J., & Sutton, B. J. (2008). IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol*, 8(3), 205-217.
- Gruber, P., Vieths, S., Wangorsch, A., Nerkamp, J., & 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(12), 4002-4007.
- Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Théry, C., & Amigorena, S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 20, 621-667.
- Haurowitz, F. (1969) Struktur und Wirkungsweise der Antikörper. *Naturwissenschaften*, 56(4), 189-194.
- Hauser, M., Asam, C., Himly, M., Palazzo, P., Voltolini, S., Montanari, C., Briza, P., Bernardi, M. L., Mari, A., Ferreira, F., & Wallner, M. (2011). Bet v 1-like pollen allergens of multiple *Fagales* species can sensitize atopic individuals. *Clin Exp Allergy*, 41(12), 1804-1814.
- Hauser, M., Egger, M., Wallner, M., Wopfner, N., Schmidt, G., & Ferreira, F. (2008). Molecular properties of plant food allergens: A current classification into protein families. *Open Immunol J*, 1, 1-12.
- Heaton, S. (2001). *Organic farming, food quality and, human health and human health: A review of the evidence*. Soil Association.
- Hejgaard, J., Jacobsen, S., & Svendsen, I. (1991). Two antifungal thaumatinlike proteins from barley grain. *FEBS Lett*, 291(1), 127-131.
- Hjernø, K., Alm, R., Canbäck, B., Matthiesen, R., Trajkovski, K., Björk, L., Roepstorff, P., & Emanuelsson, C. (2006). Down-regulation of the strawberry Bet v 1-homologous allergen in concert with the flavonoid biosynthesis pathway in colorless strawberry mutant. *Proteomics*, 6(5), 1574-1587.
- Hoffmann-Sommergruber, K. (2000). Plant allergens and pathogenesis-related proteins: What do they have in common? *Int Arch Allergy Immunol*, 122(3), 155-166.
- Holzhauser, T., Stephan, O., & Vieths, S. (2002). Detection of potentially allergenic hazelnut (*Corylus avellana*) residues in food: A comparative study with DNA PCR-ELISA and protein sandwich-ELISA. *J Agric Food Chem*, 50(21), 5808-5815.
- Holzhauser, T., Wangorsch, A., & Vieths, S. (2000). Polymerase chain reaction (PCR) for detection of potentially allergenic hazelnut residues in complex food matrixes. *Eur Food Res Technol*, 211(5), 360-365.
- Hounsome, N., Hounsome, B., Tomos, D., & Edwards-Jones, G. (2008). Plant metabolites and nutritional quality of vegetables. *J Food Sci*, 73(4), R48-65.
- Hsieh, L.-S., Moos, M., & Lin, Y. (1995). Characterization of apple 18 and 31 kd allergens by microsequencing and evaluation of their content during storage and ripening. *J Allergy Clin Immunol*, 96(6 Pt 1), 960-970.
- Hummer, K. E., Bassil, N., & Njuguna, W. (2011). *Fragaria*. In C. Kole (Ed.), *Wild crop relatives: Genomic and breeding resources: Temperate fruits* (pp. 17-44). Berlin Heidelberg: Springer.
- Husslik, F., Hanschmann, K.-M., Krämer, A., Seutter von Loetzen, C., Schweimer, K., Bellinghausen, I., Treudler, R., Simon, J. C., Vogel, L., Völker, E., Randow, S., Reuter, A., Rösch, P., Vieths, S., Holzhauser, T., & Schiller, D. (2015). Folded or not? Tracking Bet v 1 conformation in recombinant allergen preparations. *PLoS One*, 10(7), e0132956.
- Hyun, T. K., & Kim, J.-S. (2011). Genomic identification of putative allergen genes in woodland strawberry (*Fragaria vesca*) and mandarin orange (*Citrus clementina*). *Plant Omics*, 4(7), 428-434.
- Igea, J. M. (2013). The history of the idea of allergy. *Allergy*, 68(8), 966-973.
- Ipsen, H., & Løwenstein, H. (1983). Isolation and immunochemical characterization of the major allergen of birch pollen (*Betula verrucosa*). *J Allergy Clin Immunol*, 72(2), 150-159.
- Ishibashi, M., Nabe, T., Nitta, Y., Tsuruta, H., Iduhara, M., & Uno, Y. (2018). Analysis of major paralogs encoding the *Fra a 1* allergen based on their organ-specificity in *Fragaria × ananassa*. *Plant Cell Rep*, 37(3), 411-424.
- Ivanciuc, O., Schein, C. H., & Braun, W. (2003). SDAP: Database and computational tools for allergenic proteins. *Nucleic Acids Res*, 31(1), 359-362.
- Jain, S., & Kumar, A. (2015). The pathogenesis related class 10 proteins in plant defense against biotic and abiotic stresses. *Adv Plants Agric Res*, 3(1), 00077.

- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. J. (2001). The structure of a typical antibody molecule. In Janeway, C. A. (Ed.), *Immunobiology: The immune system in health and disease* (pp. 93-122). New York: Garland Publication.
- Jansen, B., Dahl, L., Fötisch, K., Haneklaus, S., Zagon, J., Vieths, S., Holzhauser, T., & Broll, H. (2006). Vergleich der Qualität von Möhren aus ökologischem und konventionellem Anbau am Beispiel der Allergenität. In G. Rahmann (Ed.) *Ressortforschung für den Ökologischen Landbau 2006* (pp. 9-17). Braunschweig: Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft.
- Jenerowicz, D., Silny, W., Dańczak-Pazdrowska, A., Polańska, A., Osmola-Mańkowska, A., & Olek-Hrab, K. (2012). Environmental factors and allergic diseases. *Ann Agric Environ Med*, 19(3), 475-481.
- Jenkins, J. A., Griffiths-Jones, S., Shewry, P. R., Breiteneder, H., & Mills, E. N. C. (2005). Structural relatedness of plant food allergens with specific reference to cross-reactive allergens: An *in silico* analysis. *J Allergy Clin Immunol*, 115(1), 163-170.
- Johansson, S. G. O., Haahtela, T., Asher, I., Baena-Cagnani, C., Boner, A., Canonica, G. W., Chuchalin, A., Custovic, A., Dagi, E., Haus, M., Lemmo-Hoten, M., Holgate, S., Holloway, J., Holt, P., Host, A., Iikura, Y., Kaplan, A., Kowalski, M. L., Lockey, R. F., Naspitz, C., Odhiambo, J., Ring, J., Sastre, J., Venables, K., Vichyanond, P., Volovitz, B., Wahn, U., Warner, J., Weiss, K., & Zhong, N.-S. (2004). World allergy organization guidelines for prevention of allergy and allergic asthma. *Int Arch Allergy Immunol*, 135(1), 83-92.
- Kahlert, H., Suck, R., Weber, B., Nandy, A., Wald, M., Keller, W., Cromwell, O., & Fiebig, H. (2008). Characterization of a hypoallergenic recombinant Bet v 1 variant as a candidate for allergen-specific immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol*, 145(3), 193-206.
- Karamloo, F., Scheurer, S., Wangorsch, A., May, S., Haustein, D., & 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(1-2), 281-293.
- Karlsson, A. L., Alm, R., Ekstrand, B., Fjellkner-Modig, S., Schiött, A., Bengtsson, U., Bjork, L., Hjernø, K., Roepstorff, P., & Emanuelsson, C. S. (2004). Bet v 1 homologues in strawberry identified as IgE-binding proteins and presumptive allergens. *Allergy*, 59(12), 1277-1284.
- Kaufmann, S. H. E. (2012) *Basiswissen Immunologie*. Berlin: Springer
- Kaul, S., Scheurer, S., Danz, N., Schicktzanz, S., Vieths, S., & Hoffmann, A. (2003). Monoclonal IgE antibodies against birch pollen allergens: Novel tools for biological characterization and standardization of allergens. *J Allergy Clin Immunol*, 111(6), 1262-1268.
- Kay, A. B. (2001). Allergy and allergic diseases: First of two parts. *N Engl J Med*, 344(1), 30-37.
- Kiewning, D., Baab, G., & Schmitz-Eiberger, M. (2013a). Effect of 1-MCP treatment on the apple (*Malus domestica* L. Borkh.) allergen Mal d 1 during long-term storage. *LWT - Food Sci Technol*, 53(1), 198-203.
- Kiewning, D., & 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(4), 798-802.
- Kiewning, D., Wollseifen, R., & Schmitz-Eiberger, M. (2013b). The impact of catechin and epicatechin, total phenols and PPO activity on the Mal d 1 content in apple fruit. *Food Chem*, 140(1-2), 99-104.
- Kofler, S., Ackaert, C., Samonig, M., Asam, C., Briza, P., Horejs-Hoeck, J., Cabrele, C., Ferreira, F., Duschl, A., Huber, C., & Brandstetter, H. (2014). Stabilization of the dimeric birch pollen allergen Bet v 1 impacts its immunological properties. *J Biol Chem*, 289(1), 540-551.
- Kofler, S., Asam, C., Eckhard, U., Wallner, M., Ferreira, F., & 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(1), 109-123.
- Larché, M., Akdis, C. A., & Valenta, R. (2006). Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 6(10), 761-771.
- Larramendi, C. H., Ferrer, A., Huertas, A. J., García-Abujeta, J. L., Andreu, C., Tella, R., Cerdà, M. T., Bartra, J., Lavín, J. R., Pagán, J. A., López-Matas, M. A., Fernández-Caldas, E., & Carnés, J. (2008). Sensitization to tomato peel and pulp extracts in the Mediterranean coast of Spain: Prevalence and co-sensitization with aeroallergens. *Clin Exp Allergy*, 38(1), 169-177.
- Lascombe, M. B., Grégoire, C., Poncet, P., Tavares, G. A., Rosinski-Chupin, I., Rabillon, J., Goubran-Botros, H., Mazié, J. C., David, B., & Alzari, P. M. (2000). Crystal structure of the allergen Equ c 1. A dimeric lipocalin with restricted IgE-reactive epitopes. *J Biol Chem*, 275(28), 21572-21577.

- Lehmann, K., Schweimer, K., Reese, G., Randow, S., Suhr, M., Becker, W.-M., Vieths, S., & Rösch, P. (2006). Structure and stability of 2S albumin-type peanut allergens: Implications for the severity of peanut allergic reactions. *Biochem J*, 395(3), 463-472.
- Lepp, U. S., Ehlers, I., Erdmann, S., Fuchs, T., Henzgen, M., Kleine-Tebbe, J., Niggemann, B., Saloga, J., Vieluf, I., Vieths, S., Zuberbier, T., & Werfel, T. (2002). Therapiemöglichkeiten bei der IgE-vermittelten Nahrungsmittel-Allergie. *Allergo J*, 11(3), 156-162.
- Lilie, H., Schwarz, E., & Rudolph, R. (1998). Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr Opin Biotechnol*, 9(5), 497-501.
- Logemann, E., & Giebelmann, R. (2016). Nachtschattengewächse und Bitterstoffe. *Toxichem Krimtech*, 83(3), 149-155.
- Loon, L. C. von (1983). The induction of pathogenesis-related proteins by pathogens and specific chemicals. *Neth J Plant Path*, 89, 265-273.
- Lorenz, A.-R., Scheurer, S., Haustein, D., & Vieths, S. (2001). Recombinant food allergens. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 756(1-2), 255-279.
- Magkos, F., Arvaniti, F., & Zampelas, A. (2003). Organic food: Nutritious food or food for thought? A review of the evidence. *Int J Food Sci Nutr*, 54(5), 357-371.
- Maleki, S. J., Chung, S. Y., Champagne, E. T., & Raufman, J. P. (2000a). The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins. *J Allergy Clin Immunol*, 106(4), 763-768.
- Maleki, S. J., Kopper, R. A., Shin, D. S., Park, C.-W., Compadre, C. M., Sampson, H., Burks, A. W., & Bannon, G. A. (2000b). Structure of the major peanut allergen Ara h 1 may protect IgE-binding epitopes from degradation. *J Immunol*, 164(11), 5844-5849.
- Maleki, S. J., Viquez, O., Jacks, T., Dodo, H., Champagne, E. T., Chung, S.-Y., & Landry, S. J. (2003). The major peanut allergen, Ara h 2, functions as a trypsin inhibitor, and roasting enhances this function. *J Allergy Clin Immunol*, 112(1), 190-195.
- Mari, A., Ballmer-Weber, B. K., & Vieths, S. (2005). The oral allergy syndrome: Improved diagnostic and treatment methods. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 5(3), 267-273.
- Mari, A., Scala, E., Palazzo, P., Ridolfi, S., Zennaro, D., & Carabella, G. (2006). Bioinformatics applied to allergy: Allergen databases, from collecting sequence information to data integration. The Allergome platform as a model. *Cell Immunol*, 244(2), 97-100.
- Marković-Housley, Z., Degano, M., Lamba, D., Roepenack-Lahaye, E. von, Clemens, S., Susani, M., Ferreira, F., Scheiner, O., & 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(1), 123-133.
- Martín-Pedraza, L., González, M., Gómez, F., Blanca-López, N., Garrido-Arandia, M., Rodríguez, R., Torres, M. J., Blanca, M., Villalba, M., & Mayorga, C. (2016). Two nonspecific lipid transfer proteins (nsLTPs) from tomato seeds are associated to severe symptoms of tomato-allergic patients. *Mol Nutr Food Res*, 60(5), 1172-1182.
- Marzban, G., Mansfeld, A., Herndl, A., Jäger, S., Stoyanova, M. E., Hemmer, W., Katinger, H., & Laimer, M. (2006). Direct evidence for the presence of allergens in *Rosaceae* fruit tree pollen. *Aerobiologia*, 22(3), 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., & Laimer, M. (2005). Localisation and distribution of the major allergens in apple fruits. *Plant Sci*, 169(2), 387-394.
- Matthes, A., & 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(22), 10548-10553.
- Mayer, M., Oberhuber, C., Loncaric, I., Heissenberger, B., Keck, M., Scheiner, O., & Hoffmann-Sommergruber, K. (2006). Nachweis von stress-induzierbaren Allergenen in Äpfeln von Bäumen mit Feuerbrandinfektion.
- McClain, S. (2017). Bioinformatic screening and detection of allergen cross-reactive IgE-binding epitopes. *Mol Nutr Food Res*, 61(8), 1600676.
- McGee, J. D., Hamer, J. E., & Hodges, T. K. (2001). Characterization of a *PR-10* pathogenesis-related gene family induced in rice during infection with *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant Microbe Interact*, 14(7), 877-886.
- Moewius, J., Röhrig, P., Schaack, D., Rampold, C., Brzukalla, H.-J., Gottwald, F., Stein-Bachinger, K., Wolter, M., & Sanders, J. (2018). *Die Bio-Branche 2018: Zahlen, Daten & Fakten*. Berlin: Bund Ökologische Lebensmittelwirtschaft e. V. (BÖLW).

- Mogensen, J. E., Wimmer, R., Larsen, J. N., Spangfort, M. D., & Otzen, D. E. (2002). The major birch allergen, Bet v 1, shows affinity for a broad spectrum of physiological ligands. *J Biol Chem*, 277(26), 23684-23692.
- Mothes, N., Horak, F., & Valenta, R. (2004). Transition from a botanical to a molecular classification in tree pollen allergy: Implications for diagnosis and therapy. *Int Arch Allergy Immunol*, 135(4), 357-373.
- Mothes-Luksch, N., Raith, M., Stingl, G., Focke-Tejkl, M., Razzazi-Fazeli, E., Ziegelmayer, R., Wöhrle, S., & Swoboda, I. (2017). Pru p 3, a marker allergen for lipid transfer protein sensitization also in Central Europe. *Allergy*, 72(9), 1415-1418.
- Movérare, R., Westritschnig, K., Svensson, M., Hayek, B., Bende, M., Pauli, G., Sorva, R., Haahtela, T., Valenta, R., & Elfman, L. (2002). Different IgE reactivity profiles in birch pollen-sensitive patients from six European populations revealed by recombinant allergens: An imprint of local sensitization. *Int Arch Allergy Immunol*, 128(4), 325-335.
- Mubarak, A., Swinny, E. E., Ching, S. Y. L., Jacob, S. R., Lacey, K., Hodgson, J. M., Croft, K. D., & Considine, M. J. (2012a). Polyphenol composition of plum selections in relation to total antioxidant capacity. *J Agric Food Chem*, 60(41), 10256-10262.
- Müller, U., Lüttkopf, D., Hoffmann, A., Petersen, A., Becker, W. M., Schocker, F., Niggemann, B., Altmann, F., Kolarich, D., Hausteiner, D., & Vieths, S. (2000). Allergens in raw and roasted hazelnuts (*Corylus avellana*) and their cross-reactivity to pollen. *Eur Food Res Technol*, 212(1), 2-12.
- Muñoz, C., Hoffmann, T., Escobar, N. M., Ludemann, F., Botella, M. A., Valpuesta, V., & Schwab, W. (2010). The strawberry fruit Fra a allergen functions in flavonoid biosynthesis. *Mol Plant*, 3(1), 113-124.
- Musidlowska-Persson, A., Alm, R., & Emanuelsson, C. (2007). Cloning and sequencing of the Bet v 1-homologous allergen Fra a 1 in strawberry (*Fragaria ananassa*) shows the presence of an intron and little variability in amino acid sequence. *Mol Immunol*, 44(6), 1245-1252.
- Neudecker, P., Schweimer, K., Nerkamp, J., Scheurer, S., Vieths, S., Sticht, H., & Rösch, P. (2001). Allergic cross-reactivity made visible: Solution structure of the major cherry allergen Pru av 1. *J Biol Chem*, 276(25), 22756-22763.
- Neumüller, M. (2011). Fundamental and applied aspects of plum (*Prunus domestica*) breeding. *Fruit Veg Cereal Sci Biotech*, 5(1), 139-156.
- Niederberger, V., Niggemann, B., Kraft, D., Spitzauer, S., & Valenta, R. (2002). Evolution of IgM, IgE and IgG<sub>1-4</sub> antibody responses in early childhood monitored with recombinant allergen components: Implications for class switch mechanisms. *Eur J Immunol*, 32(2), 576-584.
- Nunes, C., Guyot, S., Marnet, N., Barros, A. S., Saraiva, J. A., Renard, C. M. G. C., & Coimbra, M. A. (2008). Characterization of plum procyanidins by thiolytic depolymerization. *J Agric Food Chem*, 56(13), 5188-5196.
- Ortolani, C., Ispano, M., Pastorello, E. A., Ansaloni, M. D., & Magri, M. D. (1989). Comparison of results of skin prick test (with fresh foods and commercial food extracts) and RAST in 100 patients with oral allergy syndrome. *J Allergy Clin Immunol*, 83(3), 683-690.
- Ortolani, C., & Pastorello, E. A. (2006). Food allergies and food intolerances. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 20(3), 467-483.
- Pastorello, E. A., Farioli, L., Pravettoni, V., Giuffrida, M. G., Ortolani, C., Fortunato, D., Trambaioli, C., Scibola, E., Calamari, A. M., Robino, A. M., & Conti, A. (2001). Characterization of the major allergen of plum as a lipid transfer protein. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 756(1-2), 95-103.
- Pastorello, E. A., Ortolani, C., Farioli, L., Pravettoni, V., Ispano, M., Borga, A., Bengtsson, A., Incorvaia, C., Berti, C., & Zanussi, C. (1994). Allergenic cross-reactivity among peach, apricot, plum, and cherry in patients with oral allergy syndrome: An *in vivo* and *in vitro* study. *J Allergy Clin Immunol*, 94(4), 699-707.
- Patiwael, J. A., Vullings, L. G. J., Jong, N. W. de, van Toorenenbergen, A. W., Gerth van Wijk, R., & Groot, H. de (2010). Occupational allergy in strawberry greenhouse workers. *Int Arch Allergy Immunol*, 152(1), 58-65.
- Pekar, J., Ret, D., & Untersmayr, E. (2018). Stability of allergens. *Mol Immunol*, 100, 14-20.
- Pomés, A., Davies, J. M., Gadermaier, G., Hilger, C., Holzhauser, T., Lidholm, J., Lopata, A. L., Mueller, G. A., Nandy, A., Radauer, C., Chan, S. K., Jappe, U., Kleine-Tebbe, J., Thomas, W. R., Chapman, M. D., van Hage, M., van Ree, R., Vieths, S., Raulf, M., & Goodman, R. E. (2018). WHO/IUIS allergen nomenclature: Providing a common language. *Mol Immunol*, 100, 3-13.



- Poms, R. E., Klein, C. L., & Anklam, E. (2004). Methods for allergen analysis in food: A review. *Food Addit Contam*, 21(1), 1-31.
- Popescu, F.-D. (2015). Cross-reactivity between aeroallergens and food allergens. *World J Methodol*, 5(2), 31-50.
- Pravettoni, V., Primavesi, L., Farioli, L., Brenna, O. V., Pompei, C., Conti, A., Scibilia, J., Piantanida, M., Mascheri, A., & Pastorello, E. A. (2009). Tomato Allergy: Detection of IgE-binding lipid transfer proteins in tomato derivatives and in fresh tomato peel, pulp, and seeds. *J Agric Food Chem*, 57(22), 10749-10754.
- Primavesi, L., Brenna, O. V., Pompei, C., Pravettoni, V., Farioli, L., & Pastorello, E. A. (2006). Influence of cultivar and processing on cherry (*Prunus avium*) allergenicity. *J Agric Food Chem*, 54(26), 9930-9935.
- Purohit, A., Niederberger, V., Kronqvist, M., Horak, F., Grönneberg, R., Suck, R., Weber, B., Fiebig, H., van Hage, M., Pauli, G., Valenta, R., & Cromwell, O. (2008). Clinical effects of immunotherapy with genetically modified recombinant birch pollen Bet v 1 derivatives. *Clin Exp Allergy*, 38(9), 1514-1525.
- Radauer, C., & Breiteneder, H. (2006). Pollen allergens are restricted to few protein families and show distinct patterns of species distribution. *J Allergy Clin Immunol*, 117(1), 141-147.
- Radauer, C., & Breiteneder, H. (2007). Evolutionary biology of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol*, 120(3), 518-525.
- Radauer, C., Bublin, M., Wagner, S., Mari, A., & Breiteneder, H. (2008). Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of biochemical functions. *J Allergy Clin Immunol*, 121(4), 847-852.e7.
- Radauer, C., Nandy, A., Ferreira, F., Goodman, R. E., Larsen, J. N., Lidholm, J., Pomés, A., Raulf-Heimsoth, M., Rozynek, P., Thomas, W. R., & Breiteneder, H. (2014). Update of the WHO/IUIS allergen nomenclature database based on analysis of allergen sequences. *Allergy*, 69(4), 413-419.
- Rahaman, T., Vasiljevic, T., & Ramchandran, L. (2016). Effect of processing on conformational changes of food proteins related to allergenicity. *Trends Food Sci Technol*, 49, 24-34.
- Ramakrishna, A., & Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signal Behav*, 6(11), 1720-1731.
- Renkonen, J., Mattila, P., Lehti, S., Mäkinen, J., Sormunen, R., Tervo, T., Paavonen, T., & Renkonen, R. (2009). Birch pollen allergen Bet v 1 binds to and is transported through conjunctival epithelium in allergic patients. *Allergy*, 64(6), 868-875.
- Richter, K., Kramarz, S., Niemann, B., Grossklaus, R., & Lampen, A. (2009). Schwellenwerte zur Allergenkennzeichnung von Lebensmitteln. *Expertengespräch im Rahmen der BMELV-Konferenz 2008 „Allergien: Bessere Information, höhere Lebensqualität“ am 15. Oktober 2008 in Berlin*.
- Rimbach, G., Nagursky, J., & Erbersdobler, H. F. (2015). *Lebensmittel-Warenkunde für Einsteiger*. Berlin Heidelberg: Springer.
- Röder, M., & Weber, W. (2016). Allergenanalytik. *Bundesgesundheitsbl*, 59, 889-899.
- Rodríguez, J., Crespo, J. F., Lopez-Rubio, A., la Cruz-Bertolo, J. de, Ferrando-Vivas, P., Vives, R., & Daroca, P. (2000). Clinical cross-reactivity among foods of the *Rosaceae* family. *J Allergy Clin Immunol*, 106(1 Pt 1), 183-189.
- Rodríguez, R., Villalba, M., Monsalve, R. I., & Batanero, E. (2001). The spectrum of olive pollen allergens. *Int Arch Allergy Immunol*, 125(3), 185-195.
- Romagnani, S. (2004). The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: Missing immune deviation, reduced immune suppression, or both? *Immunology*, 112(3), 352-363.
- Rudeschko, O., Fahlbusch, B., Henzgen, M., Schlenvoigt, G., Herrmann, D., Vieths, S., & Jäger, L. (1995). Investigation of the stability of apple allergen extracts. *Allergy*, 50(7), 575-580.
- Sampson, H. A. (2005). Food allergy - accurately identifying clinical reactivity. *Allergy*, 60 Suppl 79, 19-24.
- Sánchez-Monge, R., Lombardero, M., García-Sellés, F. J., Barber, D., & Salcedo, G. (1999). Lipid-transfer proteins are relevant allergens in fruit allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 103(3 Pt 1), 514-519.
- Sancho, A. I., Foxall, R., Browne, T., Dey, R., Zuidmeer, L., Marzban, G., Waldron, K. W., van Ree, R., Hoffmann-Sommergruber, K., Laimer, M., & Mills, E. N. C. (2006). Effect of postharvest storage on the expression of the apple allergen Mal d 1. *J Agric Food Chem*, 54(16), 5917-5923.
- Sancho, A. I., Rigby, N. M., Zuidmeer, L., Asero, R., Mistrello, G., Amato, S., González-Mancebo, E., Fernández-Rivas, M., van Ree, R., & Mills, E. N. C. (2005). The effect of thermal processing on the

- IgE reactivity of the non-specific lipid transfer protein from apple, Mal d 3. *Allergy*, 60(10), 1262-1268.
- Saraste, M., Sibbald, P. R., & Wittinghofer, A. (1990). The P-loop - a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci*, 15(11), 430-434.
- Sathe, S. K., Teuber, S. S., & Roux, K. H. (2005). Effects of food processing on the stability of food allergens. *Biotechnol Adv*, 23(6), 423-429.
- Schenk, M. F., Cordewener, J. H. G., America, A. H. P., van't Westende, W. P. C., Smulders, M. J. M., & Gilissen, L. J. W. 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), 1-15.
- Schenk, M. F., Gilissen, L. J. W. J., Esselink, G. D., & Smulders, M. J. M. (2006). Seven different genes encode a diverse mixture of isoforms of Bet v 1, the major birch pollen allergen. *BMC Genomics*, 7(168), 1-15.
- Schenk, S., Hoffmann-Sommergruber, K., Breiteneder, H., Ferreira, F., Fischer, G., Scheiner, O., Kraft, D., & Ebner, C. (1994). Four recombinant isoforms of *Cor a 1*, the major allergen of hazel pollen, show different reactivities with allergen-specific T-lymphocyte clones. *Eur J Biochem*, 224(2), 717-722.
- Scheurer, S., Lauer, I., Foetisch, K., San Miguel Moncin, M., Retzek, M., Hartz, C., Enrique, E., Lidholm, J., Cistero-Bahima, A., & Vieths, S. (2004). Strong allergenicity of Pru av 3, the lipid transfer protein from cherry, is related to high stability against thermal processing and digestion. *J Allergy Clin Immunol*, 114(4), 900-907.
- Schirmer, T., Hoffmann-Sommergrube, K., Susani, M., Breiteneder, H., & Marković-Housley, Z. (2005). Crystal structure of the major celery allergen Api g 1: Molecular analysis of cross-reactivity. *J Mol Biol*, 351(5), 1101-1109.
- Schmitz-Eiberger, M., & 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(4), 1459-1464.
- Schöll, I., Kalkura, N., Shedziankova, Y., Bergmann, A., Verdino, P., Knittelfelder, R., Kopp, T., Hantusch, B., Betzel, C., Dierks, K., Scheiner, O., Boltz-Nitulescu, G., Keller, W., & Jensen-Jarolim, E. (2005). Dimerization of the major birch pollen allergen Bet v 1 is important for its *in vivo* IgE-cross-linking potential in mice. *J Immunol*, 6645-6650.
- Schütt, C., & Bröker, B. (2011). *Grundwissen Immunologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Schwarz, D., Welter, S., George, E., Franken, P., Lehmann, K., Weckwerth, W., Dölle, S., & Worm, M. (2011). Impact of arbuscular mycorrhizal fungi on the allergenic potential of tomato. *Mycorrhiza*, 21(5), 341-349.
- Schweimer, K., Petersen, A., Suck, R., Becker, W.-M., Rösch, P., & Matecko, I. (2008). Solution structure of Phl p 3, a major allergen from timothy grass pollen. *Biol Chem*, 389(7), 919-923.
- Seeram, N. P., Adams, L. S., Zhang, Y., Lee, R., Sand, D., Scheuller, H. S., & Heber, D. (2006). Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells *in vitro*. *J Agric Food Chem*, 54(25), 9329-9339.
- Seutter von Loetzen, C., Hoffmann, T., Hartl, M. J., Schweimer, K., Schwab, W., Rösch, P., & Hartl-Spiegelhauer, O. (2014). Secret of the major birch pollen allergen Bet v 1: Identification of the physiological ligand. *Biochem J*, 457(3), 379-390.
- Seutter von Loetzen, C., Jacob, T., Hartl-Spiegelhauer, O., Vogel, L., Schiller, D., Spörlein-Güttler, C., Schobert, R., Vieths, S., Hartl, M. J., & Rösch, P. (2015). Ligand recognition of the major birch pollen allergen Bet v 1 is isoform dependent. *PLoS One*, 10(6), e0128677.
- Seutter von Loetzen, C., Schweimer, K., Schwab, W., Rösch, P., & Hartl-Spiegelhauer, O. (2012). Solution structure of the strawberry allergen Fra a 1. *Biosci Rep*, 32(6), 567-575.
- Shefcheck, K. J., & Musser, S. M. (2004). Confirmation of the allergenic peanut protein, Ara h 1, in a model food matrix using liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). *J Agric Food Chem*, 52(10), 2785-90.
- Sicherer, S. H., & Sampson, H. A. (2014). Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *J Allergy Clin Immunol*, 133(2), 291-307.e5.
- Singh, S. M., & Panda, A. K. (2005). Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng*, 99(4), 303-310.

- Sinha, M., Singh, R. P., Kushwaha, G. S., Iqbal, N., Singh, A., Kaushik, S., Kaur, P., Sharma, S., & Singh, T. P. (2014). Current overview of allergens of plant pathogenesis related protein families. *Sci World J*, 2014:543195, 1–19.
- Slimestad, R., Vangdal, E., & Brede, C. (2009). Analysis of phenolic compounds in six Norwegian plum cultivars (*Prunus domestica* L.). *J Agric Food Chem*, 57(23), 11370-11375.
- Słowianek, M., Skorupa, M., Hallmann, E., Rembiałkowska, E., & Leszczyńska, J. (2016). Allergenic potential of tomatoes cultivated in organic and conventional systems. *Plant Foods Hum Nutr*, 71(1), 35-41.
- Somkuti, J., Houska, M., & Smeller, L. (2011). Pressure and temperature stability of the main apple allergen Mal d1. *Eur Biophys J*, 40(2), 143-151.
- Son, D.Y., Scheurer, S., Hoffmann, A., Hausteiner, D., & 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(4), 201-215.
- Spiric, J., Engin, A. M., Karas, M., & Reuter, A. (2015). Quality control of biomedical allergen products - Highly complex isoallergen composition challenges standard MS database search and requires manual data analyses. *PLoS One*, 10(11), e0142404.
- Stephan, O., & Vieths, S. (2004). Development of a real-time PCR and a sandwich ELISA for detection of potentially allergenic trace amounts of peanut (*Arachis hypogaea*) in processed foods. *J Agric Food Chem*, 52(12), 3754-3760.
- Swoboda, I., Jilek, A., Ferreira, F., Engel, E., Hoffmann-Sommergruber, K., Scheiner, O., Kraft, D., Breiteneder, H., Pittenauer, E., Schmid, E., Vicente, O., Heberle-Bors, E., Ahorn, H., & Breitenbach, M. (1995). Isoforms of Bet v 1, the major birch pollen allergen, analyzed by liquid chromatography, mass spectrometry, and cDNA cloning. *J Biol Chem*, 270(6), 2607-2613.
- Tauscher, B., Brack, G., Flachowsky, G., Henning, M., Köpke, U., Meier-Ploeger, A., Münzig, K., Niggli, U., Rahmann, G., Willhöft, C., & Mayer-Miebach, E. (2003). *Bewertung von Lebensmitteln verschiedener Produktionsverfahren: Statusbericht 2003 Senatsarbeitsgruppe „Qualitative Bewertung von Lebensmitteln aus alternativer und konventioneller Produktion“*.
- Toda, M., Reese, G., Gadermaier, G., Schulten, V., Lauer, I., Egger, M., Briza, P., Randow, S., Wolfheimer, S., Kigongo, V., del Mar San Miguel Moncin, M., Fötisch, K., Bohle, B., Vieths, S., & Scheurer, S. (2011). Protein unfolding strongly modulates the allergenicity and immunogenicity of Pru p 3, the major peach allergen. *J Allergy Clin Immunol*, 128(5), 1022-30.e1-7.
- Treutter, D., Wang, D., Farag, M. A., Baires, G. D. A., Rühmann, S., & Neumüller, M. (2012). Diversity of phenolic profiles in the fruit skin of *Prunus domestica* plums and related species. *J Agric Food Chem*, 60(48), 12011-12019.
- Tscheppe, A., & Breiteneder, H. (2017). Recombinant allergens in structural biology, diagnosis, and immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol*, 172(4), 187-202.
- Tulipani, S., Marzban, G., Herndl, A., Laimer, M., Mezzetti, B., & Battino, M. (2011). Influence of environmental and genetic factors on health-related compounds in strawberry. *Food Chem*, 124(3), 906-913.
- Turner, H., & Kinet, J.-P. (1999). Signalling through the high-affinity IgE receptor FcεRI. *Nature*, 402(6760 Suppl), B24-30.
- Ulrich, D., Komes, D., Olbricht, K., & Hoberg, E. (2007). Diversity of aroma patterns in wild and cultivated *Fragaria* accessions. *Genet Resour Crop Evol*, 54, 1185-1196.
- Ulrich, D., & Olbricht, K. (2013). Diversity of volatile patterns in sixteen *Fragaria vesca* L. accessions in comparison to cultivars of *Fragaria ×ananassa*. *J Appl Bot Food Qual*, 86(1), 37-46.
- Valenta, R. (2002). The future of antigen-specific immunotherapy of allergy. *Nat Rev Immunol*, 2(6), 446-453.
- van Boekel, M., Fogliano, V., Pellegrini, N., Stanton, C., Scholz, G., Lalljie, S., Somoza, V., Knorr, D., Jasti, P. R., & Eisenbrand, G. (2010). A review on the beneficial aspects of food processing. *Mol Nutr Food Res*, 54(9), 1215-1247.
- van Boxtel, E. L., van Beers, M. M. C., Koppelman, S. J., van den Broek, L. A. M., & Gruppen, H. (2006). Allergen Ara h 1 occurs in peanuts as a large oligomer rather than as a trimer. *J Agric Food Chem*, 54(19), 7180-7186.
- van Hengel, A. J. (2007). Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers. *Anal Bioanal Chem*, 389(1), 111-118.
- Vassilopoulou, E. V., Zuidmeer, L., Akkerdaas, J., Rigby, N., Moreno, F. J., Papadopoulos, N. G., Saxoni-Papageorgiou, P., Mills, C., & van Ree, R. (2007). Optimized techniques for the extraction of

- grape allergens appropriate for *in vivo* and *in vitro* testing and diagnosis. *Mol Nutr Food Res*, 51(3), 360-366.
- Vegro, M., Eccher, G., Populin, F., Sorgato, C., Savazzini, F., Pagliarani, G., Tartarini, S., Pasini, G., Curioni, A., Antico, A., & 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(48), 9224-9236.
- Verdino, P., Westritschnig, K., Valenta, R., & Keller, W. (2002). The cross-reactive calcium-binding pollen allergen, Phl p 7, reveals a novel dimer assembly. *EMBO J*, 21(19), 5007-5016.
- 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., & Kimber, I. (2015). Food processing and allergenicity. *Food Chem Toxicol*, 80, 223-240.
- Vieths, S., Hoffmann, A., Holzhauser, T., Müller U, Reindl J, & Hausteiner, D. (1998). Factors influencing the quality of food extracts for *in vitro* and *in vivo* diagnosis. *Allergy*, 53(46 Suppl), 65-71.
- Vieths, S., Holzhauser, T., Erdmann, S., Fuchs, T., Henzgen, M., Kleine-Tebbe, J., Lepp, U., Niggemann, B., Raithel, M., Reese, I., Saloga, J., Vieluf, I., Zuberbier, T., & Werfel, T. (2006). Neue Deklarationspflicht für Nahrungsmittelallergene in Lebensmitteln. *Allergo J*, 15, 114-122.
- Vieths, S., Scheurer, S., & Ballmer-Weber, B. (2002). Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. *Ann NY Acad Sci*, 964, 47-68.
- Visco, V., Dolecek, C., Denépoux, S., Le Mao, J., Guret, C., Rousset, F., Guinnepain, M.-T., Kraft, D., Valenta, R., Weyer, A., Banchereau, J., & Lebecque, S. (1996). Human IgG monoclonal antibodies that modulate the binding of specific IgE to birch pollen Bet v 1. *J Immunol*, 157(2), 956-962.
- von Pirquet, C. (1906) Allergie. *Munch Med Wochenschr*, 53, 1457-1458
- Wagner, S., Radauer, C., Bublin, M., Hoffmann-Sommergruber, K., Kopp, T., Greisenegger, E. K., Vogel, L., Vieths, S., Scheiner, O., & Breiteneder, H. (2008). Naturally occurring hypoallergenic Bet v 1 isoforms fail to induce IgE responses in individuals with birch pollen allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 121(1), 246-252.
- Wangorsch, A., Jamin, A., Foetisch, K., Malczyk, A., Reuter, A., Vierecke, S., Schülke, S., Bartel, D., Mahler, V., Lidholm, J., Vieths, S., & Scheurer, S. (2015). Identification of Sola 14 as Bet v 1 homologous pathogenesis related-10 allergen in tomato fruits. *Mol Nutr Food Res*, 59(3), 582-592.
- Wen, J., Vanek-Kreibitz, M., Hoffmann-Sommergruber, K., Scheiner, O., & Breiteneder, H. (1997). The potential of Bet v 1 homologues, a nuclear multigene family, as phylogenetic markers in flowering plants. *Mol Phylogenet Evol*, 8(3), 317-333.
- Wensing, M., Akkerdaas, J. H., van Leeuwen, W. A., Stapel, S. O., Bruijnzeel-Koomen, C. A. F. M., Aalberse, R. C., Bast, B. J. E. G., Knulst, A. C., & van Ree, R. (2002). IgE to Bet v 1 and profilin: Cross-reactivity patterns and clinical relevance. *J Allergy Clin Immunol*, 110(3), 435-442.
- Wigotzki, M., Steinhart, H., & Paschke, A. (2010). Influence of varieties, storage and heat treatment on IgE-binding proteins in hazelnuts (*Corylus avellana*). *Food Agric Immunol*, 12(3), 217-229.
- Wills-Karp, M., Santeliz, J., & Karp, C. L. (2001). The germless theory of allergic disease: Revisiting the hygiene hypothesis. *Nat Rev Immunol*, 1(1), 69-75.
- Wood, R. A., Sicherer, S. H., Burks, A. W., Grishin, A., Henning, A. K., Lindblad, R., Stablein, D., & Sampson, H. A. (2013). A phase 1 study of heat/phenol-killed, *E. coli*-encapsulated, recombinant modified peanut proteins Ara h 1, Ara h 2, and Ara h 3 (EMP-123) for the treatment of peanut allergy. *Allergy*, 68(6), 803-808.
- Wurm, D. J., Quehenberger, J., Mildner, J., Eggenreich, B., Slouka, C., Schwaighofer, A., Wieland, K., Lendl, B., Rajamanickam, V., Herwig, C., & Spadiut, O. (2018). Teaching an old pET new tricks: Tuning of inclusion body formation and properties by a mixed feed system in *E. coli*. *App Microbiol Biotechnol*, 102(2), 667-676.
- Xie, Y.-R., Chen, Z.-Y., Brown, R. L., & Bhatnagar, D. (2010). Expression and functional characterization of two pathogenesis-related protein 10 genes from *Zea mays*. *J Plant Physiol*, 167(2), 121-130.
- Zhou, W., Zhang, F., & Aune, A. M. (2003). Either IL-2 or IL-12 is sufficient to direct Th1 differentiation by nonobese diabetic T cells. *J Immunol*, 170(2), 735-40.
- Zhuang, Y., & Dreskin, S. C. (2013). Redefining the major peanut allergens. *Immunol. Res*, 55(1-3), 125-134.
- Zuidmeer, L., Salentijn, E., Rivas, M. F., Mancebo, E. G., Asero, R., Matos, C. I., Pelgrom, K.T.B., Gilissen, L., & van Ree, R. (2006). The role of profilin and lipid transfer protein in strawberry allergy in the Mediterranean area. *Clin Exp Allergy*, 36(5), 666-675.

## 7 Publikationen

### 7.1 Publikation I

**Kurze, Elisabeth;** Lo Scalzo, Roberto; Campanelli, Gabrielle; Schwab, Wilfried (2018) Effect of tomato variety, cultivation, climate and processing on Sola l 4, an allergen from *Solanum lycopersicum*. *PLoS One*, 13(6): e0197971.

Die Klonierung sowie die Expressions- und Reinigungsstrategie für das rekombinante Sola l 4.02 Protein wurden von mir entworfen und experimentell durchgeführt. Ebenso wurde von mir die Methodenentwicklung zur Optimierung der Proteinextraktion aus Tomaten, die Etablierung des indirekten kompetitiven ELISA sowie die Messung aller Tomatenproben durchgeführt und ausgewertet. Das Manuskript wurde von mir, Wilfried Schwab und Roberto Lo Scalzo verfasst.

Tomaten (*S. lycopersicum*) zählen weltweit zu den am häufigsten konsumierten Gemüsesorten. Neben gesundheitsfördernden Inhaltsstoffen kann der Verzehr von Tomaten auch allergische Reaktionen auslösen. Aufgrund der homologen Proteinstrukturen des Tomatenallergens Sola l 4 und des Hauptbirkenpollenallergens Bet v 1 reagieren Patienten mit Birkenpollenallergien häufig auf allergene Proteine aus Tomaten. Dieses Phänomen wird als Kreuzreaktivität beschrieben.

Ziel der Studie war die Quantifizierung des Allergens Sola l 4 in verschiedenen Tomatensorten mittels indirektem kompetitivem ELISA unter Verwendung eines spezifischen polyklonalen Antikörpers. Der Einfluss des Genotyps mit dem Ziel, Kultivare mit einem reduzierten Allergengehalt zu identifizieren, sollte untersucht werden. Zusätzlich wurden die Sorten Perbruzzo und SAAB, angebaut in Italien unter konventionellen oder ökologischen Bedingungen und anschließender Trocknung, analysiert. Der Einfluss von Anbau sowie der Verarbeitungstechnik wurde untersucht.

Unter den 23 untersuchten Sorten variierte der Sola l 4-Gehalt signifikant zwischen 0,24 und 1,71 µg Sola l 4/g FW. Rugantino und Rhianna zeigten einen niedrigen Gehalt, während die Sorten Farbini und Bambello die höchsten Mengen an Sola l 4 enthielten. Die Farbe der Früchte korrelierte nicht mit der Allergenmenge. Das Trocknen von Tomaten im Ofen und in der Sonne führte zu einer deutlichen Verringerung des Sola l 4-Gehaltes. Auch in Früchten, welche gefriergetrocknet wurden, zeigte sich ein ähnlich niedriger Gehalt. Die Instabilität gegenüber Hitze konnte für das rekombinante Protein Sola l 4.02 bestätigt werden.

Der Sola l 4-Gehalt ist von der Sorte abhängig, wobei keine Korrelation zwischen der Fruchtfarbe und Sola l 4-Menge gefunden wurde. Weiterhin wurde während des Trocknungsprozesses von Tomaten aufgrund der thermischer Instabilität eine signifikante Reduktion festgestellt, welches möglicherweise auch auf den Verlust von Wasser zurückzuführen war. Die Anbauart, konventionell oder ökologisch, hatten einen geringen Einfluss, während saisonale Schwankungen von Jahr zu Jahr eine stärkere Auswirkung zeigten.

## 7.2 Publikation II

**Kurze, Elisabeth;** Kock, Vanessa; Lo Scalzo, Roberto; Olbricht, Klaus; Schwab, Wilfried (2018) Effect of the Strawberry Genotype, Cultivation and Processing on the Fra a 1 Allergen Content. *Nutrients*, 10(7), pii: E857.

Die Klonierung des Fra a 1.02 Konstruktes wurde von Katrin Franz-Oberdorf durchgeführt, wobei die Expressions- und Reinigungsstrategie für das rekombinante Fra a 1.02 Protein von mir optimiert und experimentell durchgeführt wurde. Unter der Anleitung und Absprache des experimentellen Ablaufes mit mir führte Vanessa Kock die Optimierung der Proteinextraktionsmethode, die Entwicklung der ELISA Methode sowie die Quantifizierung des Fra a 1 Gehaltes aller Erdbeerproben durch. Die statistische Auswertung und die Erstellung aller Abbildungen wurde von mir übernommen. Das Manuskript wurde von mir, Wilfried Schwab, Roberto Lo Scalzo und Klaus Olbricht verfasst.

Weltweit wird Beerenobst in frischer oder in verarbeiteter Form in zahlreichen Lebensmittelprodukten konsumiert und stellt eine wichtige Quelle für essentielle Nährstoffe und sekundäre Pflanzenstoffe dar. Insbesondere Erdbeeren (*F. × ananassa*), die zur Gruppe der Rosengewächse gehören, enthalten einen hohen Gehalt an Folat, Vitamin C und phenolischen Verbindungen wie Anthocyanen, Flavonolen, Flavanolen und Ellagitanninen. Neben ihren gesundheitsfördernden Wirkungen, z.B. das Risiko von Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Krebs zu senken, enthalten Erdbeerfrüchte auch Proteine, die Lebensmittelallergien auslösen. Patienten, die allergische Reaktionen auf Birkenpollen zeigen, entwickeln häufig auch Kreuzreaktivitäten mit Früchten aus der Familie der Rosengewächse, darunter Äpfel, Pfirsich oder Erdbeeren.

Ziel der Studie war es, den Gehalt von Fra a 1, ein Bet v 1-homologes Proteins in Erdbeeren, mittels indirektem kompetitiven ELISA zu quantifizieren und den Einfluss von Genotyp, Kultivierung und Lebensmittelverarbeitung auf den Allergengehalt zu bestimmen. Unter Verwendung eines spezifischen polyklonalen anti-Fra a 1.02-Antikörpers wurde ein ELISA etabliert und Fra a 1 in verschiedenen Proben untersucht. Von der Erdbeersorte Asia, welche unter konventionellen und ökologischen Bedingungen in Italien angebaut wurden, wurden schließlich reife Früchte mit verschiedenen Methoden getrocknet und ebenfalls hinsichtlich ihres Fra a 1-Gehaltes analysiert.

Untersuchungen von 20 verschiedenen *Fragaria* Arten und Sorten zeigten eine hohe Variabilität des Fra a 1-Gehaltes im Bereich von 0,67 bis 3,97 µg Fra a 1/g FW. Reife Früchte von rot-, weiß- und gelbfruchtigen Erdbeergenotypen wiesen ähnliche Fra a 1-Konzentrationen auf. Im Vergleich zu frischen Erdbeeren enthielten ofen- und sonnengetrocknete Früchte aufgrund der thermischen Behandlung während der Verarbeitung etwas geringere Anteile. SDS-PAGE- und Western Blot-Analysen zeigten den Abbau von rekombinantem Fra a 1.02 nach längerer (> 10 min) Wärmebehandlung bei 99 ° C. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Genotyp die Fra a 1-Menge in Erdbeeren stark bestimmt und die Farbe der reifen Früchte nicht von der Menge des PR10-Proteins abhängt. Kultivierungsbedingungen (ökologische und konventionelle Landwirtschaft) haben keinen Einfluss.

### 7.3 Publikation III

Picchi, Valentina; Lo Scalzo, Roberto; **Kurze, Elisabeth**; Fibiani, Marta; Vangdal, Eivind; Schwab, Wilfried (2018) Impact of year of harvest, genotype and cultivation method on bioactives and Pru d 1 allergen content in plums. (*eingereicht beim International Journal of Food Sciences and Nutrition*)

Die Arbeit entstand in Kooperation mit Eivind Vangdal (Kultivierung und Ernte der Pflaumen), Valentina Picci, Roberto Lo Scalzo und Marta Fibiani, welche den experimentellen Teil zur Analyse der Qualitätsparameter Polyphenolgehalt, Phenoloxidaseaktivität, Ascorbinsäuregehalt und antioxidative Kapazität durchführten. Die Klonierung, die Expressions- und Reinigungsstrategie für das rekombinante Pru d 1 Protein, die Methodenentwicklung zur Optimierung der Proteinextraktion aus Pflaumen sowie die Etablierung des indirekten kompetitiven ELISA und Analyse der Pflaumenproben wurden von mir entworfen und experimentell durchgeführt. Das Manuskript wurde gemeinsam von Valentina Picchi, Roberto Lo Scalzo, mir, Marta Fibiani, Eivind Vangdal und Wilfried Schwab geschrieben.

Pflaumen (*P. domestica*) enthalten neben Vitamin C einen hohen Gehalt an Polyphenolen und sind gerade deshalb für die Gesundheit von Bedeutung. Dennoch stellen diese Früchte auch eine Quelle pflanzlicher Allergene dar, welche in betroffenen Patienten mit einer Birkenpollenallergie durch Kreuzreaktionen von Bet v 1 und Pru d 1 Symptome wie das OAS auslösen können.

In der Studie wurde der Einfluss des Erntejahres, des Genotyps sowie der Anbaubedingung auf die Qualität in Bezug auf Polyphenolgehalt, Polyphenoloxidaseaktivität, antioxidative Kapazität und den Allergengehalt von drei Pflaumensorten Jubileum, Reeves und Victoria untersucht.

Die Qualitätsparameter und der phytochemische Gehalt (Neochlorogensäure, Chlorogensäure, Rutin, Anthocyane, Gesamtgehalt an Polyphenolen) variierten stark mit dem Jahr und waren von der jeweiligen Pflaumensorte abhängig. Das Kultivierungssystem hatte einen geringen Einfluss auf die jeweiligen Gehalte. Vor allem der Gehalt an Ascorbinsäure nahm 2016 gegenüber 2015 stark ab, während die Menge an Polyphenolen im Jahr 2016 für alle drei Kultivare signifikant höher waren. Zudem konnte eine Korrelation mit der antioxidativen Kapazität festgestellt werden. Mit der Entwicklung eines indirekten kompetitiven ELISA zur Detektion des PR-10 Proteins Pru d 1 in Pflaumen konnte der Gehalt des Bet v 1-Homologen durch Verwendung eines spezifischen polyklonalen Pru d 1-Antikörpers quantifiziert werden. Die Menge an Pru d 1 variierte zwischen den Sorten, unterschied sich vor allem zwischen den beiden Anbaujahren und war zum Teil von der Anbaubedingung abhängig. Weiterhin stand der Allergengehalt mit dem Gehalt an Flavan-3-olen in Verbindung, was darauf hindeutete, dass diese Klasse von Phenolen einen entscheidenden Einfluss auf den Allergengehalt von Pflaumen zu nehmen scheint. Die Ergebnisse zeigten, dass die Hauptfaktoren, welche den Gehalt an phenolischen Verbindungen und anderen Inhaltsstoffen, wie Vitamin C und Pru d 1, beeinflussen, zum einen der Genotyp und zum anderen jahresabhängige Unterschiede sind. Das Kultivierungssystem spielt dabei eine geringere Rolle.





## **Anhang I - Publikationen**

### **Publikation I**

**Kurze, Elisabeth;** Lo Scalzo, Roberto; Campanelli, Gabrielle; Schwab, Wilfried (2018) Effect of tomato variety, cultivation, climate and processing on Sola l 4, an allergen from *Solanum lycopersicum*. *PLoS One*, 13(6): e0197971.



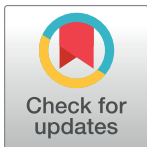
RESEARCH ARTICLE

# Effect of tomato variety, cultivation, climate and processing on Sola I 4, an allergen from *Solanum lycopersicum*

Elisabeth Kurze<sup>1</sup>, Roberto Lo Scalzo<sup>2</sup>, Gabriele Campanelli<sup>2</sup>, Wilfried Schwab<sup>1\*</sup>

**1** Biotechnology of Natural Products, Technische Universität München, Freising, Germany, **2** Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, Unità di ricerca per i processi dell'industria agroalimentare (CREA-IT), Milan, Italy

\* [wilfried.schwab@tum.de](mailto:wilfried.schwab@tum.de)



**OPEN ACCESS**

**Citation:** Kurze E, Lo Scalzo R, Campanelli G, Schwab W (2018) Effect of tomato variety, cultivation, climate and processing on Sola I 4, an allergen from *Solanum lycopersicum*. PLoS ONE 13(6): e0197971. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197971>

**Editor:** Hsin-Chih Lai, Chang Gung University, TAIWAN

**Received:** March 25, 2018

**Accepted:** May 13, 2018

**Published:** June 14, 2018

**Copyright:** © 2018 Kurze et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was supported by Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) (<https://www.ble.de>) "FaVOR-DeNonDe: Drying, Juices and Jams of Organic Fruit and Vegetables: What happens to Desired and Non-Desired compounds?" (project number 140E008).

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Abstract

Tomatoes (*Solanum lycopersicum*) are one of the most consumed vegetables worldwide. However, tomato allergies in patients suffering from birch pollen allergy occur frequently. Due to highly similar protein structures of the tomato allergen Sola I 4 and the major birch pollen allergen Bet v 1, patients cross-react with allergenic proteins from tomato as well as other fruits or vegetables. The aim of this study was to quantify Sola I 4 in various tomatoes differing in color, size and shape for identification of varieties with a reduced allergen level. Therefore, an indirect competitive ELISA using a specific polyclonal Sola I 4 antibody was developed. In addition, two varieties, both cultivated either conventionally or organically and furthermore dried with different methods, were analyzed to investigate the influence of the cultivation method and processing techniques on Sola I 4 level. Within 23 varieties, Sola I 4 content varied significantly between 0.24 and 1.71 µg Sola I 4/g FW. The tomato cultivars Rugantino and Rhianna showed the significantly lowest level, whereas in cultivars Farbini and Bambello the significantly highest concentration was determined. Drying of tomatoes in the oven and by sun resulted in a significant decrease. The thermal instability was verified for the recombinant Sola I 4 emphasizing the results for the native protein in dried tomato samples. Overall, the Sola I 4 content is cultivar-dependent and no correlation between color and Sola I 4 amount was found. During the drying process of tomatoes Sola I 4 level was significantly reduced due to thermal instability. Growing conditions have a minor effect whereas seasonal effects show a more pronounced impact. These findings could extend the knowledge about the allergen level of different tomato varieties and may help to improve food safety to potentially increase the life quality of patients suffering from birch pollen allergy.

## Introduction

Tomato (*Solanum lycopersicum*) is the most commonly grown and consumed vegetable worldwide [1]. Due to its high content of lycopene and β-carotene, acting as antioxidants and free

radical scavenger, tomato is beneficial to health decreasing the risk of cancer and cardiovascular diseases [2]. On the other hand, the consumption of tomatoes can provoke allergic reactions attributed to the presence of various allergenic proteins [3]. The prevalence of food allergy increased during the last decades affecting 3–4% of the adult population and 5% of children [4]. Due to varying geographical distribution of specific pollen allergens as well as local dietary habits, geographical diversities in sensitizations patterns between patients suffering from food allergies occur [5].

A wide range of allergens from plant origin belongs to the pathogenesis-related proteins comprising 17 different protein families [6]. Induced in plants by various stress conditions these proteins are part of the defense response system. Pathogens such as viruses, bacteria or fungi, application of harsh chemicals (herbicides, fungicides), wounding or diverse environmental changes (dryness, UV light) evoke the expression of PR-genes and the synthesis of PR-proteins. The widespread occurrence and the conservation of the PR-10 protein family within the plant kingdom emphasize an important role of this family [7]. The major birch pollen allergen Bet v 1 as well as homologous plant food allergens from *Rosaceae* such as apple (Mal d 1), peach (Pru p 1), cherry (Pru av 1) or strawberry (Fra a 1) belong to the group of intracellular PR-10 proteins with a molecular weight of 16–18 kDa [8]. The presence of a hydrophobic cavity indicates a potential role in binding nonpolar molecules. Many PR-10 proteins share about 50% of amino acid sequence identity [9]. However, cross-reactivity occurs due to the high three-dimensional structure similarity. IgE antibodies recognize similar cross-reactive conformational allergen epitopes of different plant sources [6].

Tomatoes are common sources of plant food allergens [10]. Approximately 1.5% of the population in Northern Europe [11] and up to 16% in Italy [12] is affected by allergy towards tomato. Symptoms of an immunological reaction to tomato can affect the skin (urticarial or dermatitis) but can also lead to oral allergy syndrome, rhinitis or abdominal pain [13]. Food allergies are associated with a reduced life quality and excluding specific fruits or vegetables from the daily diet. People with food allergies against PR-10 homologous allergens develop symptoms after consumption of fresh fruits. On the contrary, processed products can be tolerated [5].

Currently, 26 potential proteins from tomato have been reported to provoke allergenic reactions, including different isoforms (<http://www.allergome.org>). Recently, two isoforms of the pathogenesis-related (PR) protein Sola l 4.01 and Sola l 4.02, homologous proteins to Bet v 1, the major birch pollen allergen from *Betula verrucosa*, have been identified [14]. Bet v 1.0101 (Acc. No. X15877, UniProt P15494) and the homologous proteins Sola l 4.01 (Acc. No. KF682291) and Sola l 4.02 (Acc. No. KF682292, UniProt K4CWC4) from tomato share 44.0 and 42.5% amino acid identity, respectively [14].

It has been shown that the allergenic potential of tomatoes is rather dependent on the cultivar and the developmental stages than environmental cultivation conditions [5]. Since numerous tomato cultivars are available, it might be possible that the concentration of Sola l 4 in some genotypes is sufficiently low, so that patients suffering from birch-pollen related tomato allergy can tolerate these.

Therefore, the aim of this study was to develop an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method to quantify Sola l 4 in various tomato cultivars with a specific polyclonal antibody. To analyze a wide range, varieties differing in size, shape and color were chosen. Furthermore, the influence of cultivation conditions (organic vs. conventional) as well as different processing methods (solar, oven and freeze-drying of tomato fruits) on the Sola l 4 content was investigated. It was hypothesized that the Sola l 4 content varies with the color of the mature fruits, the growing condition and the processing method. The results of this study

could help to identify tomato fruits with a reduced allergen level to further improve food safety and life quality of birch pollen allergenic patients.

## Material and methods

### Chemicals

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany), Merck (Darmstadt, Germany) and Roth (Karlsruhe, Germany) unless otherwise noted.

### Plant material

Twenty-three different tomato varieties differing in color, size and shape (S1 Table) were provided by garden center Böck (Neufarn, Munich, Germany) and grown in the green house under equal temperature, light and water conditions. Fruits were harvested in July 2017 at full maturity (day post anthesis 40–45) of healthy plants without visible symptoms of pathogen infestation and stored at -20 °C until analysis. In the years 2015 and 2016, a local tomato cultivar SAAB and a commercial hybrid HF1 Perbruzzo were cultivated either conventionally or with two types of organic growing in the experimental field of CREA-OF (lat. 42° 53' N, long. 13° 48' E) in Central Italy Monsampolo del Tronto, Marche Region. Conventional cultivation soil was tilled and harrowed using Mater-Bi as artificially mulch (conv). Organic farming soil was coated with hairy vetch (*Vicia villosa* R.) and mulched either artificially with Mater-Bi (org) or naturally (norg) with mulch film out of lodged vetch. Fruits were harvested at full maturity in August 2015 and 2016.

### RNA isolation and cloning of Sola l 4.02

Commercially available tomatoes (cultivar Lyterno) were frozen in liquid nitrogen and homogenized to a fine powder using a Retsch mixer mill (Retsch MM400, Germany). Total RNA isolation and RNA precipitation were performed according to literature [15], except that the extraction buffer was prepared without spermidine. The concentration of the RNA preparation was determined with NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Germany) and the integrity was confirmed by agarose gel electrophoresis.

First strand cDNA synthesis was applied according to the manufacturer's instructions (Promega, Germany). The open reading frame (ORF) sequence of the *Sola l 4.02* gene was amplified with PCR using gene-specific primers published from Wangorsch et al. [14]. PCR products were cloned into pGEM<sup>®</sup>-T Easy vector system according to manufacturer's instruction (Promega, Germany). In order to obtain the expression vector the gene was amplified with two primers introducing a *SphI* site (*SphI* sola l 4 forward ACA TGC ATG CTT GGT GTA AAC ACC TTT ACT) and *BglII* site (*BglII* sola l 4 reverse CGGA AGA TCT AGC GTA GAC AGA AGG ATT) at its 5' end and 3' end, respectively. The resulting PCR product was digested with *SphI* and *BglII* and ligated into the predigested pQE70 vector (Quiagen, Hilden, Germany). After verification of the sequence by Eurofins (Ebersberg, Germany), pQE70-*Sola l 4.02* plasmid construct was transformed in *Escherichia coli* BL21 (DE3)pLysS (Novagen, Darmstadt, Germany).

### Heterologous expression and purification of Sola l 4.02 protein

Recombinant Sola l 4.02 was expressed in *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21(DE3)pLysS as a fusion protein with a C-terminal His-tag. Cells were grown in 1 l LB medium supplemented with 100 µg/ml ampicillin and 34 µg/ml chloramphenicol at 37 °C to an optical density of 0.6. Gene expression was induced with 1 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) and

cultures were incubated for 20 h at 18 °C. Cells were harvested by centrifugation (10 min; 5292g; 4 °C) and cell pellets were stored at -80 °C.

Protein purification was performed via immobilized metal affinity chromatography using Profinity Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography (IMAC) resin (Bio-Rad Laboratories, Germany). Cell pellets were suspended in 10 ml binding buffer (20 mM sodium phosphate pH 7.4; 0.5 M sodium chloride; 20 mM imidazole) and 0.5 mM PMSF, ultrasonicated and centrifuged for 30 min at 21191g at 4 °C. The supernatant containing soluble proteins was incubated for 2 h at 4 °C with the IMAC resin. After two washing steps with 10 ml of binding buffer each Sola l 4.02 protein was eluted with elution buffer (20 mM sodium phosphate pH 7.4; 0.5 M sodium chloride; 500 mM imidazole). The purity of the protein fractions was analyzed by SDS-PAGE. Five µg protein were separate in a 12% acrylamide stacking gel at 100 V for 2.5 h under non-reducing and reducing conditions with β-mercaptoethanol. For protein staining Coomassie Brilliant Blue was used. PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) was used as molecular weight marker. Elution fractions containing the respective protein were pooled and dialyzed against Phosphate-Buffered Saline (PBS) pH 7.4 at 4 °C for 20 h. Insoluble particles were removed by centrifugation and the protein solution was used as standard for indirect competitive ELISA.

### **Production of polyclonal antibodies with specificity for Sola l 4.02**

Specific polyclonal Sola l 4 antibody was produced by Davids Biotechnologie GmbH (Regensburg, Germany). Elution fractions of recombinant Sola l 4.02 protein purified from soluble fraction were pooled and used for immunization of rabbits according to a 63-day protocol. Antiserum was further purified via affinity chromatography using a column with Sola l 4 bound to the carrier matrix. Anti-Rabbit-Horseradish peroxidase (HRP) as secondary antibody was purchased from Carl Roth.

### **Purification of Sola l 4.02 from insoluble fraction (inclusion bodies)**

Sola l 4.02 was also purified from the insoluble fractions (inclusion bodies) to examine the ability of refolding of the protein and whether IgG recognition, analyzed by Western blot, was possible. The remaining pellet after cell lysis, ultra-sonication and centrifugation was used. The pellet was resolved in denaturation buffer (20 mM sodium phosphate pH 7.4; 0.5 M sodium chloride; 20 mM imidazole; 8 M urea) at 4 °C over night, centrifuged (1 h; 21191g; 4 °C) and refolded against refolding buffer (20 mM sodium phosphate pH 7.4; 0.5 M sodium chloride; 20 mM imidazole) at 4 °C over night via dialysis. After centrifuged (1 h; 21,200g; 4 °C) the supernatant was incubated with IMAC resin for 2 h at 4 °C. Protein purification was performed as described above for the soluble protein fraction. Purity of the protein fractions was evaluated by SDS-PAGE and Coomassie staining.

### **Thermal treatment of rSola l 4.02**

Five µg of recombinant Sola l 4.02 of purified pooled elution fractions from soluble fraction was incubated for 10, 20, 30, 60 and 90 min at 99 °C in a Thermoblock (Thermomixer comfort, Eppendorf) and immediately cooled on ice. Untreated protein solution was used as control. The integrity of the protein was further analyzed by SDS-PAGE. IgG binding was investigated via Western blot analysis using a specific polyclonal antibody against Sola l 4.02.

## Protein determination

The total protein concentration was determined in microtiter plates (Greiner 96 well plates, polypropylene, Sigma-Aldrich) using Roti<sup>®</sup>-Nanoquant following the manufacturer's instructions (Carl Roth, Germany) with bovine serum albumin (BSA) as standard protein. Absorption at 450 nm and 590 nm was detected with the CLARIOstar plate reader (BMG Labtech, Germany).

## Drying of tomato fruits

Ripe fruits were cut into halves or quarters and further dried with three different methods upon constant dry weight. Oven drying was performed at 55 °C for 72 h in a conventional oven dryer (Thermo-Lab, Codogno, Italy). For solar drying only solar irradiance was used and performed in a miniaturized plant (TermoTend System-GTek, Carpi, Italy) for 7 to 10 days. Due to day-night-cycle, temperature varies between 25 °C and 45 °C. Freeze-drying was performed for 96 h in an air-forced tunnel and lyophilized using a Dura-Stop tray dryer, combined with a Dura-Dry condenser module (FTS Systems, Stone Ridge, New York) from -35 °C to room temperature and samples were powdered before storage. The water loss was calculated from the difference between fresh and dried weight of the tomato fruit samples. All samples were stored at -20 °C until analysis. Dried fruits were compared to fresh, unprocessed tomatoes, which were only available in the year 2016.

## Tomato extracts

For the extraction of proteins from fresh tomatoes an established method [16] was applied. To reduce the intra- and inter-tomato variability of allergen distribution, eight frozen fruits of one variety were cut into halves or quarters, pooled and grind to a fine powder with a commercial blender (Personal Blender PB 250). For each variety protein extracts were prepared in triplicates. Tomato powder was supplemented with extraction buffer (10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 10 mM Na-DIECA; 2 mM EDTA; 2% (w/v) PVPP) containing 0.5 mM phenyl-methylsulfonyl fluoride (PMSF) and protease inhibitor cocktail (Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche) 1:2 (w/v) and incubated at 4 °C for 4 h under shaking end over end. For dried plant material a ratio of 1:4 (w/v) was used to ensure proper mixing. Tomato extract were centrifuged for 15 min at 5292xg at 4 °C and dialyzed (3.4 kDa molecular weight cut-off, Zellu-Trans, Carl Roth) against PBS pH 7.4. To remove any precipitates, a second centrifugation was performed for 10 min at 16100xg at 4 °C. Extracts were directly used for indirect competitive ELISA.

## Indirect competitive ELISA

The Sola l 4 content of tomato samples was determined by indirect competitive ELISA. Recombinant Sola l 4.02 from soluble *E. coli* fraction was used as competitor. Microtitre plates (immunoGrade™ Brand) were coated with 100 µl/well purified recombinant Sola l 4.02 protein (0.1 µg/ml) in coating buffer (PBS pH 7.4) and incubated at 4 °C overnight. After plates were washed three times with 300 µl washing buffer (0,05% (v/v) Tween 20 in PBS), free binding sites were blocked with 200 µl 2% BSA in PBS for 2 h at room temperature and washed as before. Dialyzed tomato extracts were diluted in washing buffer and 50 µl were pipetted to each well as "free" Sola l 4. Competition between immobilized and free allergen was performed by adding 50 µl of 2 µg/ml polyclonal Sola l 4-rabbit antibody and incubated for 4 h at 4 °C. Plates were washed four times and sequentially incubated with 100 µl of 1 µg/ml Anti-Rabbit-HRP (Carl Roth, Germany) for 1 h at room temperature. Following a final washing step, 100 µl

of 1-Step Ultra 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) ELISA solution (Thermo Scientific) were added and the color development was stopped with 100  $\mu$ l 2 M sulfuric acid after 15 min. The absorption at 450 nm and 620 nm was measured with CLARIOstar plate reader (BMG Labtech, Germany). Standard curves and a negative control were applied on each microplate. The quantification of Sola l 4 allergen in tomato extracts was determined based on the standard curve with recombinant Sola l 4.02 protein. Fifty  $\mu$ l/well of serial dilutions (0.0001–25  $\mu$ g/ml) of recombinant Sola l 4.02 was pipetted as “free” allergen and followed by the same procedure as the tomato samples. For data analysis the MARS software (BMG Labtech, Germany) was used. Sola l 4 content was expressed as  $\mu$ g Sola l 4 /g fresh weight respectively  $\mu$ g Sola l 4/ g dry weight. Dry matter was converted to fresh weight considering the loss of water in percent during drying process.

### Statistical analysis

For the analysis of the experimental data as well as for the box plots the statistical analysis software R (The R Foundation for Statistical Computing, R version i386 3.3.3) was used. Statistical significance levels between the variable groups were calculated using one-way analysis of variance (ANOVA). P values of  $\leq 0.05$  were considered as significant. For comparisons of mean values Tukey test was performed.

## Results

### Purification of recombinant Sola l 4.02 protein from soluble and insoluble (inclusion body) fraction

Recently, the two isoforms Sola l 4.01 and Sola l 4.02 have been identified as Bet v 1-related allergens in *Solanum lycopersicum* in tomato fruits from cultivar Verona [14]. Sola l 4.02 showed higher immunological activity in comparison to Sola l 4.01 and was therefore selected for the purpose of this study. The corresponding gene was isolated and cloned from tomato cultivar Lyterno showing complete sequence identity with the *Sola l 4.02* gene (Acc. No. KF682292; [14]).

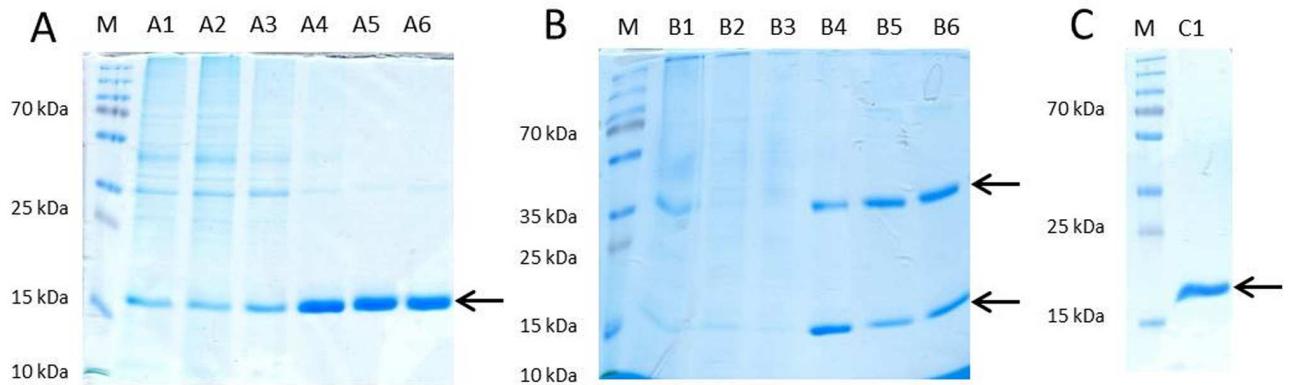
Recombinant Sola l 4.02 was produced in *E. coli* BL21(DE3)pLysS and affinity purified from soluble and insoluble fraction, respectively. Whereas SDS-PAGE analysis of the Sola l 4.02 protein isolated from the soluble fraction showed only a band at the predicted molecular weight of 18 kDa (Fig 1A) Sola l 4.02 after denaturation and refolding from inclusion bodies displayed a second band with a molecular weight of approximately 36 kDa (Fig 1B). SDS-PAGE under reducing conditions with  $\beta$ -mercaptoethanol showed only one specific band at 18 kDa (Fig 1C).

Specific polyclonal antibodies against Sola l 4 were produced via immunization of rabbit with purified recombinant protein from the soluble fraction. Western Blot analysis showed that the antibody recognized both, the soluble Sola l 4.02 as well as the refolded protein from inclusion bodies (S1 Fig). Furthermore, Western Blot analysis confirmed that the polyclonal antibody specifically recognizes native Sola l 4 allergen extracted from tomato fruits (S2 Fig).

### Thermal treatment of recombinant Sola l 4.02 protein

Pooled elution fractions of purified recombinant Sola l 4.02 from the soluble protein fraction were thermally treated and analyzed by SDS-PAGE (Fig 2A) and Western blot (Fig 2B) to investigate the effect of heat on integrity and IgG recognition. After 10 to 30 min at 99 °C the rSola l 4.02 protein was still detectable showing a clear band at 18 kDa in Coomassie stained SDS-PAGE gel (Fig 2A). Prolonged heating of 60 min or even of 90 min resulted in diffuse





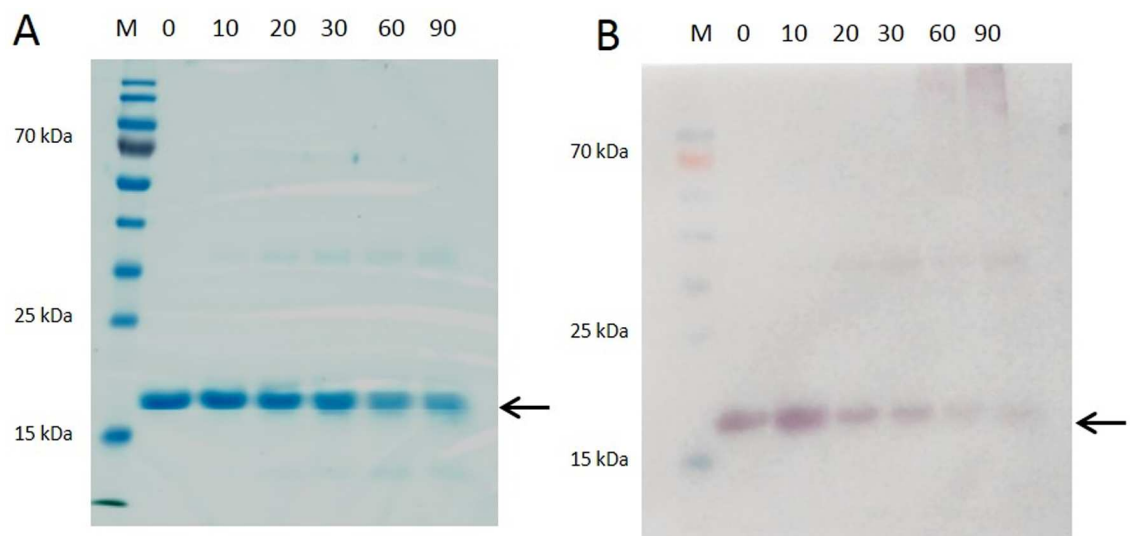
**Fig 1. SDS-PAGE analysis of the recombinant Sola l 4.02 protein.** (A) Purification from soluble protein fraction, SDS-PAGE under reducing condition with  $\beta$ -mercaptoethanol (A1 crude extract; A2 flow through; A3 washing; A4 elution 1; A5 elution 2; A6 elution 3). (B) insoluble protein fractions, SDS-PAGE under non-reducing conditions (B1 denaturation; B2 refolding; B3 flow through; B4 elution 1; B5 elution 2; B6 elution 3). (C) insoluble protein fraction (C1 pooled elution 1–3). Under non-reducing conditions, (B) two distinct protein bands were visible in the elution fractions at 18 kDa and 36 kDa. Under reducing condition with  $\beta$ -mercaptoethanol (A, C) only one band at approximately 18 kDa appeared. Five  $\mu$ g protein per lane were visualized by Coomassie Brilliant Blue G250. M: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197971.g001>

protein bands. Moreover, IgG-binding activity decreased considerably already after 10 min of thermal treatment of the Sola l 4.02 protein and was barely visible after 90 min at 99 °C (Fig 2B).

### Validation of the ELISA and extraction method

An indirect competitive ELISA was developed using recombinant Sola l 4.02 as solid phase-bound antigen and as standard protein to determine the Sola l 4 content in various fresh and dried tomato samples. A polyclonal rabbit antibody directed to Sola l 4 was used to detect the Bet v 1-related allergen in tomato extracts. The ELISA showed a typical standard curve ranging



**Fig 2. Heat stability of soluble recombinant Sola l 4.02.** (A) SDS-PAGE and (B) Western-Blot analysis of purified pooled elution fractions of the recombinant Sola l 4.02 protein heated for 10, 20, 30, 60 and 90 min at 99 °C. Untreated protein served as control (0). SDS-PAGE was performed under reducing conditions. Coomassie Brilliant Blue G250 was used for protein staining. For Western blot analysis specific polyclonal Sola l 4-antibody was used. M: PageRuler Prestained Protein Ladder.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197971.g002>

was from 0.01 to 10.0  $\mu\text{g/ml}$  (S3 Fig). To reduce the intra- and inter-tomato variability of allergen distribution, fine powder of eight frozen fruits of one variety was pooled and further used for protein extraction. Protein extracts were prepared in triplicates and extracts were diluted 2- and 4-fold for ELISA measurement. Finally the Sola l 4 content of one variety was calculated for the three extraction replicates from two dilutions and three technical replicates on the microtiter plate. The Sola l 4 content measured with ELISA was comparable in all three protein extracts (S3 Fig).

### Influence of tomato variety on Sola l 4 content

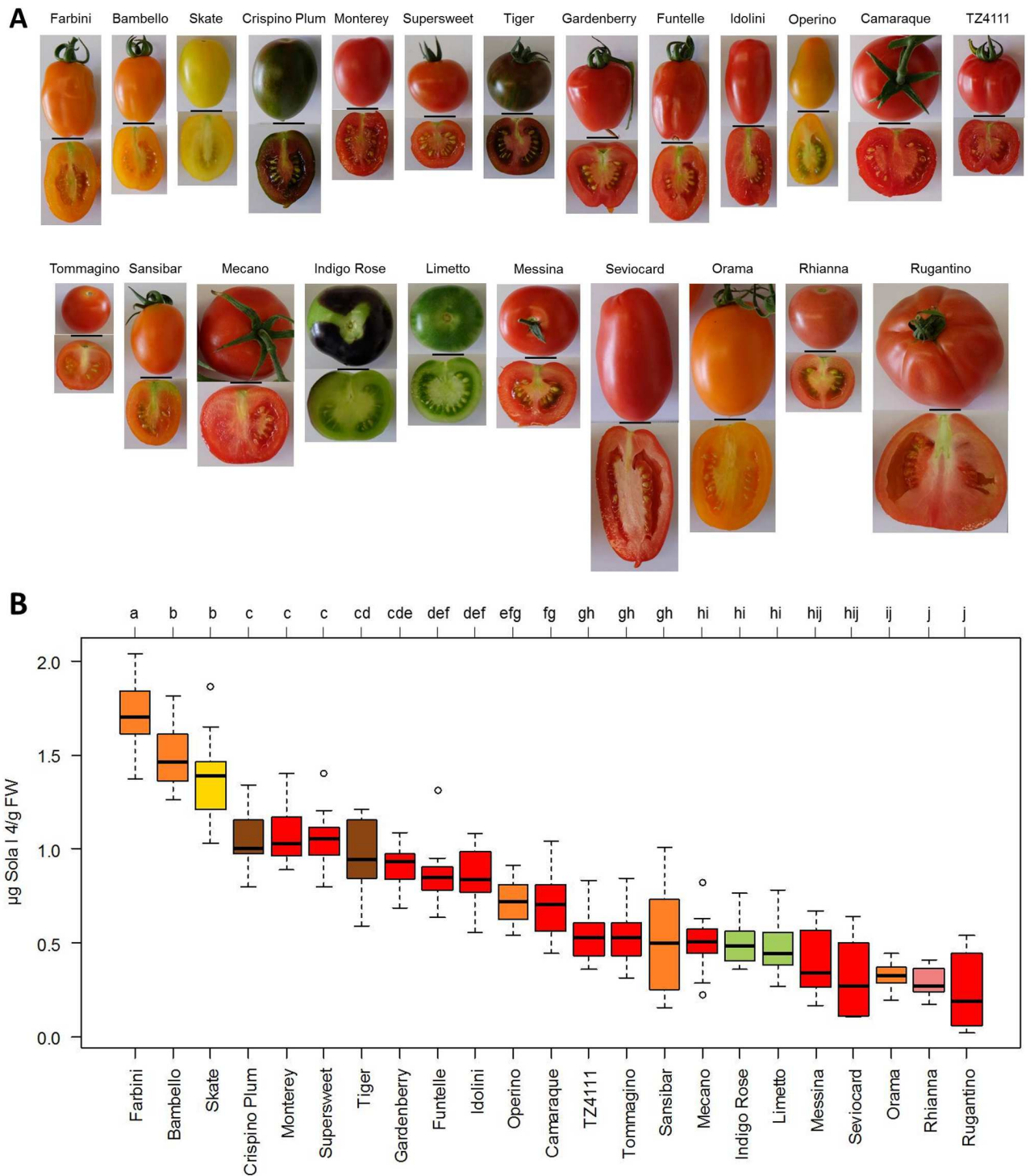
Twenty-three different colored tomato varieties of varying sizes and shapes were investigated to analyze the genetic (cultivar-to-cultivar) factor on the expression of Sola l 4 at a translational level in the fruit (Fig 3A). Total protein levels of 113.5 to 584  $\mu\text{g}$  soluble protein /g fresh weight (FW) could be extracted from fresh tomatoes (S1 Table). Sola l 4 levels ranged from 0.24 to 1.71  $\mu\text{g/g}$  FW (Fig 3B). The colors of the box plots represent the respective fruit color. The significantly lowest level of Sola l 4 was found in the cultivars Rugantino and Rhianna with 0.24 and 0.29  $\mu\text{g}$  Sola l 4/g FW, respectively whereas the significantly highest concentration was determined in cultivars Farbini and Bambello with 1.71 and 1.5  $\mu\text{g}$  Sola l 4/g FW, respectively. Ten significance groups (letters a-j) were calculated according to the Tukey Test with 5% of significance level. The percentage of Sola l 4 referred to the total soluble protein amount varied between 0.094% for cultivar Rugantino and 0.658% for cultivar Supersweet (S1 Table).

### Effect of cultivation and processing methods on Sola l 4 content in dried tomatoes

The influence of cultivation conditions, seasonal effects and processing techniques on the Sola l 4 allergen content in dried tomatoes was studied by ELISA. The two cultivars SAAB and Perbruzzo are genotypes well adapted for the growing conditions in Central East Italy. SAAB is very suitable for growing in organic crop management whereas Perbruzzo, a similar type is more adapted for commercial purposes. Tomatoes were grown in Italy in the years 2015 and 2016 either conventionally or organically, with further classification into conventionally grown with artificial mulch (conv), organically grown with artificial mulch (org) and organically grown with natural mulch (norg). After harvest, ripe fruits were dried in the oven (oven), in the sun (solar) or via freeze-drying (freeze). Water loss in percent was calculated from the difference of fresh and dry weight and was further included for conversion of allergen content of dry matter to fresh matter.

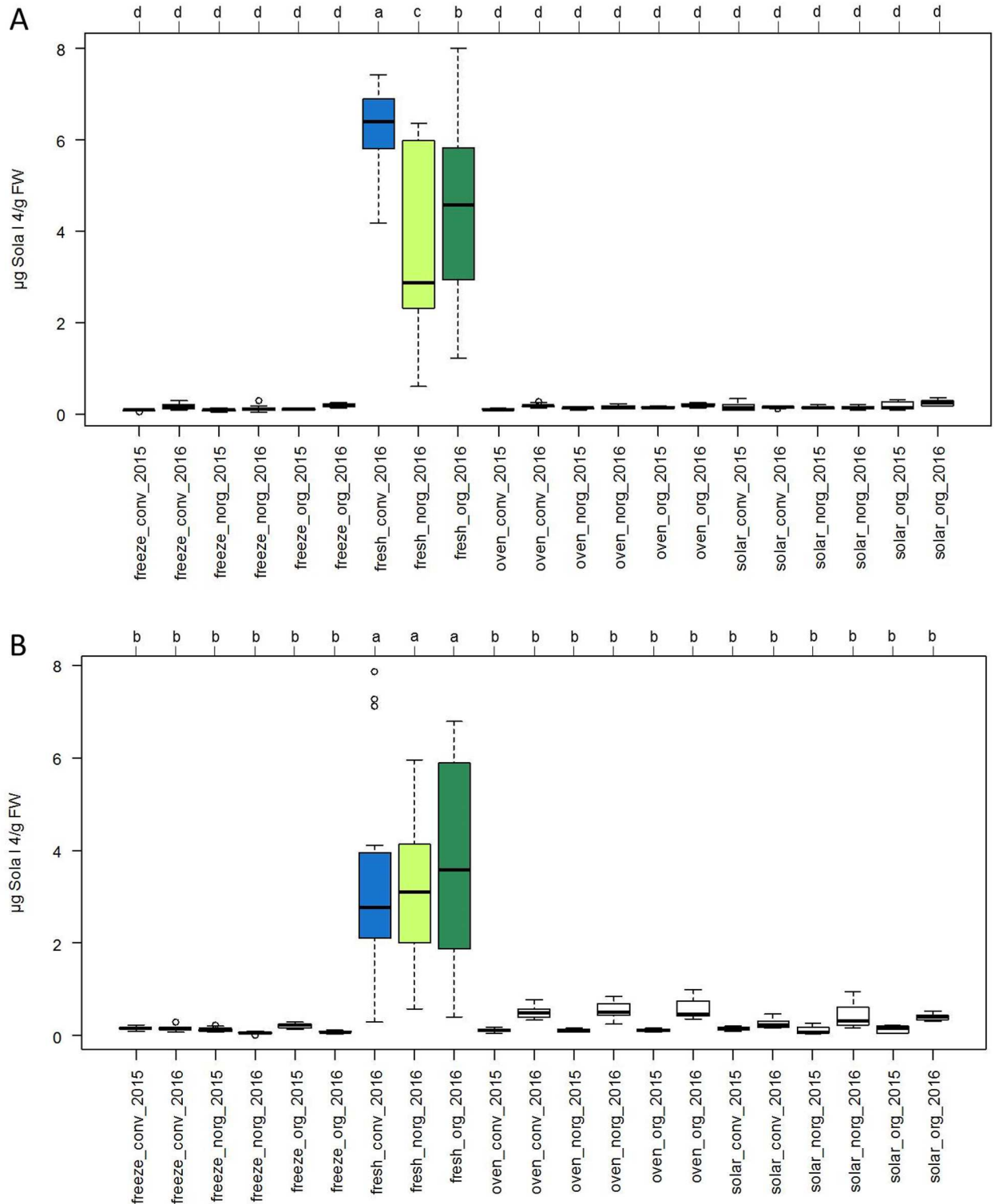
Dried tomato products of both genotypes contained significantly lower levels of Sola l 4 than the fresh fruits (Fig 4), when referring the allergen content of the samples to the corresponding fresh weight, regardless of the cultivation technique. Compared to dried fruits, fresh SAAB and Perbruzzo tomatoes of 2016 contained between 3.66 to 6.25  $\mu\text{g}$  and 3.19 to 3.74  $\mu\text{g}$  Sola l 4/g FW, respectively.

In the dried products of the SAAB genotype the allergen content ranged from 1.24  $\mu\text{g}$  Sola l 4/g dry weight (DW) for freeze-dried tomatoes grown organically with natural mulch in 2015 up to 3.93  $\mu\text{g}$  Sola l 4/g DW for solar dried fruits grown organically with artificial mulch in 2016 (Fig 5A). This corresponded to 0.07 and 0.23  $\mu\text{g}$  Sola l 4/g FW, respectively (Fig 4A). When comparing the two consecutive years, all dried samples of the SAAB genotype from 2016 showed higher allergen content than samples from 2015 (Fig 5A) with significant effects for some samples. No significant differences were observed for the influence of the cultivation method when comparing dried SAAB tomato samples from one year and fruits were dried with the same method. Furthermore, there were no significant differences between the three



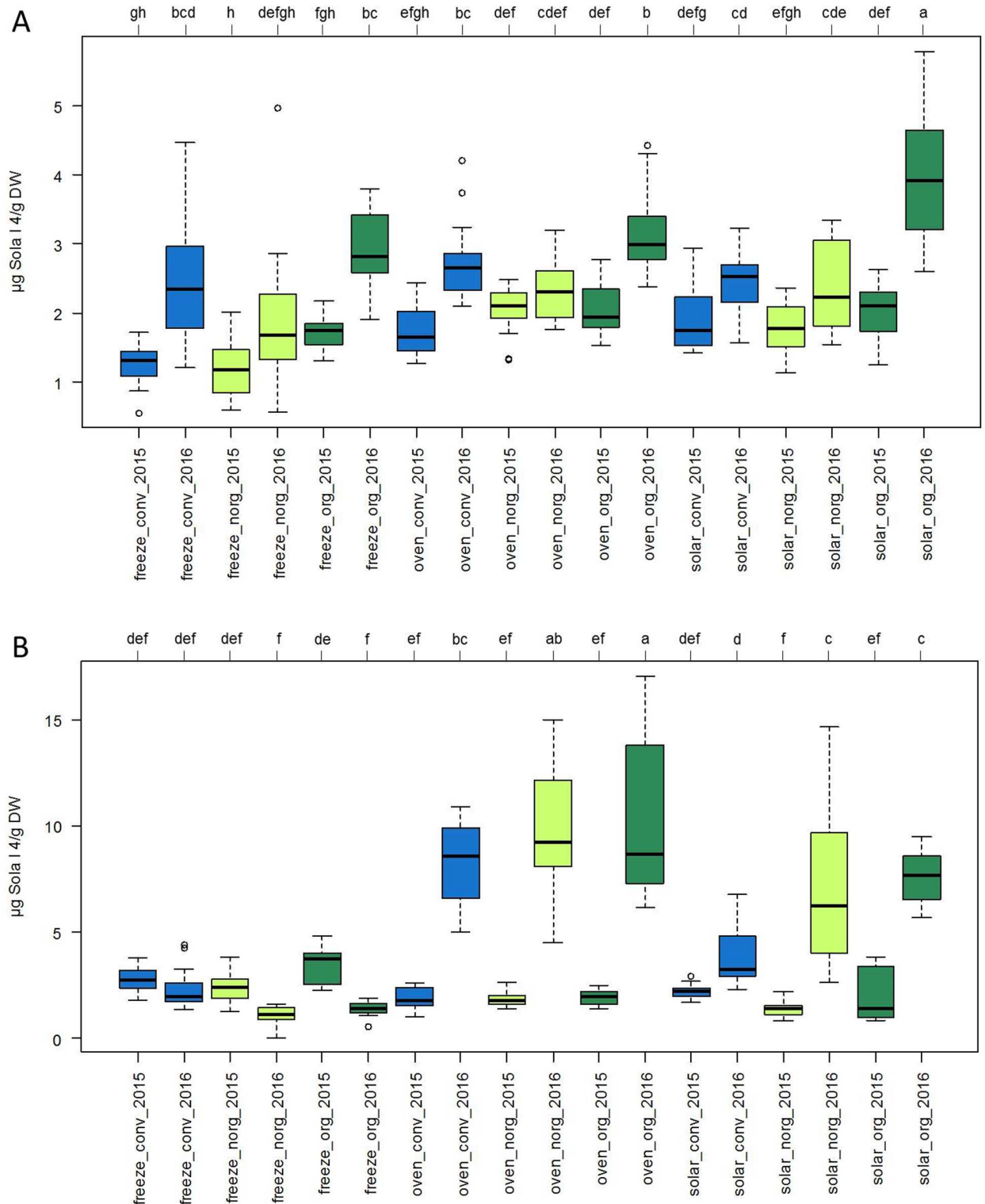
**Fig 3. Sola l 4 content in different tomato cultivars.** (A) Diversity of tomato cultivars (bar = 2 cm) and (B) corresponding Sola l 4 content in µg/g fresh weight (FW) determined with indirect competitive ELISA. The color of the box plots corresponds to the color of the ripe tomato fruit. Significant differences for each cultivar were calculated at a significance level of 5%.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197971.g003>



**Fig 4. Sola I 4 content in dried and fresh tomatoes.** (A) Allergen content in  $\mu\text{g Sola I 4/g}$  fresh weight (FW) of tomato cultivars SAAB and (B) Perbruzzo determined with indirect competitive ELISA. Plants were grown in Italy in 2015 and 2016 conventionally with artificial mulch (conv), organically with artificial mulch (org) and organically with natural mulch (norg). Tomato fruits were dried via freeze-drying (freeze), in the oven (oven) and in the sun (solar). Allergen content of dried tomato samples was referred to  $\mu\text{g Sola I 4/g FW}$  and compared with fresh tomatoes (fresh). Significant differences for each group were calculated at a significance level of 5%.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197971.g004>



**Fig 5. Effect of cultivation and drying method on Sola 1 4 content in dried tomatoes.** (A) Allergen content in µg Sola 1 4/g dry weight (DW) of tomato cultivars SAAB and (B) Perbruzzo determined with indirect competitive ELISA. Plants were grown in Italy in 2015 and 2016 conventionally with artificial mulch (conv), organically with artificial mulch (org) and organically with natural mulch (norg). Tomato fruits were dried via freeze-drying (freeze), in the oven (oven) and in the sun (solar). Significant differences for each group were calculated at a significance level of 5%.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197971.g005>

drying methods when comparing dried SAAB samples from one year and plants were grown under the same conditions.

The allergen content of dried Perbruzzo samples (Fig 5B) ranged from 1.04  $\mu\text{g}$  Sola l 4/g DW for freeze-dried tomatoes grown organically in 2016 with natural mulch up to 10.28  $\mu\text{g}$  Sola l 4/g DW for oven dried fruits grown organically with artificial mulch in 2016. This corresponded to 0.05 and 0.58  $\mu\text{g}$  Sola l 4/g FW (Fig 4B). Compared to fresh fruits dried tomatoes showed a significantly lower allergen content (Fig 4). When comparing the two consecutive years, oven and solar dried samples from cultivar Perbruzzo showed higher allergen content in 2016 than samples from 2015 (Fig 5B) with significant effects. Strikingly, freeze-dried tomatoes exhibited no significant differences between the two years. The influence of the cultivation method showed no significant effect on the allergen content of Perbruzzo products when comparing dried tomatoes from one year and fruits were dried with the same method.

## Discussion

In Northern Europe, individuals allergic to birch pollen often show cross-reactivity to allergens from *Rosaceae* fruits or other vegetables and nuts [17]. IgE antibodies directed to Bet v 1 induced in a primary sensitization reaction to birch pollen can also react with Bet v 1-related proteins from various plant origin [18]. Here, we have analyzed the Bet v 1-like Sola l 4.02 protein of the PR-10 family whose gene was identified in the *S. lycopersicum* genome only recently [14]. We studied the effects of the genotype, cultivation, climate and processing methods on the level of Sola l 4.

### Biochemical and immunological properties of recombinant Sola l 4.02

The protein Sola l 4.02 (K4CWC4) shares 42.5% amino acid similarity with Bet v 1.0101 (P15494). SDS-PAGE analysis of the recombinant protein under nonreducing conditions showed that Sola l 4.02 exists in a monomeric and a dimeric form, with a molecular weight of 18 kDa and 36 kDa, respectively (Fig 1). Two cysteine residues at position C113 and C115 might be able to form disulfide bonds. SDS-PAGE under reducing conditions with  $\beta$ -mercaptoethanol resulted in only one band at 18 kDa, probably due to the cleavage of the disulfide bond. Dimerization did not affect the structure of the protein epitopes as the binding of IgG antibodies and immunological reactivity of the dimers maintained (Fig 1). Dimerization or even oligomerization of recombinant allergens and naturally-occurring allergens was observed previously [19–21]. Similarly, Bet v 1 has been reported to exist as a dimer [22–25]. Although Bet v 1.0101 does not comprise a cysteine residue in its amino acid sequence and the mechanism of dimerization has not been fully elucidated, dimer formation can be induced by mutation of position 5 to a cysteine residue [24].

Besides of the property of the polyclonal antibody to recognize recombinant Sola l 4 purified from soluble fraction, the purification of Sola l 4 from insoluble inclusion body fraction showed that antibody binding to the refolded protein occurs. After denaturation with urea and refolding of Sola l 4, essential epitopes for antigen-antibody reaction must be present (S1 Fig). An important observation is, that the antibody recognizes specifically the allergen extracted from tomato fruits (S2 Fig). Purification of proteins from cell pellet under denaturing conditions and refolding is a common method, when the amount of soluble protein is too low. High purity and application in enzyme allergosorbent test, Western blots and basophil histamine release were described for recombinant Pyr c 1, showing similar allergenic activity to the natural allergen from pear [26]. Furthermore, specific IgE from pear-allergenic patient sera recognized the recombinant protein, purified from inclusion body fraction.

PR-10 (Bet v 1 related) proteins from *Rosaceae* family are unstable to heat and sensitive to proteases. Therefore, allergic symptoms are restricted to the upper intestinal tract (mouth) since Bet v 1-related proteins are digested by proteases in the lower intestinal tract [27]. Similarly, heat inactivation of rSola l 4.02 purified from soluble protein fraction was demonstrated (Fig 2). Thermal treatment of the recombinant allergen changed the protein structure in such a way, that recognition of the allergen epitopes by anti-Sola l 4 was remarkably reduced (Fig 2). The same phenomenon has been shown for rPru av 1 from cherry [27] and the apple allergen Mal d 1 [28].

### Allergenic potential of tomatoes is cultivar dependent

Tomato allergy is often accompanied with pollen allergies [29]. Depending on the regional distribution of pollen allergens, tomato allergic patients can be sensitized towards several tomato allergens from different protein families [5]. The best-known groups are allergens homologous to Bet v 1, profilins, and lipid transfer proteins (LTP). Tomato allergy is more common in Southern Europe where allergic reactions are caused by the major allergens Sola l 6 and Sola l 7, proteins belonging to non-specific LTP [3]. These allergens are heat stable and provoke severe symptoms. However, in Northern Europe Bet v 1 related Sola l 4 allergy is prevalent. Sola l 4 was recognized in 76% of birch/tomato allergic patients highlighting Sola l 4 as major allergen in tomato fruits [14].

Thus, an indirect competitive ELISA was established using a polyclonal antibody directed to Sola l 4.02 and differently colored tomato genotypes were analyzed as fruit color has been recently correlated with allergen content [30]. Among 23 different varieties, the allergen content varied between 0.24 and 1.71  $\mu\text{g}$  Sola l 4/g FW, independent of the total soluble protein amount respectively the percentage of Sola l 4 allergen and the color. The high variation in allergen content supports recent results, which showed that patients exhibited different antibody-binding profiles because of varying allergenic activities of tomato cultivars verified with skin prick tests and basophil activation test [31]. Besides, it seems that Sola l 4 does not function in carotenoid biosynthesis, the major group of colorants in tomato.

Fresh tomato fruits from cultivars SAAB and Perbruzzo from Italy show generally higher Sola l 4 allergen content compared to the collection of varieties from garden center Böck (Germany). Different locations and climatic conditions are an important parameter affecting [32] the allergen level, previously shown for Mal d 1 content in apples. Besides this, tomatoes from Germany were cultivated in the greenhouse.

Allergenicity of fruits is cultivar dependent as evaluated for the major apple allergen Mal d 1 [32,33]. Allergen level of the Bet v 1-homologous Mal d 1 in apple varied between 3.8 and 72.5  $\mu\text{g}/\text{g}$  pulp [33] or between 2.3 and 20.1  $\mu\text{g}/\text{g}$  FW [32]. Thus, the content of Bet v 1-homologous proteins in apples is higher than the corresponding protein in tomatoes (Fig 3). Apple allergies affect up to 2% of the population in Europe and Northern America. The prevalence of tomato allergies caused by PR-10 related allergens, however, is rare. The lower Sola l 4 allergen level in tomato compared to apple fruits might be a reason for that. Especially in the Mediterranean area tomato allergy is more relevant with severe symptoms provoked by allergens from LTPs and profilins.

It has to be taken into account that, in addition to Sola l 4.01 and Sola l 4.02, additional isoforms might be expressed in tomato fruits playing a role for PR-10 allergenic patients. The severity of an allergic reaction to fruit is related to the individual sensitivity of the patient and moreover depended on the cultivar. Identification of specific IgE-antibodies in patient sera and skin prick test with different varieties reveal in most of the cases a wide range from low to

high allergenic reactivity. Thus, the results of the ELISA have to be confirmed by further immune tests but can be helpful to improve the quality of tomato cultivars.

### Drying processing of tomato fruits has major effect on allergen content

During food processing the allergenic properties of food allergens can be altered by various parameters. Washing or peeling of the food material, breaking up through grinding or cutting, thermal treatment, fermentation processes or even purification steps in the manufacturing procedure may have an effect on the allergenic properties of food allergens [34]. Changes in epitope protein structure can be the factor for both, decreasing or increasing allergenic activity.

Non-specific LTPs are a major elicitor of tomato allergies. Both, in fresh fruits as well as in industrial products LTP are contained in crucial amounts, triggering severe allergic symptoms [35]. Due to the high resistance to proteases and heat, these proteins maintain their immunological activity [3]. In contrast, Bet v 1 related proteins are heat-labile and patients allergic to PR-10 proteins might tolerate processed food or food products. The loss of allergenicity due to thermal processing was investigated for several Bet v 1-related allergens, such as Mal d 1 [28] and Pru av 1 [27]. Furthermore, we showed that recombinant Sola l 4.02 is also heat sensitive (Fig 2).

Since dried tomatoes are a common product in food industry, the Sola l 4 amount was determined in a number of differently dried fruits. Due to thermal treatment, the level of the Sola l 4 allergen decreased significantly (Fig 4). Considering the loss of water during the drying process, dried tomatoes contain considerably lower Sola l 4 amount than fresh tomatoes. Both, the experiment with the recombinant protein and with tomato extracts from dried fruits affirm the heat-sensitivity of this PR-10 protein. Although freeze-drying is a gentle drying method known to preserve the protein structure, freeze-dried tomato samples contained the same low allergen content as oven and solar dried fruits. Due to the loss of water during drying, the protein structure of the soluble Sola l 4 protein becomes altered and is not recognized any more by the antibody. In addition to that, the protein might be degraded and therefore the antibody is unable to recognize the protein fragments. No significant changes in Sola l 4 levels between freeze-, solar-, and oven drying were observed for cultivar Perbruzzo in 2015 (Fig 5). In contrast, differences were detected in 2016. Removal of water by oven and solar-drying seemed to be less effective in 2016 promoting protein solubility and allergen stability. For cultivar SAAB the differences were insignificant between freeze-, solar-, and oven drying in both years 2015 and 2016.

According to the meteorological data (Table 1) from the growing region of tomato cultivars SAAB and Perbruzzo in Monsampolo del Tronto, the rainfall was significantly higher in 2016

**Table 1. Meteorological data at the growing location Monsampolo del Tronto, Italy for the years 2015 and 2016.**

month	mean temperature [°C]	rainfall [mm]
May 2015	18.2	56.2
June 2015	21.7	75.0
July 2015	26.9	0.4
August 2015	24.8	36.0
May 2016	16.4	69.8
June 2016	21.3	98.8
July 2016	25.1	72.2
August 2016	23.5	26.4

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197971.t001>



than in the previous year. From May to August 2015 167.6 liter per square meter were measured, compared to 267.2 liter per square meter during the same season in the following year. The average daily temperatures from May to August were slightly lower in 2016 with 21.6 °C compared to 2015 with 22.9 °C, which is in accordance with higher rainfall in 2016. Sola l 4 allergen levels of dried tomato fruits were higher in 2016 than in 2015 for the majority of analyzed samples. Due to strong rain and high humidity, the pathogen infestation is increased and might lead to upregulation of PR-10 genes. Thus, varying weather conditions including average temperature, precipitation and humidity seem to have a more important effect on the allergen content than conventional or organic growing including the fact that pathogen growing is promoted under specific climatic conditions leading to induction of PR-10 genes. We conclude that growing conditions and seasonal effects such as low humidity and high temperature, which reduce the propagation of pathogens, would also reduce Sola l 4 content.

## Conclusion

In summary, the level of Bet v 1-related allergen in tomato fruits varied significantly between cultivars. Furthermore, the heat sensitivity of the PR-10 protein Sola l 4 was confirmed for the recombinant protein as well as for tomato samples, when fruits were exposed to heat during the drying process. Sola l 4.02 may be a marker for breeding hypoallergenic tomato varieties.

## Supporting information

**S1 Fig. Recombinant Sola l 4.02 protein purified from inclusion body fraction.** (A) SDS-PAGE and (B) Western-Blot analysis of pooled elution fractions of the recombinant Sola l 4.02 protein purified from insoluble fraction (IB). SDS-PAGE was performed under reducing conditions. Coomassie Brilliant Blue G250 was used for protein staining. For Western blot analysis specific polyclonal Sola l 4-antibody was used. M: PageRuler Prestained Protein Ladder. (PDF)

**S2 Fig. Protein pattern of tomato extracts.** (A) SDS-PAGE and (B) Western-Blot analysis of native tomato protein extracts exemplarily shown for different commercially available tomato cultivars. SDS-PAGE was performed under reducing conditions. Coomassie Brilliant Blue G250 was used for protein staining. For Western blot analysis specific polyclonal Sola l 4-antibody was used. The 18 kDa band, corresponding to the native Sola l 4, is marked with an arrow. M: PageRuler Prestained Protein Ladder. (PDF)

**S3 Fig. Indirect competitive ELISA and protein extraction.** (A) Standard curve of indirect competitive ELISA to quantify Sola l 4 in tomato and (B) reproducibility of the protein extraction method exemplarily shown for cultivars Farbini, Gardenberry and Orama. (PDF)

**S1 Table. Tomato cultivars.** Sola l 4 content (mean values) in µg/g fresh weight (FW), total soluble protein in µg/g FW and percentage of Sola l 4/total soluble protein of different tomatoes. Plants were grown at garden center Böck (Neufahrn, Munich). (PDF)

## Acknowledgments

We thank garden center Böck for providing the tomato samples.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Roberto Lo Scalzo, Wilfried Schwab.

**Formal analysis:** Elisabeth Kurze, Gabriele Campanelli.

**Funding acquisition:** Roberto Lo Scalzo, Wilfried Schwab.

**Investigation:** Elisabeth Kurze.

**Methodology:** Elisabeth Kurze.

**Project administration:** Roberto Lo Scalzo, Wilfried Schwab.

**Resources:** Wilfried Schwab.

**Supervision:** Roberto Lo Scalzo, Wilfried Schwab.

**Validation:** Elisabeth Kurze.

**Writing – original draft:** Elisabeth Kurze.

**Writing – review & editing:** Roberto Lo Scalzo, Gabriele Campanelli, Wilfried Schwab.

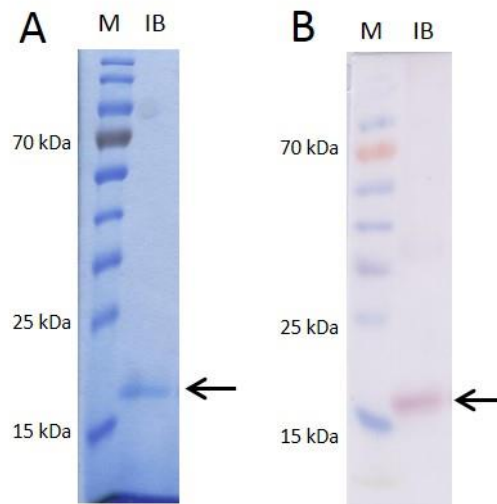
## References

1. Asero R. Tomato allergy: clinical features and usefulness of current routinely available diagnostic methods. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2013; 23(1): 37–42. PMID: [23653972](#)
2. Giovannucci E. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. *J Natl Cancer Inst*. 1999; 91(4): 317–331. PMID: [10050865](#)
3. Martín-Pedraza L, González M, Gómez F, Blanca-López N, Garrido-Arandia M, Rodríguez R, et al. Two nonspecific lipid transfer proteins (nsLTPs) from tomato seeds are associated to severe symptoms of tomato-allergic patients. *Mol Nutr Food Res*. 2016; 60(5): 1172–1182. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500782> PMID: [26840232](#)
4. Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2010; 125(2 Suppl 2): S116–25. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.08.028> PMID: [20042231](#)
5. Dölle S, Schwarz D, Lehmann K, Weckwerth W, George E, Worm M, et al. Tomato allergy: impact of genotype and environmental factors on the biological response. *J Sci Food Agric*. 2011; 91(12): 2234–2240. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4443> PMID: [21769872](#)
6. Sinha M, Singh RP, Kushwaha GS, Iqbal N, Singh A, Kaushik S, et al. Current overview of allergens of plant pathogenesis related protein families. *Sci World J*. 2014; 2014: 543195. <https://doi.org/10.1155/2014/543195> PMID: [24696647](#)
7. Hoffmann-Sommergruber K. Plant allergens and pathogenesis-related proteins: what do they have in common? *Int Arch Allergy Immunol*. 2000; 122(3): 155–166. <https://doi.org/10.1159/000024392> PMID: [10899758](#)
8. Breiteneder H, Ebner C. Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 2000; 106(1 Pt 1): 27–36. <https://doi.org/10.1067/mai.2000.106929> PMID: [10887301](#)
9. Fernandes H, Michalska K, Sikorski M, Jaskolski M. Structural and functional aspects of PR-10 proteins. *FEBS J*. 2013; 280(5): 1169–1199. <https://doi.org/10.1111/febs.12114> PMID: [23289796](#)
10. Foetisch K, Son D, Altmann F, Aulepp H, Conti A, Haustein D, et al. Tomato (*Lycopersicon esculentum*) allergens in pollen-allergic patients. *Eur Food Res Technol*. 2001; 213: 259–266. <https://doi.org/10.1007/s002170100343>
11. Petersen A, Vieths S, Aulepp H, Schlaak M, Becker WM. Ubiquitous structures responsible for IgE cross-reactivity between tomato fruit and grass pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 1996; 98(4): 805–815. PMID: [8876557](#)
12. Ortolani C, Ispano M, Pastorello EA, Ansaloni MD, Magri MD. Comparison of results of skin prick test (with fresh foods and commercial food extracts) and RAST in 100 patients with oral allergy syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. 1989; 83(3):683–690. PMID: [2926087](#)
13. Ghiani A, D'Agostino N, Citterio S, Raiola A, Asero R, Barone A, et al. Impact of wild loci on the allergenic potential of cultivated tomato fruits. *PLoS ONE*. 2016; 11(5), e0155803. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155803> PMID: [27182705](#)

14. Wangorsch A, Jamin A, Foetisch K, Malczyk A, Reuter A, Vierecke S., et al. Identification of Sola l 4 as Bet v 1 homologous pathogenesis related-10 allergen in tomato fruits. *Mol Nutr Food Res*. 2015; 59(3): 582–592. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201300620> PMID: [24510486](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24510486/)
15. Liao Z, Chen M, Guo L, Gong Y, Tang F, Sun X, et al. Rapid isolation of high-quality total RNA from taxus and ginkgo. *Prep Biochem Biotechnol*. 2004; 34(3): 209–214. <https://doi.org/10.1081/PB-200026790> PMID: [15461137](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15461137/)
16. Björkstén F, Halmeppuro L, Hannuksela M, Lahti A. Extraction and properties of apple allergens. *Allergy*. 1980; 35(8): 671–677. PMID: [7224105](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7224105/)
17. Vieths S, Scheurer S, Ballmer-Weber B. Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. *Ann N Y Acad Sci*. 2002; 964: 47–68. PMID: [12023194](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12023194/)
18. Franz-Oberdorf K, Eberlein B, Edelmann K, Hucherig S, Besbes F, Darsow U, et al. Fra a 1.02 is the most potent isoform of the Bet v 1-like allergen in strawberry fruit. *J Agric Food Chem*. 2016; 64(18): 3688–3696. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00488> PMID: [27086707](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27086707/)
19. Verdino P, Westritschnig K, Valenta R, Keller W. The cross-reactive calcium-binding pollen allergen, Phl p 7, reveals a novel dimer assembly. *EMBO J*. 2002; 21(19): 5007–5016. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf526> PMID: [12356717](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12356717/)
20. Lascombe MB, Grégoire C, Poncet P, Tavares GA, Rosinski-Chupin I, Rabillon J, et al. Crystal structure of the allergen Equ c 1. A dimeric lipocalin with restricted IgE-reactive epitopes. *J Biol Chem*. 2000; 275(28): 21572–21577. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002854200> PMID: [10787420](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10787420/)
21. Maleki SJ, Kopper RA, Shin DS, Park CW, Compadre CM, Sampson H, et al. Structure of the major peanut allergen Ara h 1 may protect IgE-binding epitopes from degradation. *J Immunol*. 2000; 164(11): 5844–5849. PMID: [10820263](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10820263/)
22. Bufe A, Spangfort M, Kahlert H, Schlaak M, Becker WM. The major birch pollen allergen, Bet v 1, shows ribonuclease activity. *Planta*. 1996; 199(3): 413–415 PMID: [8771801](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8771801/)
23. Kaul S, Scheurer S, Danz N, Schick Tanz S, Vieths S, Hoffmann A. Monoclonal IgE antibodies against birch pollen allergens: Novel tools for biological characterization and standardization of allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 2003; 111(6): 1262–1268. PMID: [12789227](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12789227/)
24. Kofler S, Ackaert C, Samonig M, Asam C, Briza P, Horejs-Hoeck J. et al. Stabilization of the dimeric birch pollen allergen Bet v 1 impacts its immunological properties. *J Biol Chem*. 2014; 289(1): 540–551. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.518795> PMID: [24253036](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24253036/)
25. Schöll I, Kalkura N, Shedziankova Y, Bergmann A, Verdino P, Knittelfelder R, et al. Dimerization of the major birch pollen allergen Bet v 1 is important for its in vivo IgE-cross-linking potential in mice. *J Immunol*. 2005; 175(10): 6645–6650. PMID: [16272319](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16272319/)
26. Karamloo F, Scheurer S, Wangorsch A, May S, Hausteiner D, Vieths S. 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*. 2001; 756(1–2): 281–293. PMID: [11419719](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11419719/)
27. Gruber P, Vieths S, Wangorsch A, Nerkamp J, Hoffmann T. Maillard reaction and enzymatic browning affect the allergenicity of Pru av 1, the major allergen from cherry (*Prunus avium*). *J Agric Food Chem*. 2004; 52(12): 4002–4007. <https://doi.org/10.1021/jf035458+> PMID: [15186129](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15186129/)
28. Vieths S, Hoffmann A, Holzhauser T, Müller U, Reindl J, Hausteiner D. Factors influencing the quality of food extracts for in vitro and in vivo diagnosis. *Allergy*. 1998; 53(46 Suppl): 65–71. PMID: [9826003](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9826003/)
29. Larramendi CH, Ferrer A, Huertas AJ, García-Abujeta JL, Andreu C, Tella R, et al. Sensitization to tomato peel and pulp extracts in the Mediterranean Coast of Spain: prevalence and co-sensitization with aeroallergens. *Clin Exp Allergy*. 2008; 38(1): 169–177. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2007.02865.x> PMID: [18005185](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18005185/)
30. Hjærnø K, Alm R, Canbäck B, Matthiesen R, Trajkovski K, Björk L, et al. Down-regulation of the strawberry Bet v 1-homologous allergen in concert with the flavonoid biosynthesis pathway in colorless strawberry mutant. *Proteomics*. 2006; 6(5): 1574–1587. <https://doi.org/10.1002/pmhc.200500469> PMID: [16447153](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16447153/)
31. Dölle S, Lehmann K, Schwarz D, Weckwert W, Scheler C, George E, et al. Allergenic activity of different tomato cultivars in tomato allergic subjects. *Clin Exp Allergy*. 2011; 41(11): 1643–1652. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2011.03841.x> PMID: [21955222](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21955222/)
32. Matthes A, Schmitz-Eiberger M. Apple (*Malus domestica* L. Borkh.) allergen Mal d 1: effect of cultivar, cultivation system, and storage conditions. *J Agric Food Chem*. 2009; 57(22): 10548–10553. <https://doi.org/10.1021/jf901938q> PMID: [19845340](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19845340/)
33. Sancho AI, Foxall R, Browne T, Dey R, Zuidmeer L, Marzban G, et al. Effect of postharvest storage on the expression of the apple allergen Mal d 1. *J Agric Food Chem*. 2006; 54(16): 5917–5923. PMID: [16881695](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16881695/)

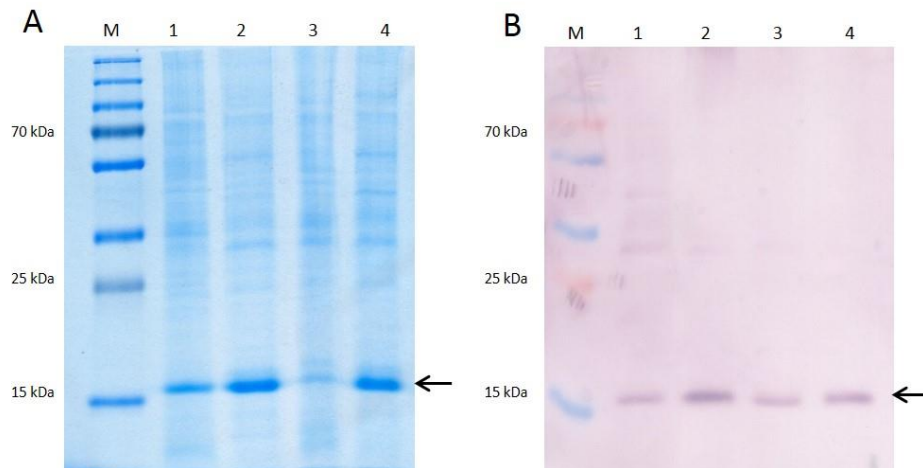
34. Besler M, Steinhart H, Paschke A. Stability of food allergens and allergenicity of processed foods. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2001; 756(1–2): 207–228. PMID: [11419714](#)
35. Pravettoni V, Primavesi L, Farioli L, Brenna OV, Pompei C, Conti A, et al. Tomato allergy: detection of IgE-binding lipid transfer proteins in tomato derivatives and in fresh tomato peel, pulp, and seeds. *J Agric Food Chem.* 2009; 57(22): 10749–10754. PMID: [19919119](#)

## Supporting information



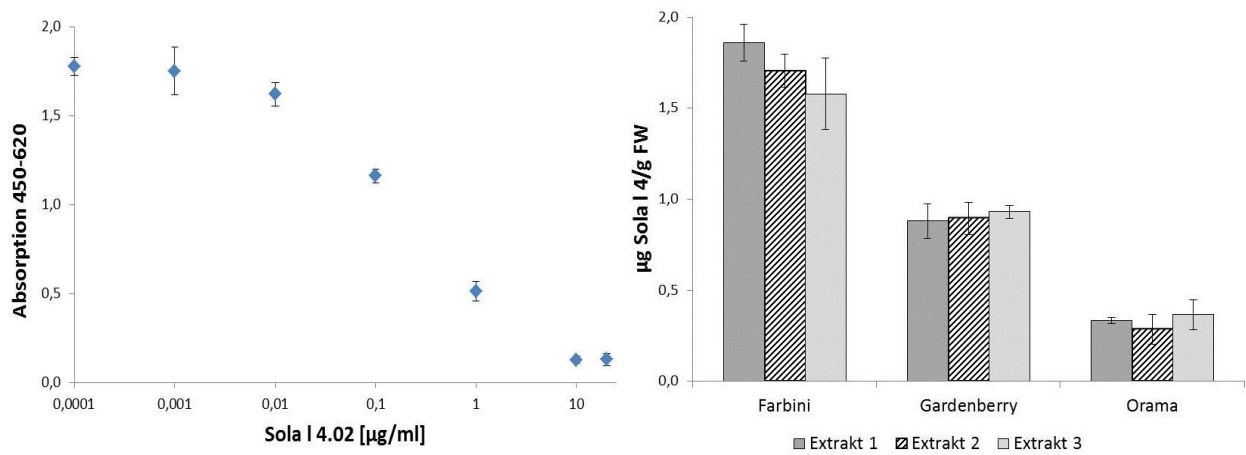
**S1 Fig. Recombinant Sola 1 4.02 protein purified from inclusion body fraction.** (A) SDS-PAGE and (B) Western-Blot analysis of pooled elution fractions of the recombinant Sola 1 4.02 protein purified from insoluble fraction (IB). SDS-PAGE was performed under reducing conditions. Coomassie Brilliant Blue G250 was used for protein staining. For Western blot analysis specific polyclonal Sola 1 4-antibody was used. M: PageRuler Prestained Protein Ladder.

## Supporting information



**S2 Fig. Protein pattern of tomato extracts.** (A) SDS-PAGE and (B) Western-Blot analysis of native tomato protein extracts exemplarily shown for different commercially available tomato cultivars. SDS-PAGE was performed under reducing conditions. Coomassie Brilliant Blue G250 was used for protein staining. For Western blot analysis specific polyclonal Sola 1 4-antibody was used. The 18 kDa band, corresponding to the native Sola 1 4, is marked with an arrow. M: PageRuler Prestained Protein Ladder.

## Supporting information



**S3 Fig. Indirect competitive ELISA and protein extraction.** (A) Standard curve of indirect competitive ELISA to quantify Sola 1 4 in tomato and (B) reproducibility of the protein extraction method exemplarily shown for cultivars Farbini, Gardenberry and Orama.

## Supporting information

**S1 Table. Tomato cultivars.** Sola l 4 content (mean values) in  $\mu\text{g/g}$  fresh weight (FW), total soluble protein in  $\mu\text{g/g}$  FW and percentage of Sola l 4/total soluble protein of different tomatoes.

Plants were grown at garden center Böck (Neufahrn, Munich).

<b>cultivar</b>	<b>color</b>	<b>Sola l 4 [<math>\mu\text{g/g}</math> FW]</b>	<b>total soluble protein [<math>\mu\text{g/g}</math> FW]</b>	<b>% Sola l 4/total soluble protein</b>
Indigo Rose	green/black peel	$0.493 \pm 0.11$	$291.1 \pm 19.2$	0.169
Limetto	green	$0.489 \pm 0.17$	$144.1 \pm 10.2$	0.339
Skate	yellow	$1.363 \pm 0.20$	$229.0 \pm 14.0$	0.595
Bambello	orange	$1.497 \pm 0.15$	$584.0 \pm 19.9$	0.256
Farbini	orange	$1.714 \pm 0.19$	$380.9 \pm 4.7$	0.450
72-187 Operino	orange	$0.718 \pm 0.11$	$423.3 \pm 21.1$	0.170
Orama	orange	$0.328 \pm 0.06$	$292.1 \pm 9.0$	0.112
Sansibar	orange	$0.534 \pm 0.30$	$298.3 \pm 3.7$	0.179
Rhianna	rose	$0.292 \pm 0.08$	$113.5 \pm 13.3$	0.257
Camaraque	red	$0.698 \pm 0.16$	$474.3 \pm 12.2$	0.147
Funtelle	red	$0.855 \pm 0.15$	$291.8 \pm 9.3$	0.293
Gardenberry	red	$0.902 \pm 0.11$	$318.3 \pm 6.0$	0.283
Idolini	red	$0.854 \pm 0.15$	$411.6 \pm 19.8$	0.207
Mecano	red	$0.501 \pm 0.13$	$313.4 \pm 14.1$	0.160
Messina	red	$0.384 \pm 0.16$	$144.0 \pm 3.1$	0.267
Monterey	red	$1.065 \pm 0.14$	$394.4 \pm 21.0$	0.270
Rugantino	red	$0.244 \pm 0.19$	$259.7 \pm 10.0$	0.094
Seviocard	red	$0.337 \pm 0.22$	$261.9 \pm 11.1$	0.129
Supersweet	red	$1.050 \pm 0.14$	$159.5 \pm 7.1$	0.658
Tommagino	red	$0.535 \pm 0.15$	$140.2 \pm 5.5$	0.382
TZ 4111	red	$0.551 \pm 0.13$	$217.8 \pm 3.2$	0.253
Crispino Plum	brown	$1.067 \pm 0.14$	$480.6 \pm 15.8$	0.222
Tiger	brown/green	$0.967 \pm 0.19$	$295.7 \pm 20.5$	0.327




## **Publikation II**

**Kurze, Elisabeth;** Kock, Vanessa; Lo Scalzo, Roberto; Olbricht, Klaus; Schwab, Wilfried (2018)  
Effect of the Strawberry Genotype, Cultivation and Processing on the Fra a 1 Allergen Content. *Nutrients*,  
10(7), pii: E857.



Article

# Effect of the Strawberry Genotype, Cultivation and Processing on the Fra a 1 Allergen Content

Elisabeth Kurze <sup>1</sup>, Vanessa Kock <sup>1</sup>, Roberto Lo Scalzo <sup>2</sup>, Klaus Olbricht <sup>3,4</sup> and Wilfried Schwab <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Biotechnology of Natural Products, Technische Universität München, Liesel-Beckmann-Str.1, 85354 Freising, Germany; elisabeth.kurze@tum.de (E.K.); vanessa.kock@tum.de (V.K.)

<sup>2</sup> Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, Unità di ricerca per i processi dell'industria agroalimentare (CREA-IAA), via Venezian 26, 20133 Milan, Italy; roberto.loscalzo@crea.gov.it

<sup>3</sup> Hansabred GmbH & Co. KG, Radeburger Landstr. 12, 01108 Dresden, Germany; k.olbricht@hansabred.org

<sup>4</sup> Humboldt-Universität zu Berlin, Albrecht Daniel Thaer-Institute, 10099 Berlin, Germany

\* Correspondence: wilfried.schwab@tum.de; Tel.: +49-8161-712912

Received: 16 May 2018; Accepted: 28 June 2018; Published: 2 July 2018



**Abstract:** Birch pollen allergic patients show cross-reactivity to vegetables and fruits, including strawberries (*Fragaria × ananassa*). The objective of this study was to quantify the level of the Fra a 1 protein, a Bet v 1-homologous protein in strawberry fruits by a newly developed ELISA, and determine the effect of genotype, cultivation and food processing on the allergen amount. An indirect competitive ELISA using a specific polyclonal anti-Fra a 1.02 antibody was established and revealed high variability in Fra a 1 levels within 20 different genotypes ranging from 0.67 to 3.97 µg/g fresh weight. Mature fruits of red-, white- and yellow-fruited strawberry cultivars showed similar Fra a 1 concentrations. Compared to fresh strawberries, oven and solar-dried fruits contained slightly lower levels due to thermal treatment during processing. SDS-PAGE and Western blot analysis demonstrated degradation of recombinant Fra a 1.02 after prolonged (>10 min) thermal treatment at 99 °C. In conclusion, the genotype strongly determined the Fra a 1 quantity in strawberries and the color of the mature fruits does not relate to the amount of the PR10-protein. Cultivation conditions (organic and conventional farming) do not affect the Fra a 1 level, and seasonal effects were minor.

**Keywords:** strawberry; food allergy; Fra a 1; pathogenesis-related proteins; indirect competitive ELISA

## 1. Introduction

Berries are consumed worldwide as fresh fruits as well as processed food products and are an important source of essential nutrients and health beneficial phytochemicals [1]. Strawberry fruits (*Fragaria × ananassa*, *F. × ananassa*) belonging to the group of *Rosaceae* contain high content of vitamin C, folate and phenolic compounds such as anthocyanins, flavonols, flavanols and ellagitannins [2]. Besides their health-beneficial effects e.g., lowering the risk of cardiovascular diseases [3] and cancer [4], strawberry fruits contain proteins, which can elicit food allergies. During the last decades, the prevalence of allergies increased drastically whereby 3–4% of the adult population and up to 5% of children are affected by food allergies [5]. Sensitization patterns of patients suffering from allergies differ due to diverse geographical distribution of pollen allergens and alimentary habits [6]. In Northern Europe, sensitization against Bet v 1, the major allergen from birch pollen (*Betula verrucosa*), dominates [7]. IgE antibodies produced in response to a primary sensitization to birch pollen allergens can cross-react with similar allergen epitopes from different plant origins leading to birch-pollen related food allergy [8]. Local symptoms affecting the skin (itching) and the mucous membranes (rhinitis)

or further more systemic symptoms (asthma, anaphylactic shock) are characteristic afflictions [9]. Food allergies leading to subsequent exclusion of specific fruits and vegetables from a balanced and healthy diet are further associated with a reduced life quality.

Pathogenesis-related (PR) proteins presenting a major source of plant-derived food allergens can be subdivided into 17 different protein families and are widely distributed in the plant kingdom [8]. As part of the plant defense system, expression of *PR-10* genes is induced upon various abiotic and biotic factors such as pathogen attack, wounding, environmental changes and chemicals. PR-10 proteins, including Bet v 1 and homologous allergens from *Rosaceae* such as Mal d 1, the major allergen from apple (*Malus domestica*) or Pru p 1, an allergen from peach (*Prunus persica*), are intracellular proteins with a molecular weight of 16–18 kDa and sensitive to heat and proteases [10]. The widespread occurrence and the high amino acid sequence homology within the PR-10 protein family emphasizes an important function [11].

The genus *Fragaria* comprises numerous species with variations in fruit size and color including red, white and yellow fruits, content of aromatic compounds and genetic diversity with ploidy levels ranging from diploid to decaploid [12]. The octoploid ( $2n = 8x = 56$ ) garden strawberry *F. × ananassa* Duch. is the primary hybrid-species used for cultivation and commerce and is grown all over the world. The wild members of *F. vesca* ( $2n = 2x = 14$ ), also known as woodland strawberry, bear small aromatic fruits and are distributed throughout Europe, Northern Asia and North America [13]. *F. nilgerrensis* ( $2n = 2x = 14$ ), naturally bearing small white fruits, has a fruity banana-like or apricot/peach like aroma [14]. Other species are *F. × vescana* ( $2n = 10x = 70$ ) obtained by cross-breeding *F. × ananassa* × *F. vesca*, the Chilean strawberry *F. chilensis* ( $2n = 8x = 56$ ) and the musk strawberry *F. moschata* ( $2n = 6x = 42$ ).

Strawberry fruit are a source of allergens. Currently seven proteins including different isoforms have been found in strawberry fruits ([www.allergen.org](http://www.allergen.org)). They may be responsible for allergenic reactions in sensitized individuals as well as reactions caused due to cross-reactivity of allergens. The non-specific lipid transfer protein Fra a 3 and the profilin Fra a 4 are responsible for strawberry allergies mainly occurring in the Mediterranean area [15], while reactions to the Bet v 1-homologous protein Fra a 1 appear in North and Central Europe [16]. About 30% of patients sensitized to Bet v 1 report allergenic reactions after consumption of strawberry fruits. Compared to fresh fruits, processed food and food products are often tolerated due to heat and protease instability of PR-10 proteins. Bet v 1.0101 (UniProt P15494) and Fra a 1 (UniProt Q3T923) share 53.8% amino acid identity. Fra a 1 shares even 76.3% identity with Mal d 1 (UniProt P43211), the major apple allergen. The three dimensional structure of Fra a 1 shows an identical protein fold with other members of the PR-10 family forming a seven-stranded antiparallel  $\beta$ -sheet with two short V-shaped  $\alpha$ -helices and a long  $\alpha$ -helix at the C-terminal [17]. Besides the highly similar glycine-rich loop, the protein forms a hydrophobic cavity indicating a potential role in binding nonpolar molecules. Fra a proteins are able to bind natural flavonoids such as quercetin-3-O-glucuronide and (+) catechin in this hydrophobic cavity [18]. Moreover, the Fra a 1 expression is linked to flavonoid pathway indicating an essential biological role in pigment formation in fruits [19]. In addition, qPCR analysis showed the ripening-related gene expression pattern of *fra a 1.02* and basophil activation tests demonstrated that Fra a 1.02 and Fra a 1.03 proteins resulted in the highest activation of basophils, compared to the other isoforms [16].

As previous studies showed that the allergenic potential of tomatoes [6] and apples [20,21] is cultivar-dependent; the aim of this study was to establish an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method for the quantification of the Fra a 1 allergen in strawberry fruits of different genotypes. The influences of genetic effect, cultivation (organic vs. conventional) as well as various processing methods (drying with oven, sun or freeze-drying) on allergen content were investigated.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Chemicals

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany), Merck (Darmstadt, Germany) and Carl Roth (Karlsruhe, Germany) unless otherwise noted.

### 2.2. Plant Material

In May and June 2017, 20 strawberry cultivars from six species (Table S1) differing in color, size and shape were harvested at full maturity. Plants were grown on the field of Hansabred GmbH & Co. KG (Dresden, Germany) under same light, temperature and water conditions. Fruits were picked at full maturity (day post anthesis 35–40), at the time of the main harvest and stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  until analysis.

In the years 2015–2017, *E. × ananassa* cultivar Asia, a well-known cultivar used in organic cultivation, was grown either conventionally or organically in Forlì-Cesena, Italy (lat.  $44^{\circ}13'15.91''$  N; long.  $12^{\circ}14'41.27''$  E). The specific details for growing conditions are listed in Tables S2 and S3. Fruits were harvested at full maturity (35–40 days post anthesis) and divided in four aliquots, one was directly stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (fresh) and the remaining three were subjected to different drying processes (freeze, oven and sun).

### 2.3. Heterologous Expression and Purification of rFra a 1.02 Protein

The plasmid construct pQE70 *fra a 1.02* generated in a previous study [16,22] was used for transformation in the expression strain *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 (DE3) pLysS. Recombinant Fra a 1.02 was expressed as a fusion protein with a C-terminal His-tag. Cells were grown in 1 l LB medium containing  $100\text{ }\mu\text{g/mL}$  ampicillin and  $34\text{ }\mu\text{g/mL}$  chloramphenicol at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  until optical density reached 0.6. After induction of gene expression with  $1\text{ mM}$  isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside, (IPTG) the culture was further incubated for 20 h at  $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Cells were harvested by centrifugation (10 min;  $5282\text{ g}$ ;  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) and cell pellets were stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The purification of the recombinant protein was performed via immobilized metal affinity chromatography (IMAC) using the Profinity IMAC Resin (Biorad). After suspending the pellet in 10 mL binding buffer (30 mM Tris-HCl pH 7.5; 500 mM NaCl; 15 mM imidazole) supplemented with  $1\text{ mM}$  phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and  $\beta$ -mercaptoethanol, ultrasonication and centrifugation (30 min;  $21,191\text{ g}$ ;  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), the supernatant containing soluble proteins was incubated for 2 h at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  with the IMAC Resin. Following two washing steps with 10 mL of binding buffer, rFra a 1.02 protein was finally eluted with elution buffer (30 mM Tris-HCl pH 7.5; 500 mM NaCl; 250 mM imidazole). The purity of the protein fractions was evaluated by SDS-PAGE. Five  $\mu\text{g}$  protein was separated in a 12% acrylamide stacking gel at 100 V for 2.5 h under reducing conditions with  $\beta$ -mercaptoethanol. Protein staining was performed with Coomassie Brilliant Blue G250. As molecular weight marker PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, Planegg, Germany) was used. Pure elution fractions were pooled and dialyzed against carbonate buffer (pH 9) at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 20 h. Insoluble particles were removed by centrifugation. After freeze-drying, proteins were dissolved in Milli Q, containing  $1\text{ mM}$  L-cysteine and stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  and were further used as a standard substance for indirect competitive ELISA.

In addition, refolding of the rFra a 1.02 protein after denaturation with urea and antibody binding was examined by purification of the protein from the insoluble fractions (inclusion bodies). Therefore, the remaining cell pellet after cell lysis, ultra-sonication and centrifugation was dissolved in denaturation buffer (30 mM Tris-HCl pH 7.5; 0.5 M sodium chloride; 15 mM imidazole; 8 M urea) at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  over-night. After centrifugation (30 min;  $21,191\text{ g}$ ;  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) proteins were refolded via dialysis against refolding buffer (30 mM Tris-HCl pH 7.5; 0.5 M sodium chloride; 15 mM imidazole), at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  over-night and centrifuged again to remove insoluble proteins. The supernatant was incubated with IMAC resin for 2 h at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  and protein purification was performed as described for the soluble protein fraction. The purity of the protein fractions was examined by SDS-PAGE followed by Coomassie staining and

IgG binding capacity was analyzed by Western blot using 2 µg/mL of a primary polyclonal antibody with specificity against Fra a 1.02 and a secondary Anti-Rabbit-Alkaline Phosphatase (AP) antibody diluted 1:7500 (*v/v*).

#### 2.4. Protein Determination

The total protein concentration was quantified using Roti<sup>®</sup>-Nanoquant following the manufacturer's instructions (Carl Roth, Germany). Measurement was performed in microtiter plates (Greiner 96 well plates, polypropylene, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany). Bovine serum albumin (BSA) was used as standard protein. Absorption at 450 nm and 590 nm was measured with the CLARIOstar plate reader (BMG Labtech, Germany).

#### 2.5. Production of Polyclonal Anti-Fra a 1.02 Antibody

Davids Biotechnologie GmbH (Regensburg, Germany) produced the polyclonal antibody with specificity against Fra a 1.02. Elution fractions of purified rFra a 1.02 protein purified from soluble protein fraction were used for immunization of rabbits comprising six immunizations within 63 days. Furthermore, the antiserum was purified via affinity chromatography using a Fra a 1.02 bound column. Finally, the purified polyclonal antibody (0.9 mg/mL) was used for Western blot analysis and ELISA. As secondary antibodies, Anti-Rabbit-Horseradish peroxidase (HRP) and Anti-Rabbit-Alkaline Phosphatase (AP) were purchased from Carl Roth (Germany).

#### 2.6. Thermal Treatment of rFra a 1.02

Freeze-dried rFra a 1.02 from soluble and insoluble fraction was diluted in PBS (pH 7.4) to five µg total protein and further incubated for 10, 30, 60 and 90 min at 99 °C in a Thermoblock (Thermomixer comfort, Eppendorf), and cooled on ice immediately. As control, non-heated protein solution was used. The integrity of the protein was analyzed by SDS-PAGE and IgG binding was examined via Western blot using the specific polyclonal anti-Fra a 1.02 antibody.

#### 2.7. Processing of Strawberry Fruits

Strawberries from cultivar Asia (*F. × ananassa* Duch.) were harvested at full maturity in May 2015 to 2017 and were further subjected to drying. Ripe fruits were cut into halves and dried using three different methods upon constant dry weight (DW). Oven and solar-dried fruits were only available in 2015 and 2016. For oven drying a conventional oven dryer (Thermo-Lab, Codogno, Italy) was used. Drying process was performed at 55 °C for 72 h. Solar drying via solar irradiance was performed in a miniaturized plant (TermoTend System-GTek, Carpi, Italy) for 7 to 10 days. Temperature varied between 22 °C and 35 °C due to day-night-cycle. Freeze-drying was performed from −35 °C to room temperature for 96 h using an air-forced tunnel and a Dura-Stop tray dryer combined with a Dura-Dry condenser module for lyophilization (FTS Systems, Stone Ridge, New York, NY, USA). Freeze-dried samples were further powdered before storage. Water loss was calculated from the weights of fresh and dried samples. All samples were stored at −20 °C until analysis.

#### 2.8. Strawberry Extracts

Proteins from fresh and dried strawberry fruits were extracted according to Vassilopoulou [23]. To reduce the allergen variability within one fruit and between fruits, eight frozen strawberry fruits of one genotype were cut into small pieces, pooled and grind to a fine powder using a commercial blender (Personal Blender PB 250). For each sample protein extraction was performed in triplicates. Strawberry powder was homogenized with extraction buffer (200 mM potassium phosphate buffer pH 7; 20 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA); 100 mM diethyldithiocarbamic acid (DIECA); 5% (*w/v*) polyvinylpyrrolidone (PVPP); 0.5% (*v/v*) Tween 20) containing 0.5 mM PMSF and protease inhibitor cocktail (Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche). For fresh fruits, a ratio of 1:2 (*w/v*)

was applied, whereas for dried strawberries a ratio of 1:8 (*w/v*) was used to warrant proper mixing. After incubation for 30 min at 4 °C and end-over-end rotation, insoluble particles were removed by centrifugation (15 min; 5292 g; 4 °C). The supernatant containing soluble proteins was dialyzed against phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4) over night at 4 °C (ZelluTrans 3.5 kDa MWCO, Carl Roth). To remove other insoluble precipitates, a second centrifugation (10 min; 16,100 g; 4 °C) was performed and extracts were directly used for allergen determination via indirect competitive ELISA.

### 2.9. Temperature Stability of Protein Extracts

Protein extracts from *F. × ananassa* cultivars Elsanta and Snow White, *F. × vescana* cultivar Florika and *F. vesca* cultivar Yellow Wonder were incubated for 10 min at 30, 40, 50, 60, 70, 80, and 90 °C in a Thermoblock (Thermomixer comfort, Eppendorf, Germany), and cooled on ice. As control, non-heated protein extract was used. The stability of the native Fra a 1 protein was further analyzed by indirect competitive ELISA.

### 2.10. Indirect Competitive ELISA

The Fra a 1 content of strawberry samples was quantified by indirect competitive ELISA using rFra a 1.02 as standard protein and competitor and a specific polyclonal anti-Fra a 1.02 antibody. Microtitre plates (immunoGrade™ Brand) were coated with 100 µL of 0.5 µg/mL rFra a 1.02 diluted in coating buffer (PBS pH 7.4) and incubated at 4 °C over-night. After three washing steps with 300 µL of washing buffer (0.05% (*v/v*) Tween 20 in PBS), free binding sites were blocked with 200 µL of 1% milk powder diluted in PBS for 2 h at room temperature and washed as before. For each strawberry sample protein extraction was performed in triplicates and analyzed on the same microtitre plate. Fifty µL of dialyzed strawberry protein extracts were diluted (1:2 and 1:4) in washing buffer and pipetted in triplicates to each well as “free” Fra a 1. For competition between free and immobilized allergen, 50 µL of 1 µg/mL polyclonal anti-Fra a 1.02 antibody solution, diluted in washing buffer, was added and incubated for 3 h at 4 °C. To remove unbound primary antibody, plates were washed four times and sequentially incubated with 100 µL of 1 µg/mL Anti-Rabbit-HRP (Carl Roth, Germany) for 1 h at room temperature. After a final washing step, 100 µL 1-Step Ultra 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) ELISA solution was added and color development was performed for 10 min in the dark. The enzymatic reaction was stopped with 100 µL 2 M sulfuric acid and absorption was detected at 450 nm and 620 nm using the CLARIOstar plate reader (BMG Labtech, Germany). Blank well controls and standard curves were applied on each microplate. The standard curve was measured with serial dilutions of 0.0001–50 µg rFra a 1.02/mL. Fifty µL/well of rFra a 1.02 was pipetted as “free” allergen and followed by the same procedure as the strawberry samples. Data analysis was performed using the MARS software (BMG Labtech, Germany). Allergen amount in strawberry extracts was quantified with 4-Parameter Plot and expressed as µg Fra a 1/g FW respectively µg Fra a 1/g DW. Dry matter was converted to fresh weight (FW) considering the loss of water in percent during drying process.

### 2.11. Statistical Analysis

The statistical analysis software R (The R Foundation for Statistical Computing, R version i386 3.5.0) was used for data analysis and illustration of box plots. Experimental data were analyzed using the nonparametric Kruskal–Wallis test. Median values and statistical significance levels between the variable groups were calculated using Dunn’s Test and p-value adjustment according to Bonferroni method. *p* values of ≤0.05 were considered as significant.

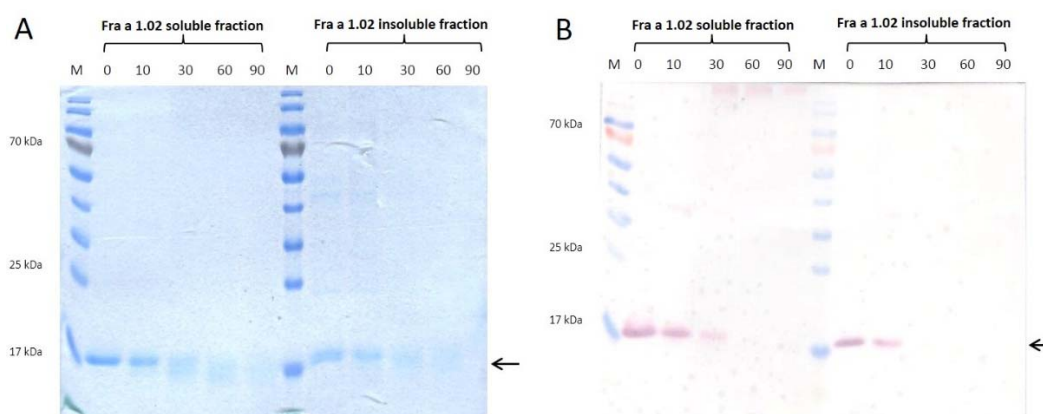
## 3. Results

### 3.1. Purification and Thermal Stability of Recombinant Fra a 1.02 Protein from Soluble and Insoluble Fraction

Recently, eight isoforms of the Fra a 1 protein have been identified as Bet v 1-related allergens in *F. × ananassa* [16]. The gene encoding the isoform Fra a 1.02 is highly expressed in the fruit tissue

compared to the low expression level of Fra a 1.01E and 1.03; Fra a 1.01E and Fra a 1.03 are highly expressed in roots and open flowers, respectively. In general, their relative expression levels are low [19]. Besides the high relative expression and the highest activation of basophils among all eight isoforms sharing 74.5–97.5% amino acid sequence identity [16], Fra a 1.02 was identified as the major strawberry allergen and was therefore selected for the purpose of this study. Visualized by SDS-PAGE, the rFra a 1.02 produced in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS as a C-terminal His-tag fusion protein showed one dominant band at the predicted molecular weight of 18 kDa in the eluted fractions of both, soluble and refolded insoluble fraction (Figure 1A). The polyclonal anti-Fra a 1.02 antibody was produced upon immunization of rabbit with the purified recombinant protein from the soluble fraction. IgG antibodies recognized the soluble as well as the refolded rFra a 1.02 form as confirmed by Western blot (Figure 1B). In addition, different isoforms of the native Fra a 1 contained in protein extracts isolated from fruits of different strawberry varieties were specifically recognized among total soluble protein (Figure S1).

To investigate the effect of heat on IgG recognition, dialyzed elution fractions of rFra a 1.02 purified from soluble and refolded insoluble protein fractions were thermally treated and examined by SDS-PAGE (Figure 1A) and Western blot (Figure 1B). After 10 min at 99 °C rFra a 1.02 protein was still detectable showing a band at 18 kDa in the Coomassie stained gel (Figure 1A). After a prolonged heating process for 30, 60 and 90 min the protein band became more and more blurred. In accordance with the SDS-PAGE, IgG-binding activity decreased after 30 min of thermal treatment showing barely visible protein bands (Figure 1B). Consequently, after 30 min at 99 °C no bands were visible.



**Figure 1.** Heat stability of recombinant Fra a 1.02. (A) SDS-PAGE performed under reducing conditions with  $\beta$ -mercaptoethanol and (B) Western blot analysis of dialyzed elution fractions of the rFra a 1.02 protein purified from soluble and refolded insoluble fraction. Two  $\mu$ g of protein were heated for 10, 30, 60 and 90 min at 99 °C. Untreated protein served as control (0). Coomassie Brilliant Blue G250 was used for protein staining. For Western blot specific polyclonal anti-Fra a 1.02 antibody was used. M: PageRuler Prestained Protein Ladder.

### 3.2. Establishment and Validation of the ELISA

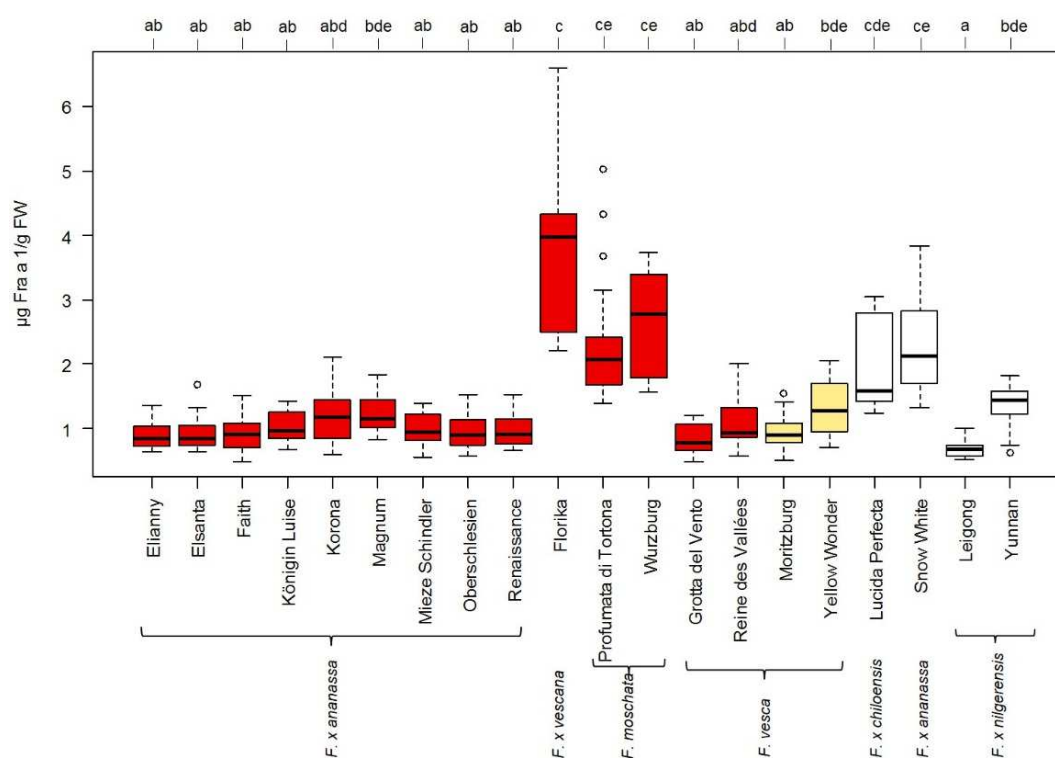
Using the rFra a 1.02 as a solid phase-bound antigen and as a standard protein, an indirect competitive ELISA was established to determine the Fra a 1 content in strawberries. A specific polyclonal Fra a 1.02-rabbit antibody was used to quantify the Bet v 1-homologous in strawberry extracts. The standard curve of the ELISA evaluated with the MARS software showed a typical linear range from 0.01 to 10.0  $\mu$ g/mL with reproducible results (Figure S2). The inter-assay variation of the absorption values of the standard curve (serial dilutions of 0.0001–50  $\mu$ g rFra a 1.02/mL for competition reaction) performed in triplicates were under 5%. The intra-assay (day-to-day/plate to plate) variation was under 20%. Standard curves were similar and, therefore, resulting data of strawberry samples with unknown Fra a 1 content could be compared. The established ELISA method remained unaffected by small variations of parameters (room temperature, preparation of buffer solution). Indicated by



the decrease of the absorption signal of the four-parameter plot, the lowest concentration of the target protein Fra a 1 was 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$  reflecting the detection limit. Strawberry extracts were diluted to a concentration within the working range and gave reliable results demonstrating the dilutional linearity.

### 3.3. Influence of Strawberry Variety on Fra a 1 Content

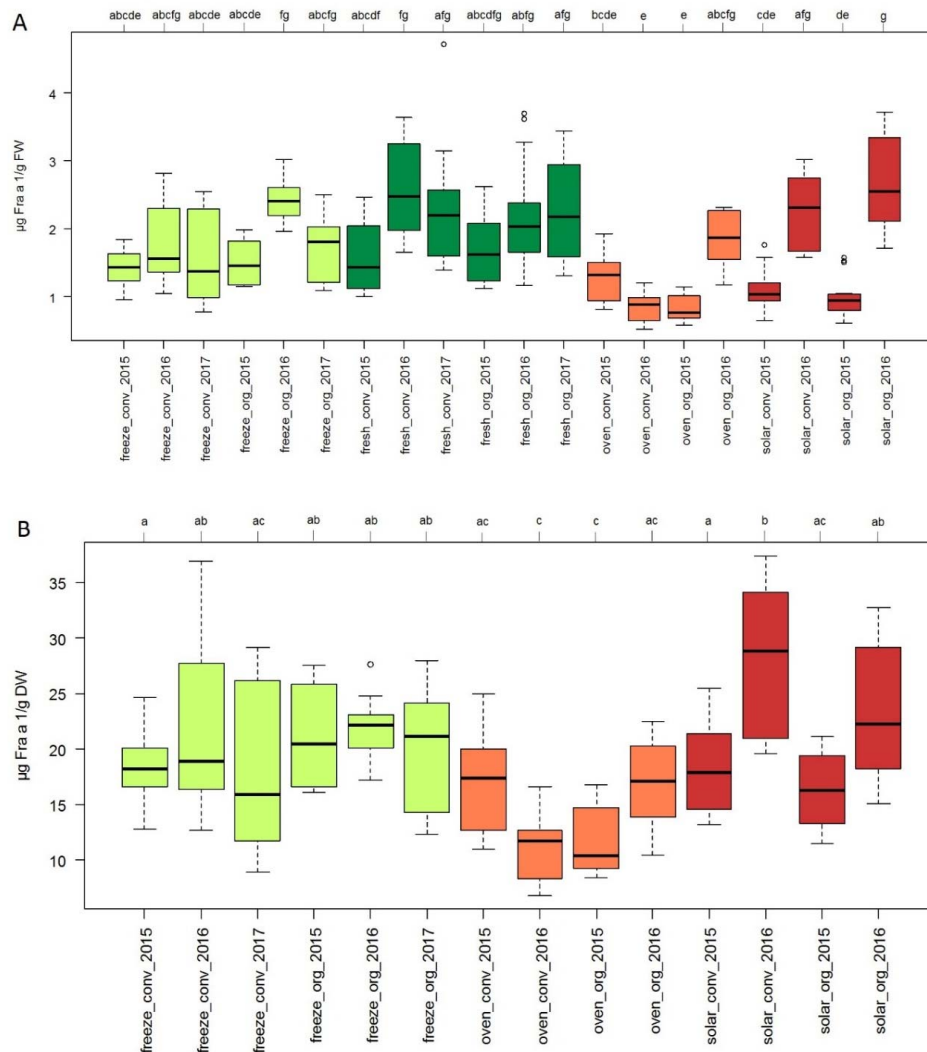
Fruits of twenty different *Fragaria* genotypes including mature red-, white-, and yellow-colored fruits of different sizes were investigated regarding the genetic effect (cultivar-to-cultivar) on Fra a 1 expression at the translational level (Figure 2). An established method was used for protein extraction [23]. The total soluble protein level of fresh strawberry fruits varied between 0.89 and 2.04 mg soluble protein/g FW (Table S1). The Fra a 1 concentration ranged from 0.67 to 3.97  $\mu\text{g}/\text{g}$  FW (median value) comprising five significance groups (letters a–e) with 5% of significance level ( $p$  value  $\leq 0.05$ ) according to the Dunn's Test (Figure 2). The *F. x vescana* cultivar Florika showed the highest level of Fra a 1 (3.97  $\mu\text{g}/\text{g}$  FW) followed by *F. moschata* accession Wuerzburg with 2.78  $\mu\text{g}/\text{g}$  FW. The lowest concentration was determined in *F. nilgerrensis* accession Leigong and *F. vesca* accession Grotta del Vento with 0.67 and 0.78  $\mu\text{g}/\text{g}$  FW, respectively. Leigong showed a 5.9-fold lower Fra a 1 content compared to Florika. The *F. x ananassa* genotypes contained a similar level of the allergen ranging between 0.84 and 1.17  $\mu\text{g}/\text{g}$  except for the white-fruited *F. x ananassa* cultivars Snow White with significant higher Fra a 1 content of 2.13  $\mu\text{g}/\text{g}$  FW and Lucida Perfecta with 1.58  $\mu\text{g}/\text{g}$  FW. Even the red-fruited genotypes of *F. vesca* Grotta del Vento and Reine des Vallées as well as the yellow-fruited *F. vesca* Moritzburg revealed allergen levels similar to those of *F. x ananassa* genotypes. *F. vesca* Yellow Wonder, *F. chiloensis* Lucida Perfecta and *F. nilgerrensis* Yunnan showed slightly higher Fra a 1 levels than the *F. x ananassa* cultivars. The percentage of Fra a 1 referred to the total soluble protein amount ranged from 0.04% for Leigong to 0.28% for Florika (Table S1).



**Figure 2.** Fra a 1 content in fruits of different strawberry genotypes. Allergen content in  $\mu\text{g}$  Fra a 1/g FW determined with indirect competitive ELISA. The color of the box plots corresponds to the color of the ripe strawberry fruits. Comparisons of median values were performed by the Dunn's Test. Significant differences for each cultivar were calculated at a significance level of 5% ( $p$  value  $\leq 0.05$ ) indicated with letters a–d.

### 3.4. Effect of Cultivation and Processing Methods on Allergen Content in Strawberry Fruits

The effects of cultivation conditions, seasonal effects and processing techniques such as drying on the Fra a 1 content were examined for *F. × ananassa* cultivar Asia (Figure 3A). Cultivar Asia was chosen as it is tolerant against most common root-diseases and thus, used in organic farming.



**Figure 3.** Fra a 1 content in fresh and dried fruits of strawberry cultivar Asia. (A) Allergen content in  $\mu\text{g Fra a 1/g FW}$  and (B)  $\mu\text{g Fra a 1/g DW}$  determined with indirect competitive ELISA. Plants were grown in Italy in three consecutive years from 2015 to 2017 either conventional (conv) or organic (org). Ripe fruits (fresh) were dried via freeze-drying (freeze), in the oven (oven) and in the sun (solar). Comparisons of median values were performed by the Dunn's Test. Significant differences for each group were calculated at a significance level of 5% ( $p$  value  $\leq 0.05$ ) indicated with different letters (a–g).

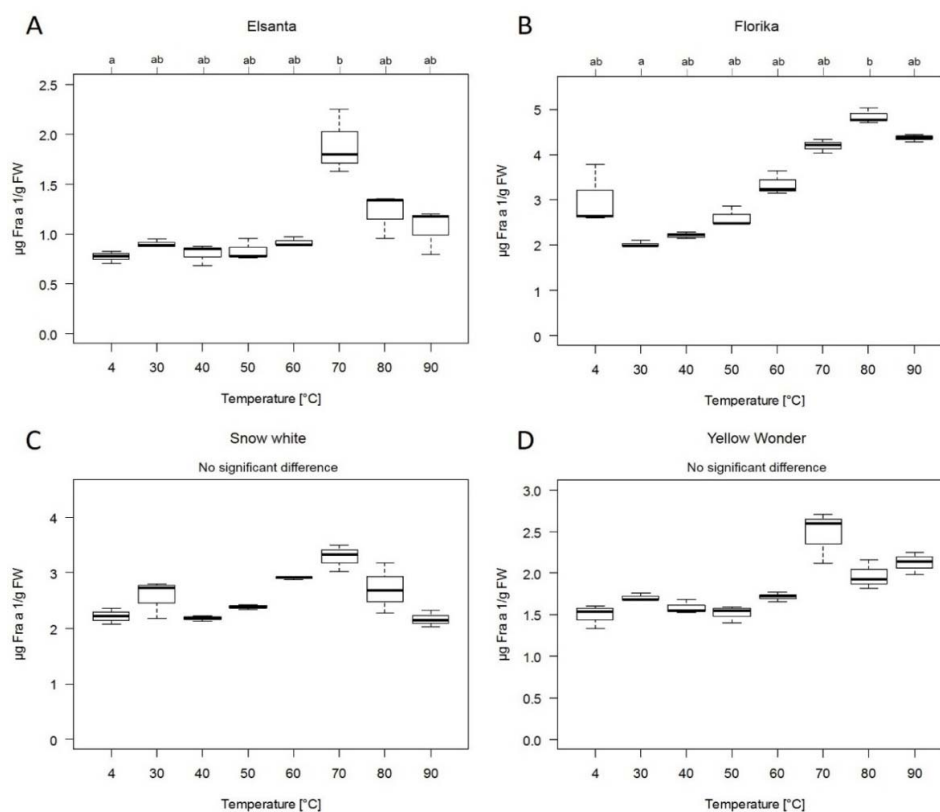
Statistical evaluation of the data yielded seven significance groups (letters a–g) with 5% significance level ( $p$  value  $\leq 0.05$ ) according to the Dunn's Test when the Fra a 1 content of the samples was expressed as  $\mu\text{g/g FW}$ . The Fra a 1 level ranged from 0.77  $\mu\text{g/g FW}$  for oven-dried fruits grown organically in 2015 up to 2.54  $\mu\text{g/g FW}$  for solar-dried samples grown organically in 2016. In freeze-dried samples Fra a 1 levels between 1.38 and 2.4  $\mu\text{g/g FW}$  were detected, which were similar to the concentrations found in fresh fruits ranging from 1.44 and 2.48  $\mu\text{g/g FW}$ . Two out of eight oven and solar-dried samples showed significantly lower Fra a 1 concentrations compared to fresh fruits.

Three significance groups (letters a–c) were obtained when the Fra a 1 values were expressed as  $\mu\text{g/g DW}$ . In dried samples the Fra a 1 content varied between 10.4 and 28.8  $\mu\text{g/g DW}$  for oven-dried fruits grown organically in 2015 and solar-dried fruits grown conventionally in 2016 (Figure 3B). Freeze-dried samples showed no significant differences with similar Fra a 1 content ranging from 16 to 22.1  $\mu\text{g/g DW}$  in all three years. Furthermore, no significant differences between cultivation techniques, either organic or conventional, were found for all dried samples. Both, seasonal effects and effects of cultivation conditions were observed for oven dried samples. Moreover, solar-dried strawberries showed year-dependent Fra a 1 levels. Although the growing method had no influence on solar-dried fruits, seasonal variations had an impact, whereby the allergen content in 2016 was significantly higher than in 2015.

### 3.5. Temperature Stability of Native Fra a 1 in Strawberry Protein Extracts

The temperature stability of Fra a 1 in protein extracts isolated from *F. × ananassa* cultivars Elsanta and Snow White, *F. × vescana* cultivar Florika and *F. vesca* cultivar Yellow Wonder was investigated.

Extracts were heated for 10 min at different temperatures ranging from 30 to 90 °C followed by allergen quantification via ELISA (Figure 4). Up to 50 °C Fra a 1 level of the different samples was rather constant, except for Florika. The detected Fra a 1 content increased for all cultivars at higher temperatures (70 °C) compared to the untreated 4 °C control. The highest Fra a 1 level was detected at 70 °C for cultivars Elsanta, Snow White and Yellow Wonder (Figure 4A,C,D) and at 80 °C for cultivar Florika (Figure 4B).



**Figure 4.** Thermal stability of native Fra a 1. Allergen content of strawberry cultivar (A) Elsanta, (B) Florika, (C) Snow White and (D) Yellow Wonder in  $\mu\text{g Fra a 1/g FW}$ . Strawberry extracts were heated for 10 min at increasing temperatures from 30 to 90 °C. Untreated extract served as control (4 °C). Fra a 1 content was determined with indirect competitive ELISA. Comparisons of median values were performed by the Dunn’s Test. Significant differences for each group were calculated at a significance level of 5% ( $p$  value  $\leq 0.05$ ) indicated with letters a and b.

## 4. Discussion

Food allergies especially to *Rosacea* fruits such as apple, peach and strawberry are often associated with birch pollen-related allergies due to cross-reacting IgE antibodies [24]. About 70% of birch-pollen allergic patients show IgE-mediated food allergies against various fruits and vegetables [25]. Strawberry allergy mainly affects 30% of population revealing adverse reactions after ingestion of the fruit [26]. The Bet v 1-homologous Fra a 1 is recognized by IgE from strawberry allergic patients [27] and cross-reacts with antibodies to Bet v 1 and the homologous apple allergen Mal d 1 (61% and 78% sequence identity, respectively). Here, we report the first ELISA applicable for the quantification of Fra a 1, a member of the PR-10 family in strawberry fruit. Studies showed that Fra a 1 constitutes a protein family of at least eight members according to the corresponding sequences found in the *F. vesca* and *F. × ananassa* genomes [16]. Since isoform Fra a 1.02 showed high basophil activation in BAT and its coding gene is highly expressed in ripe fruits, Fra a 1.02 was identified as important allergen in strawberry fruits and selected as target protein. Due to the use of the polyclonal antibody raised against Fra a 1.02, it is to be assumed that other isoforms of the same protein in strawberry fruit extracts can be recognized. Therefore, the determination of the total Fra a 1 amount is possible.

### 4.1. Biochemical Properties and Thermal Stability of Recombinant Fra a 1.02

SDS-PAGE analysis of the rFra a 1.02 protein under reducing conditions showed a distinct band with a molecular weight of 18 kDa (Figure 1). The polyclonal anti-Fra a 1.02 antibody showed binding capacity to the protein purified from the soluble fraction as well as refolded from the insoluble fraction (Figure 1). Thus, denaturation with urea and refolding via dialysis allowed recognition of essential epitopes for antigen-antibody binding (Figure 1). Formation of inclusion bodies of recombinant proteins is a frequently observed phenomenon as overextension of the protein translation and folding machinery in *E. coli* may lead to misfolded, inactive protein aggregates whereby the content of soluble proteins decreases. A solution is the purification of the inclusion bodies under denaturing conditions and refolding of the target protein. This procedure delivers the protein in high yield and purity. Furthermore, depending on the conditions during bacterial cultivation, correctly folded secondary structure elements can be present [28]. Recombinant proteins isolated from inclusion bodies and natural allergens may show similar allergenic activities, as demonstrated for Pyr c 1, the Bet v 1-homolog from pear [29]. Specific IgE sera from patients allergic to pear recognized the recombinant Pyr c 1 refolded from insoluble fraction. In addition to soluble and refolded rFra a 1.02 the polyclonal anti-Fra a 1.02 antibody also specifically recognized native Fra a 1 from strawberry extracts as verified by Western blot (Figure S1). Except for an unknown cultivar, all other protein extracts from fruits of known strawberry cultivars showed a single visible band in Western blot whereas native Fra a 1 was barely visible by Coomassie staining.

The rFra a 1.02 protein is thermally unstable (Figure 1). Due to heat treatment at 99 °C, simulating the cooking process, the protein structure of the recombinant protein changed, so that recognition and binding of the specific polyclonal antibody was remarkably reduced or even not possible (after 60 and 90 min) depending on the time of heat treatment. Likewise, other PR-10 proteins, such as rPru av 1 from cherry [30] and Mal d 1 from apple [31] are heat sensitive. A common feature of PR-10 proteins is the thermal instability and enzymatic digestion by proteases within the lower part of the gastrointestinal tract [30]. After ingestion of fruits from *Rosaceae* family, symptoms of allergic reactions to PR-10 proteins are restricted to the upper part of the intestinal tract (mouth). Remarkably, the native strawberry Fra a 1 seems to be more heat stable in the strawberry protein extract after short-term heating for 10 min up to 90 °C (Figure 4). Both, recombinant Fra a 1.02 and fruit extracts were diluted or dialyzed in PBS (pH 7.4), respectively. The matrix composition of the extract or binding of natural ligands may have a stabilization effects underlining the function of Fra a 1 proteins in pigment formation and binding of compounds from the secondary metabolic pathway such as quercetin-3-O-glucuronide or (+) catechin [18,19]. Similarly, heating of semi-purified protein extracts from celery tuber and apple for 30 min at 100 °C did not deplete the immune-reactivity of the major

allergens in these samples [31]. In our study, in some cases, the results of the indirect competitive ELISA demonstrated an even higher Fra a 1 content after heating (10 min at 70 °C). The detected increase of Fra a 1 might be due to changes in protein structure after thermal treatment leading to the presentation of essential epitopes for recognition by the specific antibody. Thus, additional Fra a 1 isoforms, besides Fra a 1.02, which might be present in the strawberry protein extracts, could present extra epitopes due to heat-induced conformational changes [32,33]. Nevertheless, prolonged heating resulted in complete protein destruction [30] as shown for rFra a 1.02 in buffer solution (Figure 1). Although Bet v 1 homologous proteins have been generally reported to be sensitive to heat the overall thermal instability might vary due to the primary and secondary structure but also due to the environment in which the protein is heated, e.g., sugar rich solution.

#### 4.2. Fra a 1 Content of Strawberry Fruits Is Genotype Dependent

The variety within the genus *Fragaria* is enormous with diversity in color, size, aroma compound composition and ploidy levels [12]. The fruit color has been correlated with allergen content [34]. Although colorless strawberry cultivars have low commercial importance due to some negative features (small and soft fruits), they attracted attention as two white-fruited cultivars showed low Fra a 1 levels in comparison to red-fruited varieties when examined by 2D-DIGE [35]. Hence, the newly developed ELISA was used to quantify the Fra a 1 content in various strawberry genotypes. Among 20 varieties differing in genus, color and size, the Fra a 1 level varied significantly confirming the genotype dependency (Figure 2). Previous studies obtained similar results and proved that the allergenicity of apples and tomatoes is cultivar dependent [20,36]. All red-fruited cultivars from *F. × ananassa* revealed a similar Fra a 1 content, except for the white-fruited cultivar Snow White, which showed a significant higher Fra a 1 concentration (Figure 2). Snow White was developed by cross-breeding with Chilean landraces of *F. chiloensis*. This pedigree background might be one reason for the high Fra a 1 content, since the *F. chiloensis* cultivar Lucida Perfecta also showed levels higher than that of the red-fruited *F. × ananassa*. Of all investigated cultivars, the highest Fra a 1 level was determined in Florika *F. × vesca* obtained by cross-breeding *F. × ananassa* × *F. vesca*. Due to crossing of cultivated strawberries with wild species nutritional properties may altered as well as unfavorable compounds such as food allergen [37]. Overall, the colorless fruited cultivars showed varying Fra a 1 levels between 0.67 and 2.13 µg/g FW verifying recent results, that white-fruited strawberries do not always show reduced Fra a 1 levels [12]. Despite of the white fruit color of Lucida Perfecta, a representative of *F. chiloensis*, a relative high allergen content of 1.58 µg Fra a 1/g FW was quantified. Plants of the species *F. chiloensis* have been considered resistant against frost and diseases by some breeders and were therefore used as parents for crossing [13]. Robustness and resistance of plants is often related to the expression of PR-10 protein because plants synthesize them in response to different stress factors.

Basophil activation tests demonstrated that fruits from white-fruited cultivars have similar allergenic potential compared to red-fruited cultivars [12]. Similarly, our results show that the Fra a 1 level in fruits of the cultivated strawberry genotype *F. × ananassa* is not statistically significant to the concentration in yellow- and white-fruited genotypes, except Lucida Perfecta and Snow White, which even show higher values. However, it is impossible to conclude on the general allergenicity of the fruits from the different genotypes as allergic reactions are complex processes differing from patient to patient and occurring symptoms cannot be attributed to one single protein. Previous studies showed that the content of the major apple allergen Mal d 1, a Bet v 1- and Fra a 1-homologue, is not directly related to the allergenic response of birch pollen allergic patients due to patient-related variations [38]. In addition, various Fra a 1 isoforms are produced in strawberry fruits during maturation and ripening, which show different binding affinities to the polyclonal antibody and differ considerably in basophil activation [16]. For allergic patients the reaction to a specific PR-10 isoform might be different depending on the IgE-antibodies from patient sera.

#### 4.3. Cultivation Condition and Drying Processing of Strawberries has Minor Effect on Fra a 1 Content

Thermal treatment of food like cooking, boiling or dry heating is an essential process in daily life as well as in food industry. Allergenicity of food can be altered by increasing, unchanging or decreasing the allergen amount, depending on the structure and features of allergic proteins [39]. Since dried fruits are a common product in food industry, especially in cereal, the Fra a 1 amount was quantified in various dried strawberries. Allergic reaction in patients cross-reacting to Bet v 1-homologous proteins of the *Rosaceae* family are primarily caused by fresh fruits and symptoms are mainly restricted to the mouth (OAS) due to the sensitivity to heat and proteases. This implies that processed food or food products might be tolerated [40]. For native Mal d 1 [31] and recombinant Pru av 1 [30] a loss of allergenicity due to thermal processing was observed. In this study we showed that rFra a 1.02 is heat-sensitive in buffer solution (Figure 1) whereas native Fra a 1 was quite stable in a strawberry protein extract (Figure 4).

Changes in micronutrient content, phenolic compound composition acting as natural antioxidants as well as allergen level in strawberry fruits might be explained by a genotype-dependent reaction to various environmental stress-conditions differing from year to year [41]. The influence of cultivation conditions, seasonal effects and drying processes on the Fra a 1 allergen content was examined by indirect competitive ELISA. For fresh strawberries from *F. × ananassa* Asia, no significant differences were obtained comparing the two growing methods organic vs. conventional of the same year (Figure 3A). Seasonal effects were minor and a drastically reduced level of the Fra a 1 was not observed in dried strawberries. The average temperature for drying in the oven was 55 °C. Depending on the sun intensity, the daily temperature varied between 22 and 35 °C for solar drying. Although the protein structure of the native Fra a 1 protein might be changed due to the loss of water during drying, the antibody is still able to recognize the protein or fragments. The temperature rise during processing seems not sufficient to completely destroy essential epitopes. As shown for rFra a 1.02 only prolonged heating at high temperatures results in complete protein destruction and loss of IgG activity (Figure 1). Similarly, the gentle method of freeze-drying known to preserve the protein structure did not affect the Fra a 1 level compared to fresh fruits (Figure 3A).

The meteorological data (Table S3) from the growing location in Italy at Forlì-Cesena presenting the main ripening seasons in April and May revealed a progressive increase in temperature and a decrease in relative humidity from April to May. Temperatures were generally higher in April 2016 whereas atmospheric moisture was higher in May 2016 compared with the other years. Variations of the temperature and humidity might have affected the sensitive signaling pathways within the fruits and consequently the amount of Fra a 1. Thus, varying weather conditions including changes in temperature, precipitation and humidity as well as pathogen infestation seem to have a more important effect on the Fra a 1 level than growing methods. Specific climatic conditions can promote pathogen growth leading to synthesis of PR-10 proteins. This well-known plant response might eventually explain the observed seasonal effect, which is especially obvious for the solar-dried samples. In 2016, the pathogen pressure might be quite intense due to the high humidity and resulted in the highest Fra a 1 levels quantified in the study.

## 5. Conclusions

The content of the Bet v 1-related Fra a 1 protein in strawberry fruits varied significantly between different genotypes whereby varieties from one species show similar levels. Species showing a reduced Fra a 1 content might be beneficial for breeding of new cultivars with improved fruit quality. The effect of the cultivation method on the Fra a 1 content was insignificant but seasonal variations were observed. The rFra a 1 protein was stable against short-term thermal treatment but was degraded and lost IgG binding activity after prolonged heating.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6643/10/7/857/s1>, Figure S1: Protein pattern of strawberry extracts, Figure S2: Standard curve of indirect competitive ELISA, Table S1:

Strawberry cultivars, Table S2: Growing conditions for conventional and organic strawberry cv. Asia, Table S3: Temperature and relative humidity at the growing location Forlì-Cesena in Italy for April and May in the years 2015 to 2017.

**Author Contributions:** W.S. and R.L.S. acquired the funding; E.K. and V.K. performed the experimental analysis.

**Funding:** This research was funded by Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) grant number 14OE008, project title “FaVOR-DeNonDe: Drying, Juices and Jams of Organic Fruit and Vegetables: What happens to Desired and Non-Desired compounds?”.

**Acknowledgments:** We thank Hansabred for providing the strawberry samples.

**Conflicts of Interest:** The authors have declared no conflict of interest. The founding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results.

## References

1. Giampieri, F.; Tulipani, S.; Alvarez-Suarez, J.M.; Quiles, J.L.; Mezzetti, B.; Battino, M. The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition* **2012**, *28*, 9–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Afrin, S.; Gasparri, M.; Forbes-Hernandez, T.Y.; Reboredo-Rodriguez, P.; Mezzetti, B.; Varela-López, A.; Giampieri, F.; Battino, M. Promising Health Benefits of the Strawberry: A Focus on Clinical Studies. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 4435–4449. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Basu, A.; Rhone, M.; Lyons, T.J. Berries: Emerging impact on cardiovascular health. *Nutr. Rev.* **2010**, *68*, 168–177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Seeram, N.P.; Adams, L.S.; Zhang, Y.; Lee, R.; Sand, D.; Scheuller, H.S.; Heber, D. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 9329–9339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Sicherer, S.H.; Sampson, H.A. Food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2010**, S116–S125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Dölle, S.; Schwarz, D.; Lehmann, K.; Weckwerth, W.; George, E.; Worm, M.; Franken, P. Tomato allergy: impact of genotype and environmental factors on the biological response. *J. Sci. Food Agric.* **2011**, *91*, 2234–2240. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Karlsson, A.L.; Alm, R.; Ekstrand, B.; Fjellkner-Modig, S.; Schiött, Å.; Bengtsson, U.; Björk, L.; Hjernø, K.; Roepstorff, P.; Emanuelsson, C.S. Bet v 1 homologues in strawberry identified as IgE-binding proteins and presumptive allergens. *Allergy* **2004**, *59*, 1277–1284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Sinha, M.; Singh, R.P.; Kushwaha, G.S.; Iqbal, N.; Singh, A.; Kaushik, S.; Kaur, P.; Sharma, S.; Singh, T.P. Current Overview of Allergens of Plant Pathogenesis Related Protein Families. *Sci. World J.* **2014**, *2014*, 1–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Ebner, C.; Hirschwehr, R.; Bauer, L.; Breiteneder, H.; Valenta, R.; Ebner, H.; Kraft, D.; Scheiner, O. Identification of allergens in fruits and vegetables: IgE cross-reactivities with the important birch pollen allergens Bet v 1 and Bet v 2 (birch profilin). *J. Allergy Clin. Immunol.* **1995**, *96*, 962–969. [[CrossRef](#)]
10. Breiteneder, H.; Ebner, C. Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2000**, *106*, 27–36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Hoffmann-Sommergruber, K. Plant Allergens and Pathogenesis-Related Proteins: What Do They Have in Common? *Int. Arch. Allergy Immunol.* **2000**, *122*, 155–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Franz-Oberdorf, K.; Eberlein, B.; Edelmann, K.; Bleicher, P.; Kurze, E.; Helm, D.; Olbricht, K.; Darsow, U.; Ring, J.; Schwab, W. White-fruited strawberry genotypes are not per se hypoallergenic. *Food Res. Int.* **2017**, *100*, 748–756. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Darrow, G.M. *The Strawberry: History, Breeding and Physiology*; Holt, Rinehart and Winston: New York, NY, USA, 1966.
14. Ulrich, D.; Komes, D.; Olbricht, K.; Hoberg, E. Diversity of aroma patterns in wild and cultivated *Fragaria* accessions. *Genet. Resour. Crop Evol.* **2007**, *54*, 1185–1196. [[CrossRef](#)]
15. Zuidmeer, L.; Salentijn, E.; Rivas, M.F.; Mancebo, E.G.; Asero, R.; Matos, C.I.; Pelgrom, K.T.B.; Gilissen, L.J.W.J.; van Ree, R. The role of profilin and lipid transfer protein in strawberry allergy in the Mediterranean area. *Clin. Exp. Allergy* **2006**, *36*, 666–675. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

16. Franz-Oberdorf, K.; Eberlein, B.; Edelmann, K.; Hücherig, S.; Besbes, F.; Darsow, U.; Ring, J.; Schwab, W. Fra a 1.02 Is the Most Potent Isoform of the Bet v 1-like Allergen in Strawberry Fruit. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 3688–3696. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Seutter von Loetzen, C.; Schweimer, K.; Schwab, W.; Rösch, P.; Hartl-Spiegelhauer, O. Solution structure of the strawberry allergen Fra a 1. *Biosci. Rep.* **2012**, *32*, 567–575. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Casañal, A.; Zander, U.; Muñoz, C.; Dupeux, F.; Luque, I.; Botella, M.A.; Schwab, W.; Valpuesta, V.; Marquez, J.A. The Strawberry Pathogenesis-related 10 (PR-10) Fra a Proteins Control Flavonoid Biosynthesis by Binding to Metabolic Intermediates. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 35322–35332. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Muñoz, C.; Hoffmann, T.; Escobar, N.M.; Ludemann, F.; Botella, M.A.; Valpuesta, V.; Schwab, W. The Strawberry Fruit Fra a Allergen Functions in Flavonoid Biosynthesis. *Mol. Plant* **2010**, *3*, 113–124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Matthes, A.; Schmitz-Eiberger, M. Apple (*Malus domestica* L. Borkh.) Allergen Mal d 1: Effect of Cultivar, Cultivation System, and Storage Conditions. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 10548–10553. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Marzban, G.; Puehringer, H.; Dey, R.; Brynda, S.; Ma, Y.; Martinelli, A.; Zaccarini, M.; van der Weg, E.; Housley, Z.; Kolarich, D.; et al. Localisation and distribution of the major allergens in apple fruits. *Plant Sci.* **2005**, *169*, 387–394. [[CrossRef](#)]
22. Franz-Oberdorf, K.; Langer, A.; Strasser, R.; Isono, E.; Ranftl, Q.L.; Wunschel, C.; Schwab, W. Physical interaction between the strawberry allergen Fra a 1 and an associated partner FaAP: Interaction of Fra a 1 proteins and FaAP. *Proteins* **2017**, *85*, 1891–1901. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Vassilopoulou, E.V.; Zuidmeer, L.; Akkerdaas, J.; Rigby, N.; Moreno, F.J.; Papadopoulos, N.G.; Saxoni-Papageorgiou, P.; Mills, C.; van Ree, R. Optimized techniques for the extraction of grape allergens appropriate for in vivo and in vitro testing and diagnosis. *Mol. Nutr. Food Res.* **2007**, *51*, 360–366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Vieths, S.; Scheurer, S.; Ballmer-Weber, B. Current Understanding of Cross-Reactivity of Food Allergens and Pollen. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2002**, *964*, 47–68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Kaiser, R.; Mageney, V.; Schwefel, K.; Vollmers, D.; Krüger, A.; Horn, R. Genotyping of red and white fruited strawberry (*Fragaria* L.) accessions and hybrids based on microsatellite markers and on the genetic diversity in the allergen genes fra 1 and fra 3. *Genet. Resour. Crop Evol.* **2016**, *63*, 1203–1217. [[CrossRef](#)]
26. Eriksson, N.E.; Möller, C.; Werner, S.; Magnusson, J.; Bengtsson, U.; Zolubas, M. Self-Reported Food Hypersensitivity in Sweden, Denmark, Estonia, Lithuania, and Russia. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* **2004**, *14*, 70–79. [[PubMed](#)]
27. Musidlowska-Persson, A.; Alm, R.; Emanuelsson, C. Cloning and sequencing of the Bet v 1-homologous allergen Fra a 1 in strawberry (*Fragaria ananassa*) shows the presence of an intron and little variability in amino acid sequence. *Mol. Immunol.* **2007**, *44*, 1245–1252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Wurm, D.J.; Quehenberger, J.; Mildner, J.; Eggenreich, B.; Slouka, C.; Schwaighofer, A.; Wieland, K.; Lendl, B.; Rajamanickam, V.; Herwig, C. Teaching an old pET new tricks: tuning of inclusion body formation and properties by a mixed feed system in *E. coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102*, 667–676. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Karamloo, F.; Scheurer, S.; Wangorsch, A.; May, S.; Hausteine, D.; Vieths, S. 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.* **2001**, *756*, 281–293. [[CrossRef](#)]
30. Gruber, P.; Vieths, S.; Wangorsch, A.; Nerkamp, J.; Hoffmann, T. Maillard Reaction and Enzymatic Browning Affect the Allergenicity of Pru av 1, the Major Allergen from Cherry (*Prunus avium*). *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 4002–4007. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Vieths, S.; Hoffmann, A.; Holzhauser, T.; Müller, U.; Reindl, J.; Hausteine, D. Factors influencing the quality of food extracts for in vitro and in vivo diagnosis. *Allergy* **1998**, *53*, 65–71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Verhoeckx, K.C.M.; Vissers, Y.M.; Baumert, J.L.; Faludi, R.; Feys, M.; Flanagan, S.; Herouet-Guichenev, C.; Holzhauser, T.; Shimojo, R.; van der Bolt, N.; et al. Food processing and allergenicity. *Food Chem. Toxicol.* **2015**, *80*, 223–240. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Kamath, S.D.; Rahman, A.M.A.; Voskamp, A.; Komoda, T.; Rolland, J.M.; O’Hehir, R.E.; Lopata, A.L. Effect of heat processing on antibody reactivity to allergen variants and fragments of black tiger prawn: A comprehensive allergenomic approach. *Mol. Nutr. Food Res.* **2014**, *58*, 1144–1155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



34. Hjernø, K.; Alm, R.; Canbäck, B.; Matthiesen, R.; Trajkovski, K.; Björk, L.; Roepstroff, P.; Emanuelsson, C. Down-regulation of the strawberry Bet v 1-homologous allergen in concert with the flavonoid biosynthesis pathway in colorless strawberry mutant. *Proteomics* **2006**, *6*, 1574–1587. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Alm, R.; Ekefjärd, A.; Krogh, M.; Häkkinen, J.; Emanuelsson, C. Proteomic variation is as large within as between strawberry varieties. *J. Proteome Res.* **2007**, *6*, 3011–3020. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Dölle, S.; Lehmann, K.; Schwarz, D.; Weckwert, W.; Scheler, C.; George, E.; Franken, P.; Worm, M. Allergenic activity of different tomato cultivars in tomato allergic subjects. *Clin. Exp. Allergy* **2011**, *41*, 1643–1652. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Laimer, M.; Maghuly, F. Awareness and knowledge of allergens: A need and a challenge to assure a safe and healthy consumption of small fruits. *J. Berry Res.* **2010**, *1*, 61–71. [[CrossRef](#)]
38. Asero, R.; Marzban, G.; Martinelli, A.; Zaccarini, M.; Machado, M.L. 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.* **2006**, *38*, 94–98. [[PubMed](#)]
39. Besler, M.; Steinhart, H.; Paschke, A. Stability of food allergens and allergenicity of processed foods. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **2001**, *756*, 207–228. [[CrossRef](#)]
40. Ortolani, C.; Ispano, M.; Pastorello, E.A.; Ansaloni, E.; Magri, G.C. Comparison of results of skin prick test (with fresh foods and commercial food extracts) and RAST in 100 patients with oral allergy syndrome. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1989**, *83*, 683–690. [[CrossRef](#)]
41. Tulipani, S.; Marzban, G.; Herndl, A.; Laimer, M.; Mezzetti, B.; Battino, M. Influence of environmental and genetic factors on health-related compounds in strawberry. *Food Chem.* **2011**, *124*, 906–913. [[CrossRef](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

# Supplemental data

## Effect of the strawberry genotype, cultivation and processing on the

### Fra a 1 allergen content

**Elisabeth Kurze**<sup>1</sup>, **Vanessa Kock**<sup>1</sup>, **Roberto Lo Scalzo**<sup>2</sup>, **Klaus Olbricht**<sup>3,4</sup>, **Wilfried Schwab**<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Biotechnology of Natural Products, Technische Universität München, Liesel-Beckmann-Str.1, 85354 Freising, Germany; elisabeth.kurze@tum.de; vanessa.kock@tum.de; wilfried.schwab@tum.de

<sup>2</sup> Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, Unità di ricerca per i processi dell'industria agroalimentare (CREA-IAA), via Venezian 26, 20133 Milan, Italy; roberto.loscalzo@crea.gov.it

<sup>3</sup> Hansabred GmbH & Co. KG, Radeburger Landstr. 12, 01108 Dresden, Germany; k.olbricht@hansabred.org

<sup>4</sup> Humboldt-Universität zu Berlin, Albrecht Daniel Thaer-Institute, Berlin, Germany

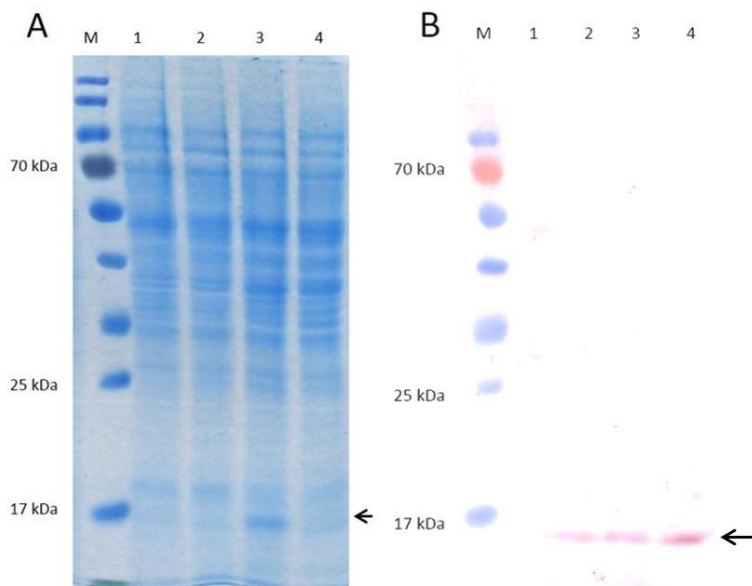
**Figure S1. Protein pattern of strawberry extracts.**

**Figure S2. Standard curve of indirect competitive ELISA.**

**Table S1. Strawberry cultivars**

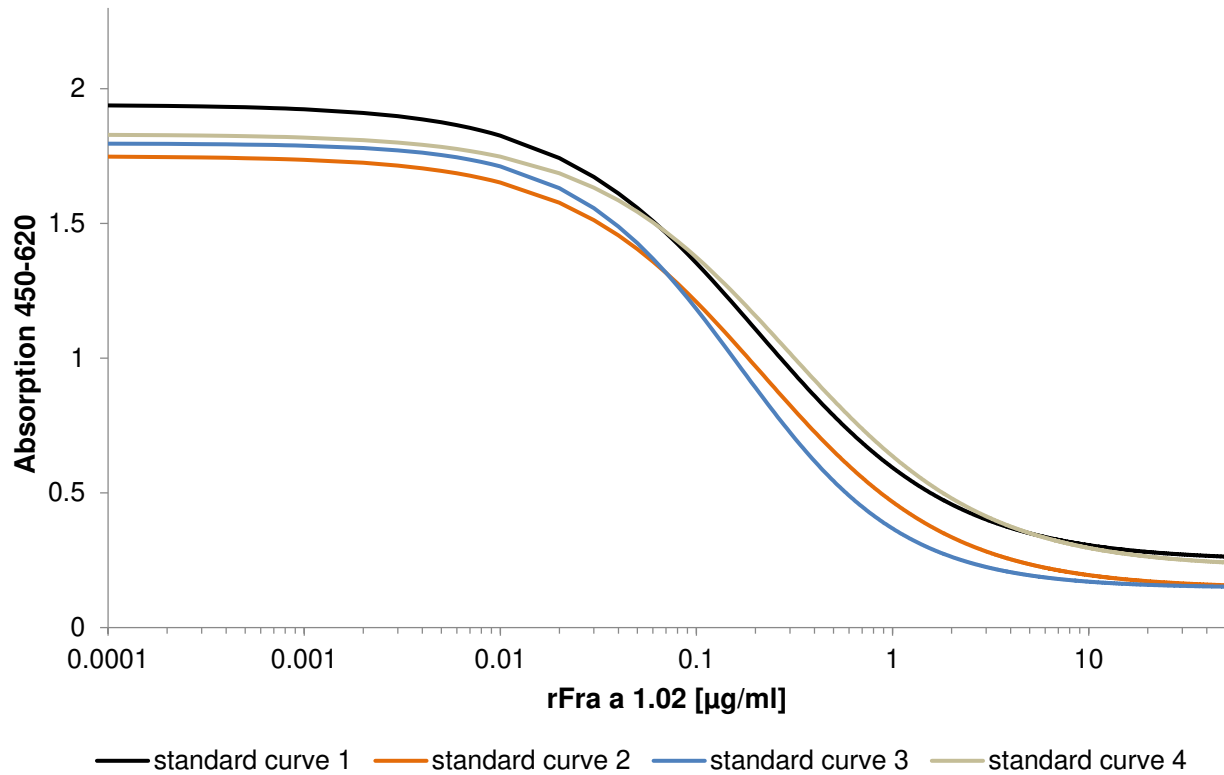
**Table S2. Growing conditions for conventional and organic strawberry cv. Asia cultivated in Italy, Forlì-Cesena district.**

**Table S3. Temperature and relative humidity at the growing location Forlì-Cesena in Italy for April and May in the years 2015 to 2017; National Agrometeorological DataBase of Italy SIAN (National Agricultural Information System)**



**Figure S1. Protein pattern of strawberry extracts.**

Native strawberry protein extracts of commercially available cultivars analyzed by (A) SDS-PAGE and (B) Western-Blot analysis. 1 – Fruits (unknown cultivar) from grocery store strawberry, 2 – Elsanta, 3 – Florika, 4 – Magnum. SDS-PAGE was performed under reducing conditions. For protein staining coomassie Brilliant Blue G250 was used. Western blot analysis was performed using a specific polyclonal Fra a 1.02-antibody. The 18 kDa band, corresponding to the native Fra a 1, is marked with an arrow. M: PageRuler Prestained Protein Ladder



**Figure S2. Standard curve of indirect competitive ELISA.**

Competitive ELISA was performed using serial dilutions of rFra a 1.02 as free allergen. From the standard curves obtained at different days the concentration of Fra a 1 in µg/ml in various strawberry samples was calculated using the 4-paramter plot.

**Table S1. Strawberry cultivars**

Fra a 1 content (mean values) in  $\mu\text{g/g}$  FW, total soluble protein in  $\mu\text{g/g}$  FW and percentage of Fra a 1/total soluble protein of different strawberries. Plants were grown at Hansabred (Dresden, Munich).

variety	cultivar	color	Fra a 1 [ $\mu\text{g/g}$ FW]	total soluble protein [ $\text{mg/g}$ FW]	% Fra a 1/total soluble protein
<i>F. × ananassa</i>	Elianny	red	$0.881 \pm 0.91$	$1.014 \pm 0.058$	0.087
<i>F. × ananassa</i>	Elsanta	red	$0.931 \pm 0.27$	$1.002 \pm 0.039$	0.093
<i>F. × ananassa</i>	Faith	red	$0.945 \pm 0.31$	$0.888 \pm 0.050$	0.106
<i>F. × ananassa</i>	Königin Luise	red	$1.025 \pm 0.24$	$1.290 \pm 0.104$	0.079
<i>F. × ananassa</i>	Korona	red	$1.185 \pm 0.42$	$1.085 \pm 0.064$	0.109
<i>F. × ananassa</i>	Magnum	red	$1.231 \pm 0.28$	$1.168 \pm 0.112$	0.105
<i>F. × ananassa</i>	Mieze Schindler	red	$0.985 \pm 0.26$	$1.250 \pm 0.065$	0.079
<i>F. × ananassa</i>	Oberschlesien	red	$0.957 \pm 0.26$	$1.023 \pm 0.077$	0.094
<i>F. × ananassa</i>	Renaissance	red	$0.968 \pm 0.23$	$1.102 \pm 0.043$	0.088
<i>F. × ananassa</i>	Snow White	white	$2.343 \pm 0.75$	$0.981 \pm 0.075$	0.239
<i>F. chiloensis</i>	Lucida Perfecta	white	$1.938 \pm 0.66$	$1.359 \pm 0.136$	0.143
<i>F. moschata</i>	Profumata di Tortona	red	$2.378 \pm 1.02$	$1.441 \pm 0.119$	0.165
<i>F. moschata</i>	Wuerzburg	red	$2.696 \pm 0.79$	$1.590 \pm 0.089$	0.169
<i>F. nilgerensis</i>	Leigong	white	$0.686 \pm 0.13$	$1.722 \pm 0.127$	0.039
<i>F. nilgerensis</i>	Yunnan	white	$1.339 \pm 0.35$	$1.502 \pm 0.163$	0.089
<i>F. vesca</i>	Grotta del Vento	red	$0.818 \pm 0.24$	$1.794 \pm 0.138$	0.046
<i>F. vesca</i>	Moritzburg	yellow	$0.937 \pm 0.27$	$1.858 \pm 0.104$	0.050
<i>F. vesca</i>	Reine des Vallées	red	$1.111 \pm 0.43$	$2.044 \pm 0.115$	0.054
<i>F. vesca</i>	Yellow Wonder	yellow	$1.331 \pm 0.43$	$1.920 \pm 0.062$	0.069
<i>F. × vesana</i>	Florika	red	$3.817 \pm 1.28$	$1.385 \pm 0.155$	0.276

**Table S2. Growing conditions for conventional and organic strawberry cv. Asia cultivated in Italy, Forlì-Cesena district.**

	conventional	organic
<b>Name of Farm</b>	Integrated “Burioli Claudio”	Organic “Guardigni Paola”
<b>Location</b>	S. Martino in fiume (Cesena)	S. Martino in fiume (Cesena)
<b>Dimension</b>	8 hectares	10 hectares
<b>Age of the farm</b>	-	10 years
<b>Type of cultivation</b>	no-forced tunnel	semi-forced tunnel
<b>Plant transplant</b>	July	July
<b>Closing of tunnel</b>	May	March
<b>Planting spacing</b>	0.35 per 0.30 m	0.35 per 0.30 m
<b>Total production</b>	900 g/plant	850 g/plant
<b>Marketable production</b>	750 g/plant	700 g/plant
<b>Fertilization</b>	8-24-16 NPK, three times, 15 g/plant Sequestrene, 0.05 g/plant	Autumn cereal grass ( <i>Triticum</i> spp.) green manure at the end of April solid organic manure in June (before transplant) fertirrigation with products approved for Organic
<b>Treatments of pesticides</b>	commonly used anti-fungal and insecticides	Copper, Neem oil, Phytoseiids (against Spider mite)
<b>Harvest dates</b>	20 May 2015 24 May 2016 11 May 2017	20 May 2015 24 May 2016 11 May 2017
<b>Product destination</b>	cooperative and direct sale	direct sale

**Table S3. Temperature and relative humidity at the growing location Forlì-Cesena in Italy for April and May in the years 2015 to 2017; National Agrometeorological DataBase of Italy SIAN (National Agricultural Information System)**

	Year	Month			
		April	Historical Data (1960-1990)	May	Historical Data (1960-1990)
<b>T<sub>min</sub> [°C]</b>	2015	7.5		13.2	
	2016	9.0	8.2	11.6	12.2
	2017	7.6		12.1	
<b>T<sub>max</sub> [°C]</b>	2015	20.7		26.5	
	2016	22.0	18.0	25.6	24.1
	2017	21.0		24.8	
<b>T<sub>mean</sub> [°C]</b>	2015	14.1		19.8	
	2016	15.5	13.1	18.6	18.2
	2017	14.3		18.5	
<b>relative humidity [%]</b>	2015	85		69	
	2016	82		82	
	2017	81		71	





### **Publikation III**

Picchi, Valentina; Lo Scalzo, Roberto; **Kurze, Elisabeth**; Fibiani, Marta; Vangdal, Eivind; Schwab, Wilfried (2018) Impact of year of harvest, genotype and cultivation method on bioactives and Prud l allergen content in plums. (*eingereicht beim International Journal of Food Sciences and Nutrition*)



1 **Impact of year of harvest, genotype and cultivation method on bioactives and Pru d 1**  
2 **allergen content in plums**

3

4 Valentina Picchi<sup>1</sup>, Roberto Lo Scalzo<sup>1\*</sup>, Elisabeth Kurze<sup>2</sup>, Marta Fibiani<sup>1</sup>, Eivind Vangdal<sup>3</sup>,  
5 Wilfried Schwab<sup>2</sup>

6

7 <sup>1</sup>Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, Research Centre for  
8 Engineering and Agro-Food Processing (CREA-IT), Via G. Venezian 26, 20133 Milan (Italy)

9 <sup>2</sup>Technical University of Munich, Center of Life and Food Science Weihenstephan,  
10 Biotechnology of Natural Products, Liesel-Beckmann-Str. 1, 85354 Freising (Germany)

11 <sup>3</sup>Nibio Ullensvang, 5781 Lofthus, Norway

12

13 \*Corresponding author: [roberto.loscalzo@crea.gov.it](mailto:roberto.loscalzo@crea.gov.it)

14

15 **Abstract**

16 The present work studied the effect of the year of harvest, the genotype and the cultivation  
17 method on the nutritional quality and the allergen content of three plum cultivars. The  
18 common quality parameters and the phytochemical content strongly varied with the year and  
19 the cultivar, while the system of cultivation had a minor influence. In particular, ascorbic acid  
20 greatly decreased in 2016 compared to 2015, while polyphenols were higher in 2016. The  
21 health promoting compounds, and particularly phenolics, were significantly correlated with  
22 the antioxidant capacity. Finally, the allergen content was strongly dependent on the content  
23 of flavan-3-ols, suggesting that this class of phenolics is determinant in influencing the  
24 allergen content in plums. Results showed that the major factor affecting the quality and the

25 concentration of natural metabolites of plum, in addition to the diversity among genotypes, is  
26 the year-to-year variation, whereas the system of cultivation plays a marginal role.

27

## 28 **Keywords**

29 Plum, phytochemical, organic farming, antioxidant capacity, allergen.

30

## 31 **Introduction**

32 Plum (*Prunus domestica* L.) is a fruit rich in bioactives, mainly phenolics. At molecular  
33 levels, the potential effects on human health of these compounds are currently under  
34 investigation (Rice-Evans et al. 1997). The content of bioactives in a fruit can be influenced  
35 by several factors, among which the genotype and the environment. As regards to the  
36 genotype, Slimestad et al. (2009) found large cultivar differences in phenolic content in  
37 Norwegian plums, and the similar variations were observed for other quality indexes (soluble  
38 solids and organic acids content) (Vangdal et al. 2007). In addition, the year of harvest may  
39 deeply influence the content of bioactive compounds, mainly through variations of climatic  
40 conditions (e.g. rainfall, humidity and mean temperature) (Hornick 1992; Woese et al. 1997;  
41 Bourn and Prescott 2002). Several studies have compared the nutritional quality of vegetables  
42 and fruits obtained with different systems of cultivation, particularly focusing on the effect of  
43 organic management on the phytochemical content. The nutritional superiority of organic raw  
44 material is not clearly supported by the studies on the topic, that reported contrasting results  
45 (Gąstoł and Domagała-Świątkiewicz 2013). The production of vitamins is mainly depending  
46 on variety, ripeness of fruits and crop size (Bernacchia et al. 2016). Some studies underlined a  
47 positive effect of organic farming on vitamin C content, while others did not found a  
48 consistent relation (Rembalkowska 2007). Analogously, polyphenols, which are involved in  
49 the plant defensive mechanism against biotic and abiotic stress, were found to be both

50 increased and decreased in organic products compared to samples produced with conventional  
51 methods (Bernacchia et al. 2016). Recently, it was suggested that the interaction between  
52 cultivation practices and genotypic characteristics, plays a major role in determining the final  
53 content of bioactive compounds (Lo Scalzo et al. 2013). As regards plums, previous works  
54 have demonstrated that conventional and organic products differ only marginally in  
55 macronutrients whereas the concentration of some antioxidant vitamins and of secondary  
56 metabolites (phenolics) could be markedly influenced by the system of cultivation (Lombardi-  
57 Boccia et al., 2004).

58 Besides health beneficial compounds, plums also contain allergenic proteins (i.e. compounds  
59 that can cause food allergies). In plums, allergens from different protein families have been  
60 identified, including the thaumatin-like protein Pru d 2, the lipid transfer protein Pru d 3, and  
61 the profilin Pru d 4 (Pastorello et al. 2001). Pru d 1, a member of the pathogenesis-related  
62 (PR) protein 10 (PR-10) family, was also identified thanks to its similarity with the major  
63 birch pollen allergen Bet v 1 (El-Kereamy et al. 2009). Plants synthesize the PR proteins as  
64 response to various stress conditions, such as pathogen attack, chemical application,  
65 wounding or environmental factors (Sinha et al. 2014). Homologous PR-10 proteins are  
66 widely distributed in the plant kingdom. Because of their high homology of amino-acid  
67 sequence, IgE antibodies can cross-react with similar epitopes from different plant origin  
68 (Hoffmann-Sommergruber 2000). Thus, due to cross-reaction of antibodies with Bet v 1 and  
69 related PR-10 proteins in fruit, birch-pollen related food allergies occur. Despite this  
70 potentially important effect, little information is available about the variation of Pru d 1  
71 content in plums due to genotypic characteristics, weather variability and type of cultivation  
72 system.

73 In the present work, we analyzed the effect of the year of harvest, the genotype and the  
74 cultivation method on the bioactives and the Pru d 1 allergen content of three plum cultivars

75 commonly grown in Norway. This study contributes to elucidate the effect of organic  
76 cultivation on plum quality, a matter that was so far was investigated.

77

## 78 **Material and methods**

79

### 80 ***Plant material and cultivation***

81 The experiment was conducted using three cultivars of *Prunus domestica* L.: Jubileum,  
82 Victoria and Reeves. The Victoria cultivar was selected as one of the most commonly  
83 cultivated in Norway, whereas Jubileum and Reeves were selected because of their interesting  
84 characteristics as reported in a previous work (Vangdal et al. 2007). Plums were cultivated in  
85 two consecutive years (2015 and 2016) with either organic (Org) or conventional (Conv)  
86 systems. Fruits were collected from three farms located in the Hardanger area (Western  
87 Norway) having comparable climatic and soil conditions. In particular, conventional plums  
88 were picked in the same farm, whereas organic Victoria were supplied from a second farm (9  
89 km from the conventional farm) and organic Jubileum and Reeves were picked in a third farm  
90 (6 km from the conventional farm). The orchards had been grown as organic or conventional  
91 since they were established (at least 6 years). The trees were 6 to 8 years old and grafted on  
92 St. Julien A rootstock. Planting space was  $1.25 - 1.75 \times 4.5$  m and the trees were vertical axis  
93 shaped. A 1 m wide strip in the tree row was mechanically kept weed free, and management  
94 practices followed to standard procedures in the area with fertilizers and plant protection  
95 program for conventional and organic growing, respectively. No fungicides or rain protecting  
96 systems were used in the orchards. Plums were harvested 2-4 days before they were fully ripe  
97 as advised in commercial orchards (Vangdal and Flatland, 2010). After harvest, plums were  
98 cold stored (4 °C) overnight before being shipped by airplane to Italy the day after. Plums  
99 arrived in Milan in the evening and were then cold stored (3 °C) for a night. The day after,

100 three replicates of fruits of uniform size (2.5 kg each sample) for each combination of cultivar  
101 x year x cultivation were randomly selected for further processing. Plums were cut into two  
102 halves and rapidly frozen at -50 °C in an air-forced tunnel and then lyophilized using a Dura-  
103 Stop tray dryer, combined with a Dura-Dry condenser module (FTS Systems, Stone Ridge,  
104 NY).

105

### 106 *Weather data*

107 Daily mean temperature and rainfall from 1<sup>st</sup> May until the date of harvest were measured in  
108 the area (i.e. NIBIO Ullensvang Research Centre) by the Norwegian Meteorological Institute  
109 ([www.met.no](http://www.met.no)). The data were processed to obtain the monthly mean temperature and  
110 cumulative rainfall and were compared with the climatology computed over historical series  
111 (period 1960-1990) (Table 1).

112

### 113 *Common quality parameters*

114 Dry matter (DM) was determined as the percentage of the lyophilized weight with respect to  
115 the fresh weight. Soluble solids content (SSC) and titratable acidity (TA) were measured in  
116 aqueous extracts obtained by adding 27 ml of distilled water to 3 g of lyophilized powder.  
117 SSC was measured with a bench-top refractometer (RFM 91, Bellingham/Stanley Ltd.,  
118 Atlanta) and expressed as °Bx on a fresh weight (FW) basis. TA was determined by automatic  
119 titration with 0.1 N NaOH until pH 8.2 (682 Titroprocessor, Metrohm) and expressed in g  
120 malic acid Eq/100g FW.

121

### 122 *Polyphenol content*

123 *Monomeric phenols*

124 The monomeric phenols were determined by RP-HPLC-DAD following the method of  
125 Vangdal et al. (2017). The extract was prepared from 800 mg of lyophilized powder dissolved  
126 in 10 ml of a 1:1 mixture of EtOH and 0.06 N HCl. The mixture was vortexed for 30 s and  
127 vigorously shaken for 60 min at room temperature, then centrifuged at  $25000 \times g$  at 4 °C. The  
128 supernatant was filtered through a 0.45 mm filter and analyzed by HPLC. Phenolic acids were  
129 detected at 320 nm, flavonols at 350 nm, and anthocyanins at 520 nm. The components of  
130 plum extracts were identified by their UV-VIS spectra and according to the literature (Hong  
131 and Wrolstad 1990; Slimestad et al. 2009). The quantification was made by external standard  
132 calibration response, using chlorogenic acid for both Neo- and chlorogenic acids, *p*-coumaric  
133 acid, rutin, cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside.

134

#### 135 *Total flavan-3-ols*

136 Total flavan-3-ols were quantified by the vanillin reaction, following the method by Price et  
137 al. (1978). The analysis was performed on an acidified aqueous EtOH extract, as previously  
138 described for monomeric phenols. The reaction solution consisted of 1.5 ml of EtOH, 1.0 ml  
139 of 12 N HCl, 0.3 ml of plum extract and 0.5 ml of a freshly prepared vanillin solution (5%  
140 w/v in EtOH). The solutions were kept at room temperature for 45 minutes, then the  
141 absorbance was read at 500 nm, 1 cm light path, 20 °C. For each sample, a blank was  
142 prepared by substituting the vanillin solution with pure EtOH. Calibration was carried out  
143 with (+)catechin solutions at known concentrations (0.1 - 3.0 mg/ml), treated in the same way  
144 as the samples, so the results were in mg catechin equivalents (CE) per 100 g dry weight  
145 (DW) of fruit.

146

#### 147 *Total ascorbic acid content*



148 Total ascorbic acid (AsA) was determined after extract reduction with Tris-carboxyethyl  
149 phosphine (TCEP), following the method described by Wechtersbach and Cigić (2007).  
150 Briefly, 15 mL of cold 6% aqueous solution of metaphosphoric acid was added to 1 g of  
151 lyophilized powder, vortexed for 30 s and then centrifuged for 15 min at  $25000 \times g$ . Extracts  
152 were then treated with 100 mmol/L TCEP in 1 M HCl. Reduced extracts were then three-fold  
153 diluted with 0.02 M orthophosphoric acid and immediately analyzed by HPLC. The analytical  
154 column was a  $250 \times 6$  mm i.d., Inertsil ODS-3, maintained at 40 °C. The isocratic elution was  
155 performed using 0.02 M orthophosphoric acid at a flow rate of 0.7 mL/min. Samples were  
156 measured at 254 nm. The concentration of AsA was calculated from the experimental peak  
157 area by analytical interpolation in a standard calibration curve.

158

#### 159 *Polyphenol oxidase activity*

160 The polyphenol oxidase (PPO, EC 1.10.3.1) activity was assayed as described by Fujita and  
161 Tono (1998). In brief, 70 mg of lyophilized fruit was dissolved in 1.2 mL of Mc Ilvaine buffer  
162 (pH 5.0). Chlorogenic acid served as substrate in Mc Ilvaine buffer at pH 7.0 at 25 °C,  
163 following the increase in absorbance within 1 minute of reaction and considering the increase  
164 in absorbance in the linear portion of the curve (Cancellòn et al. 2004). The results were  
165 expressed as U/g of DW, with 1 U corresponding to 0.1 absorbance unit increase per minute,  
166 at 420 nm and 20 °C.

167

#### 168 *Antioxidant capacity*

##### 169 *Folin-Ciocalteu index*

170 The Folin-Ciocalteu index (FCI) was measured on the same extracts used for anthocyanins  
171 and phenolics with the Folin-Ciocalteu reagent, as described in Slinkard and Singleton (1977)  
172 with slight modifications. An aliquot of 50 µl of sample was diluted with 3 ml distilled H<sub>2</sub>O

173 and 0.5 mL of Folin-Ciocalteu reagent and left at room temperature for 5 min. The solution  
174 was then treated with 1 mL of 15 % (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and incubated in the dark for 1 h. The  
175 absorbance of the blue coloured solution was read at 730 nm. The FCI was estimated using a  
176 standard curve obtained with gallic acid.

177

#### 178 *DPPH<sup>•</sup> and superoxide anion scavenging*

179 The antioxidant capacity was measured using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil (DPPH<sup>•</sup>) radical  
180 quenching and superoxide anion (<sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup>) radical scavenging, according to a previously validated  
181 method described in Picchi et al. (2012). To measure the electronic paramagnetic resonance  
182 (EPR) we used a MiniScope MS200 Magnettech (Berlin, Germany). For sample preparation,  
183 500 mg of lyophilized powder were extracted with 15 ml of a 1:1 mixture of EtOH and 0.06  
184 N HCl, homogenised and centrifuged at 25000 × g for 10 min at 4 °C.

185 The reaction solution for the DPPH<sup>•</sup> scavenging experiment consisted of 0.2 ml methanol,  
186 0.05 ml extract solution and 0.05 ml of a 0.5 mM DPPH<sup>•</sup> ethanolic solution. These solutions  
187 were accurately mixed in a glass tube assay and successively placed in a capillary for EPR  
188 measurements. The experimental settings of the spectrometer were as follows: field set, 3350  
189 G; scan range, 50 G; scan time, 60 s; modulation amplitude, 3000 mG; microwave  
190 attenuation, 7 dB; and receiver gain, 7 E10. The system was calibrated with known  
191 concentrations of AsA (range of 0.009-0.360 mg/mL,  $y = 14.979 \ln(x) + 80.266$ ,  $R^2 = 0.984$ )  
192 and the results were expressed as mg equivalents of AsA per 100 g DW.

193 The antioxidant capacity towards <sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup> was based on the spin trapping of generated radicals by  
194 potassium superoxide (KO<sub>2</sub>) in DMSO with the addition of 18-crown-6 ether to complex K<sup>+</sup>.  
195 The spin trap reagent was 5,5-dimethylpyrrolidine-N-oxide (DMPO). Under these conditions,  
196 a typical DMPO-OOH adduct (1:1:1:1) was observed. The reaction solution contained 0.1 ml  
197 of a 50 mM DMPO phosphate buffer solution (PBS 0.1 M pH 7.4), 0.1 ml of superoxide

198 solution and 50 µl of plum extract. EPR recording conditions were as follows: field set, 3500  
199 G; scan range, 50 G; scan time, 45 s; modulation amplitude, 1500 mG; microwave  
200 attenuation, 4 dB; receiver gain,  $2 \times 100$ . The system was calibrated with known  
201 concentrations of AsA (range 0.01-0.20 mg/mL,  $y = 24.146 \ln(x) + 126$ ,  $R^2 = 0.975$ ) and the  
202 results were expressed as mg equivalents of AsA per 100 g DW.

203

## 204 *Allergen content of plums*

### 205 *Protein extraction*

206 Protein extraction from freeze-dried plum samples was performed according to Björkstén et  
207 al. (1980) and prepared in duplicates. Briefly, lyophilized plum powder was homogenized  
208 with extraction buffer (10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 10 mM Na-DIECA; 2 mM EDTA;  
209 2% PVPP w/v) containing 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and protease inhibitor  
210 cocktail (Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche) in a ratio of 1:4 (w/v) and incubated  
211 for 1 h at 4 °C. After centrifugation for 15 min at 5000 × g at 4 °C the supernatant was  
212 dialyzed against PBS (pH 7.4) at 4 °C for 20 h. A second centrifugation step was performed  
213 to remove remaining precipitates. Extracts were directly used for allergen quantification by  
214 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).

215

### 216 *Indirect competitive ELISA*

217 Recombinant Pru d 1 was heterologously expressed in *Escherichia coli* strain BL21  
218 (DE3)pLysS (Novagen, Darmstadt, Germany) as a fusion protein with a C-terminal His-tag  
219 and purified using Profinity IMAC Resin according to manufactures instructions. The  
220 recombinant allergen was further used for the indirect competitive ELISA to determine the  
221 Pru d 1 content of dried plum samples. The ELISA was performed according to Sancho et al.  
222 (2006) with minor modifications. Microtiter plates were coated with 0.1 ng/µl recombinant

223 Pru d 1 in phosphate buffer (PBS) pH 7.4. After three washing steps with washing buffer  
224 (0.05 % (v/v) Tween 20 in PBS) blocking was performed with 2 % BSA in PBS for 2 h at  
225 room temperature. Dialyzed plum extracts were incubated with a specific polyclonal Pru d 1  
226 antibody (Davids Biotechnologie, Regensburg, Germany) for 4 h at 4 °C for competition  
227 reaction. After another washing step, an Anti-Kanin-HRP secondary antibody (Carl Roth,  
228 Germany) was used to detect the primary antibody and incubated for 1 h at room temperature.  
229 After a final washing step, 1-Step Ultra 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) substrate was  
230 used as substrate for the enzymatic reaction, which was stopped after 10 min with 2 M  
231 sulfuric acid. Absorbance was detected at 450 nm and 620 nm as reference wavelengths with  
232 CLARIOstar plate reader (BMG Labtech, Germany). The quantification of Pru d 1 allergens  
233 in plum extracts was determined based on the standard curve with recombinant Pru d 1  
234 protein. Serial dilutions (0.0001-25 µg/ml) of recombinant Pru d 1 were pipetted as “free”  
235 allergen and followed by the same procedure as the plum samples. The MARS software  
236 (BMG Labtech, Germany) was used for data analysis. Pru d 1 allergen content was expressed  
237 as µg Pru d 1/g dry weight.

238

### 239 *Statistical analysis*

240 The experimental design was a completely randomized block design. All the analyses were  
241 conducted using three biological replicates for each combination of cultivar x year x  
242 cultivation. Results were expressed as mean of three replicates. Data were subjected to three-  
243 way analysis of variance (ANOVA) to test the effect of the year, cultivar and system of  
244 cultivation. The mean values associated with the main factors as well as their interactions  
245 were evaluated using Tukey's test and statistically significant differences were accepted at the  
246 probability level  $P < 0.05$ . Pearson's correlation coefficient was used to determine the  
247 correlation among variables. Data of Pru d 1 content were analyzed using the nonparametric

248 Kruskal–Wallis test. Dunn’s Test was used to calculate median values and statistical  
249 significance levels between the variable groups. For p-value adjustment Bonferroni method  
250 was applied. p values of  $< 0.05$  were considered as significant. To obtain a comprehensive  
251 characterization of the samples, data were finally subjected to principal component analysis  
252 (PCA). The statistical analyses were performed using R (The R Foundation for Statistical  
253 Computing, R version i386 3.5.0) and Statgraphics v.7 (Manugistic Inc., Rockville, MD,  
254 USA).

255

## 256 **Results and discussion**

257

### 258 *Weather during the two seasons*

259 Compared to local climatology (i.e. the historical series of meteorological data), the year 2015  
260 was characterized by lower temperatures and higher rainfall from May to July (Table 1). Year  
261 2016 was characterized by normal temperature and rainfall with the exception of the month of  
262 June that was exceptionally dry. These different climatic conditions caused the harvest to be  
263 carried on at different timings. The recommended standard ripeness was in fact reached in  
264 2015 more than two weeks later than in 2016. As a result, plums were harvested the 22<sup>th</sup> and  
265 6<sup>th</sup> September, in 2015 and 2016, respectively.

266

### 267 *Common quality parameters*

268 The results of multi-factorial ANOVA indicated that the factor year significantly affected the  
269 quality parameters (Table 2), with higher values of DM and SSC in 2015 compared to 2016  
270 particularly in Jubileum and Victoria, while lower values of TA were recorded in 2015  
271 compared to 2016, apart from Jubileum variety (Table 3). These findings may relate to the  
272 lower than usual temperatures that characterized year 2015 and caused the delayed in the

273 harvest. In fact, the accumulation of sugar content in two out of three varieties is in  
274 accordance with the finding that late harvested plums tend to have higher SSC in comparison  
275 with the early mature ones (Sahamishirazi et al. 2017). DM, SSC and TA were influenced by  
276 the system of cultivation ( $P < 0.01$ , Table 2). For DM and TA, the interaction “cultivar  $\times$   
277 system of cultivation” was also significant ( $P < 0.01$ , Table 2). Jubileum and Victoria showed  
278 significantly lower values of DM when cultivated with the organic system, whereas Org  
279 Reeves had higher DM compared to Conv samples. As for SSC content, it was found high in  
280 all samples (ranging from 8.5 to 13.3 °Bx), with higher values in Conv compared to Org in  
281 Jubileum and Victoria plums in both years. TA was lower in Reeves with respect to the other  
282 two varieties. Victoria showed lower TA in Org than Conv in both years, while in Jubileum  
283 the TA was unaffected by the organic cultivation. The results show that the system of  
284 production differently influenced the common quality parameters, particularly decreasing DM  
285 and SSC in Jubileum and Victoria but not in Reeves. The literature did not show a clear trend  
286 depending on the cultivation method (Woese et al. 1997; Gąstoł and Domagała-Świątkiewicz,  
287 2013) and the evolution of the above parameters could greatly depend on the assessed variety.

288

### 289 ***Polyphenol content***

290 Three compounds were detected at 320 nm in plum extracts: neo-chlorogenic acid (Neo-  
291 CGA, Rt 12.4 min), chlorogenic acid (CGA, Rt 19.6 min), and an ester of *p*-coumaric acid  
292 (coumaryl derivative, Rt 16.1 min), probably the 3'-hydroxycoumaroyl quinic acid, in  
293 agreement to the results of Slimestad et al. (2009). Additionally, rutin was detected at 350 nm  
294 (Rt 25.2 min) whereas the two major anthocyanins (ATH) characteristic of plums were  
295 identified at 520 nm as cyanidin-3-glucoside (Rt 16.4 min) and cyanidin-3-rutinoside (Rt 18.2  
296 min).

297 Neo-CGA was the most important phenolic in plums, responsible for more than 80% of total  
298 plum monomeric polyphenols (Table 4), in accordance with previous data (Kim et al. 2003;  
299 Tomás-Barberán et al. 2001). The level of Neo-CGA was strongly influenced by the year and  
300 the cultivar but to a lesser extent by the system of cultivation (Table 2). As regards to the  
301 year, Neo-CGA showed significantly ( $P < 0.001$ ) higher values in 2016 compared to 2015,  
302 varying on average between 185.2 and 553.9 mg/100g DW, in 2015 and 2016, respectively.  
303 Recently, Sahamishirazi et al. (2017) observed that lower radiation and less sunshine hours  
304 from July to October determined higher mean values of phenolic content in plums. Similarly,  
305 in our study, the higher rainfall observed in 2016 before and during the harvest time could  
306 have reduced the incident radiation and avoided water stress conditions, which in turn may  
307 have influenced the transpiration and photosynthetic activities, consequently resulting in  
308 higher phenolic content, as previously observed by Sahamishirazi et al. (2017). Similarly, the  
309 same authors found that CGA derivatives and flavans of plum cultivars that received higher  
310 radiation and more sunshine hours contained lower free phenolic acids. This observation is in  
311 accordance with the reported inverse correlation between phenolic concentrations and air  
312 temperature (Miletić et al. 2012; Xu et al. 2011), particularly during winter when plants are  
313 exposed to sunlight (Grace and Logan 2000).

314 A clear difference in Neo-CGA content was also evidenced among the varieties, with the  
315 highest concentration observed in Victoria (635.7 mg/100 g DW on average) and the lowest  
316 in Reeves (162.8 mg/100g DW on average). Differences among the three cultivars were  
317 already reported by other authors (Slimestad et al. 2009) and confirmed the genotypic  
318 difference with regard to the polyphenol content. In general, organic management resulted in  
319 a lower content of Neo-CGA compared to the conventional management, and this result was  
320 particularly evident in Victoria (Table 4). Although higher contents of secondary metabolites  
321 in organically grown compared with conventionally grown food products have been observed

322 in many studies (Caris-Veyrat et al. 2004; Hallmann 2012; Lombardo et al. 2017), other  
323 studies found that the differences between cultivation systems are not consistent (Dangour  
324 et al. 2009; Worthington 2001), while others reported higher phenolics in conventionally  
325 produced fruit. Specifically, in a three-year study on conventionally and organically grown  
326 plums, Lombardi-Boccia et al. (2004) found that the total polyphenol content and Neo-CGA  
327 were significantly higher in conventionally grown plums. These findings indicate that the  
328 modulation of phenolic biosynthesis and metabolism depends on many factors, among which  
329 the different C/N balance between conventional and organic cultivation could be one of the  
330 cause (Rembalkowska 2007; Hallmann 2012). Compared to monomeric phenolics, lower  
331 amounts were found for flavonols and anthocyanin, in agreement with a previous report (Kim  
332 et al. 2003). As regards to flavonols, plums are mainly rich in quercetin-derivatives and here  
333 rutin was the most predominant, with values ranging from 11 to 29 mg/100g DW (Table 4).  
334 Similar findings were reported by Kim et al. 2003. The level of this compound was not  
335 influenced by the year of cultivation, while it varied mostly with the cultivar, showing higher  
336 values in Victoria compared to the other two cultivars. Finally, conventional system seems to  
337 positively affect rutin content.

338 ATH, which are the main responsible for the pigmentation of plum skin, were higher in 2016  
339 than 2015, similarly to Neo-CGA that also showed an increase (Table 4). In both years, the  
340 conventional system generally determined higher values compared to the organic system.  
341 There was a great varietal difference and the highest ATH content was detected in Jubileum,  
342 in accordance to what was previously reported (Vangdal et al. 2017).

343 Flavan-3-ols are abundant in plums (Nunes et al. 2008; Venter et al. 2013), particularly as  
344 dimeric and trimeric form of catechin (Tomás-Barberán et al. 2001). In the present study, the  
345 level of flavan-3-ols (Table 5) showed a high variability, ranging from 500 to 4000 mg  
346 CE/100g DW. In particular, flavan-3-ols were significantly lower in 2015 (1117.1 mg



347 CE/100g) compared to 2016 (2462.6 mg CE/100g), following the same temporal variation of  
348 monomeric phenols. Among the three cultivars, Jubileum showed the lowest flavan-3-ols  
349 level (1361.5 mg CE/100g) compared to Reeves (1942.3 mg CE/100g) and Victoria (2065.8  
350 mg CE/100g). The highest variation between years was observed in Reeves, where in 2016  
351 the flavan-3-ols were more than 4-fold higher in Conv samples and more than 5-fold in Org  
352 ones.

353

#### 354 ***Total ascorbic acid***

355 Gil et al. (2002) reported that plums do not contain high AsA levels. In their work, in fact,  
356 AsA ranged from 2.5 to 10.2 mg/100g fruit. However, this antioxidant metabolite is of great  
357 importance in determining the antioxidant potential of a fruit. In our study, we observed that  
358 the year strongly influenced the AsA level (Table 2) and particularly in Jubileum and  
359 Victoria, that showed higher AsA values in 2015 compared to 2016 (Table 5). Among the  
360 three varieties, Victoria, which showed the highest AsA content, was subjected to a strong  
361 decrease of this metabolite in 2016, compared to 2015. This result could be related to the  
362 earlier harvest date in 2016, and is line with the finding that some early-ripening apple  
363 cultivars had lower AsA content compared to those harvested late in the season (Davey and  
364 Keulemans 2004). The interactions “year × cultivation system” and “cultivar × cultivation  
365 system” were significant, as well as the interaction between the three factors, indicating that  
366 the cultivation system differently affected the AsA level depending on the year and the  
367 cultivar. For example, Jubileum, showed significantly lower AsA levels in Org plums than  
368 Conv in 2015, but not in 2016. On the contrary, Victoria showed higher AsA content in Org  
369 plums compared to Conv in 2015, but not in 2016.

370

#### 371 ***PPO activity***

372 The PPO activity was significantly affected by the three factors (Tables 2 and 5). On average,  
373 plums harvested in 2015 had higher PPO activity (43.6 U/g DW) compared to those of 2016  
374 (31.3 U/g DW). The variation of the PPO activity between the two years was particularly  
375 evident in Reeves, which showed very low values in 2016 compared to 2015 (Table 5). On  
376 the other hand, Jubileum distinguished for the highest values in both years. Even if to a lesser  
377 extent, the system of cultivation significantly affected the PPO activity, being higher in Conv  
378 compared to Org samples. Interestingly, a significant negative correlation was found between  
379 PPO activity and total flavan-3-ols ( $r = -0.58$ ,  $P < 0.001$ ), indicating that samples with higher  
380 value of flavan-3-ols had lower PPO activity. This observation is in agreement with previous  
381 results by other authors who suggested that these compounds - when highly polymerized - act  
382 as PPO inhibitors even in low concentration (Le Bourvellec et al. 2004).

383

#### 384 *Antioxidant capacity*

385 In the present paper, the level of reducing substances (Folin-Ciocalteu Index), ranged from  
386 375.6 to 555.5 mg/100 g DW, which corresponded to 53.3 to 118.7 mg/100 g FW. Kim et al.  
387 (2003) reported a wider range in plums from California (125.0 - 372.6 mg/100 g FW),  
388 whereas Slimestad et al. (2009) reported for Norwegian plums a range (18 - 44 mg/100 g FW)  
389 similar to the one we observed. The FCI (Table 2, 5) was not influenced by sampling year and  
390 systems of cultivation ( $P > 0.05$ ), but it varied with the variety ( $P < 0.001$ , Table 2). In  
391 particular, Victoria distinguished for the highest FCI level (724.1 mgGAE/100g DW), while  
392 Reeves had the lowest one (434.5 mgGAE/100g DW), in accordance with the study of  
393 Slimestad et al. (2009), which reported low TEAC values for Reeves. This result is also in  
394 line with the positive relationship found between FCI and Neo-CGA content ( $r = 0.73$ ,  $P <$   
395  $0.001$ ).

396 On the other hand, the year of cultivation strongly influenced the other two measured indexes,  
397 DPPH<sup>•</sup> and superoxide scavenging (Table 2). Interestingly, two opposite effects were found,  
398 with DPPH<sup>•</sup> scavenging increasing in 2016 with respect to 2015 (Figure 1, top), while the  
399 superoxide scavenging was comparable for two out of three varieties while in the case of  
400 Victoria it was higher in 2015 than 2016 (Figure 1, bottom). Similarly to FCI, Victoria had a  
401 significantly higher DPPH<sup>•</sup> and superoxide anion scavenging capacity compared to the other  
402 cultivars. In plums, Gil et al. (2002) measured a DPPH<sup>•</sup> scavenging capacity in the range of  
403 27.4 to 61.1 mg AsAeq/100 g FW, while in the presented study DPPH<sup>•</sup> varied between 4.5  
404 and 22.0 mg AsAeq/100 g, when reported on fresh weight basis.

405 As expected, the health promoting compounds, and particularly phenolics, were significantly  
406 correlated with the measured antioxidant indexes, in accordance with previous findings (Gil et  
407 al. 2002; Kim et al. 2003; Slimestad et al. 2009). The linear regression analysis showed that  
408 flavan-3-ols were primarily responsible for the DPPH<sup>•</sup> scavenging activity ( $r = 0.86$ ,  $P <$   
409  $0.001$ ), while AsA content was positively related to superoxide anion quenching capacity ( $r =$   
410  $0.66$ ,  $P < 0.001$ ). The high antioxidant capacity of flavan-3-ols was demonstrated in the work  
411 of Venter et al. (2013) on *Prunus salicina*, where the post-column on-line coupling of the  
412 ABTS<sup>•+</sup> scavenging assay with HPLC-DAD revealed that flavan-3-ols had the greatest  
413 antioxidant response.

414

#### 415 ***Allergen content***

416 Allergies to food, especially to fruits from *Rosacea* plants such as apple, peach, strawberry or  
417 plum are often accompanied with birch pollen allergies due to cross-reacting antibodies.  
418 Previous studies showed, that the allergenicity of apples and tomatoes is cultivar dependent  
419 (Dölle et al. 2011; Sancho et al. 2006). The influence of the cultivar, growing conditions and  
420 seasonal effect on the Pru d 1 allergen content of plums was studied by indirect competitive

421 ELISA. Comparing fruits grown under the same conditions, we observed that the three  
422 varieties differed to some extent in their allergen level.

423 According to the Kruskal-Wallis test, five significantly different groups (letters a-e) were  
424 detected with 5 % of significance level (Figure 2). The significantly lowest level of Pru d 1  
425 was found in the cultivar Reeves grown conventionally in year 2016 with 1.15  $\mu\text{g}$  Pru d 1/g  
426 DW (mean value 0.954  $\mu\text{g}$  Pru d 1/g DW), whereas the significantly highest concentration  
427 was determined in the cultivar Jubileum organically grown in 2015 with 5.29  $\mu\text{g}$  Pru d 1/g  
428 DW (mean value 5.328  $\mu\text{g}$  Pru d 1/g DW).

429 The results of the statistical analysis indicated that the cultivation method had no significant  
430 effect on the allergen content. Only in Victoria in 2015 the Pru d 1 level changed with the  
431 cultivation system. In fact, the Pru d 1 level was higher in Org compared to Conv in Victoria.  
432 When comparing the two consecutive years, all plum samples from 2016 showed lower  
433 allergen content than samples harvested in 2015 (Table 2, Figure 2), and a cultivar effect was  
434 observed, with Jubileum showing significant higher values compared to Victoria and Reeves.  
435 Varying weather conditions (precipitation and temperature) thus appear to have an important  
436 influence on the allergen content in plums.

437 The linear regression analysis evidenced that Pru d 1 content was negatively related with  
438 flavan-3-ols content ( $r = - 0.73$ ,  $P < 0.001$ ) and positively related with PPO activity ( $r = 0.72$ ,  
439  $P < 0.001$ ). This result indicate that lower Pru d 1 values were observed in those samples with  
440 higher flavan-3-ols content and higher PPO activity, and these two parameters were in turn  
441 inversely related. In fact, in 2015, when flavan-3-ols were significantly lower, the values of  
442 Pru d1 were significantly higher. The relationship between the allergen content and total  
443 phenols as well as PPO activity was previously studied on Mal d 1 (Kiewning et al. 2013;  
444 Schmitz-Eiberger et al. 2011). In line with our results, Rudeschko et al. (1995) associated the  
445 lower allergenicity of apple to a higher polyphenol content and the assumed oxidative

446 reactions that took place between apple phenols and the allergen. Similarly, as regards to the  
447 cherry allergen Pru av 1, Gruber et al. (2004) observed a decrease in allergenic potential of  
448 the protein in the presence of polyphenols and PPO. Kiewning et al. (2013) found a high  
449 correlation between Mal d 1 and the PPO activity of two apple cultivars, i.e., Elstar and Diwa,  
450 while the correlation of these factors was moderate for fruits of the cultivar Boskoop. The  
451 latter cultivar showed the highest amount of total phenols, which was nearly twice as high as  
452 in Diwa. The authors concluded that the activity of PPO is more important than the content of  
453 total phenols to reduce the Mal d 1 level and if there is a high PPO activity, Mal d 1 could be  
454 reduced even if the total phenol concentration is low. On the contrary, in the present study we  
455 observed a tendency towards higher Pru d 1 level in Jubileum, which also showed the highest  
456 PPO activity and the lowest level of flavan-3-ols, thus suggesting that flavan-3-ols content are  
457 probably more important than the activity of PPO to reduce the Pru d 1 level in plums.  
458 Conventional and organic cultivation showed minor effects on the Pru d 1 level, and our  
459 results indicated that the allergen content of plums might be cultivar dependent. A wider  
460 range of cultivars should be analyzed to clarify which cultivars constantly express low  
461 amount of Pru d 1.

462

### 463 *Principal component analysis*

464 Principal component analysis (PCA) was performed to have a more comprehensive view of  
465 the relationships among the analyzed variables and the three factors (year, cultivar and system  
466 of cultivation). As expected, the PCA (Fig. 3) clearly separated plums cultivated in 2015 (left  
467 side) from those cultivated in 2016. Polyphenols (Neo-CGA and CGA), TA and FCI had the  
468 most positive loading for PC1, and best distinguished the two years of sampling. Among  
469 plums harvested in 2016, cultivar Reeves grouped towards the more positive region of the  
470 PC2, since it has the greatest flavan-3-ols content compared to other two genotypes. Plums

471 harvested in 2015 distinguished for their higher SSC, AsA and Superoxide scavenging  
472 capacity, with respect to those cultivated in 2016. Additionally, also Pru d1 content and PPO  
473 activity were higher in samples grown in 2015.

474

#### 475 **Conclusion**

476 The presented data clearly indicate that the main factor that affect the quality parameters in  
477 plum, besides the diversity among assayed genotypes, is the year-to-year variation, whereas  
478 the system of cultivation plays a marginal role. New and interesting results were reported  
479 regarding the relationship between the allergen content of plum and specific class of phenols,  
480 as well as the involvement of PPO enzymes. Further studies are needed on a wider range of  
481 genotypes, in order to better clarify the influence of the system of cultivation on the quality of  
482 plum fruit.

483

#### 484 **Disclosure statement**

485 The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content  
486 and writing of this article.

487

#### 488 **Funding**

489 This research was supported by the ERA-NET action “CORE Organic Plus” (Contract no.  
490 618107) in the framework of the “FaVOr-DeNonDe” Project  
491 (<http://coreorganicplus.org/researchprojects/favor-denonde/>).

492

#### 493 **References**

494 Bernacchia R, Preti R, Vinci G. 2016. Organic and conventional foods: differences in  
495 nutrients. *Ital J Food Sci.* 28:565-578.

496 Björkstén F, Halmeppuro L, Hannuksela M, Lahti A. 1980. Extraction and properties of apple  
497 allergens. *Allergy*. 35:671–677.

498 Bourn D, Prescott JA. 2002. Comparison of the nutritional value, sensor qualities, and food  
499 safety of organically and conventionally produced foods. *Crit Rev Food Sci*. 42:1-34.

500 Caris-Veyrat C, Amiot MJ, Tyssandier V, Grasselly D, Buret M, Mikolajczak M, Guillard  
501 JC, Bouteloup-Demange C, Borel P. 2004. Influence of organic versus conventional  
502 agricultural practice on the antioxidant microconstituent content of tomatoes and  
503 derived purees; consequences on antioxidant plasma status in humans. *J Agric Food*  
504 *Chem*. 52:6503–6509

505 Concellòn A, Añòn MC, Chaves AR. 2004. Characterization and changes in polyphenol  
506 oxidase from eggplant fruit (*Solanum melongena* L.) during storage at low temperature.  
507 *Food Chem*. 88:17–24.

508 Dangour AD, Dodhia SK, Hayter A, Allen E, Lock K, Uauy R. 2009. Nutritional quality of  
509 organic foods: a systematic review. *Am J Clin. Nutr*. 90:680–685.

510 Davey MW, Keulemans J. 2004. Determining the potential to breed for enhanced antioxidant  
511 status in Malus: mean inter- and intravarietal fruit vitamin C and glutathione contents at  
512 harvest and their evolution during storage. *J Agric Food Chem*. 52:8031-8038.

513 Dölle S, Schwarz D, Lehmann K, Weckwerth W, George E, Worm M, Franken P. 2011.  
514 Tomato allergy: impact of genotype and environmental factors on the biological  
515 response. *J Sci Food Agric*. 91:2234–2240.

516 El-Kereamy A, Jayasankar S, Taheri A, Errampalli D, Paliyath G. 2009. Expression analysis  
517 of a plum pathogenesis related 10 (PR10) protein during brown rot infection. *Plant Cell*  
518 *Rep*. 28:95-102.

519 Fujita S, Tono T. 1988. Purification and some properties of polyphenoloxidase in eggplant  
520 (*Solanum melongena*). *J Sci Food Agric*. 46:115-123.

521 Gąstoł M, Domagała-Świątkiewicz I. 2013. Comparing nutritional content of fruits,  
522 vegetables and juices from organic and conventional crops. CAB Reviews. 8:1-10.

523 Gil MI, Tomás-Barberán FA, Hess-Pierce B, Kader AA. 2002. Antioxidant capacities,  
524 phenolic compounds, carotenoids, and vitamin C contents of nectarine, peach and plum  
525 cultivars from California. J Agric Food Chem. 50:4976-4982.

526 Grace SC, Logan BA. 2000. Energy dissipation and radical scavenging by the plant  
527 phenylpropanoid pathway. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 355:1499-1510.

528 Gruber P, Vieths S, Wangorsch A, Nerkamp J, Hofmann T. 2004. Maillard reaction and  
529 enzymatic browning affect the allergenicity of Pru av 1, the major allergen from cherry  
530 (*Prunus avium*). J Agric Food Chem. 52:4002–4007.

531 Hallmann E. 2012. The influence of organic and conventional cultivation systems on the  
532 nutritional value and content of bioactive compounds in selected tomato types. J Sci  
533 Food Agric. 92:2840–2848.

534 Hoffmann-Sommergruber K. 2000. Plant allergens and pathogenesis-related proteins. What  
535 do they have in common? Int Arch Allergy Immunol. 122:155–166.

536 Hong V, Wrolstad RE. 1990. Characterization of anthocyanin-containing colorants and fruit  
537 juices by HPLC/photodiode array detection. J Agric Food Chem. 38:698-708.

538 Hornick SB. 1992. Factors affecting the nutritional quality of crops. Am J Alternative Agr.  
539 7:63-68.

540 Kiewning D, Wollseifen R, Schmitz-Eiberger M. 2013. The impact of catechin and  
541 epicatechin, total phenols and PPO activity on the Mal d 1 content in apple fruit. Food  
542 Chem. 140:99–104.

543 Kim DO, Chun OK, Kim YJ, Moon HY, Lee CY. 2003. Quantification of polyphenolics and  
544 their antioxidant capacity in fresh plums. J Agric Food Chem. 51:6509-6515.



545 Le Bourvellec C, Le Quéré JM, Sanoner P, Drilleau JF, Guyot S. 2004. Inhibition of apple  
546 polyphenol oxidase activity by procyanidins and polyphenol oxidation products, J Agric  
547 Food Chem. 52:122-130.

548 Lo Scalzo R, Picchi V, Migliori CA, Campanelli G, Leteo F, Ferrari V, Di Cesare LF. 2013.  
549 Variations in the phytochemical contents and antioxidant capacity of organically and  
550 conventionally grown Italian cauliflower (*Brassica oleracea* L. subsp. *botrytis*): results  
551 from a three-year field study. J Agric Food Chem. 61:10335-10344.

552 Lombardi-Boccia G, Lucarini M, Lanzi S, Aguzzi A, Cappelloni M. 2004. Nutrients and  
553 antioxidant molecules in yellow plums (*Prunus domestica* L.) from conventional and  
554 organic productions: a comparative study. J Agric Food Chem. 52: 90-94.

555 Lombardo S, Pandino G, Mauromicale G. 2017. The effect on tuber quality of an organic  
556 versus a conventional cultivation system in the early crop potato. J Food Comp Anal.  
557 62:189-196.

558 Miletić N, Popović B, Mitrović O, Kandić M. 2012. Phenolic content and antioxidant capacity  
559 of fruits of plum cv. 'Stanley' (*Prunus domestica* L.) as influenced by maturity stage  
560 and on-tree ripening. Aust J Crop Sci. 6:681–687.

561 Nunes C, Guyot S, Marnet N, Barros AS, Saraiva JA, Renard CMGC, Coimbra MA. 2008.  
562 Characterization of plum procyanidins by thiolytic depolymerization. J Agric Food  
563 Chem. 56:5188–5196.

564 Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Giuffrida MG, Ortolani C, Fortunato D, Trambaioli C,  
565 Scibola E, Calamari AM, Robino AM, Conti A. 2001. Characterization of the major  
566 allergen of plum as a lipid transfer protein. J Chromatogr B. 756:95 –103.

567 Picchi V, Migliori CA, Lo Scalzo R, Campanelli G, Ferrari V, Di Cesare LF. 2012.  
568 Phytochemical content in organic and conventionally grown Italian cauliflower. Food  
569 Chem. 130:501–509.

570 Price ML, Scoyoc SV, Butler LG. 1978. A critical evaluation of the vanillin reaction as an  
571 assay for tannin in *Sorghum* grain. J Agric Food Chem. 26:1214-1218.

572 Rembialkowska E. 2007. Quality of plant products from organic agriculture. J Sci Food  
573 Agric. 87:2757-2762.

574 Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds.  
575 Trends Plant Sci. 2:152-159.

576 Rudeschko O, Fahlbusch B, Henzgen M, Schlenvoigt G, Herrmann D, Vieths S, Jäger L.  
577 1995. Investigation of the stability of apple allergen extracts. Allergy. 50:575–580.

578 Sahamishirazi S, Moehring J, Claupein W, Graeff-Hoenninger S. 2017. Quality assessment of  
579 178 cultivars of plum regarding phenolic, anthocyanin and sugar content. Food Chem.  
580 214:694–701.

581 Sancho AI, Foxall R, Browne T, Dey R, Zuidmeer L, Marzban G, Waldron KW, van Ree R,  
582 Hoffmann-Sommergruber K, Laimer M, Mills EN. 2006. Effect of postharvest storage  
583 on the expression of the apple allergen Mal d 1. J Agric Food Chem. 54:5917–5923.

584 Schmitz-Eiberger M, Matthes A. 2011. Effect of harvest maturity, duration of storage and  
585 shelf life of apples on the allergen Mal d 1, polyphenoloxidase activity and polyphenol  
586 content. Food Chem. 127:1459–1464.

587 Sinha M, Singh RP, Kushwaha GS, Iqbal N, Singh A, Kaushik S, Kaur P, Sharma S, Singh  
588 TP. 2014. Current overview of allergens of plant pathogenesis related protein families.  
589 Sci World J. 2014:1–19.

590 Slimestad R, Vangdal E, Brede C. 2009. Analysis of phenolic compounds in six Norwegian  
591 plum cultivars (*Prunus domestica* L.). J Agric Food Chem. 57:11370-11375.

592 Slinkard K, Singleton VL. 1977. Total phenol analysis: Automation and comparison with  
593 manual methods. Am J Enol Vitic. 28:49-55.

594 Tomás-Barberán FA, Gil MI, Cremin P, Waterhouse AL, Hess-Pierce B, Kader AA. 2001.  
595 HPLC-DAD-ESIMS analysis in nectarines, peaches and plums. J Agric Food Chem.  
596 49:4748-4760.

597 Vangdal E, Flatland SB. 2010. Criteria for picking plums (*Prunus domestica* L.) at the  
598 optimum maturity stage for the fresh fruit market. Acta Hort. 874: 125-130

599 Vangdal E, Flatland S, Nordbø R. 2007. Fruit quality changes during marketing of new plum  
600 cultivars (*Prunus domestica* L.). Hort Sci. 34:91-95.

601 Vangdal E, Picchi V, Fibiani M, Lo Scalzo R. 2017. Effects of the drying technique on the  
602 retention of phytochemicals in conventional and organic plums (*Prunus domestica* L.).  
603 Lebensm-Wiss Technol. 85:506-509

604 Venter A, Joubert E, de Beer D. 2013. Characterisation of phenolic compounds in South  
605 African plum fruits (*Prunus salicina* Lindl.) using HPLC coupled with diode-array,  
606 fluorescence, mass spectrometry and on-line antioxidant detection. Molecules. 8:5072-  
607 5090.

608 Wechtersbach L, Cigić B. 2007. Reduction of dehydroascorbic acid at low pH. J Biochem  
609 Biophys Methods. 70:767–772.

610 Woese K, Lange D, Boess C, Bögl KW. 1997. A comparison of organically and  
611 conventionally grown foods – results of a review of the relevant literature. J Sci Food  
612 Agric. 74:281-293.

613 Worthington V. 2001. Nutritional quality of organic versus conventional fruits, vegetables,  
614 and grains. J Altern Complement Med. 7:161–167.

615 Xu C, Zhang Z, Zhu L, Huang Y, Lu J. 2011. Influence of growing season on phenolic  
616 compounds and antioxidant properties of grape berries from vines grown in subtropical  
617 climate. J Agric Food Chem. 59:1078–1086.

618

Table 1

Mean monthly temperatures and total monthly rainfall during the period May–September in the Hardanger area (Western Norway) in 2015 and 2016. The historical mean temperatures and rainfall are indicated in parenthesis. For each year of study, the harvest date is reported.

	Temperature (°C)			Rainfall (mm)		
	2015	2016	(10.2)	2015	2016	(50)
May	8.7	11.8	(10.2)	140	73	(50)
June	11.9	16	(13.8)	135	29	(64)
July	14.4	14.9	(15.0)	85	74	(75)
August	15.1	14.3	(14.1)	73	138	(92)
September	12.3	14.3	(10.5)	64	160	(157)
Harvest date	22-set	06-set				

Table 2

Significance of ANOVA for each measured quality parameter, phytochemical, PPO, antioxidant capacity (Folin-Ciocalteu Index, DPPH<sup>\*</sup> and Superoxide anion scavenging capacity) and Pru d1 content, relating to their value in the three plum cultivars harvested across two cultivation years (2015 and 2016) and two cultivation systems (conventional and organic)<sup>a</sup>.

	Year (Y)	Cultivar (C)	System of cultivation (S)	Y x C	Y x S	C x S	Y x C x S
<i>Common quality parameters</i>							
DM	***	**	**	***	ns	***	ns
SSC	***	***	**	***	ns	ns	ns
TA	***	***	***	***	**	***	***
<i>Phytochemicals</i>							
Neo-CGA	***	***	*	***	ns	**	ns
Coumaryl derivative	**	***	ns	*	ns	ns	ns
CGA	***	*	ns	**	*	*	ns
Rutin	ns	**	*	ns	ns	ns	ns
ATH	***	***	*	*	ns	ns	ns
TP	***	***	*	***	ns	*	ns
Flavan-3-ols	***	***	ns	***	*	***	***
AsA	***	**	ns	***	*	***	***
<i>PPO activity</i>	**	***	*	***	ns	**	**
<i>Antioxidant capacity</i>							
Folin-Ciocalteu Index	ns	***	ns	**	ns	**	ns
DPPH <sup>*</sup>	***	***	*	**	ns	**	*
Superoxide	***	***	ns	*	ns	ns	ns
<i>Pru d1 content</i>	***	***	ns	***	ns	***	***

<sup>a</sup> ns, not significant; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

Table 3

Dry matter (DM), Soluble solids content (SSC) and Titratable acidity (TA) of conventional (Conv) and organic (Org) Jubileum, Reeves and Victoria plums in the two years of cultivation (2015 and 2016). Results are presented as mean of three replicates  $\pm$  standard deviation. Different letters within each column indicate means significantly different according to Tukey's test ( $P < 0.05$ ).

Cultivar	System of cultivation	Year	DM (%)	SSC ( $^{\circ}$ Bx FW)	TA <sup>a</sup> (g/100 g FW)
Jubileum	Conv	2015	16.9 $\pm$ 0.8 a	13.3 $\pm$ 0.7 a	1.33 $\pm$ 0.07 a
		2016	13.9 $\pm$ 0.4 bc	10.2 $\pm$ 0.6 b	1.12 $\pm$ 0.02 b
	Org	2015	15.7 $\pm$ 1.0 a	12.1 $\pm$ 0.9 a	1.37 $\pm$ 0.08 a
		2016	12.3 $\pm$ 0.7 d	8.5 $\pm$ 0.8 c	1.11 $\pm$ 0.09 b
Reeves	Conv	2015	12.7 $\pm$ 0.9 cd	9.6 $\pm$ 0.7 bc	0.84 $\pm$ 0.06 d
		2016	13.0 $\pm$ 0.1 bcd	10.4 $\pm$ 0.3 b	0.83 $\pm$ 0.01 d
	Org	2015	14.0 $\pm$ 0.8 bc	10.6 $\pm$ 0.5 b	0.87 $\pm$ 0.04 d
		2016	14.1 $\pm$ 0.3 bc	10.7 $\pm$ 0.4 b	1.07 $\pm$ 0.05 bc
Victoria	Conv	2015	17.1 $\pm$ 1.8 a	12.8 $\pm$ 1.6 a	1.11 $\pm$ 0.14 b
		2016	14.1 $\pm$ 1.0 b	10.0 $\pm$ 1.1 b	1.28 $\pm$ 0.14 a
	Org	2015	14.2 $\pm$ 0.2 b	10.3 $\pm$ 0.4 b	0.95 $\pm$ 0.03 cd
		2016	12.3 $\pm$ 0.7 d	8.5 $\pm$ 0.6 c	1.04 $\pm$ 0.07 bc

<sup>a</sup> Data are expressed as g malic acid equivalents.

Table 4

Neo-chlorogenic acid (Neo-CGA), p-Coumaric (p-Coum), Chlorogenic acid (CGA), Rutin (Rut), Anthocyanins (ATH), Total polyphenols (TP) of conventional (Conv) and organic (Org) Jubileum, Reeves and Victoria plums in the two years of cultivation (2015 and 2016). Results are presented as mean of three replicates  $\pm$  standard deviation. Data are expressed in mg/100g DW. Different letters within each column indicate means significantly different according to Tukey's test ( $P < 0.05$ ).

Cultivar	System of cultivation	Year	Neo-CGA	p-Coum	CGA	Rut	ATH	TP						
Jubileum	Conv	2015	212 $\pm$ 15	ef	21 $\pm$ 5	bc	33 $\pm$ 10	ef	22 $\pm$ 8	abcd	22.2 $\pm$ 2	b	309 $\pm$ 39	fg
		2016	411 $\pm$ 30	cd	30 $\pm$ 3	ab	41 $\pm$ 5	cde	11 $\pm$ 3	d	35.9 $\pm$ 1	a	530 $\pm$ 35	cd
	Org	2015	161 $\pm$ 47	fg	19 $\pm$ 13	bc	19 $\pm$ 8	g	14 $\pm$ 8	cd	20.0 $\pm$ 8	bc	234 $\pm$ 80	gh
		2016	456 $\pm$ 54	c	40 $\pm$ 3	a	47 $\pm$ 5	bcd	16 $\pm$ 2	bcd	22.3 $\pm$ 1	b	581 $\pm$ 53	c
Reeves	Conv	2015	86 $\pm$ 8	gh	7 $\pm$ 6	cd	22 $\pm$ 8	g	19 $\pm$ 9	abcd	1.9 $\pm$ 0.2	f	137 $\pm$ 15	hi
		2016	238 $\pm$ 23	ef	5 $\pm$ 1	d	36 $\pm$ 6	de	27 $\pm$ 0.1	a	17.1 $\pm$ 1	c	323 $\pm$ 30	fg
	Org	2015	68 $\pm$ 19	h	5 $\pm$ 4	d	20 $\pm$ 6	g	12 $\pm$ 6	d	2.3 $\pm$ 0.1	ef	107 $\pm$ 14	i
		2016	260 $\pm$ 4	e	5 $\pm$ 1	d	52 $\pm$ 2	bc	19 $\pm$ 6	abcd	6.7 $\pm$ 1	d	342 $\pm$ 2	ef
Victoria	Conv	2015	350 $\pm$ 111	d	31 $\pm$ 19	ab	25 $\pm$ 10	fg	29 $\pm$ 11	a	4.3 $\pm$ 2	def	438 $\pm$ 151	de
		2016	1040 $\pm$ 55	a	42 $\pm$ 3	a	64 $\pm$ 7	a	26 $\pm$ 0.2	ab	4.8 $\pm$ 1	def	1177 $\pm$ 66	a
	Org	2015	235 $\pm$ 38	ef	22 $\pm$ 11	b	18 $\pm$ 5	g	25 $\pm$ 8	abc	2.5 $\pm$ 1	ef	302 $\pm$ 55	fg
		2016	919 $\pm$ 32	b	36 $\pm$ 1	a	56 $\pm$ 5	ab	20 $\pm$ 1	abcd	6.2 $\pm$ 1	de	1037 $\pm$ 38	b

Table 5

Ascorbic Acid content (AsA), Flavan-3-ols content, Polyphenol oxidase (PPO) activity, Folin-Ciocalteu Index (FCI) of conventional (conv) and organic (org) Jubileum, Reeves and Victoria plums in the two years of cultivation (2015 and 2016), expressed on a dry weight (DW) basis. Results are presented as mean of three replicates  $\pm$  standard deviation. Different letters within each column indicate means significantly different according to Tukey's test ( $P < 0.05$ ).

Cultivar	System of cultivation	Year	AsA (mg/100 g DW)		Flavan-3-ols <sup>a</sup> (mgCE/100 g DW)			PPO <sup>b</sup> (U/g DW)		FCI <sup>c</sup> (mg GAE/100 g DW)	
Jubileum	Conv	2015	11.5 $\pm$ 3	a	882 $\pm$ 373	e	43 $\pm$ 2	ab	593 $\pm$ 23	cd	
		2016	3.6 $\pm$ 1	ef	2064 $\pm$ 156	cd	53 $\pm$ 17	ab	508 $\pm$ 39	de	
	Org	2015	4.2 $\pm$ 1	ef	1112 $\pm$ 152	de	56 $\pm$ 10	ab	471 $\pm$ 34	ef	
		2016	2.9 $\pm$ 0.1	f	1388 $\pm$ 161	d	54 $\pm$ 22	ab	459 $\pm$ 106	ef	
Reeves	Conv	2015	4.9 $\pm$ 0.1	de	521 $\pm$ 75	f	59 $\pm$ 15	a	411 $\pm$ 42	ef	
		2016	5.0 $\pm$ 2	de	2463 $\pm$ 313	b	8 $\pm$ 3	de	376 $\pm$ 43	f	
	Org	2015	6.1 $\pm$ 1	cd	766 $\pm$ 148	ef	23 $\pm$ 2	cd	434 $\pm$ 51	ef	
		2016	4.1 $\pm$ 1	ef	4018 $\pm$ 170	a	4 $\pm$ 2	e	518 $\pm$ 22	de	
Victoria	Conv	2015	9.0 $\pm$ 3	b	2004 $\pm$ 183	d	38 $\pm$ 5	bc	665 $\pm$ 66	bc	
		2016	4.6 $\pm$ 1	de	2490 $\pm$ 184	b	51 $\pm$ 1	ab	841 $\pm$ 26	a	
	Org	2015	11.1 $\pm$ 0.4	a	1416 $\pm$ 95	e	42 $\pm$ 12	abc	657 $\pm$ 133	bc	
		2016	7.2 $\pm$ 0.3	c	2353 $\pm$ 122	bc	18 $\pm$ 6	de	733 $\pm$ 23	b	

<sup>a</sup> Data are expressed as mg catechin equivalents (CE).

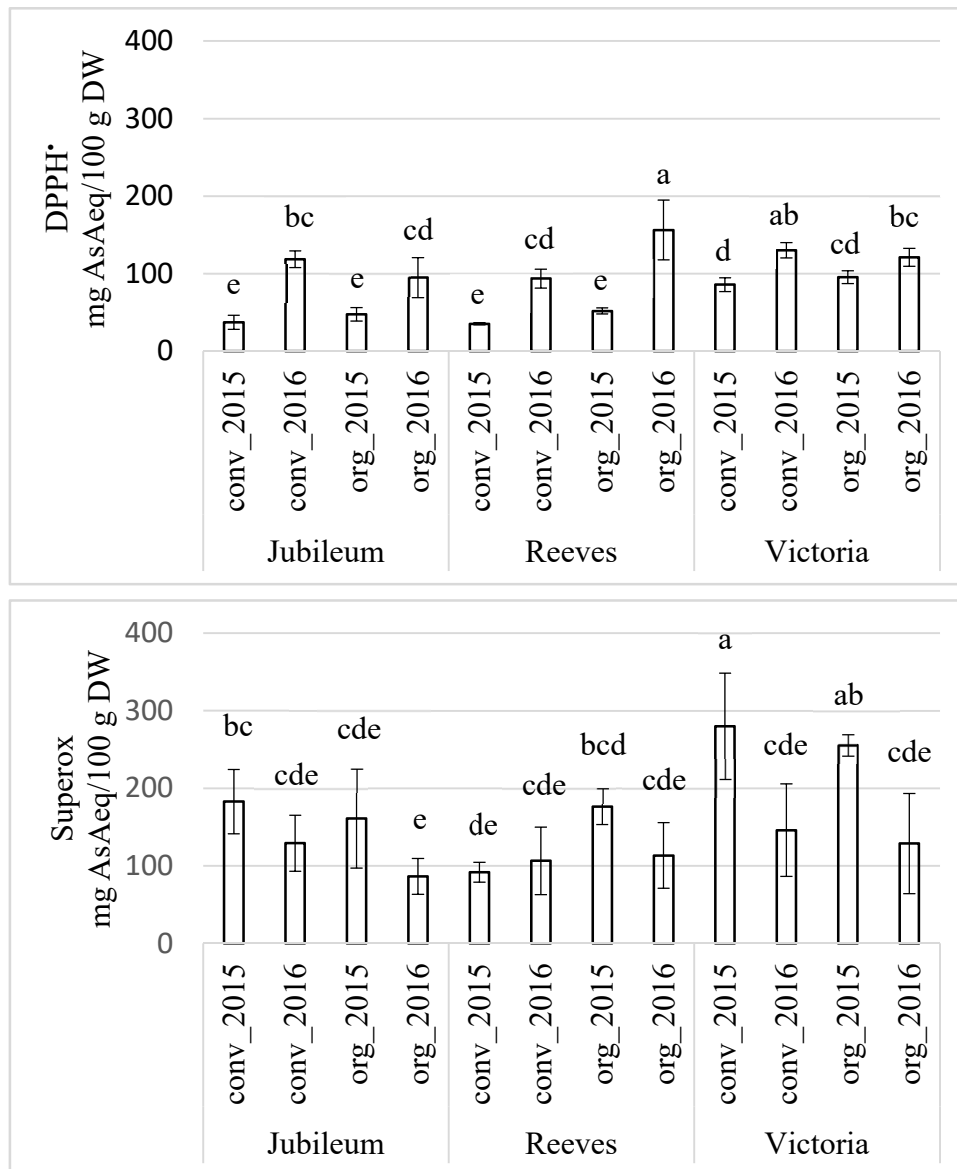
<sup>b</sup> One unit (U) of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that causes an increase in absorbance of 0.1 per minute per ml, monitored at 420 nm, at 25 °C.

<sup>c</sup> Data are expressed as mg gallic acid equivalents (GAE).



Figure 1

Antioxidant activity measured as DPPH<sup>\*</sup> (top) and superoxide anion (Superox, bottom) scavenging capacity of conventional (conv) and organic (org) Jubileum, Reeves and Victoria plums in the two years of cultivation (2015 and 2016). Error bars represent the standard deviation. Different letters above bars indicate means significantly different according to Tukey's test ( $P < 0.05$ ).



<sup>a</sup> Data are expressed as mg of ascorbic acid equivalents (AsAeq)/100 g dry weight (DW).

Figure 2

Box-and-whisker plots describing the allergen content expressed as  $\mu\text{g Pru d 1/g}$  dry weight (DW) of conventional (conv) and organic (org) Jubileum, Reeves and Victoria plums in the two years of cultivation (2015 and 2016). Medians, quartiles, and extreme values are given. Whiskers extend to the most extreme data point if it is within a distance of  $1.5 \times$  inter-quartile range from the box, otherwise to the  $1.5 \times$  inter-quartile range and outliers are shown. Different letters above bars indicate medians significantly different ( $P < 0.05$ ).

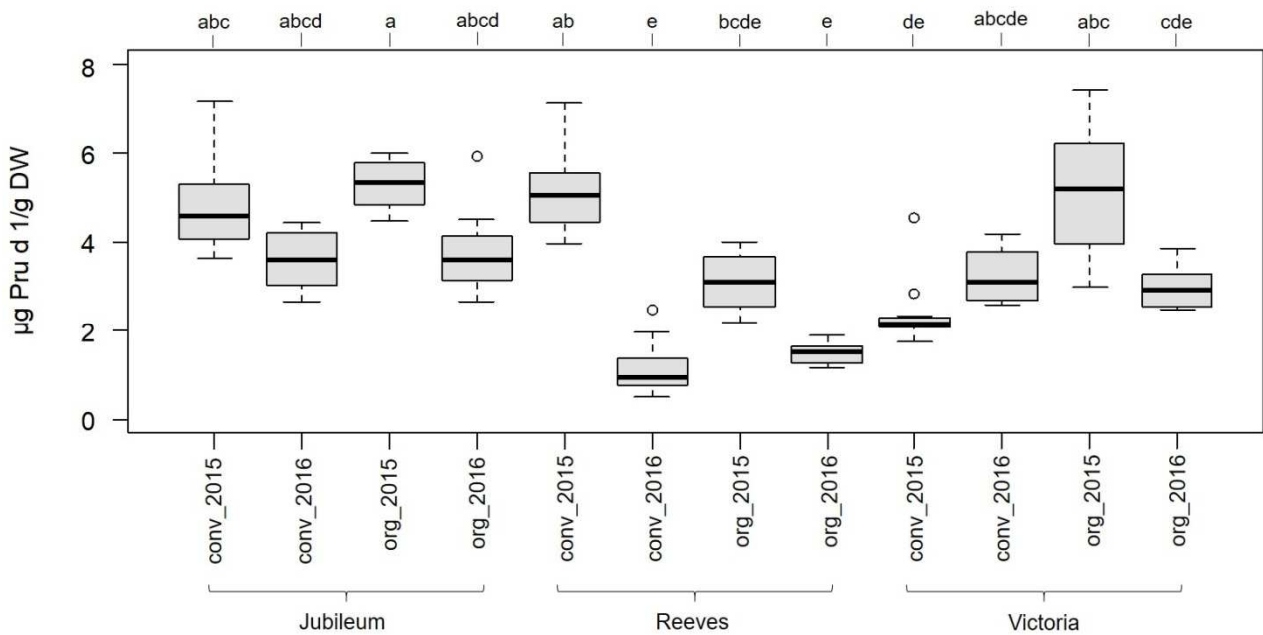
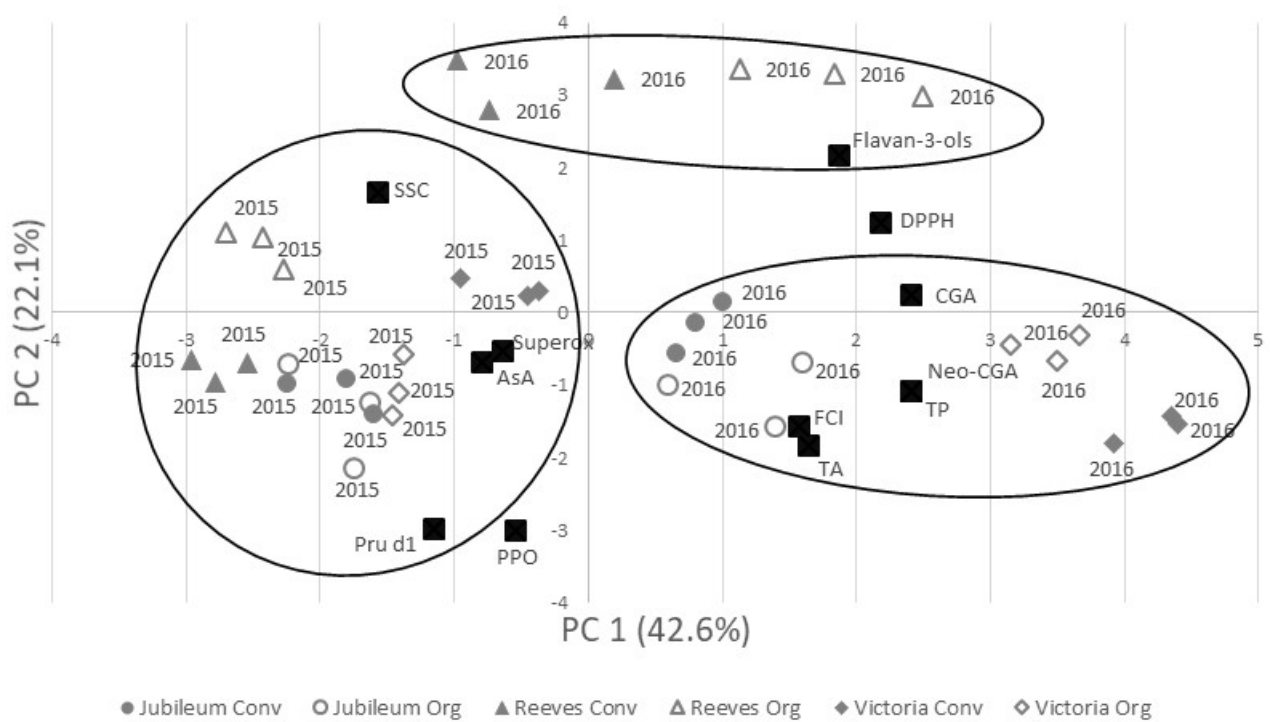


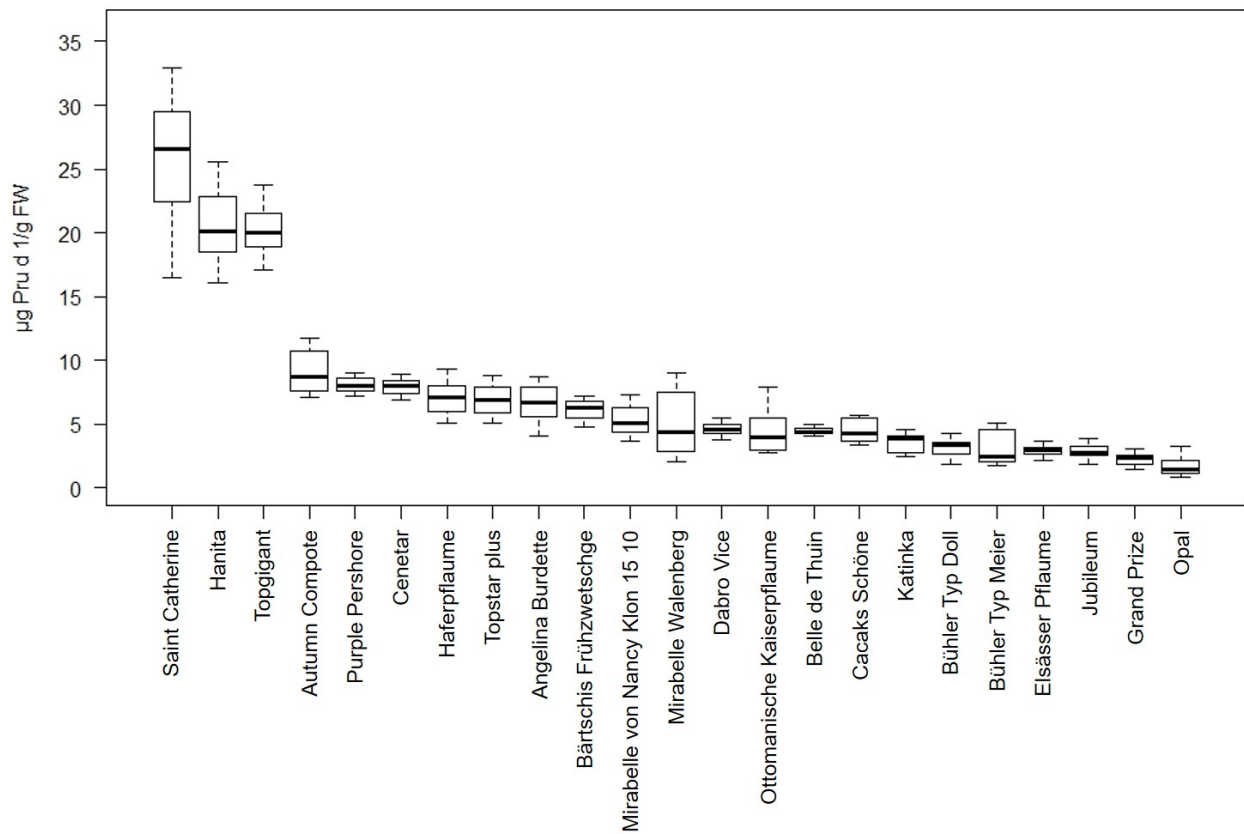
Figure 3

Results of PCA: biplot of PC1 vs PC2 showing the loadings of variables (black squares) and the scores of Jubileum (circle), Reeves (triangle) and Victoria (diamond) plums from conventional (full symbols) and organic (open symbols) farming. The selected parameters used in PCA were common quality parameters, phytochemicals, PPO activity and antioxidant capacity, which clearly separates the two years of cultivation (2015 and 2016). The percentage of total variance explained from each principal component is shown in parentheses. SSC: Soluble solids content; TA: titratable acidity; Neo-CGA: neo-chlorogenic acid; CGA: chlorogenic acid; TP: total polyphenols; AsA: ascorbic acid; PPO: Polyphenol oxidase activity; FCI: Folin-Ciocalteu Index; DPPH: DPPH scavenging capacity; Superox: superoxide anion scavenging capacity; Pru d1: allergen content.



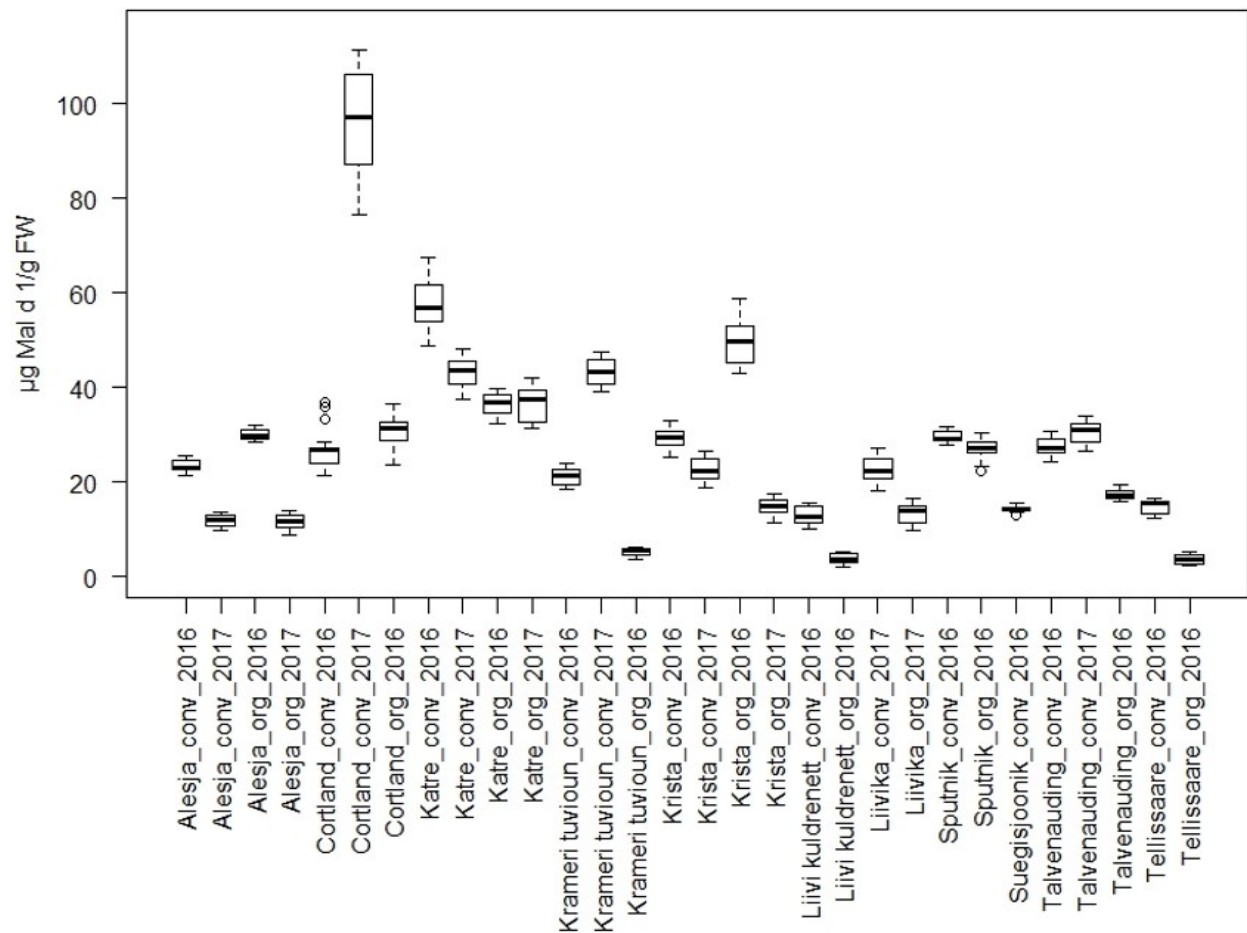


## Anhang II – Ergänzungsmaterial



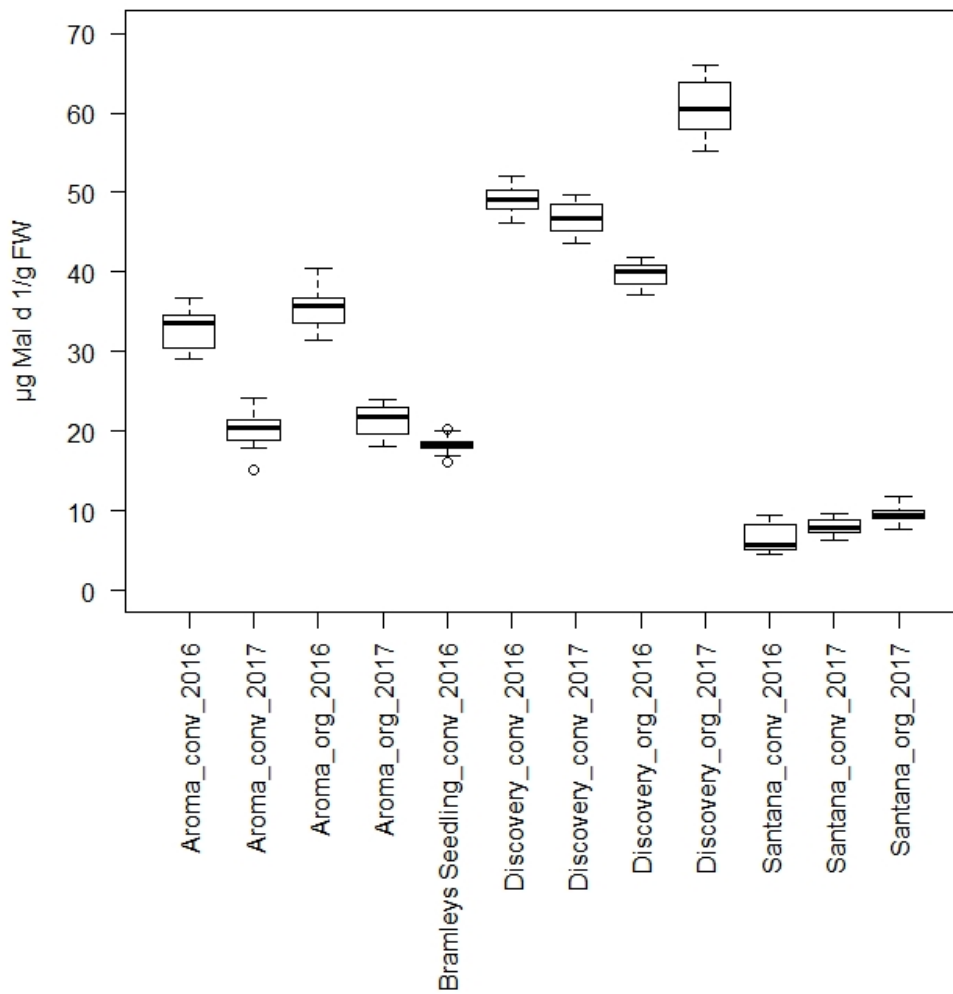
**Abbildung S 1: Gehalt des Bet v 1-homologen Proteins Pru d 1 in verschiedenen Pflaumensorten**

Mittels indirektem kompetitivem ELISA wurde der Pru d 1-Gehalt in µg/g FW in verschiedenen Sorten von *Prunus domestica* bestimmt, welche im Jahr 2017 von der Versuchsanlage der Technischen Universität München, Wissenschaftszentrum Weißenstephan, Freising geerntet wurden; unveröffentlichte Daten



**Abbildung S 2: Gehalt des Bet v 1-homologen Proteins Mal d 1 in verschiedenen Apfelsorten (Herkunft Estland)**

Mittels indirektem kompetitivem ELISA wurde der Mal d 1-Gehalt in µg/g FW in verschiedenen Sorten von *Malus domestica* bestimmt, welche in den Jahren 2016 und 2017 unter konventionellen (conv) bzw. ökologischen (org) Bedingungen in Estland angebaut und geerntet wurden; unveröffentlichte Daten



**Abbildung S 3: Gehalt des Bet v 1-homologen Proteins Mal d 1 in verschiedenen Apfelsorten (Herkunft Norwegen)**

Mittels indirektem kompetitivem ELISA wurde der Mal d 1-Gehalt in  $\mu\text{g/g}$  FW in verschiedenen Sorten von *Malus domestica* bestimmt, welche in den Jahren 2016 und 2017 unter konventionellen (conv) bzw. ökologischen (org) Bedingungen in Norwegen angebaut und geerntet wurden; unveröffentlichte Daten





## Anhang III

Legende:

<i>ATG</i>	Startcodon
<i>TAA</i>	Stoppcodon
<b>CTT</b>	zusätzlich eingefügtes Codon zum Erhalt des <i>open reading frames</i>
<u>His<sub>6</sub>-tag</u>	kodiert vom pQE70 Vektor
<u>AGATTT</u>	Punktmutation in <i>Bgl</i> III-Stelle im <i>Pru d 1</i> -Gen

### Klonierung von *Sola l 4.02* und *Pru d 1* über *Sph*I / *Bgl*III in pQE70 Vektor

DNA-Sequenz *Sola l 4.02* in pQE70

*ATGCTTGGTGTAACACCTTTACTCATGAGTCCACAACCACAATTGCCCAACAAGGCTATT  
CAAAGGTTTGGTTCTTGATTTTGATAGCCTTGTACCTAAATTGTTGTCACATGATGTTAAGAG  
CATTGAGATTGTTGAGGGAGATGGTGGTGCTGGAAGCATCAAGCAAATGAACTTTGTTGAA  
GGTGGACCAATTAAGTACTTGAAGCACAAGATTCATGTGATTGATGACAAGAATTTGGTAAC  
AAAATATTCACTTATTGAAGGTGATGTTCTTGGTGACAAATTGGAATCAATTGCCTATGATG  
TCAAATTTGAAGCTGCTGGAGATGGAGGTTGTGTTTGCAAGACAACAAGTATCACACA  
AAGGGTGATCATGTTGTTAGTGAAGAAGAACAATGTAGGCAAAGGGAAAGCCATTGACC  
TATTCAAGGCCATCGAAGCGTACCTCCTCGCTAATCCTTCTGTCTACGCTAGATCTCATCACC  
ATCACCATCACTAA*

Proteinsequenz rekombinantes *Sola l 4.02*

MLGVNTFTHE STTTIAPTRL FKGLVLDLFDL LVPKLLSHDV KSIEIVEGDG GAGSIKQMN  
VEGGPIKYLK HKIHVIDDKN LVTKYSLIEG DVLGDKLESI AYDVKFEAAG DGGCVCKTTT  
EYHTKGDHVV SEEEHNVGKG KAIDLFKAIE AYLLANPSVY ARSHHHHHH\*

### Klonierung von *Fra a 1.02* über *Sph*I / *Sph*I in pQE70 Vektor

DNA-Sequenz von *Fra a 1.02* in pQE70

*ATGCTGATGGGTGTGTTCACTTATGAAACCGAGTTCACCTCCGTCATCCCACCACCAAGATTG  
TTCAAGGCTTTCATCCTTGATGCCGACAATCTCATCCCCAAGATTGCTCCCCAAGCAGTTAAG  
TGTGCTGAAATCATTGAAGGAGACGGAGGCGTAGGCACCATCAAGAAGATCACCTTTGGCG  
AAGGCAGCCAGTTCGGCTCAGTGACCCACAAGATCGATGGGATTGACAAAGAGAAGCTTTGT  
GTACAGCTACAGTTTGATCGAAGGAGATGCCTTGTCCGACAAGATTGAGAAGATCTCTTACG  
AGACCAAATTTGGTGTGATCTTCCGATGGAGGATCCATCATCAAGAGCACAAGCAACTACCAC  
ACCAAAGGTGACGTGGAGATCAAGGAAGAGCATGTCAAGGCTGGAAAAGAGAAGGCGTCG  
CACCTCTTCAAGCTTGTGTAAGGCTACCTCTTGGCCAATCCTAATGAATACTGTTGCATGCGA  
GGATCCAGATCTCATCACCATCACCATCACTAA*

Proteinsequenz rekombinantes Fra a 1.02

MLMGVFTYET EFTSVIPPPR LFKAFILDAD NLIPKIAPQA VKCAEIEGD GGVGTIKKIT  
FGEGSQFGSV THKIDGIDKE NFVYSYSLIE GDALSDKIEK ISYETKLVSS SDGGSIIKST  
SNYHTKGDVE IKEEHVKAGK EKASHLFKLV EGYLLANPNE YCCMRGSRSH HHHHH\*

**Klonierung von Pru d 1 über SphI / BglIII in pQE70 Vektor**

DNA-Sequenz von Pru d 1 in pQE70

ATGCTTGGTGTCTTCACATATGAGAGCGAGTTCACCTCTGAGATCCCACCACCAAGATTGTT  
CAAGGCCTTTGTCCTCGATGCTGACAACCTTGTCCCTAAGATTGCTCCACAGGCAATTAAGC  
ATTCTGAAATCCTTGAAGGAGATGGCGGCCCGGAACCATCAAGAAGATCACTTTCGGCGA  
AGGCAGCCAGTACGGCTACGTGAAGCACAAGATTGACTCCATTGACAAAGAAAACCATTCA  
TACAGCTACACCTTGATCGAAGGAGATGCTTTGGGAGACAATCTTGAGAAGATTTTCGTACGA  
GACCAAGTTGGTGGCATCCCCAGCGGAGGATCCATCATCAAGAGCATCAGCCACTACCAC  
ACCAAGGGAGATGTTGAGATCAAGGAAGAGCATGTCAAGGCTGGCAAAGAGAAGGCCTCA  
AATCTCTTCAAGCTCATTGAGACCTACCTTAAGGGCCACCCCGATGCCTACAACAGATCTCA  
TCACCATCACCATCACTAA

Proteinsequenz rekombinantes Pru d 1

MLGVFTYESE FTSEIPPPRL FKAFVLDADN LVPKIAPQAI KHSEILEGDG GPGTIKKITF  
GEGSQYGYVK HKIDSIDKEN HSYSYTLIEG DALGDNLEKI SYETKLVASP SGGSIIKSIS  
HYHTKGDVEI KEEHVKAGKE KASNLFLKIE TYLKGHPDAY NRSHHHHHH\*