

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

TUM School of Life Sciences

Molekulare Untersuchung von allergenen Determinanten des
Apfelallergens Mal d 1 mittels Proteomics, Immunoassays und
Liganden-Bindungsstudien

Soraya Chebib

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Life Sciences der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Prof. Dr. Dirk Haller

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Wilfried Schwab

2. Prof. Dr. Michael Rychlik

Die Dissertation wurde am 11.04.2022 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die TUM School of Life Sciences am 26.07.2022 angenommen.

**„We keep moving forward, opening new doors, and doing new things,
because we're curious and curiosity keeps leading us down new paths.”**

Walt Disney

„Every ultimate fact is only the first of a new series...”

Ralph Waldo Emerson

Danksagung

In den letzten drei Jahren hatte ich das Privileg viele wundervolle Menschen kennenzulernen und mit ihnen zu arbeiten.

Einen großen Dank an **Prof. Dr. Wilfried Schwab** für die Überlassung des Promotionsthemas, die wertvolle Unterstützung, Anregungen, hilfreichen Diskussionen und dem entgegengebrachten Vertrauen in meine Arbeit.

Ich danke allen Kooperationspartner des „AllArm“-Projektes für die erfolgreiche Zusammenarbeit im Projekt. Vielen Dank **Prof. Dr. Engelke** vom Bundesministerium für Landwirtschaft und Ernährung für die Finanzierung des Projektes. Ich danke der **Züchtungsinitiative Niederelbe** und **Prof. Dr. Werner Dierend** von der Hochschule Osnabrück für die Züchtung und die Bereitstellung der zahlreichen Apfel-Genotypen. Vielen Dank **Prof. Dr. Werner Dierend** und **Katrin Plate** für die Organisation, Ernte, Lagerung und Versendung der Apfelproben nach Freising. Danken möchte ich auch **Prof. Dr. med. Karl-Christian Bergmann** und **seinem gesamten Team** des Allergie-Centrum-Charité in Berlin für die Durchführung der klinischen Studien und die Bereitstellung der Daten.

Vielen Dank **Dr. Christina Ludwig** und **Dr. Chen Meng** für die Durchführung der Proteomik-Analysen und das wissenschaftliche Know-how bei der bioinformatischen Auswertung der Daten.

Herzlichen Dank an **Dr. Karin Kleigrew** für die Unterstützung als Mentorin.

Ich danke meiner ehemaligen Projektpartnerin **Dr. Emilia Romer** für eine erfolgreiche unkomplizierte Zusammenarbeit und den fachlichen Austausch in einem stets freundschaftlichen Arbeitsklima.

Ich danke all meinen Studenten, die mich tatkräftig im Labor unterstützt haben. Vielen Dank **Maximilian Merz, Paula Dewes, Ana Bici, Anna Schießl, Sarah Merkle und Marina Caushaj**.

Ich danke allen Mitarbeitern, auch den Ehemaligen, der Professur Biotechnologie der Naturstoffe für die Unterstützung, ständige Hilfsbereitschaft und die gute Arbeitsatmosphäre. Vielen Dank **Dr. Johanna Trinkl, Martina Kolarek, Anja Forstner, Dr. Annika**

Haugeneder, Dr. Elisabeth Kurze, Dr. Kate McGraphery, Dr. Guangxin Sun, Dr. Nicolas Figueora, Dr. Thomas Hoffmann, Dr. Ruth Habegger, Shuai Zhao, Dr. Rafal Jonczyk, Mechthild Mayershofer, Hannelore Meckl, Dr. Walter Weiß, Jieren Liao und Heike Adamski.

Mein allergrößter Dank gebührt jedoch **meiner Familie**, die für mich die Säulen sind, ohne die ich nicht stehen könnte. Sie sind meine Inspiration für alles und haben mich stets ermutigt, das zu tun, was ich mir wünsche und der Mensch zu sein, der ich sein möchte. Vielen Dank **meinen Eltern, meiner Schwester Jasmin, meinem Bruder Amir, meiner Schwägerin Rika und den beiden kleinen Sternen in unserer Familie Ismail und Aliya.**

Publikationen

Die Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden im Zeitraum von August 2018 bis Oktober 2021 an der Professur Biotechnologie der Naturstoffe der Fakultät TUM School of Life Sciences der Technischen Universität München durchgeführt. Die Dissertation wurde im Rahmen des AllArm-Projektes angefertigt, gefördert durch das Bundesministerium für Landwirtschaft und Ernährung (BMLE). Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert.

Originalartikel:

Chebib, Soraya; Meng, Chen; Ludwig, Christina; Bergmann, Karl-Christian; Becker, Sylvia; Dierend, Werner; Schwab, Wilfried (2022): Identification of allergenomic signatures in allergic and well-tolerated apple genotypes using LC-MS/MS. *Food Chemistry: Molecular Sciences* 4, 100111. DOI: 10.1016/j.fochms.2022.100111.

Chebib, Soraya; Schwab, Wilfried (2021): Microscale Thermophoresis Reveals Oxidized Glutathione as High-Affinity Ligand of Mal d 1. *Foods* 10 (11), 2771. DOI: 10.3390/foods10112771

Romer, Emilia; **Chebib, Soraya;** Bergmann, Karl-Christian; Plate, Katrin; Becker, Sylvia; Ludwig, Christina; Meng, Chen; Fischer, Thilo; Dierend, Werner; Schwab, Wilfried (2020): Tiered approach for the identification of Mal d 1 reduced, well tolerated apple genotypes. *Scientific Reports* 10, 9144. DOI: 10.1038/s41598-020-66051-4

Becker, Soraya; Becker Sylvia; **Chebib, Soraya;** Schwab, Wilfried; Dierend, Werner; Zuberbier, Torsten; Bergmann, Karl-Christian (2021): Die Testung von Äpfeln auf ihre Allergenität. *Erwerbs-Obstbau* 63 (4). DOI: 10.1007/s10341-021-00600-7

Vorträge:

Chebib, Soraya; Schwab, Wilfried: Apple allergen Mal d 1-Integrated approach for unraveling the determinants of apple allergenicity in the search for low allergenic apple cultivars, Forschungsseminar der Lebensmittelchemie, 09.11.2020, TUM, Freising, Deutschland

Chebib, Soraya; Schwab, Wilfried: Das Apfelallergen Mal d 1: Untersuchungen zur Identifizierung von Einflussfaktoren auf die Allergenität, Projekttreffen, 26.02.2021, virtuelle Konferenz

Inhaltsverzeichnis

<i>Danksagung</i>	<i>I</i>
<i>Publikationen</i>	<i>III</i>
<i>Inhaltsverzeichnis</i>	<i>IV</i>
<i>Abkürzungen</i>	<i>VIII</i>
<i>Abbildungen</i>	<i>X</i>
<i>Tabellen</i>	<i>XII</i>
<i>Zusammenfassung</i>	<i>XIII</i>
<i>Summary</i>	<i>XVI</i>
1. Einleitung	1
1.1. Der Kulturapfel	1
1.2. Gesundheitliche Bedeutung des Apfels	3
1.3. Pollen- und Nahrungsmittelallergien	6
1.3.1. Geschichtlicher Hintergrund zu Allergien	6
1.3.2. Pathomechanismus der Allergie.....	7
1.3.3. Klassifizierung von Allergenen.....	9
1.3.4. Kreuzallergie	11
1.3.5. Apfelallergie und -allergene.....	12
1.3.6. Epitope von Allergenen.....	13
1.3.7. Therapie.....	15
1.4. Birkenpollenallergene und birkenpollenassoziierte Nahrungsmittelallergene .	17
1.4.1. PR-10 Familie: Bet v 1 und homologe Proteine	17
1.4.2. Physiologische Funktion	18
1.4.3. Stabilität von PR-10 Proteinen.....	19
1.4.4. Strukturelle Eigenschaften	20
1.5. Proteomik in Pflanzen	22
1.6. Ziele der Arbeit	24
2. Material und Methoden	25
2.1. Material	25
2.1.1. Pflanzliches Material.....	25
2.1.2. Chemikalien	26
2.1.3. Medien.....	28
2.1.4. Puffer und Lösungen	29
2.1.5. Gentechnisch veränderte Organismen.....	31
2.1.6. Antikörper und Enzyme	31
2.1.7. Verbrauchsmaterialien	32

2.1.8. Geräte	33
2.1.9. Flüssigkeitschromatographie-Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie	33
2.1.10. Sonstige Geräte	34
2.1.11. Software	35
2.2. Methoden	36
2.2.1. Plasmid-DNA-Extraktion.....	36
2.2.2. Herstellung des rekombinanten Proteins.....	36
2.2.3. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	38
2.2.4. SDS-PAGE.....	38
2.2.5. Western Blot.....	39
2.2.6. Bestimmung des Mal d 1 Gehaltes mittels indirekt kompetitiven ELISA.....	40
2.2.7. Lagerungsexperimente	41
2.2.8. Orale Provokationstests.....	42
2.2.9. Polyphenoloxidaseaktivität	43
2.2.10. Kolorimetrische Methoden zur Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes	44
2.2.11. Qualitative und quantitative Bestimmung von Polyphenolen mittels LC-MS.....	45
2.2.12. Liganden-Bindungsstudien	48
2.2.13. Proteomik-Analysen mittels LC-MS/MS.....	51
3. Ergebnisse	53
3.1. Herstellung und Reinigung des rekombinanten Proteins rMal d 1.02	53
3.2. Bestimmung des Mal d 1 Gehaltes mittels indirekt kompetitiven ELISA.....	54
3.2.1. Mal d 1 Konzentrationen in Genotypen der Selektionsstufe 1	54
3.2.2. Mal d 1 Konzentrationen in Genotypen der Selektionsstufe 2	57
3.2.3. Biologische Variabilität des Mal d 1 Gehaltes.....	59
3.2.4. Einfluss der ULO-Lagerung auf den Mal d 1 Gehalt.....	62
3.2.5. Einfluss der Kühllagerung auf die Mal d 1 Konzentration	64
3.2.6. Klinische Studie mittels oraler Provokationstests.....	66
3.3. Polyphenole.....	68
3.3.1. Polyphenoloxidaseaktivität	68
3.3.2. Gesamtpolyphenolgehalt.....	70
3.3.3. Quantifizierung der Polyphenole mittels LC-MS	73
3.3.4. Einfluss der Kühllagerung auf die Polyphenol-Zusammensetzung	77
3.3.5. Korrelationen.....	81
3.4. Biophysikalische Charakterisierung von Protein-Ligand-Interaktionen.....	85
3.4.1. Quantitative Analyse der Ligand-Bindungsstudien	85
3.4.2. Molekulare Dockingexperimente.....	89
3.5. Proteomik-Analysen zur Identifizierung von Mal d Proteinen	93

3.5.1. Mal d Isoformen.....	93
3.5.2. LC-MS/MS Datenevaluierung	94
3.5.3. Definition von Genotyp-Gruppen	98
3.5.4. Hierarchische Clusteranalyse	98
3.5.5. LC-MS/MS Analyse von verschiedenen Apfelproteinextrakten	102
3.5.6. Korrelationen.....	114
4. Diskussion.....	117
4.1. Herstellung und Reinigung des rekombinanten Proteins rMal d 1.02	117
4.2. Quantifizierung der Mal d 1 Konzentration in verschiedenen Apfel-Genotypen mittels ELISA.....	118
4.2.1. Umwelt- und Genotypeneffekt auf die Mal d 1 Gehalte.....	119
4.2.2. Stabilität von Mal d 1 während der Lagerung.....	121
4.2.3. Allergenes Potential von verschiedenen Apfel-Genotypen	123
4.3. Polyphenoloxidase-Aktivität	125
4.4. Gesamtpolyphenolgehalt	126
4.5. Polyphenol-Zusammensetzung von Äpfeln	128
4.5.1. Stabilität von Polyphenolen	131
4.5.2. Korrelationen von Metaboliten	132
4.6. Biophysikalische Charakterisierung von Protein-Ligand-Interaktionen.....	134
4.6.1. Molekulare Dockingexperimente.....	134
4.6.2. Bindung von Flavonoiden an rMal d 1.02	135
4.6.3. GSH und GSSG im Komplex mit rMal d 1.02	136
4.6.4. Einfluss der Ligandenbindung auf die Allergenität des Proteins.....	140
4.7. Mal d Proteine in verschiedenen Apfel-Genotypen.....	142
4.7.1. Mal d 1 Isoformen mit hypoallergenen und hyperallergenen Eigenschaften	142
4.7.2. Strukturelle Eigenschaften von Epitopen in Mal d 1 Proteinen.....	144
4.7.3. Die Apfelallergene Mal d 2, Mal d 3 und Mal d 4.....	151
4.7.4. Grenzen von Proteomik.....	153
4.8. Abschließende Schlussfolgerung	155
5. Anhang.....	CLVII
5.1. Isolierung von Plasmid-DNA	CLVII
5.2. Polyklonaler Antikörper	CLVIII
5.3. Allergengehalte von Genotypen der Selektionsstufe 1	CLIX
5.4. Allergengehalte von Genotypen der Selektionsstufe 2	CLXI
5.5. Intra-Variabilität der Allergengehalte verschiedener Genotypen	CLXII
5.6. Metabolit-Profil von Apfelpollen.....	CLXVI
5.7. Stabilität von Polyphenolen während der Lagerung.....	CLXVII

Inhaltsverzeichnis

5.8. Proteomik	CLXIX
5.9. Humanstudien	CLXXI
6. <i>Literatur</i>	<i>CLXXII</i>

Abkürzungen

ANS	8-Anilino-naphthalin-1-sulfonsäure	GST	Glutathion-S-Transferase
APC	Antigenpräsentierende Zelle, engl. antigen presenting cells	IgE	Immunglobulin E
Äpfsre	Äpfelsäure	IL	Interleukin
APS	Ammoniumsulfat	IMAC	Immobilisierter-Metallionen- Affinitätschromatographie
AS	Aminosäuren	INF	Interferon
BCIP	5-Bromo-4-chlor-3-indoxylphosphat	IPTG	Isopropyl- β -D-1- thiogalactopyranosid
BR	Braeburn	IS	internen Standard
BSA	Bovines Serumalbumin	ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
Cat	Catechin	Ka-Ar	Kaempferol-Arabinosid
CDR	Komplementaritätsbestimmende Region, engl. complementary-determining region	K _d	Dissoziationskonstante
Chisre	Chinasäure	KL	Kühllagerung
Chlsre	Chlorogensäure	LC-MS	Flüssigkeitschromatographie- Massenspektrometrie
Chlsre-Di	Chlorogensäure-Dimer	MG	Molekulargewicht
Chlsre-Glc	Chlorogensäure-Glucosid	MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex, engl. major histocompatibility complex
Citsre	Citronensäure	MST	Microscale Thermophoresis
Cu-Chsre	Cumaroyl-Chinasäure	NBT	p-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
Cu-Glc-Es	Cumarsäure-Glucose-Ester	Neochlsre	Neochlorogensäure
Cy-Hex 1	Cyanidin-Hexosid 1	OAS	orale Allergiesyndrom
Cy-Hex2	Cyanidin-Hexosid 2	OIT	orale Immuntherapie
Cy-Pen 1	Cyanidin-Pen 1	PG	Gesamtpolyphenolgehalt
Cy-Pen 2	Cyanidin-Pen 2	Phe	Phenylalanin
Cy-Pen 3	Cyanidin-Pen 3	Phl	Phloridzin
Cy-Pen 4	Cyanidin-Pen 4	Phl-2-Xy-Glc	Phloretin-2-Xylosyl-Glucosid
Cy-Pen 5	Cyanidin-Pen 5	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Cy-Pen 6	Cyanidin-Pen 6	PPO	Polyphenoloxidase
DHC	Dihydrochalcone	Procy	Procyanidin
DHF	3,4-Dihydroxyflavon	Procy B1	Procyanidin B1
Dic-Hex	Dicumaryl-Hexose	Procy B2	Procyanidin B2
DMF	Dimethylformamid	PR-Proteine	Pathogenese-assoziierte Proteine, engl. pathogenesis-related proteins
DMSO	Dimethylsulfoxid	PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
EDTA	Ethylenediamintetraessigsäure Dinatriumsalz	Qu-Ar	Quercetin-Arabinosid
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay	Qu-Gal	Quercetin-Galactosid
Epi	Epicatechin	Qu-Glu	Quercetin-Glucuronid
equ	Äquivalente, engl. equivalents	Qu-Rh	Quercetin-Rhamnosid
FBB	Fast Blue B	Qu-Ru	Quercetin-Rutinosid
FC	Folin-Ciocalteu	Qu-Xy	Quercetin-Xylosid
Fe-Glc-Es	Ferulasäure-Glucose-Ester	R	Korrelationskoeffizient
FG	Frischgewicht	RNAse-Aktivität	Ribonukleaseaktivität
GAE	Gallussäure Äquivalente, engl. gallic acid equivalents	S/N	Signal-Rausch-Verhältnis
GD	Golden Delicious	SAN	Santana
GSH	Glutathion reduziert	SAWA	kustischer Oberflächenwellensensor
GSSG	Glutathion oxidiert	SIT	spezifische Immuntherapie

Abkürzungen

SLIT	<i>sublinguale Immuntherapie</i>	TRIS	<i>Tris(hydroxymethyl)aminomethan</i>
TEMED	<i>Tetramethylethylendiamin</i>	ULO	<i>Niedrigsauerstoffbedingung, engl.</i>
Th	<i>T-Helferzelle</i>		<i>ultra low oxygen</i>
TMB	<i>3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin</i>	v.u.Z.	<i>vor unserer Zeitrechnung</i>
TNF	<i>Tumornekrosefaktor</i>	ZSD	<i>Zimtsäurederivate</i>
tr	<i>Retentionszeit</i>		

Aminosäure	Drei-Buchstaben-Code	Ein-Buchstaben-Code
<i>Alanin</i>	Ala	A
<i>Arginin</i>	Arg	R
<i>Asparagin</i>	Asn	N
<i>Asparaginsäure</i>	Asp	D
<i>Cystein</i>	Cys	C
<i>Glutamin</i>	Gln	Q
<i>Glutaminsäure</i>	Glu	E
<i>Glycin</i>	Gly	G
<i>Histidin</i>	His	H
<i>Isoleucin</i>	Ile	I
<i>Leucin</i>	Leu	L
<i>Lysin</i>	Lys	K
<i>Methionin</i>	Met	M
<i>Phenylalanin</i>	Phe	F
<i>Prolin</i>	Pro	P
<i>Serin</i>	Ser	S
<i>Threonin</i>	Thr	T
<i>Tryptophan</i>	Trp	W
<i>Tyrosin</i>	Tyr	Y
<i>Valin</i>	Val	V

Abbildungen

Abbildung 1 Weltweite Apfelproduktion 2020.....	1
Abbildung 2 Strukturbeispiele von wichtigen Polyphenolen im Apfel	5
Abbildung 3 Der Pathomechanismus der Typ I-Allergie.....	7
Abbildung 4 Strukturen von allergenen Proteinen.....	10
Abbildung 5 Epitop Klassifizierung.....	13
Abbildung 6 Dreidimensionale Strukturen von Bet v 1 (PDB-Code 1BV1) und Mal d 1 (PDB-Code 5MMU).....	21
Abbildung 7 Sequenzalignment von Bet v 1 mit PR-10 Homologen aus verschiedenen Pflanzenfamilien.....	21
Abbildung 8 SDS-PAGE und Western-Blot von rMal d 1.02	53
Abbildung 9 Mal d 1 Gehalte verschiedener Genotypen aus Selektionsstufe 1	55
Abbildung 10 Mal d 1 Gehalte verschiedener Genotypen aus Selektionsstufe 1	56
Abbildung 11 Mal d 1 Gehalte ausgewählter Genotypen der Selektionsstufe 2.....	57
Abbildung 12 Rotfleischige (links) und weißfleischige (rechts) Äpfel	58
Abbildung 13 Mal d 1 Gehalte von zehn biologischen Replikaten der Genotypen p22, p27 und p188	60
Abbildung 14 Mal d 1 Gehalte von zehn biologischen Replikaten der Genotypen p143, p124 und p34	61
Abbildung 15 Mal d 1 Gehalte von zehn biologischen Replikaten des Genotyps p160.....	62
Abbildung 16 Mal d 1 Gehalte verschiedener Genotypen während der ULO-Lagerung.	63
Abbildung 17 Entwicklung des Mal d 1 Gehaltes von Genotypen aus dem Jahr 2016 mit zunehmender Lagerung über drei Auslagerungszeitpunkte unter Kühlagerungsbedingungen	65
Abbildung 18 Ergebnisse der klinischen Studie mittels oraler Provokationstests	66
Abbildung 19 Ergebnisse der klinischen Studie mittels Provokationstests zur Ermittlung eines Schwellenwertes	67
Abbildung 20 Polyphenoloxidaseaktivität verschiedener Apfelgenotypen aus dem Erntejahr 2018 (a) und 2019 (b)	69
Abbildung 21 Gesamtpolyphenolgehalt (PG) verschiedener Apfelgenotypen aus dem Erntejahr 2018	71
Abbildung 22 Gesamtpolyphenolgehalt (PG) verschiedener Apfelgenotypen aus dem Erntejahr 2019	72
Abbildung 23 Spearman-Korrelationsanalyse zwischen dem Mal d 1 Gehalt und dem Gesamtpolyphenolgehalt mittels FC-Assay (a) und FBB-Assay (b).....	73
Abbildung 24 Heatmap der relativen Polyphenolgehalte von weißfleischigen (WF) und rotfleischigen (RF) Genotypen	75
Abbildung 25 Relative Konzentrationen der Flavan-3-ole über drei Auslagerungszeitpunkte.....	77

Abbildungen

Abbildung 26	Relative Konzentrationen der Flavonole über drei Auslagerungszeitpunkte....	78
Abbildung 27	Relative Konzentrationen der Anthocyane über drei Auslagerungszeitpunkte.....	79
Abbildung 28	Relative Konzentrationen von GSH und GSSG über drei Auslagerungszeitpunkte.....	80
Abbildung 29	Korrelations-Matrix der Metabolit-Gehalte der untersuchten Genotypen nach Spearman.....	81
Abbildung 30	Korrelationen nach Spearman zwischen den Gehalten von verschiedenen Metaboliten, sowie zwischen den Gehalten von Metabolit-Klassen und Mal d 1	84
Abbildung 31	Die Wechselwirkung des Proteins rMal d 1.02 mit verschiedenen Liganden ..	87
Abbildung 32	Die Wechselwirkung des Proteins rMal d 1.02 mit verschiedenen Liganden ..	88
Abbildung 33	Kapillarscan (links), MST-Spuren (Mitte) und Dosis-Wirkungskurven (rechts)	89
Abbildung 34	3D- (links) and 2D- (rechts) Wechselwirkungsmodell von rMal d 1.02	91
Abbildung 35	3D- (links) and 2D- (rechts) Wechselwirkungsmodell von rMal d 1.02	92
Abbildung 36	Phylogenetische Analyse von Mal d Proteinen und ihren Isoformen	94
Abbildung 37	Allgemeine Informationen zu den detektierten Peptiden mittels LC-MS/MS.....	95
Abbildung 38	Peptidpositionen innerhalb von Mal d 1 Proteinsequenzen	96
Abbildung 39	Peptidpositionen innerhalb von Mal d 2 (a), Mal d 3 (b) und Mal d 4 (c)	97
Abbildung 40	Einteilung der analysierten Genotypen gemäß ihres allergenen Potentials	98
Abbildung 41	Hierarchische Clusteranalyse aus den detektierten Peptidintensitäten der analysierten Genotypen	101
Abbildung 42	Beeswarm Boxplots der durchgeführten t-test Analysen zwischen Gruppe I- und Gruppe III-Genotypen des Erntejahres 2017	105
Abbildung 43	Beeswarm Boxplots der durchgeführten t-test Analysen zwischen Gruppe I- und Gruppe III-Genotypen des Erntejahres 2018	106
Abbildung 44	Korrelationsanalyse zwischen dem Mal d 1 Gehalt und der Peptidintensität.	115
Abbildung 45	Korrelationsanalyse zwischen dem mittleren Symptomwert aus den oralen Provokationstests und der Peptidintensität	116
Abbildung 46	PR-10 Proteine und ihre Bedeutung in der Flavonoid-/ Anthocyan-Biosynthese in Bezug auf GSH und GST.....	140
Abbildung 47	Alignment der Mal d 1.02 Isoform Q40280.3 und den detektierten unspezifischen Peptiden.....	145
Abbildung 48	Vorhergesagte Epitope der Isoform AAD29671.1 aus der Gruppe der Mal d 1.01-Proteine	150

Tabellen

Tabelle 1 Inhaltsstoffe des Apfels	3
Tabelle 2 Pollen-assoziierte Nahrungsmittelallergien.....	12
Tabelle 3 Wichtige Allergene der PR-10 Proteinfamilie	17
Tabelle 4 Chemikalien	26
Tabelle 5 Puffer und Lösungen	29
Tabelle 6 Gentechnisch veränderte Organismen.....	31
Tabelle 7 Antikörper	31
Tabelle 8 Enzyme.....	32
Tabelle 9 Verbrauchsmaterialien	32
Tabelle 10 Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) Einstellungen	33
Tabelle 11 Geräte	34
Tabelle 12 Software	35
Tabelle 13 Herstellung des SDS-PAGE-Gels	39
Tabelle 14 Auslagerungstermine (ULO-1, ULO-2, ULO-3, ULO-4) für die Lagerungsversuche unter ULO-Bedingungen.....	42
Tabelle 15 Auslagerungstermine (KL-1, KL-2, KL-3) für die Lagerungsversuche unter KL-Bedingungen.....	42
Tabelle 16 Identifizierte Metabolite mittels LC-MS.....	46
Tabelle 17 Prozentuale Sequenzhomologie von Mal d 1-4 Isoformen	93
Tabelle 18 Identifizierte Mal d Proteine in 52 Apfel-Genotypen	103
Tabelle 19 Hoch angereicherte Peptide in Gruppe III-Genotypen aus drei Erntejahren (2017, 2018, 2019)	110
Tabelle 20 Hoch angereicherte Peptide in Gruppe I-Genotypen des Erntejahres 2017.....	111
Tabelle 21 Hoch angereicherte Peptide in Gruppe I-Genotypen des Erntejahres 2018.....	112
Tabelle 22 Identifizierte Liganden von PR-10 Proteinen.....	138
Tabelle 23 Hypoallergene und hyperallergene Mal d 1 Gene, ihre allelischen Varianten und ihre zugehörigen Proteine.....	143
Tabelle 24 Analyse von wichtigen Aminosäuren für die B-Zell-Epitop Formatierung in den identifizierten Mal d 1 Isoformen.....	147

Zusammenfassung

Der Apfel (*Malus Domestica L. Borkh*) gehört zu den beliebtesten Obstsorten weltweit und ist wirtschaftlich von großer Bedeutung, die vor allem in letzter Zeit aufgrund einer steigenden Nachfrage nach nährstoffreichen Nahrungsmitteln stark zugenommen hat.

Die traditionelle Züchtung hat mehr als 7500 Apfelsorten mit einer Reihe wünschenswerter Merkmale (z.B. Nährwert, Aroma, Geschmack) hervorgebracht. Abgesehen von den positiven nutritiven Eigenschaften enthalten Äpfel auch Allergene. In Zentral- und Nordeuropa leiden viele Patienten mit einer Sensibilisierung gegen Birkenpollen nach dem Verzehr von frischen Äpfeln an einem sogenannten oralen Allergiesyndrom. Diese Art der Apfelallergie wird durch eine Kreuzreaktivität von IgE-Antikörpern gegen das Hauptbirkenpollenallergen Bet v 1 und das Apfelallergen Mal d 1 verursacht. Beide Proteine sind Pathogenese-assoziierte (PR)-10 Proteine und teilen ein hohes Maß an Homologie. Es ist bereits lange bekannt, dass die Schwere der allergischen Reaktionen nicht ausschließlich auf die individuelle Sensibilität der Patienten zurückzuführen ist, sondern viel mehr von der Apfelsorte selbst abhängig ist. Vor diesem Hintergrund wurden in dieser Arbeit die spezifischen und sensibilisierenden Einflussfaktoren untersucht, die den sortenspezifischen Grad der Allergenität bestimmen. In Langzeitstudien wurde der Mal d 1 Gehalt von Genotypen verschiedener Kreuzungspopulationen über mehrere Erntejahre quantifiziert. Die Bestimmung des Allergengehaltes erfolgte mittels indirekt kompetitiven ELISA („enzyme linked immunosorbent assay“) unter Verwendung von rekombinanten rMal d 1.02 und eines polyklonalen Antikörpers, der antigenspezifisch, jedoch nicht epitopspezifisch bindet. Für eine Vielzahl von Genotypen wurden Mal d 1 Gehalte zwischen 0,1 und 50 µg/g Frischgewicht bestimmt. Einige Genotypen wiesen über mehrere Erntejahre hinweg stabile Mal d 1 Gehalte auf und waren somit von Umweltfaktoren wenig beeinflusst, während andere Genotypen starke Mal d 1 Schwankungen zwischen verschiedenen Erntejahren zeigten.

Zudem wurden klinischen Studien mittels oraler Provokationstests in Kooperation mit dem Allergie-Centrum-Charité in Berlin durchgeführt, um verschiedene Genotypen hinsichtlich ihres allergenen Potentials zu bewerten. Dabei ergab sich keine signifikante Korrelation zwischen dem Mal d 1 Gehalt und der Verträglichkeit bei allergischen Individuen. Dieses Phänomen weist darauf hin, dass noch weitere Faktoren das allergene Potential von Apfelsorten beeinflussen.

Polyphenole sind sekundäre Pflanzenstoffe und wurden bereits mehrfach in der Vergangenheit mit einer anti-allergenen Wirkung in Verbindung gebracht. Mittels kolorimetrischer Assays

wurde der Gesamtpolyphenolgehalt von verschiedenen Genotypen bestimmt und mit dem Mal d 1 Gehalt in Relation gesetzt. Es ergaben sich signifikant positive Korrelationen mit Korrelationskoeffizienten (R) von 0,72 und 0,76. Das Polyphenol-Profil ausgewählter Genotypen wurde mittels Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) analysiert. Dabei konnte eine signifikant positive Korrelation (R= 0,51) zwischen der relativen Konzentration der Flavonole und dem Mal d 1 Gehalt identifiziert werden.

Weiterhin wurde auch das Liganden-Bindungsverhalten von dem rekombinanten Protein rMal d 1.02 untersucht, da die Bildung von Protein-Liganden-Komplexen zu einer möglichen Modulation der Allergenität führen können. Mal d 1 besitzt eine für PR-10 Proteine typische Sekundärstruktur mit einem großen hydrophoben Hohlraum, in welchem verschiedene Liganden gebunden werden können. In dieser Arbeit konnte rekombinantes rMal d 1.02 im Komplex mit den Liganden Glutathion (GSH), oxidiertem Glutathion (GSSG), (+)-Catechin und Quercetin-3-rhamnosid mittels Microscale Thermophoresis identifiziert werden. Dabei wurden Bindungsaffinitäten im niedrigen mikromolaren Bereich mit Dissoziationskonstanten von 35,79 μM für GSH, 0,157 μM für GSSG, 16,39 μM für (+)-Catechin und 29,51 μM für Quercetin-3-rhamnosid ermittelt. Molekulare Dockingexperimente zeigten, dass die Liganden (+)-Catechin und Quercetin-3-rhamnosid im Inneren des hydrophoben Hohlraums durch hydrophobe und polare Wechselwirkungen stabilisiert wurden, während für die GSH- und GSSG-rMal d 1.02-Komplexe hydrophile Interaktionen und van der Waals Kräfte entscheidend sind. Die identifizierten Komplexe mit rMal d 1.02 wiesen auf eine mögliche Transportfunktion des Proteins im Flavanoid-Biosyntheseweg hin. Zudem könnten die GSH/GSSG-Protein-Komplexe wichtige Co-Transporter bei der Glutathion-S-transferase abhängigen Anthocyan-Akkumulation in der Vakuole darstellen.

Bei Mal d 1 handelt es sich um eine große Proteinfamilie. Das Vorkommen von spezifischen Mal d 1-Isoformen kann das allergene Potential von Apfel-Genotypen beeinflussen. Mittels Bottom-up Proteomik-Analysen wurde die Isoformzusammensetzung von 52 Apfel-Genotypen untersucht. Die Ergebnisse zeigen Unterschiede in der Peptid-/Isoformzusammensetzung. Insgesamt wurden 21 Mal d 1 Isoformen mit Hilfe von spezifischen Peptiden eindeutig identifiziert. Ein Vergleich von Genotypen mit einem niedrigen und hohen allergenen Potential ergab, dass spezifische Peptide der Isoformgruppe Mal d 1.11 stärker in gut verträglichen Genotypen angereichert wurden. Für Mal d 1.08 wurden zahlreiche signifikant negative Korrelationen mit dem mittleren Symptomwert aus den in-vivo Daten identifiziert. Dagegen waren die spezifischen Peptide der Mal d 1.03 Isoformen AAX21002.1 und AAX21008.1 hauptsächlich in allergenen Genotypen angereichert. Weiterhin konnten T-Zell und B-Zell

Eigenschaften für Peptide der Isoformgruppe Mal d 1.01 postuliert werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen ein umfassendes Genotyp-spezifisches von Mal d 1 abgeleitetes Peptidspektrum. Die detektierten Peptide besitzen möglicherweise unterschiedliche IgE-Bindungseigenschaften und könnten daher als potenzielle molekulare Marker für die allergologische Bewertung von Apfelsorten dienen. Diese Ergebnisse können außerdem für die Züchtung von hypoallergenen Apfelsorten hoher Qualität wichtig sein, die mit einer Erhöhung der Verbrauchersicherheit einhergehen würden.

Summary

The apple (*Malus Domestica L. Borkh*) is one of the favourite fruits worldwide and it holds strong economic importance, which has recently increased as a consequence of rising demand for nutrient-rich foods. Traditional breeding programs have produced more than 7,500 apple varieties with desirable characteristics (e.g. nutritional value, flavour, pleasant taste). Aside from nutrition properties, several allergenic proteins have been identified in apples. In Central and Northern Europe, many patients with birch tree pollen sensitisation also suffer from oral allergy syndrome after the consumption of fresh apples. This type of apple allergy is caused by cross-reactive IgE antibody responses against the main birch pollen allergen Bet v 1 and the apple allergen Mal d 1. Both proteins are so-called pathogenesis-related (PR)-10 proteins and they share a high degree of sequence homology. It is known that the severity of allergic reactions is not only dependent on the sensitivity of susceptible individuals but also the apple variety itself. In this context, the specific and sensitising critical factors influencing the variety-specific degree of allergenicity have been investigated.

In long-term studies, the Mal d 1 content of various genotypes has been analysed over several harvest years. The allergen content was determined using an indirect competitive ELISA (“enzyme linked immunosorbent assay”), recombinant rMal d 1.02 and a polyclonal antibody with an affinity for the same antigen but different epitopes. In most genotypes of different crossbreeding populations, Mal d 1 levels ranged between 0.1 and 50 µg/g fresh weight. Several genotypes showed stable Mal d 1 contents over several harvest years, thus being unaffected by environmental changes, whereas other genotypes showed high fluctuations between different harvest years. In addition, clinical studies using oral provocation tests have been carried out in cooperation with the Allergie-Centrum-Charité in Berlin to investigate the allergenic potential of different apple genotypes. No significant correlation was found between the Mal d 1 content and the tolerability of allergic individuals. Consequently, the Mal d 1 concentration alone cannot fully define the allergenicity of apple varieties, thus indicating that other factors must be involved.

Polyphenols are secondary plant metabolites and they have been frequently associated with anti-allergenic properties. The total polyphenol content of different genotypes was determined using colorimetric assays. The correlation of polyphenol concentrations and Mal d 1 contents revealed significant positive correlations with correlation coefficients (R) of 0.72 and 0.76. Furthermore, the polyphenol profile was analysed for several genotypes using liquid

chromatography-mass spectrometry (LC-MS). A significantly positive correlation ($R = 0.51$) between the relative concentration of the flavonols and the Mal d 1 content was identified.

Additionally, the ligand binding behaviour of the recombinant protein rMal d 1.02 was investigated using Microscale Thermophoresis. The binding of ligands could modulate the allergenicity of the protein. Mal d 1 adopt a typical PR-10 fold, forming a large hydrophobic cavity capable of binding various ligands. In this study, the binding of several ligands such as glutathione (GSH), oxidised glutathione (GSSG), (+)-catechin and quercetin-3-rhamnoside to rMal d 1.02 was detected. Binding affinities in the low micromolar range with dissociation constants of 35.79 μM , 0.157 μM , 16.39 μM and 29.51 μM were determined for GSH, GSSG, (+)-catechin and quercetin-3-rhamnoside, respectively. Molecular docking of each compound to rMal d 1.02 showed that (+)-catechin and quercetin-3-rhamnoside were mostly stabilised by hydrophobic and polar interactions, while the GSH/GSSG-rMal d 1.02 complex was associated with hydrophilic interactions and van der Waals forces. The identified complexes with rMal d 1.02 indicate a possible transport function of the protein in the flavanoid biosynthetic pathway. In addition, the GSH/GSSG protein complexes can represent important co-transporters in the glutathione-S-transferase-dependent anthocyanin accumulation in the vacuole.

Mal d 1 is a large protein family that comes in a variety of isoforms. The presence of specific Mal d 1 isoforms can influence the allergenic potential of apple genotypes. The isoform composition of 52 apple genotypes was analysed using bottom-up proteomics. Twenty-one Mal d 1 isoforms were identified by specific peptides. A comparison of low and high allergenic genotypes showed high expression levels of specific peptides of the isoform group Mal d 1.11 in well-tolerated genotypes. Additionally, numerous significant negative correlations between the mean symptom score obtained by oral provocation tests and peptides related to Mal d 1.08 were identified. The specific peptides of the Mal d 1.03 isoforms AAX21002.1 and AAX21008.1 showed higher abundancies in allergenic genotypes. Moreover, Mal d 1.01 peptides with T-cell- and B-cell-epitope properties have been postulated. This study represents a comprehensive detection of allergen isoforms and provides genotype-specific peptide/isoform profiles. The detected peptides may have different IgE binding properties and are potentially molecular markers for assessing allergenicity in various apple varieties. They may also be important breeding hypoallergenic apple cultivars of high quality, thus increasing the safety of allergic consumers.

1. Einleitung

1.1. Der Kulturapfel

Der Kulturapfel (*Malus x domestica* Borkh) ist eine Sammelbalgfrucht aus der Familie der *Rosaceae*. Diese Familie umfasst viele der am häufigsten konsumierten Früchte der nördlichen Hemisphäre wie Birne (*Pyrus communis*), Erdbeere (*Fragaria ananassa*) und die Steinfrüchte Pfirsich (*Prunus persica*), Aprikose (*Prunus armeniaca*), Pflaume (*Prunus domestica*) und Kirsche (*Prunus avium*) (Dirlewanger et al. 2002; Arumuganathan und Earle 1991). Zu der Gattung *Malus* gehören zwischen 25 und 55 Arten, wobei die bekannteste Art der Kulturapfel *Malus x domestica* darstellt. *Malus x domestica* gehört zur Unterfamilie Spiraeoideae, Stamm Pyreae, Subtribus Pyrinae. Der haploide Chromosomensatz der Pyreae besteht aus 17 Chromosomen (Chevreau et al. 1985). Der Kulturapfel wird in den gemäßigten Klimazonen auf der ganzen Welt kultiviert, sowohl in kälteren Regionen wie etwa Sibirien und Nordchina als auch in sehr warmen Gebieten wie Kolumbien und Indonesien. Nach Bananen und Melonen, ist der Apfel die beliebteste Frucht weltweit (FAOSTAT, www.faostat.fao.org). Die Weltproduktion von Äpfeln betrug im Jahr 2020 rund 86 Millionen Tonnen, wobei der größte Apfelproduzent China war, gefolgt von USA, Türkei und Polen (Abbildung 1).

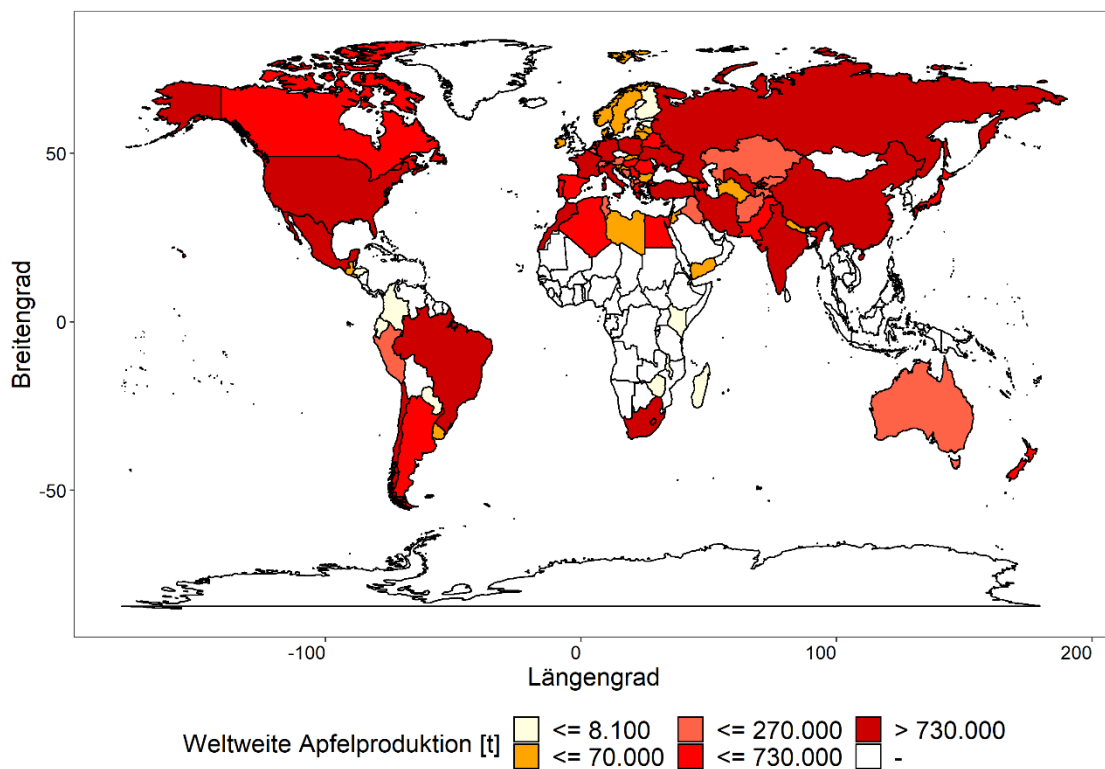


Abbildung 1 Weltweite Apfelproduktion 2020 [t] (FAOSTAT, www.faostat.fao.org).

Vermutlich wurde der Kulturapfel von Römern und Griechen entlang der Seidenstraße nach Süd- und Osteuropa und Nordafrika gebracht. An einer dieser Handelswege liegt die Region Tian Shan in der Nähe von Almaty (früher: Alma-Ata, übersetzt: „Vater der Äpfel“) in Kasachstan. Dort ist das Zentrum der genetischen Diversität und der Ursprung des Kulturapfels (Janick 1996). Die ersten validen Beweise für den Apfelanbau in Anatolien und Mesopotamien stammen aus dem zweiten Jahrtausend vor unserer Zeitrechnung (v.u.Z.) (Luby 2003). Die Entdeckung der vegetativen Vermehrung durch Pfropfen vor 3800 Jahren erleichterte den Apfelanbau erheblich, da er die Erhaltung und Verteilung einer bestimmten Sorte ermöglichte (Harris et al. 2002). Seit dem 16. Jahrhundert werden Zwergwurzelstöcke zur Kontrolle der Baumhöhe verwendet (Pereira-Lorenzo et al. 2009). Die ersten gezielten Kreuzungen wurden 1806 von Thomas Knight durchgeführt (Kellerhals 2009; Janick 1996). Seitdem haben Züchter nach Sorten mit verbesserter Fruchtqualität und Lagerfähigkeit sowie einer erhöhten Resistenz gegen Schädlinge und Krankheiten gesucht, die zu geringeren Arbeits- und Energiekosten hergestellt werden könnten. Heute sind mehr als 20.000 unterschiedliche Apfelsorten bekannt. Nur wenige von ihnen haben jedoch wirtschaftliche Bedeutung erlangt. Die Sorten „Golden Delicious“ (GD), „Idared“ und „Jonagold“ machen derzeit 35 % der europäischen Produktion aus (<https://ec.europa.eu/eurostat>). Bei einigen Sorten wie „Golden Delicious“, „Granny Smith“ oder „Braeburn“ (BR) handelt es sich um Zufallssämlinge, die nicht aus kontrollierten Kreuzungen stammen (Janick 1996). Die Apfelmucht wird durch die lange Jugendphase von Apfelbäumen, die zwischen 3 und 10 Jahren abhängig vom Genotyp und den Anbaupraktiken beträgt, und in der keine Nachkommen produziert werden können, beeinträchtigt (Janick 1996; Hemmat et al. 1994). Außerdem wird die Einführung eines bestimmten Merkmals in einen stabilen genetischen Hintergrund durch Selbstinkompatibilität, die eine Rückkreuzung behindert (Hegedüs 2006; Halász et al. 2006) und durch ein hohes Maß an Heterozygotie erschwert (Pereira-Lorenzo et al. 2009; Velasco et al. 2010). Daher kann sich die Produktion einer marktfähigen neuen Apfelsorte über mehrere Jahre erstrecken (Schouten et al. 2006).

1.2. Gesundheitliche Bedeutung des Apfels

Im Allgemeinen ist der Apfel von besonderer ernährungsphysiologischer Bedeutung, da er viele essenzielle Nährstoffe wie Vitamine, Mineralstoffe, Kohlenhydrate, Ballaststoffe und Antioxidantien liefert (Tabelle 1) (United States Department of Agriculture 2019). Der Nährwert des Apfels wird durch verschiedene Zucker, wie etwa Mono- und Disacchariden und größeren Mengen des Zuckeralkohols Sorbitol bestimmt (Aprea et al. 2017).

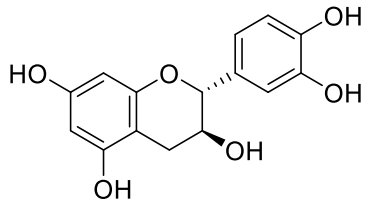
Tabelle 1 Inhaltsstoffe des Apfels (United States Department of Agriculture 2019).

Inhaltsstoffe	Apfel (pro 100 g)
Wasser	85,6 g
Protein	0,26 g
Lipide	0,17 g
Kohlenhydrate	13,8 g
Ballaststoffe	2,4 g
Kalium	107 mg
Phosphor	11 mg
Calcium	6 mg
Magnesium	5 mg
Vitamin A	3 RE*
Vitamin B ₁	0,02 mg
Vitamin B ₂	0,03 mg
Vitamin B ₃	0,09 mg
Vitamin B ₅	0,06 mg
Vitamin B ₆	0,04 mg
Vitamin B ₉	3 µg
Vitamin C	4,6 mg
Vitamin E	0,18 g
Vitamin K	2,2 µg

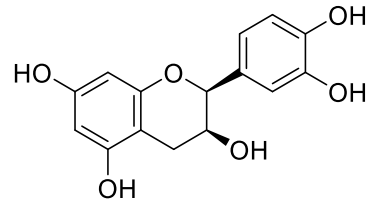
*RE: Retinol Äquivalente

In einer Vielzahl epidemiologischer Studien konnten positive Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit und das Wohlbefinden durch einen regelmäßigen Obstkonsum dargelegt werden. Einige Studien zeigten, dass der Verzehr von Äpfeln mit einem verringerten Risiko von Krebs, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Schlaganfall und andere chronische Krankheiten verbunden ist (Kader 2002; Gerhauser 2008; van Breda und Kok 2018; Bondonno et al. 2018). So konnte beispielsweise Knekt et al. (2002) zeigen, dass der Verzehr von Äpfeln eine Abnahme der Mortalität von koronaren Herzkrankheiten bewirkt. Bondonno et al. (2018) berichteten ebenfalls, dass ein erhöhter Apfelkonsum das Risiko von Herzkrankheiten

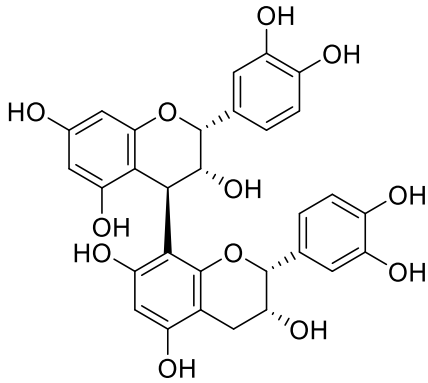
verringert. In der Studie von Gallus et al. (2005) wurde für Probanden, die einen Apfel oder mehr pro Tag verzehrten, ein deutlich verringertes Risiko von Krebserkrankungen der Mundhöhle, des Pharynx, der Speiseröhre, des Kolorektums, des Kehlkopfes, der Brust, des Eierstocks und der Prostata nachgewiesen im Vergleich zu Probanden, die weniger als einen Apfel pro Tag konsumierten. Jedrychowski et al. (2009) zeigten ebenfalls ein signifikant verringertes Risiko für Darmkrebs nach einem täglichen Verzehr von Äpfeln. Die natürliche Hemmung der Tumorzellproliferation kann vor allem auf die hohen Gehalte verschiedener polyphenolischer Inhaltsstoffe, und das damit einhergehende antioxidative Potential, zurückgeführt werden (Eberhardt et al. 2000; Scalzo et al. 2005; van Breda und Kok 2018). Polyphenole sind sekundäre Pflanzenstoffe. Im Apfel beträgt der Gesamtpolyphenolgehalt zwischen 0,1 und 1% des Frischgewichtes (FG) (Li et al. 2021; Lachman et al. 2006). Mit etwa 22 % trägt der Apfel wesentlich zur Aufnahme von Polyphenolen über Früchte bei (Vinson et al. 2001). Einige der wichtigsten aus Apfel isolierten und identifizierten phenolischen Verbindungen sind Chlorogensäure, Hydroxyzimtsäuren, Epicatechin, Catechin, Gallaocatechin, Procyanidin, Phloretin-Glukosid, Quercetin-Glykoside und Dihydrochalkon-Glykoside (Abbildung 2) (Treutter 2010, 2001). Die genannten Polyphenole verteilen sich auf die unterschiedlichen Kompartimente der Frucht. Während in der Schale und im Fruchtfleisch sowohl Catechine, Phloridizin als auch Procyanidine gleichermaßen nachgewiesen werden konnten, befinden sich im Fruchtfleisch bevorzugt die Phenylpropansäuren, in der Schale die Quercetinderivate und in den Kernen die Dihydrochalkone (Wojdyło et al. 2008; Guyot et al. 1998; McGhie et al. 2005). Durchschnittlich befinden sich 46 % der Polyphenole in der Schale des Apfels, wobei wiederum der Flavanolgehalt im Fruchtfleisch höher ist als in der Schale (McGhie et al. 2005).



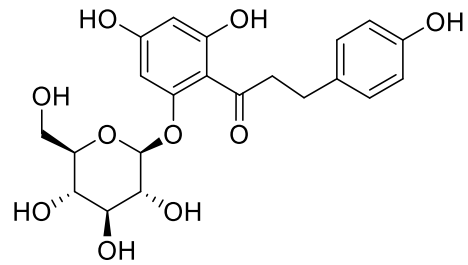
(+) - Catechin (Flavan-3-ol)



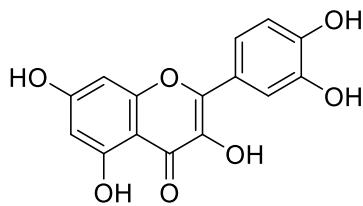
(-) - Epicatechin (Flavan-3-ol)



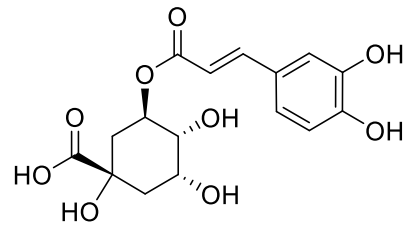
Procyanidin B2 (Flavan-3-ol)



Phloridzin (Dihydrochalcon)



Quercetin (Flavonol)



Chlorogensäure (Zimtsäurederivat)

Abbildung 2 Strukturbeispiele von wichtigen Polyphenolen im Apfel. Strukturen wurden mit Hilfe von ChemDraw (2.1.11) erstellt.

1.3. Pollen- und Nahrungsmittelallergien

1.3.1. Geschichtlicher Hintergrund zu Allergien

Das Auftreten von Allergien wird oft als Phänomen der Neuzeit angesehen. Doch tatsächlich reichen die historischen Dokumentationen allergischer Reaktionen bis in die Zeit v.u.Z. zurück. Hippokrates, ein griechischer Arzt, beschreibt im 5. Jahrhundert v.u.Z., einen Zusammenhang zwischen dem Konsum von Käse und einer allergischen Reaktion. Auch der römische Philosoph und Dichter Lukrez hatte bereits im ersten Jahrhundert v.u.Z. erkannt: „Was des einen Menschen Nahrung ist, ist des anderen übles Gift“ (Ring 2014). Überlieferungen aus dem alten Persien dokumentieren einen sogenannten Rosenschnupfen, der vermutlich eine Pollenallergie war und sich bei vielen Menschen im Frühjahr zeigte. Eine weitere Nahrungsmittelallergie wurde im 15. Jahrhundert unserer Zeitrechnung aus der Regierungszeit Richards des Dritten beschrieben. Der englische König nutzte die Symptome einer durch Erdbeeren ausgelösten Allergie, um sein Gegenüber eines versuchten Giftmordes zu bezichtigen und den vermeintlichen Täter hinrichten zu lassen (Wüthrich 2014). Die tatsächliche Ursache von allergischen Reaktionen konnte erst im 19. Jahrhundert unserer Zeitrechnung durch Charles Harrison Blackley aufgeklärt werden. Blackley selbst litt unter einer sogenannten Sommererkältung, die von Symptomen wie Niesen, tränenden Augen und einer laufenden Nase begleitet wurde. Durch Selbstversuche gelang es Blackley nachzuweisen, dass Pollen die Symptome eines Heuschnupfens auslösen können (Wüthrich 2014). Anfang des 20. Jahrhunderts unserer Zeitrechnung stellte der Wiener Kinderarzt Clemens von Pirquet fest, dass das Verabreichen von tierischem Antiserum gegen Pocken zu einer Sensibilisierung und einer akuten Immunantwort mit teilweise schweren Folgen führte. Pirquet erkannte, dass diese Reaktion auf die Bildung von Antikörpern gegen die im Serum enthaltenen Antigene hervorgerufen wird (Shulman 2017). Pirquet führte daraufhin den Begriff „Allergie“ (griechisch allos = anders, fremd, ergon = Arbeit) ein, um die Antigen-Antikörper-Reaktion zu beschreiben (Pirquet 2006). In den darauffolgenden Jahren entwickelte sich das Fachgebiet der Allergologie zu einer anerkannten medizinischen Fachrichtung und zu einem wichtigen Forschungsgebiet.

1.3.2. Pathomechanismus der Allergie

Der Definition nach bezeichnet eine Allergie eine Überempfindlichkeitsreaktion des Immunsystems auf exogene, normalerweise harmlose Substanzen (Galli et al. 2008). Bei diesen allergieauslösenden Antigenen handelt es sich um Allergene, die durch Nahrungsaufnahme, Inhalation oder durch die Magen- oder Mundschleimhaut in das Immunsystem gelangen können. In der Regel sind Allergene Proteine, Glykoproteine oder Peptide, welche beispielsweise aus Pollen von Gräsern und Bäumen, sowie aus Lebensmitteln (Erdnüsse, Walnüsse, Schellfische, Fische, Kuhmilch, Hühnerei, Soja und Weizen) stammen können (Singh und Bhalla 2008). Allergische Symptome treten gehäuft in atopischen Individuen auf, die durch ihre genetische Prädisposition eine IgE-vermittelte Sensibilisierung entwickeln (Johansson et al. 2004). Nahrungsmittelallergien, aber auch Pollenallergien können dem Mechanismus einer Typ-I-Allergie folgen, die zu einer sofortigen, IgE-gesteuerten Immunantwort führt (Abbildung 3) (Singh und Bhalla 2008; Mygind et al. 2000).

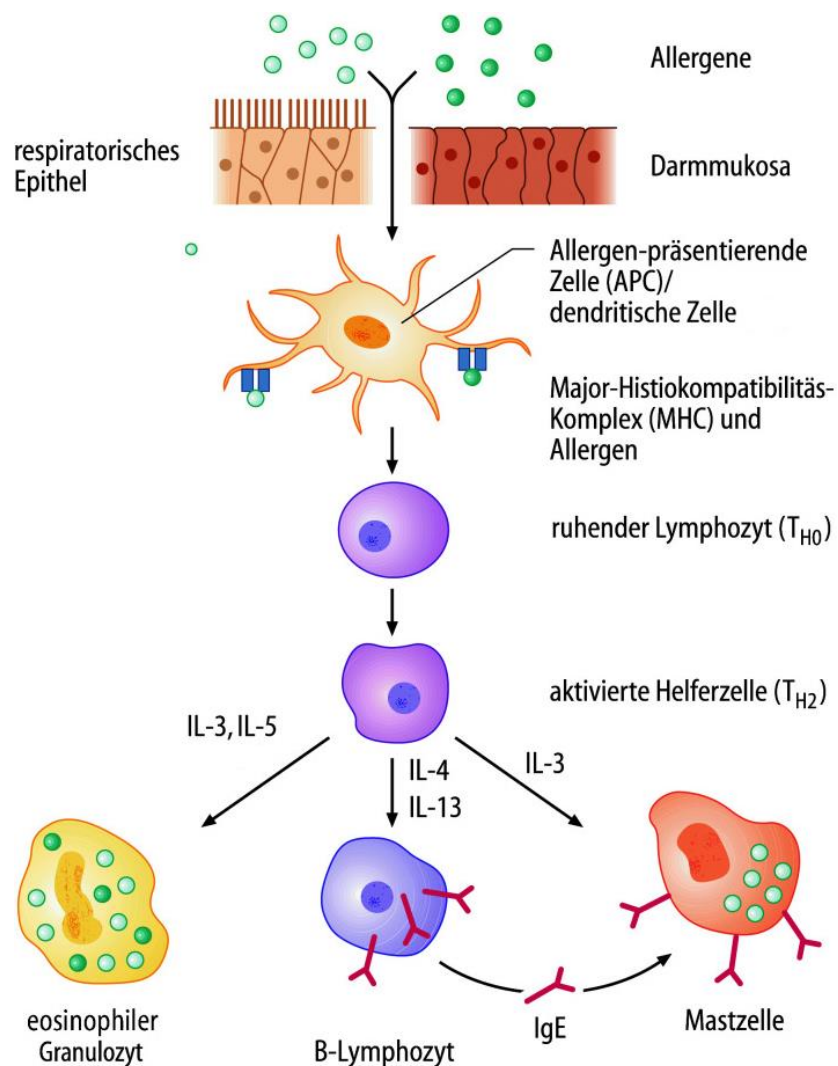


Abbildung 3 Der Pathomechanismus der Typ I-Allergie (modifiziert nach Urbanek und Nemat 2019).

Die Entwicklung von Typ-I-Allergien kann in zwei Phasen unterteilt werden. In der Sensibilisierungsphase wird das Individuum einem Allergen ausgesetzt, welches über dendritische Zellen der Epithelien in den Körper gelangt. Das Auftreten von klinischen Symptomen bleibt jedoch aus. Die Allergene werden von den lokalen antigenpräsentierenden Zellen (APC) aufgenommen und in Peptide gespalten. APCs sind Makrophagen, B-Zellen oder dendritische Zellen, die Peptide des prozessierten Allergens auf ihrer Oberfläche den T-Helferzellen (Th) 2 mit Hilfe von Klasse-II-Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) präsentieren (Chehade und Mayer 2005). Naive, nicht-aktivierte CD4⁺ Th, die im peripheren Blut und in stark durchbluteten peripheren Geweben zirkulieren, können über einen geeigneten T-Zell-Rezeptor an MHC-Klasse-II-Peptid-Komplexe binden, was über eine Signalkaskade zur Proliferation von nativen spezifischen T-Lymphozyten und zur Freisetzung von Zytokinen (Interleukin (IL)-4, IL-13, IL-5) führt (Murphy und Weaver 2018b). Dadurch werden die B-Zellen dazu stimuliert, allergenspezifische Immunoglobulin E (IgE)-Antikörper zu produzieren, welche sich an Mastzellenrezeptoren heften.

Je nach induzierten Zytokinmilieu wird eine Th1- oder Th2-gesteuerte Immunantwort induziert (Bufe 2003). Zu den TH1-Zytokinen gehören Interferon (INF) -gamma, IL-2, IL-12 und Tumornekrosefaktor (TNF)- β , während Th2-Zellen die Zytokine IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 freisetzen. Das Zytokin IL-4 nimmt eine Schlüsselrolle bei der Produktion von IgE ein, indem es die Umwandlung zu diesem Isotyp stimuliert. Erkennt eine B-Zelle mit ihrem B-Zellrezeptor ihr spezifisches Allergen, präsentiert sie es auf ihrer Zelloberfläche (Murphy und Weaver 2018b). Die B-Zellen können mit aktivierten Th2-Zellen über CD40-Ligand-CD40- bzw. CD28-CD80-Wechselwirkungen interagieren, was eine effiziente B-Zell-Stimulation bewirkt und damit eine Umwandlung von B-Zellen zu antikörpersekretierenden Plasmazellen induziert (Chehade und Mayer 2005; Poulsen und Hummelshoj 2007). Im Vergleich zu Th2-assoziierten Immunantwort bewirkt eine Th1-gesteuerte Immunantwort die IgE-Synthese. Die IgE-Antikörper binden an den hochaffinen Rezeptor für IgE (Fc ϵ RI) auf der Oberfläche von Mastzellen und Basophilen (Granulozyten) (Prussin und Metcalfe 2006). In der Effektorphase, führt ein erneuter Kontakt mit dem Allergen zu einer allergischen Reaktion (Hessel et al. 2005). Es kommt zur Bildung von Allergen-induzierten IgE-Rezeptorkomplexen. Weist das Allergen mindestens zwei verschiedene Antikörperbindungsstellen auf, tritt eine Quervernetzung von zwei rezeptorgebundenen IgE-Antikörpern über ein Allergen auf. Die IgE-Vernetzung führt zur Mastzell-Degranulation und dem Austreten von Entzündungsmediatoren wie Histamin, Leucotrien oder Prostaglandin D₂ (Singh und Bhalla 2008). Diese Substanzen sind für die

allergische Inflammation und dem Auftreten von klinisch relevanten allergischen Symptomen verantwortlich. Histamin verursacht eine Erweiterung der Blutgefäße und somit eine Senkung des Blutdrucks oder eine Kontraktion der glatten Muskulatur (Ashina et al. 2015; Simons 2004). Dies kann zu lokalen Entzündungen wie Schwellungen der Schleimhäute in Mund, Nase, Hals und Rachen, Magen-Darm-Beschwerden und manchmal auch zu schweren Reaktionen wie Anaphylaxie führen (Ausukua et al. 2009).

1.3.3. Klassifizierung von Allergenen

1986 wurde von der World Health Organisation eine allgemeingültige Allergennomenklatur, eingeführt, die über die Herkunft und den taxonomischen Namen des Allergens informiert (Marsh et al. 1986). Danach werden Allergene mit den ersten drei Buchstaben des Genus (Gattung), gefolgt von dem ersten Buchstaben der Spezies und einer chronologischen Nummer gemäß der Reihenfolge ihrer Charakterisierung bezeichnet (Chapman et al. 2007; Marsh et al. 1986). Allergene können pflanzlichen und tierischen Ursprungs sein, sind meist wasserlöslich und besitzen Molekulargewichte zwischen 10 und 70 kDa (Puc 2003). Je nach Applikationsweg unterscheidet man zwischen inhalativen Allergenen (z.B. Gräser-, Baum-, Getreidepollen), nutritiven Allergenen (z.B. Kuhmilch, Fisch, Erdnüsse) und parenteralen Allergenen (z.B. Insektengifte, Antibiotika) (Speer und Gahr 2009). Einige der Allergene sind hochallergen und werden als Majorallergene bezeichnet, wenn in mehr als 50 % der getesteten Patienten mit einer spezifischen Nahrungsmittelallergie eine IgE Sensibilisierung hervorgerufen wird. Bei weniger als 50 % Sensibilisierungsrate spricht man entsprechend von Minorallergenen (Jäger und Wüthrich 2002). Proteine können mit Sequenzhomologien von mindestens 30% zu Proteinfamilien oder basierend auf ihrer Funktion und strukturellen Eigenschaften auf molekularer Ebene in Superfamilien eingeteilt werden (Breiteneder und Radauer 2004). In der Datenbank „Structural Classification of Proteins Database“ (SCOP) (<https://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk>) sind über 5000 Proteinfamilien und über 2000 Superfamilien aufgeführt. Nahrungsmittelallergene sind nur in einigen wenigen dieser Gruppen zu finden. Beispiele für Proteinfamilien und Superfamilien von tierischen Allergenen sind die Parvalbumine des Fisches und die Tropomyosine verschiedener Meeres- und Weichtiere. Fast 60% aller pflanzlichen Nahrungsmittelallergene gehören zu einer von vier Protein-Superfamilien. Zu diesen Familien gehört die Prolamin-Superfamilie, die Cupin-Superfamilie, die Profiline und die Bet v 1-Superfamilie (Radauer und Breiteneder 2007). Die Vertreter der Profiline und Bet v 1-Superfamilie sind wesentlich bei Pollenassozierten Nahrungsmittelallergien. Die Prolamin-Superfamilie umfasst Speicherproteine von Getreide, Protease-Inhibitoren, 2S-Albumine und

nicht spezifische Lipidtransferproteine. Zu der Cupin-Superfamilie gehören zum Beispiel die Viciline und die Legumine (Radauer und Breiteneder 2007). Bet v 1 verwandte Proteine, Profilin und Cupine zeichnen sich durch α -helikale Strukturen und β -Faltblättern aus (Abbildung 4 a, b) (Neudecker et al. 2001; Fedorov et al. 1997). Die Mitglieder der Prolamin-Familie bilden reine α -helikale Strukturen aus, während das Graspollenallergen Phl p 3 aus der Familie der Expansine aus einer reinen β -Faltblattstruktur besteht (Abbildung 4 c, d) (Schweimer et al. 2008).

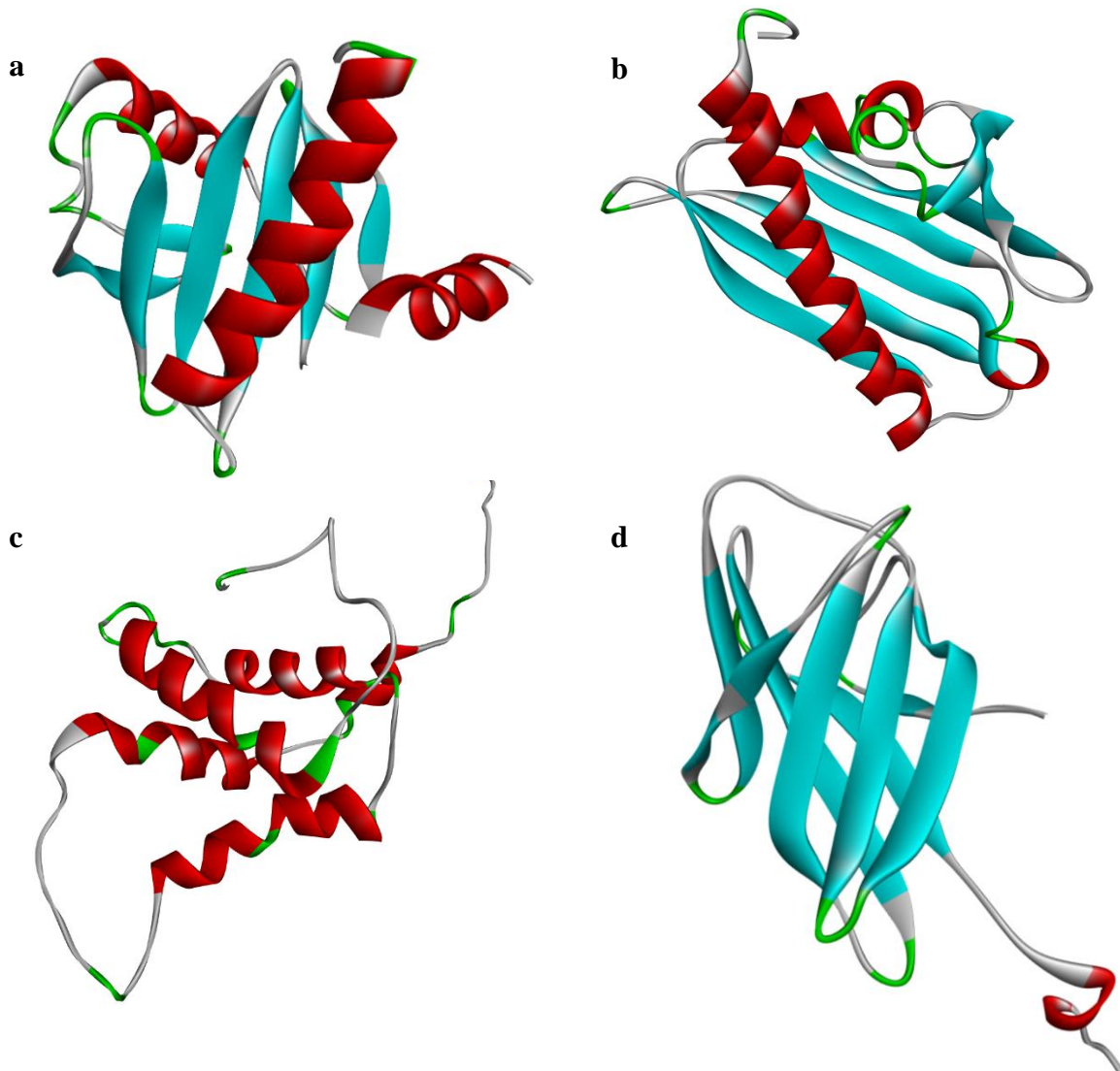


Abbildung 4 Strukturen von allergenen Proteinen. Profilin: Bet v 2 (PDB-Code: 1CQA) (a), Bet v 1-Familie: Pru av 1 (PDB-Code: 1E09) (b), Prolamin: Ara h 6 (PDB-Code: 1W2Q) (c), Expansin: Phl p 3 (PDB-Code: 2JNZ) (d).

1.3.4. Kreuzallergie

Es kann zwischen IgE vermittelten Typ-I- und Typ-II-Allergien differenziert werden. Bei Soforttyp-Reaktionen vom Typ I kommt es bei Erstkontakt zu einer Sensibilisierung gegenüber einem Allergen mit Bildung von IgE Antikörpern. Diese Form von Allergie tritt bevorzugt bei kleinen Kindern auf. Eine Nahrungsmittelallergie des Typs II kommt hauptsächlich bei erwachsenen Patienten vor und ist eine Folge immunologischer Kreuzreaktivitäten von Inhalationsallergenen (Breiteneder und Ebner 2000). Hauptauslöser sind konservierte Proteinfamilien in Pollen von Bäumen, Gräsern und Unkraut, als auch in Früchten. Die zugrundeliegende molekulare Ursache für eine pollenassoziierte Nahrungsmittelallergie ist in der Kreuzaktivität von IgE-Antikörpern gegen Pollenallergene und strukturellen homologen Proteinen in verschiedenen Nahrungsmitteln zu finden (Kazemi-Shirazi et al. 2000). Hierbei sind Kreuzreaktionen von Birkenpollen mit zahlreichen Früchten, sowie von Gras- oder Ragweedpollen mit Früchten, verschiedene Gemüsearten und Nüssen zu nennen (Vieths et al. 2002). Bei Nahrungsmittelallergien im Zusammenhang mit Birkenpollen tritt eine Kreuzreaktivität zwischen IgE gegen das Hauptallergen der Birkenpollen (Bet v 1) und der strukturell homologen Nahrungsmittelallergenen aus verschiedenen Früchten, Nüssen wie Erdnuss oder Haselnuss, Hülsenfrüchten und Gemüse auf (Tabelle 2) (Breiteneder und Mills 2006; Ausukua et al. 2009). Bet v 1 und Bet v 1-verwandte Nahrungsmittelallergene zeigen ähnliche IgE-Bindungsregionen (Epitope) auf ihrer molekularen Oberfläche, die Antikörperkruzreaktionen verursachen. In Deutschland sind über 12 Millionen Menschen (nach Selbsteinschätzung) von einer Pollenallergie betroffen. 80 % aller Birkenpollenallergiker sind gegen verschiedene Nahrungsmittel sensibilisiert und bei 60 % der Betroffenen kam es zu einer entsprechenden Manifestation der Nahrungsmittelallergie (Klimek et al. 2019). Patienten mit einer pollen-assoziierten Nahrungsmittelallergie können nach dem Verzehr von pflanzlichen Lebensmitteln unterschiedliche allergische Symptome aufweisen. Der bekannteste Vertreter lokalisierter allergischer Reaktionen auf Lebensmitteln ist das „orale Allergiesyndrom“ (OAS). Häufig treten nur schwache Reaktionen auf, wie lokaler Juckreiz, Kribbeln und Schwellungen der Zunge oder der Lippen. Die Symptome beschränken sich auf den Mund- und Rachenraum, da die Epitope gegenüber der Magen-Darm-Passage labil sind. Gelegentlich kann es auch zu schweren Symptomen wie Anaphylaxie, Asthma und Urtikaria kommen (Kondo und Urisu 2009; van Ree 2002; Ausukua et al. 2009).

Einleitung

Tabelle 2 Pollen-assoziierte Nahrungsmittelallergien (modifiziert nach Ausukua et al. (2009) und Mastrorilli et al. (2019)).

Pollen	Früchte	Gemüse	Nüsse
Birkenpollen	Kirsche, Aprikose, Pfirsich, Nektarine, Apfel, Birne, Kiwi, Banane, Mango, Ananas	Sellerie, Karotte, Tomaten, Pastinake, Petersilie, Dill, Kreuzkümmel, Koriander, Fenchel, Kartoffel, Pfeffer (grün), Linsen, Erbsen, Bohnen, Erdnüsse	Haselnuss, Walnuss, Mandel
Gräserpollen	Wassermelone, Orange, Kiwi	Tomaten, Kartoffel, Erdnüsse	
Beifußpollen	Mango, Kiwi, Pfirsich, Litschi	Sellerie, Karotte, Fenchel, Knoblauch, Koriander, Brokkoli, Kreuzkümmel, Kohl, Erdnüsse	
Traubenkrautpollen	Banane, Wassermelone	Kürbis, Gurke, Zucchini	
Wermutpollen	Apfel, Wassermelone	Sellerie, Karotte	

1.3.5. Apfelallergie und -allergene

Die Apfelallergie ist eine IgE-vermittelte, meist birkenpollenassoziierte und oropharyngeale Kreuzreaktion mit einer hohen Prävalenz in Europa. In Deutschland beträgt die Punktprävalenz der Birkenpollenallergiker unter Erwachsenen 17 % und der Apfelallergiker unter Erwachsenen 9 % gemäß der Ergebnisse der DEGS1-Studie, die in einem Zeitraum zwischen 2008 und 2011 durchgeführt wurde (Haftenberger et al. 2013). Im Apfel kann zwischen dem Majorallergen Mal d 1 mit einem Molekulargewicht (MG) von 17-18 kDa und den Minorallergenen Mal d 2, ein thaumatin-ähnliches Protein mit einem MG von 31 kDa, Mal d 3 mit einem MG von 9 kDa und Mal d 4 mit einem von MG 14-15 kDa differenziert werden (Krebitz et al. 2003; Hsieh et al. 1995; Vanek-Krebitz et al. 1995; Pastorello et al. 1999). Eine Apfelallergie tritt häufig bei Patienten mit Heuschnupfen im Frühjahr auf, die durch Pollen von Birken und Erle verursacht werden. Die an diesem Phänomen beteiligten Allergene heißen Bet v 1 und Bet v 2 in Birkenpollen und Mal d 1 und Mal d 4 in Apfel (Vanek-Krebitz et al. 1995; Hsieh et al. 1995). Bet v 2 und Mal d 4 gehören zur Gruppe der Profiline. Das kreuzreaktive Syndrom tritt nur in Gebieten mit signifikanter Exposition gegenüber Birkenpollen auf, das heißt in Nord- und Mitteleuropa. Die meisten Apfelallergiker können verarbeitete Apfelprodukte wie etwa Apfelmus mit Symptomfreiheit verzehren, da es sich bei Mal d 1 und Mal d 4 um hitzelabile und gegen Proteasen instabile Proteine handelt. Die Allergenität eines Apfels steht im Zusammenhang mit Sorte und Reifegrad (Hsieh et al. 1995; Vieths et al. 1993; Vieths et al.

1994). Eine Allergie gegenüber Äpfeln tritt auch in Mittelmeerländern wie Spanien, Italien und Griechenland auf, in denen keine Exposition gegenüber Birkenpollen besteht. Eine Kreuzreaktivität mit Gräserpollen, die ebenfalls ein ähnliches Profilinallergen aufweisen, kann in diesen Bereichen die Ursache für eine Apfelallergie sein. Häufig tritt eine Apfelallergie im Mittelmeerraum jedoch unabhängig von Pollenallergien auf. In diesen Fällen ist das Lipidtransferprotein Mal d 3, ein gegen Hitze und Proteasen resistentes Protein, für die allergische Reaktionen verantwortlich (Pastorello et al. 1999; Sánchez-Monge et al. 1999).

1.3.6. Epitope von Allergenen

Ein Epitop oder antigene Determinante bezeichnet die Molekülstruktur innerhalb eines Allergens, das an der Antikörperbindung beteiligt ist (van Regenmortel 1989; Barlow et al. 1986). Ein Paratop stellt die spezifische Bindungsstelle eines Antikörpers dar. Ein Proteinepitop kann als konformationelles (diskontinuierliches) oder als sequenzielles (kontinuierliches) Epitop aufgebaut sein (Abbildung 5). Ein Konformationsepitop befindet sich auf verschiedenen Abschnitten einer Aminosäuresequenz, die durch Faltung auf der molekularen Oberfläche des Allergens räumlich eng benachbart sind und zusammen vom Paratop erkannt werden können. Im Gegensatz dazu bestehen sequenzielle Epitope aus einem linearen Abschnitt benachbarter Aminosäuren, die eine Antikörperbindungsstelle aufweisen. Bei T-Zell-Epitopen handelt es sich ausschließlich um sequenzielle Epitope, da T-Zell-Rezeptoren während einer allergischen Reaktion nur an Peptide binden, die an der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen (mit Hilfe von MHC-Molekülen) präsentiert werden (Pomés 2010). Dagegen sind B-Zell-Epitope hauptsächlich konformationell, was auf die Relevanz der strukturellen Homologie zwischen Allergenen bei pollenassoziierten Nahrungsmittelallergien hinweist (El-Manzalawy und Honavar 2010).

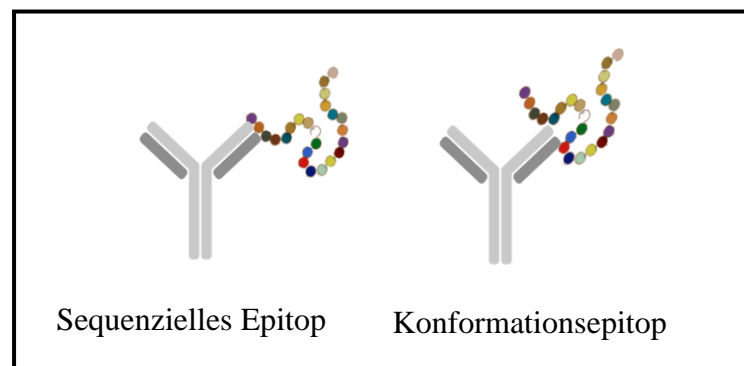


Abbildung 5 Epitop Klassifizierung

Über die klinisch relevanten Antikörperbindungsstellen ist bisher wenig bekannt. Es wurden nur wenige IgE-bindende B-Zell-Epitope und T-Zell-Epitope von Allergenen verifiziert (Pomés

2010). Mit Strukturmethoden wie Röntgenkristallographie und NMR-Spektroskopie konnten IgE-Epitope und Bindungsstellen von Allergenen mit Fab-Fragmenten monoklonaler IgG1-Antikörper bestimmt werden. Für Bet v 1 wurde die Bindung mit dem Fab-Fragment des monoklonalen murinen IgG1-Antikörpers BV16 identifiziert (Mirza et al. 2000). Es wurde gezeigt, dass dieser Antikörper die Serum-IgE-Bindung verringern kann, was darauf hinweist, dass das von BV16 definierte Epitop mit allergenspezifischen Antikörperepitopen überlappt (Spangfort et al. 2003). Daneben ist bekannt, dass einzelne Aminosäuren für die Antikörperbindung von mehreren Allergenen entscheidend sind. Dafür wurden Mutationsvarianten von Allergenen erzeugt, um Aminosäuren zu identifizieren, die für die IgE-Bindung entscheidend sind. Zeigen diese Varianten eine verringerte Antikörperbindung, bei gleichzeitig unveränderter Gesamtkonformation des Proteins, könnte die substituierte Aminosäure eine Schlüsselrolle bei der Erkennung der Epitopkonformation darstellen. Für einige Nahrungsmittelallergene konnten bereits potenzielle IgE-Bindestellen identifiziert werden. Beispielsweise wurden in dem Hauptallergen der Kirsche Pru av 1 die Aminosäurereste Lys28 und Glu45 und im Sellerieallergen Api g 1 der Aminosäurerest Lys44 als entscheidend für die IgE-Reaktivität beschrieben (Neudecker et al. 2003; Wiche et al. 2005). Eine weitere Möglichkeit zur Epitopkartierung stellt die Verwendung der Phagendisplay-Technologie dar (Luzar et al. 2016). Dabei wird eine Bakteriophagen-Bibliothek verwendet, die eine Reihe von kurzen Peptiden enthält. Auf dem Phagen präsentierte Peptide, die von allergenspezifischen Antikörpern erkannt werden, sind nicht zwangsläufig identisch mit dem eigentlichen B-Zell-Epitop und werden als Mimotope bezeichnet. Diese ahmen die chemisch-physikalischen Eigenschaften der Epitope nach. Mit Hilfe dieser Methode wurden IgE bindende Peptide in Bet v 1 (Ganglberger et al. 2000), Phl p 5 a (Hantusch et al. 2004) und Pru p 3 (Pacios et al. 2008) identifiziert. In Bet v 1, Gly m 4, Ara h 8 und Pru av 1 wurden drei IgE-Bindungsregionen mit konservierten Aminosäuren kartiert (Mittag et al. 2006). Diese identifizierten Regionen wurden durch die Kombination verschiedener Peptide nachgeahmt, die sowohl von denselben als auch von unterschiedlichen Patienten erkannt wurden.

1.3.7. Therapie

Die kausale Behandlung von Nahrungsmittelallergien besteht in der strikten Vermeidung von Allergenen. Dies kann jedoch nur durch eine korrekte Lebensmittelkennzeichnung und den Ausschluss versteckter oder eingeschleppter Spuren von Allergenen gewährleistet werden (Eigenmann 2001). Die Behandlung allergischer Symptome ist sowohl bei Pollen- als auch bei Nahrungsmittelallergien möglich. Verschiedene Medikamente wie Antihistaminika, die den Histamin-H1-Rezeptor blockieren, Adrenalin, Kortikosteroide, H2-Blocker oder β 2-Antagonisten können den Ausbruch der allergischen Immunreaktion und seine Symptome sofort lindern (Sicherer und Teuber 2004; Murphy und Weaver 2018a). Die spezifische Immuntherapie (SIT), auch Hyposensibilisierung genannt, wird zur Behandlung von allergischen Symptomen eingesetzt, die unter anderem durch Gras oder Baumpollen sowie Hausstaubmilben oder Katzenschuppen verursacht werden (Tosca et al. 2020; Cools et al. 2000; Mothes et al. 2004). Während der SIT werden in der sogenannten initialen Steigerungsphase wiederholt steigende Dosen des sensibilisierenden Allergens verabreicht bis schließlich die Erhaltungsdosis erreicht ist. In der Erhaltungsphase wird dieselbe Dosis monatlich über einen längeren Zeitraum (mehrere Jahre) injiziert. Durch die SIT soll die allergeninduzierende TH2-Reaktion zu einem durch TH1 dominierten Zytokinprofil verlagert werden und damit die IgE vermittelten Reaktionen verringern. Die Wirksamkeit der SIT bei pollenbedingten Nahrungsmittelallergien wurde in mehreren Studien analysiert. Die Ergebnisse sind jedoch widersprüchlich (Mauro et al. 2011). Bei der Behandlung von Birkenpollinose-Patienten mit SIT kann eine Verringerung des oralen Allergiesyndroms gegen Apfel oder Haselnuss erreicht werden, jedoch wird häufig nur eine vorübergehende Verbesserung der Nahrungsmittelallergie beobachtet. Zur Behandlung von Lebensmittelallergien wurde die SIT zum einen als sublinguale Immuntherapie (SLIT) getestet, bei der die Einnahme des Allergens über die Mundschleimhaut erfolgt und zum anderen als orale Immuntherapie (OIT), bei der zunehmende Dosen des allergieauslösenden Nahrungsmittels in nativer Form eingenommen werden (Syed et al. 2013; Vázquez-Ortiz et al. 2013; Pajno et al. 2018; Muraro et al. 2018). Die SLIT und OIT finden aufgrund von begrenzten Erfolgsraten und dem Auftreten von beträchtlichen und systematischen Nebenwirkungen keinen routinemäßigen Einsatz bei der Behandlung von Nahrungsmittelallergien (Vázquez-Ortiz et al. 2013; Pfaar et al. 2018).

Neben der SIT gibt es weitere Möglichkeiten zur Behandlung von Allergien. So werden in klinischen Studien gereinigte rekombinante Allergene anstelle von rohen Allergenextrakten verwendet (Pree et al. 2007; Pfaar et al. 2018; Pree et al. 2007; Mothes et al. 2004). Der Einsatz

von modifizierten rekombinanten Proteinen können die Nebenwirkungen der SIT reduzieren, den Therapieverlauf beschleunigen und gleichzeitig die Wirksamkeit der SIT verbessern. Beispielsweise können hypoallergene Varianten verwendet werden, die nur wenige B-Zell-Epitope auf der Oberfläche der allergenen Proteine aufweisen und damit weniger in der Lage sind Rezeptor-gebundene IgE-Antikörper quervernetzen. Gleichzeitig sollen jedoch die T-Zell-Bindungsstellen erhalten bleiben (Pree et al. 2007). Es werden auch rekombinante Allergene diskutiert, die mit hypoallergenen Fusionsproteinen modifiziert sind. Focke-Tejkl et al. (2015) zeigten, dass bei der Immunisierung IgG-blockierende Antikörper induziert wurden, die die IgE-Bindung an die Hauptallergene von Gräserpollen hemmten. Neue Ansätze zur Behandlung von Nahrungsmittelallergien sind die epikutane und intralymphatische Allergenapplikation und die Verwendung von spezifischen Adjuvantien (Pfaar et al. 2018). Die intralymphatische Allergenapplikation basiert auf der Theorie, dass Allergene von allergenpräsentierenden Zellen zu einem spezifischen Lymphknoten transportiert werden und dort eine Immunantwort auslösen. Diese Therapieform führte bei Patienten mit einer Allergie gegenüber Gräsern und Pollen zu verringerten Heuschnupfensymptomen und einer Verringerung des spezifischen Serum-IgE (Senti et al. 2008). Auftretende Symptome werden außerdem schneller abgemildert. Die erzielten Effekte der Immuntherapie hielten bis zu drei Jahre an und die Therapiedauer konnte von 3 Jahren auf 8 Wochen reduziert werden.

1.4. Birkenpollenallergene und birkenpollenassoziierte Nahrungsmittelallergene

1.4.1. PR-10 Familie: Bet v 1 und homologe Proteine

Die Familie der Pathogen-assoziierten Proteine (engl. pathogenesis-related proteins; PR-Proteine) ist im Pflanzenreich weit verbreitet und umfasst insgesamt 17 Klassen. Die Expression von PR-Proteinen wird in Pflanzen durch Stressbedingungen wie Verwundung pflanzlicher Organe, mikrobieller Befall oder Pilzbefall und abiotische Stressfaktoren wie Kälte, Hitze und Trockenheit induziert (Somssich et al. 1986; Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki 2006; Agarwal und Agarwal 2014). Daneben gibt es auch PR-Proteine, die gewebe- oder entwicklungspezifisch konstitutiv exprimiert werden (Breiteneder und Ebner 2000). So wird beispielsweise Bet v 1, das Hauptallergen der Weißbirke (*Betula verrucosa*), konstitutiv exprimiert, während die Expression seiner Isoformen durch Stress, Bakterien- und Pilzbefall, Auxinbehandlung, sowie Schwermetalle induziert wird (Swoboda et al. 1995a; Hoffmann-Sommergruber 2000; Utriainen et al. 1998; Swoboda et al. 1994; Koistinen et al. 2005; Poupard et al. 2001). PR-Proteine besitzen niedrige Molekulargewichte (10-40 kDa) und sind vorwiegend in der Vakuole, Zellwand und im Interzellularraum lokalisiert. Die PR-10 Proteinfamilie umfasst verschiedene Pollen- und Nahrungsmittelallergene, die eine Sequenzhomologie zu Bet v 1 aufweisen (Tabelle 3).

Tabelle 3 Wichtige Allergene der PR-10 Proteinfamilie (nach <http://www.meduniwien.ac.at/allfam/list.php?family=AF069>, Stand Juli 2021).

Spezies	Gattung	Allergen	AS	Sequenz-identität mit Bet v 1 a [%]	Uniprot-Eintrag
Apfel (<i>Malus domestica</i>)	Rosaceae	Mal d 1	159	56	P43211
Aprikose (<i>Prunus armeniaca</i>)	Rosaceae	Pru ar 1	160	59	O50001
Birke (<i>Betula verrucosa</i>)	Rosaceae	Bet v 1	160	100	P15494
Birne (<i>Pyrus communis</i>)	Rosaceae	Pyr c 1	159	57	O65200
Erdbeere (<i>Fragaria ananassa</i>)	Rosaceae	Fra a 1	160	53	Q3T923
Erdnuss (<i>Arachis hypogaea</i>)	Fabaceae	Ara h 8	157	46	Q6VT83
Pfirsich (<i>Prunus persica</i>)	Rosaceae	Pru p 1	160	59	Q216V8
Sellerie (<i>Apium graveolens</i>)	Apiaceae	Api g 1	154	41	P49372
Süßkirsche (<i>Prunus avium</i>)	Rosaceae	Pru av 1	160	59	O24248

Die Mitglieder der PR-10-Proteinfamilie codieren jeweils ganze Genfamilien und kommen in den meisten Pflanzen in mehreren Isoformen vor. Die Aminosäuresequenzen der Isoformen

besitzen untereinander eine hohe prozentuale Sequenzidentität, können sich aber in ihrem allergenen Potential stark unterscheiden (Ferreira et al. 1996; Ahammer et al. 2017b; Son et al. 1999). Für Bet v 1 existieren mehr als 20 Isoformen, die von einer Vielzahl von verschiedenen Genen exprimiert werden (IUIS, <http://www.allergen.org>; zuletzt aufgerufen am 30.11.2021) (Schenk et al. 2009; Schenk et al. 2006; Swoboda et al. 1995b). Die hyperallergene Isoform Bet v 1 a ist in Pollen die vorherrschende Isoform (Ahammer et al. 2017b; Wagner et al. 2008). Im Gegensatz zu anderen Isoformen von Bet v 1, besitzt Bet v 1 a keine Cystein-Reste und ist nicht in der Lage Disulfidbrücken-Bindungen auszubilden. Bet v 1 l unterscheidet sich in neun Aminosäurereste von Bet v 1 a und gilt als hypoallergene Isoform (Ferreira et al. 1996; Marković-Housley et al. 2003; Swoboda et al. 1995b).

1.4.2. Physiologische Funktion

PR-10 Proteine sind in der Pflanzenwelt weit verbreitet. Jedoch sind spezifische biologische Funktionen für die einzelnen Mitglieder der PR-10 Familie weitgehendst ungeklärt. Bisher wurden Ligandbindungseigenschaften und Ribonukleaseaktivität *in vitro* (RNase-Aktivität) nachgewiesen (Koistinen et al. 2005; Besbes et al. 2019; Bufe 1998; Neudecker et al. 2001; Mogensen et al. 2007). Das Bindungsverhalten von Bet v 1 und seinen Homologen wurde in der Vergangenheit mehrfach z.B. mittels Isothermer Titrationskalorimetrie, Röntgenkristallographie und NMR-Spektroskopie untersucht (Koistinen et al. 2005; Bufe et al. 1996; Mogensen et al. 2007; Neudecker et al. 2001). Im hydrophoben Hohlraum im Proteininneren können Bet v 1 und Pru av 1 verschiedene Liganden wie Fettsäuren, Flavonoide, Cytokine und Pflanzensteroiden mit Bindungsaffinitäten im mikromolaren Bereich binden (Koistinen et al. 2005; Neudecker et al. 2001; Moiseyev et al. 1997). Andere Studien haben gezeigt, dass sowohl PR-10-Proteine aus Ginseng als auch Bet v 1 und Fra a 1 RNase-Aktivität aufweisen und somit möglicherweise zur Pathogenabwehr beitragen (Koistinen et al. 2005; Moiseyev et al. 1997; Bufe et al. 1996; Besbes et al. 2019). Für die RNase-Aktivität von Bet v 1 zusammen mit dem Liganden Quercetin-3-O-sophorosid wurde eine Schutzfunktion gegen UV-Schäden postuliert (Seutter von Loetzen et al. 2014; Bufe et al. 1996). Weiterhin könnte das deglykosylierte Quercetin ein wichtiges Signal zur Pollenkeimung liefern. Außerdem besitzt Bet v 1 die Fähigkeit durch Konformationsänderung Membrane zu binden und zu permeabilisieren (Mogensen et al. 2002). Dieses Merkmal wurde erstmals in der strukturell ähnlichen Superfamilie der Lipidtransferdomänen (START) des humanen Transportproteins MLN64 beobachtet. Die START-Domäne hat eine ähnliche Tertiärstruktur wie Bet v 1 und kann im hydrophoben Hohlraum im Inneren der Domäne Liganden wie

Cholesterin binden (Iyer et al. 2001; Miller 2007). Dies lässt eine Transport- und Lagerfunktion für Bet v 1 vermuten (Tsujishita und Hurley 2000).

1.4.3. Stabilität von PR-10 Proteinen

Im Allgemeinen sind Nahrungsmittelallergene als temperaturstabile Proteine bekannt. Erst bei hohen Temperaturen kommt es zur Denaturierung und damit zur Entfaltung der Proteine (Mills et al. 2003). Oft enthalten Pflanzen verschiedene Allergene, die jeweils eine unterschiedliche Stabilität aufweisen. Birkenpollen-verwandte Allergene sind in der Regel thermolabil. Bei der thermischen Denaturierung kann es zur Inaktivierung von diskontinuierlichen Konformationsepitopen und der damit verbundenen Zerstörung der IgE-Bindungskapazität kommen (Lüttkopf et al. 2000; Jankiewicz et al. 1997; Ballmer-Weber et al. 2002). Für das Apfelallergen Mal d 1 konnte die thermische Inaktivierung des Proteins durch Kochen der Frucht bereits in in-vitro und in-vivo Experimenten gezeigt werden (Bohle et al. 2006). Im Gegensatz dazu ist die IgE-Bindung an Dau c 1, dem Allergen in der Karotte, weniger durch Erhitzen betroffen. So hatte eine thermische Behandlung auf über 121°C kaum eine Auswirkung auf die Allergenität des Proteins (Wigotzki 2001).

In vielen Fällen führen Lebensmittelmatrixeffekte wie enzymatische und nicht enzymatische Reaktionen während des Erhitzungsvorganges zu einer verringerten IgE-Bindung (Garcia et al. 2007; Gruber et al. 2004). Die nukleophilen Gruppen eines Proteins können zum Beispiel mit Polyphenolen bzw. den reaktiveren Chinonen reagieren (Björkstén et al. 1980; Rudeschko et al. 1995b). Im Rahmen der Maillard-Reaktion können reaktive Aminosäureketten von Proteinen mit reduzierenden Zuckern interagieren (Toda et al. 2014). Die Glykierung von Pru av 1 mit verschiedenen Zuckern wie Glukose oder Ribose reduzierte die IgE-Reaktivität signifikant (Gruber et al. 2004). Eine 2-tägige Inkubation des Haselnussallergens Cor a 1 mit Glukose bei 70 °C führte zu einer Verringerung der Mediatorfreisetzungskapazität, die möglicherweise auf eine Modifikation der nukleophilen Aminosäuren im Zuge der Glykierung zurückzuführen ist (Cucu et al. 2012; Cucu et al. 2011). Für das rekombinante Pru av 1 konnte nach Inkubation mit den Monosachariden Glucose und Ribose bei 100°C eine verringerte IgE Bindungskapazität nachgewiesen werden (Gruber et al. 2004). Darüber hinaus wird die Stabilität von cytosolischen Proteinen durch hohe Makromolekülkonzentrationen beeinflusst und unterscheidet sich von isolierten Allergenen in wässriger Umgebung (Minton 2001). Weiterhin sind die meisten PR-10 Proteine bei niedrigen pH-Werten wenig stabil und gegen proteolytischer Spaltung nicht resistent (Schimek et al. 2005; Sancho et al. 2011). Für die Bet v 1 homologen Proteine Api g 1, Mal d 1, Cor a 1 und Pru p 1 wurde eine vollständige

Denaturierung bei einem pH-Wert von 2,5 gezeigt (Sancho et al. 2011). Ein enzymatischer Verdau durch Pepsin führte außerdem zu einem Verlust ihrer IgE-Bindungskapazität. Interessanterweise kam es bei Mal d 1 und Cor a 1.04 nach Pepsin-Verdau zu keinem Verlust ihrer T-Zell aktivierenden Eigenschaften (Schimek et al. 2005).

1.4.4. Strukturelle Eigenschaften

Bet v 1 und seine Homologen sind globuläre Proteine mit Molekülmassen um 17 kDa und zeichnen sich neben einer hohen Aminosäuresequenzidentität auch durch eine identische Proteinfaltung aus (Abbildung 6) (Vieths et al. 2002). Bereits 1996 konnte die Struktur von Bet v 1 durch Röntgenkristallographie und Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) aufgeklärt werden (Gajhede et al. 1996). Die dreidimensionale Struktur des globulären Proteins besteht aus antiparallelen β -Faltblattstrukturen umgeben von einer 25 AS langen C-terminalen amphipathischen α -Helix. Das β -Faltblatt setzt sich aus sieben antiparallelen Strängen zusammen und wird durch zwei kurze V-förmig angeordnete α -Helices von der C-terminalen α -Helix getrennt, wodurch ein offener Hohlraum gebildet wird. Dieser Hohlraum ist überwiegend hydrophob und weist drei Öffnungen auf der Proteinoberfläche auf (Gajhede et al. 1996). Die dreidimensionale Struktur von Mal d 1 weist mit einer Sequenzidentität von 56 % die gleiche charakteristische Faltung wie Bet v 1 auf (Ahammer et al. 2017a).

Ein wichtiges strukturelles Element stellt die hochkonservierte „P-loop“ (engl. phosphate binding loop) bzw. P-Schleife dar, die reich an Glycin-Resten ist (Abbildung 7) (Ahammer et al. 2017a). Das Motiv befindet sich in der Aminosäuresequenz an Position 47 – 55 und folgt dem allgemeinen Aufbau G-X-G-G-X-G-X-X-K (Reste 47-55). Das Strukturelement ist in Proteinkinasen und Nukleotid-bindenden Proteinen vorhanden und besitzt Phosphorylierungscharakter (Saraste et al. 1990). Vor diesem Hintergrund wurde die P-Schleife als mögliche Binderegion postuliert. Es ist bisher unklar, ob das beschriebene Strukturelement für die biologische Funktion eine Rolle spielt.

Für Bet v 1 und seine Homologen ist als einzige posttranslationale Modifikation die Abspaltung des NH_2 terminalen Methionins aus massenspektrometrischen Untersuchungen bekannt (Swoboda et al. 1995a). Daneben wurde für PR-10 c Proteine eine S-Glutathionylierung berichtet (Koistinen et al. 2002).

Einleitung

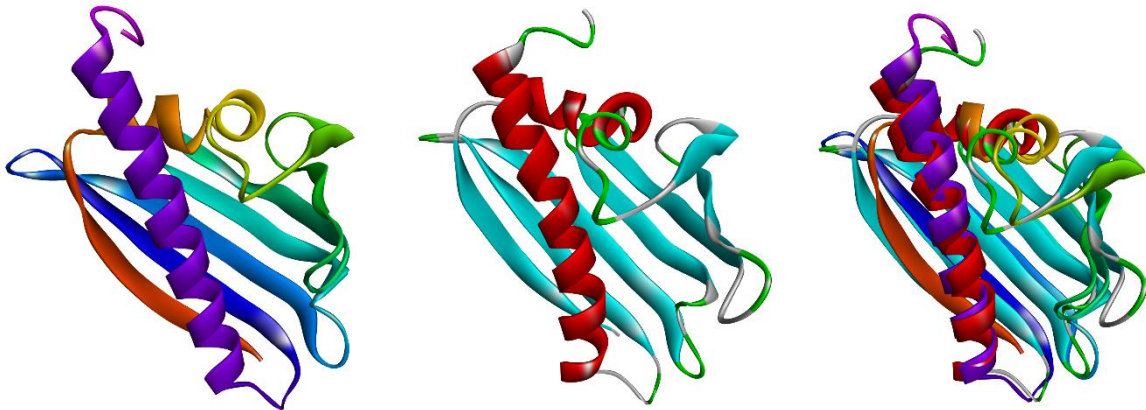


Abbildung 6 Dreidimensionale Strukturen von *Bet v 1* (PDB-Code 1BV1) und *Mal d 1* (PDB-Code 5MMU). Von links nach rechts: *Bet v 1*, *Mal d 1*, Überlagerung der Kristallstrukturen von *Bet v 1* und *Mal d 1*. Das Alignment der Proteinstrukturen erfolgte mit *Discovery Studio v21.1.0.20298* (<https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>; zuletzt aufgerufen am 22.09.2021).

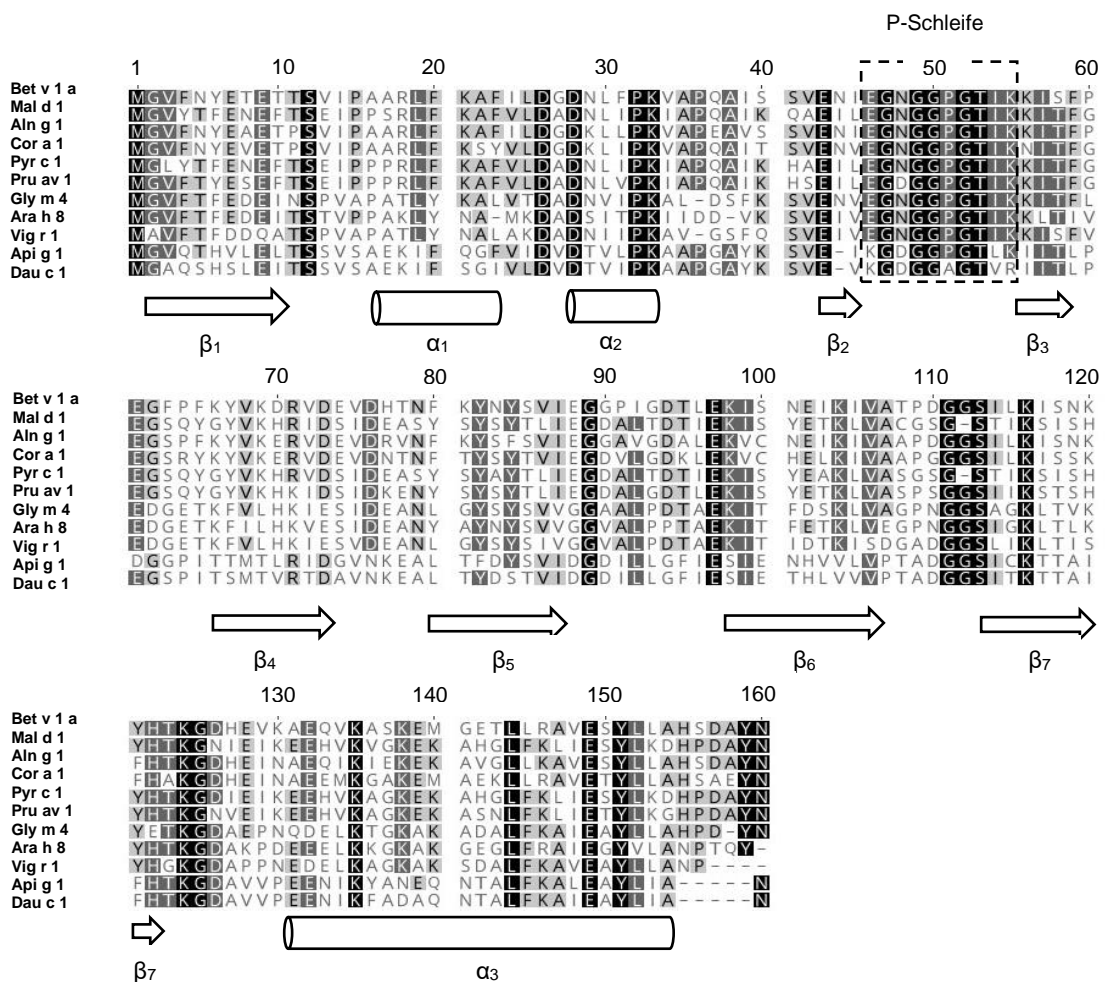


Abbildung 7 Sequenzalignment von *Bet v 1* mit PR-10 Homologen aus verschiedenen Pflanzenfamilien. Von oben nach unten: *Bet v 1 a*, *Mal d 1*, *Aln g 1*, *Cor a 1*, *Pyr c 1*, *Pru av 1*, *Gly m 4*, *Ara h 8*, *Vig r 1*, *Api g 1*, *Dau c 1*. 100 % übereinstimmende Reste sind schwarz markiert, 80 – 100 % Ähnlichkeit dunkelgrau und 60 – 80 % Ähnlichkeit grau. Die hoch konservierte Region mit Glu 46 und der P-Schleife ist entsprechend gekennzeichnet (schwarzer Rahmen). Die Sekundärstrukturelemente, basierend auf der 3D-Struktur von *Bet v 1*, sind unter dem Alignment dargestellt. Das Alignment wurde mit Hilfe von *Geneious Prime* (v. 2021.1.1) (<https://www.geneious.com>) erstellt.

1.5. Proteomik in Pflanzen

Der Begriff „Proteom“ wurde 1994 von Marc R. Wilkins eingeführt und beschreibt die Gesamtheit aller durch ein Genom exprimierter Proteine in einer Zelle, einem Gewebe oder einem Organismus über seine gesamte Lebenszeit (Wilkins et al. 1996). Im Gegensatz zum Genom, welches für alle Zellen desselben Organismus gleich ist, ist das Proteom dynamisch und kann sich zu unterschiedlichen Zeitpunkten in seiner qualitativen und quantitativen Proteinzusammensetzung verändern. Die Analyse von Proteomen, d.h. die Erforschung der Proteombestandteile und deren Funktionen, unter definierten Bedingungen zu einem bestimmten Zeitpunkt wird als Proteomik (engl. proteomics) bezeichnet. Die kleinsten Einheiten eines Proteoms sind verschiedene funktionelle Proteine und ihre Isoformen, die durch reversible posttranslationale Modifikationen, alternatives Spleißen und andere Prozesse gebildet werden. Proteome variieren je nach Organismus und können mehrere Tausend Proteine umfassen. Darüber hinaus kann sich die Häufigkeit verschiedener Proteine in einer Zelle oder einem Gewebe über 12 Größenordnungen erstrecken (Jungblut et al. 2008). Die Massenspektrometrie (MS) hat sich als hervorragende Technik für die Erforschung des Proteoms hervorgetan. Dabei kann zwischen zwei unterschiedlichen Techniken unterschieden werden (Kelleher 2004). Mit dem Top-down-Ansatz werden intakte Proteine nach chromatographischer Auftrennung und massenspektrometrischer Fragmentierung identifiziert und charakterisiert. Bottom-up Proteomik ist der gebräuchlichste Ansatz für die Proteomanalyse, der auch mittels Flüssigchromatographische-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) kleine Peptide nach dem tryptischen Verdau von Proteinen analysiert (Nilsson et al. 2010; Zhang et al. 2013).

In der Vergangenheit wurden Proteomik-Techniken vielfach eingesetzt, um Allergene in verschiedenen Pflanzen zu bestimmen mit dem übergeordneten Ziel die Verbrauchersicherheit und Lebensmittelqualität zu erhöhen (López-Pedrouso et al. 2014; Nakamura und Teshima 2013). Die Heterogenität der Klasse der Allergene spiegelt sich in der Datenbank AllerBase (<http://bioinfo.unipune.ac.in/AllerBase/Home.html>; zuletzt aufgerufen am 29.11.2021) mit 2233 verschiedenen Allergenen unterschiedlicher Spezies wider (Kadam et al. 2017). Vor diesem Hintergrund ist mit „Allergenomics“ ein neues Spezialgebiet entstanden mit dem Ziel Lebensmittelallergene mittels Hochdurchsatztechnologien systematisch zu analysieren (Nakamura und Teshima 2013; Wang et al. 2020; López-Pedrouso et al. 2020). Eine Vielzahl von Isoformen, posttranslationalen Modifikationen und strukturellen Veränderungen während der Verarbeitung, können das allergene Potential beeinflussen (López-Pedrouso et al. 2020).

Die 2S-Albumine aus Senf und Haselnuss wurden mit einer Kombination aus Bottom-up- und Top-down-Proteomik analysiert, um Isoformen und posttranslationale Modifikationen zu identifizieren (Korte et al. 2017; Hummel et al. 2015). Korte et al. (2017) zeigten außerdem unterschiedliche Isoform Muster für verschiedene Sorten eines allergenen Samens. Weiterhin wurden verschiedene Allergene relativ quantifiziert, um mögliche Auswirkungen der Verarbeitung auf die Allergenzusammensetzung zu bestimmen. So führte beispielsweise das Rösten von Erdnüssen zu keinen Konzentrationsunterschieden der klinisch relevanten Allergene Ara h 2 und 6 aus der Albumin-Superfamilie, während das Entfetten von Erdnussmehl die Menge an Oleosinen (Ara h 10 und Ara h 11) um das 100-fache reduzierte (Johnson et al. 2016). Downs et al. (2016) zeigten mittels Bottom-up Proteomik, dass Walnussallergene unterschiedlich auf die thermische Verarbeitung reagieren. Dabei war die Allergen-Detektion mittels LC-MS/MS stark vom Protein, von dessen Anfälligkeit gegenüber dem enzymatischen Aufschluss, dem Grad der thermischen Verarbeitung und der Probenvorbereitung abhängig. Außerdem ermöglichte der Einsatz von Proteomik die Entwicklung von neuen Anwendungen zur Lebensmittelaufentifizierung, Allergendetektion oder der Charakterisierung von Glutenfraktionen (Proteine aus Gerste, Hafer, Roggen, Weizen) im Zusammenhang mit Zöliakie (Korte und Brockmeyer 2017). Weiterhin führte eine konventionelle 2D-PAGE-Analyse mit anschließendem Western Blot Verfahren, das mit Seren von Allergikern durchgeführt wurde, und eine MS-Analyse zur Identifizierung neuer Allergene (Marzano et al. 2020). Innerhalb der MS-Techniken stellt die zielgerichtete Proteomik (engl. targeted proteomics) einen bedeutenden Ansatz zum Screening auf bestimmte Proteine mittels SRM („selective reaction monitoring“) und MRM („multiple reaction monitoring“) dar. Shaheen et al. (2019) identifizierten im MRM-Modus wichtige Peptide der Linsenallergene Len c 1.0101, Len c 1.0102 und LTPs. Bei unbekannt proteotypischen Peptiden, kann Shotgun-Proteomik durchgeführt werden, mit dem Ziel Peptide zu identifizieren, die ein Fingerabdruck für weitere zielgerichtete Proteomik-Untersuchungen darstellen können (López-Pedrouso et al. 2020).

1.6. Ziele der Arbeit

Der Schwerpunkt der Arbeit lag auf der Untersuchung von verschiedenen allergenen Determinanten des Apfelallergens Mal d 1 zur Entwicklung von hypoallergenen Apfelvarietäten. In Langzeitstudien wurde eine Vielzahl von Apfel-Genotypen von Kreuzungspopulationen aus verschiedenen Kultivaren mittels indirekt kompetitiven ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) auf den Mal d 1 Gehalt untersucht. Ergänzend dazu wurden Genotypen unterschiedlicher Allergengehaltsklassen, aber vor allem solche, die sich durch einen konstant niedrigen Allergengehalt über mehrere Erntejahre auszeichneten, im Rahmen von Humanstudien an dem Allergiezentrum Charité in Berlin unter der Leitung von Prof. Dr. Karl-Christian Bergmann allergologisch bewertet. Die dabei erhaltenen in-vivo Daten wurden mit den ermittelten Mal d 1 Gehalten in Relation gesetzt.

Zudem wurden ausgewählte Genotypen mittels Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie auf ihre Polyphenol-Zusammensetzung untersucht, um mögliche Zusammenhänge zwischen einzelnen Metaboliten oder Metabolitklassen und Mal d 1 zu identifizieren. Die genaue Charakterisierung der Polyphenol-Zusammensetzung auf der Basis der in-vivo Daten von der Charité und der Mal d 1 Gehalte erlaubte Rückschlüsse auf mögliche antiallergische Wirkungen von Polyphenolen.

Im Gegensatz zum Birkenpollenallergen Bet v 1 und anderen PR-10 Proteinen wurden für das Apfelallergen Mal d 1 bisher keine physiologischen Interaktionspartner identifiziert. Vor diesem Hintergrund wurde das Bindungsverhalten von rekombinanten rMal d 1.02 mittels Microscale Thermophoresis analysiert, um Hinweise auf die physiologische Funktion von Mal d 1 zu erhalten.

Mal d 1 ist als große Proteinfamilie bekannt, die sich aus verschiedenen Isoformen zusammensetzt. Die Identifizierung von einigen Proteinisoformen auf der Genebene gelang in der Vergangenheit mittels verschiedener molekularbiologischer Methoden. Die Expression von verschiedenen Isoformen auf Proteinebene konnte bisher in vielen Fällen nicht bestätigt werden. In einer umfassenden Proteomikanalyse wurden verschiedene Apfel-Genotypen auf ihre Isoformzusammensetzung untersucht und Korrelationsanalysen mit den aus Humanstudien gewonnenen Verträglichkeitsdaten durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Pflanzliches Material

Alle Apfelgenotypen wurden von der Hochschule Osnabrück in Zusammenarbeit mit der Züchtungsinitiative Niederelbe GmbH & Co. KG durch Kreuzung verschiedener Elternsorten erzeugt, in Osnabrück kultiviert und für die Untersuchungen freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Einige wenige Genotypen wurden an den Standorten Bodensee, Esteburg (Niedersachsen), Frankreich und Italien kultiviert. Für die Kreuzungen wurden verschiedene Elternsorten wie Gala, Santana (SAN), Pinova, Topaz, RubINETTE, Golden Delicious, Delbarestivale, Honeycrisp, Retina, Rubens, Elstar, Gloster, Fuji, Braeburn, Dalinbel und Pinova verwendet. Nach der Ernte wurden von den meisten Genotypen Mischproben aus je einem Viertel von drei reifen Äpfeln desselben Genotyps generiert. Die Untersuchung der biologischen Variabilität erfolgte anhand von 10 Einzelproben je Genotyp. In vakuumierten Zustand erfolgte ihre Lagerung bei -20 °C. Für die weiteren Analysen wurden die Proben mit flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemahlen und bis zur Analyse bei -80°C gelagert. Von einem Teil der Genotypen wurde von der Hochschule Osnabrück Pollenmaterial zur Verfügung gestellt. Dieses wurde ebenfalls mit flüssigem Stickstoff zu einem Pulver gemahlen und bei -80°C gelagert.

Bei den untersuchten Proben handelt es sich um Genotypen der Selektionsstufe 1 und 2. Die Selektionsstufe 1 beschreibt ein frühes Stadium der Züchtung. Nur Äpfel einer bestimmten Fruchtqualität, die den Kriterien von Aussehen, Geschmack und Fruchtgröße entsprachen, gelangten in die Selektionsstufe 2. Genotypen dieses Stadiums wurden hinsichtlich weiterer Parameter, wie Ertragsleistung, Inhaltsstoffe und Resistenzen gegen Krankheitserreger, bewertet.

Für die Analyse des Mal d 1 Gehaltes wurde ein Kontrollstandard verwendet, der aus kommerziell erhältlichen Äpfeln der Sorte Jonagold hergestellt wurde. Bei jeder Probenaufarbeitung und ELISA-Messung wurde ein Standard mitgeführt.

Der Genotyp p186 wurde in p211 umbenannt.

2.1.2. Chemikalien

Tabelle 4 Chemikalien

Chemikalie	Summenformel	Hersteller
Acrylamid/ Bisacrylamid (30 %)	$C_3H_5NO / C_7H_{10}N_2O_2$	Carl Roth, Karlsruhe
Agar		Fluka, Buchs (St. Gallen)
Aktivkohle		Carl Roth, Karlsruhe
Aluminiumsulfat Hexadecahydrat	$Al_2(SO_4)_3 \times 16 H_2O$	Carl Roth, Karlsruhe
Ameisensäure	CH_2O_2	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	$(NH_4)_2S_2O_8$	BioRad, Taufkirchen
Ampicillin Natriumsalz	$C_{16}H_{18}N_3NaO_4S$	Carl Roth, Karlsruhe
Biochanin A		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Brillant Blau G 250	$C_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2$	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP)	$C_8H_8NO_4BrCl$	Carl Roth, Karlsruhe
(+)-Catechin	$C_{15}H_{14}O_6$	Carl Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	$C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$	Carl Roth, Karlsruhe
L-Cystein $\geq 99\%$	$C_3H_7NO_2S$	Carl Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	C_2H_6OS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dimethylformamid (DMF)	C_3H_7NO	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dinatriumhydrogenphosphat	Na_2HPO_4	Merck KGaA, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz (EDTA)	$C_{10}H_{16}N_2O_8$	Carl Roth, Karlsruhe
(+)-Epicatechin	$C_{15}H_{14}O_6$	Hausinterner Standard
(-)-Epicatechin	$C_{15}H_{14}O_6$	Fluka, Buchs (St. Gallen)
Essigsäure	$C_2H_4O_2$	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	C_2H_5OH	VWR International GmbH, Darmstadt
Fast Blue B (FBB) Salz	$C_{14}H_{12}N_4O_2Cl_2 \times ZnCl_2$	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Folin-Ciocalteu (FC) Reagenz		VWR International GmbH, Darmstadt
Gallussäure	$C_7H_6O_5$	Carl Roth, Karlsruhe
Glutaminsäure	$C_5H_9NO_4$	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Material und Methoden

Chemikalie	Summenformel	Hersteller
Glutathion oxidiert (GSSG)	$C_{20}H_{32}N_6O_{12}S_2$	Carl Roth, Karlsruhe
Glutathion reduziert (GSH)	$C_{10}H_{17}N_3O_6S$	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	$C_2H_5NO_2$	Carl Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt		Carl Roth, Karlsruhe
Imidazol	$C_3H_4N_3$	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol	C_3H_8O	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG)	$C_9H_{18}O_5S$	Carl Roth, Karlsruhe
2 x Laemmli Puffer		Bio-Rad, Taufkirchen
Kaliumchlorid	KCl	Carl Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	$MgCl_2$	Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumchlorid, 50 mM	$MgCl_2$	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Methanol	CH_3OH	VWR International GmbH, Darmstadt
Methanol LC-MS Chromasolv	MeOH	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Milchpulver		Carl Roth, Karlsruhe
Monolith His-Tag Labeling Kit RED-tris-NTA 2 nd Generation		Nanotemper Technologies GmbH, München
Natriumacetat Trihydrat	$C_2H_3NaO_2 \times 3 H_2O$	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat	Na_2CO_3	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid ≥ 95 %	NaCl	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat ≥ 98 %	NaH_2PO_4	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS) ≥ 99 %	$C_{12}H_{25}NaO_4S$	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	$NaHCO_3$	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	$NaH_2PO_4 \times H_2O$	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid	NaOH	Hanns Nierle, Freising
Nickelchlorid Hexahydrat	$NiCl_2 \times 6 H_2O$	Fluka, Buchs (St. Gallen)
p-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	$C_{40}H_{30}Cl_2N_{10}O_6$	Carl Roth, Karlsruhe
PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Größenstandard 10-180 kDa)		Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Profinity™ IMAC His-Tag-Resin		Bio-Rad Laboratories GmbH, Taufkirchen
Pepton aus Casein		Carl Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	$C_7H_7FO_2S$	Carl Roth, Karlsruhe

Material und Methoden

Chemikalie	Summenformel	Hersteller
<i>o</i> -Phosphorsäure (85 %)	H ₃ PO ₄	Merck KGaA, Darmstadt
Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP)	(C ₆ H ₉ NO) _n	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PureYield™ Plasmid Miniprep System		Promega, Mannheim
Pyrocatechin	C ₆ H ₆ O ₂	Merck KGaA, Darmstadt
Quercetin-3-O-rhamnosid	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	Hausinterner Standard
Roti-Nanoquant		Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure ≥32 %	HCl	Carl Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure	H ₂ SO ₄	Merck KGaA, Darmstadt
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	C ₁₆ H ₂₀ N ₂	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) ≥99 %	C ₆ H ₁₆ N ₂	Carl Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	C ₄ H ₁₁ NO ₃	Carl Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	C ₁₄ H ₂₂ O(C ₂ H ₄ O) _n mit n = 9-10	Carl Roth, Karlsruhe
Trypton aus Casein		Carl Roth, Karlsruhe
Tween-20	C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆	Carl Roth, Karlsruhe
Urea	CH ₄ N ₂ O	Carl Roth, Karlsruhe

2.1.3. Medien

LB-Medium (pH 7)	10 g/L Natriumchlorid 10 g/L Trypton 5 g/L Hefeextrakt
LB-Agar (pH 7)	10 g/L Natriumchlorid 10 g/L Trypton 5 g/L Hefeextrakt 15 g/L Agar

2.1.4. Puffer und Lösungen

Tabelle 5 Puffer und Lösungen

Puffer/ Lösung	Herstellung
<i>Proteinaufreinigung von rekombinanten Proteinen</i>	
Rückfaltungspuffer	10 mM NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 10 mM Na ₂ HPO ₄ 0,5 M NaCl 5 mM Imidazol
Natriumcarbonatpuffer (pH 9)	Lösung I 10 mM NaHCO ₃ Lösung II 10 mM Na ₂ CO ₃ Lösung I mit Lösung II auf pH 9 einstellen
Bindungspuffer (mit HCl auf pH 7,5)	50 mM TRIS 220 mM NaCl 10 mM Imidazol
Elutionspuffer (mit HCl auf pH 7,5)	50 mM TRIS 220 mM NaCl 250 mM Imidazol
<i>Regeneration His-Tag Resin</i>	
Natriumphosphatpuffer (pH 7,5)	Lösung I: 0,2 M Na ₂ HPO ₄ Lösung II: 0,2 M NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O Lösung II mit Lösung I auf pH 7,5
NaCl-Lösung	3 M NaCl
EDTA-Lösung (pH 8)	0,6 M EDTA
Lösung I	25 mL Natriumphosphatpuffer 10 mL NaCl (3 M) 33,3 mL EDTA (0,6 M) Mit ddH ₂ O auf 100 mL auffüllen
Lösung II	70 % Ethanol
Lösung III (pH 8)	25 mL 0,2 M Natriumphosphatpuffer 10 mL NaCl (3 M) Mit ddH ₂ O auf 100 mL auffüllen
Lösung IV (pH 4)	50 mM Natriumacetat 0,3 M NaCl
Lösung V (pH 6)	0,2 M NiCl ₂ x 6 H ₂ O

Material und Methoden

<i>SDS-PAGE</i>	
10 x Oberpuffer	25 mM TRIS 1,92 M Glycin 34,7 mM SDS
Oberpuffer	10 x Oberpuffer 1:10 mit ddH ₂ O verdünnen
Kolloidale Coomassie Färbelösung	5 % Al ₂ (SO ₄) ₃ 20 % Ethanol 0,1 % Brillant Blau G 250 2 % H ₃ PO ₄
Entfärbelösung	10 % Ethanol 7 % C ₂ H ₄ O ₂ Nach Verwendung der Lösung Regeneration über Aktivkohlefiltration
<i>Western Blot</i>	
Semidry Blotting Puffer	25 mM TRIS 200 mM Glycin 20 % Methanol
Blockierungspuffer	5 % BSA in Waschpuffer
Waschpuffer	20 mM TRIS 140 mM NaCl 0,1 % Tween 20
Detektionspuffer	100 mM TRIS 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂
NBT	5 % NBT in 70 % DMF
BCIP	135 mM BCIP in ddH ₂ O
<i>Mal d 1 Extraktion aus Äpfeln und Detektion mittels ELISA</i>	
Extraktionspuffer (pH 8)	6 M Harnstoff 20 mM TRIS 220 mM NaCl 5 mM Imidazol
PBS-Puffer (pH 7,4)	Lösung I 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 150 mM NaCl Lösung II 10 mM NaH ₂ PO ₄ Lösung I mit Lösung II auf pH 7,4 einstellen
PBS-T-Puffer	PBS-Puffer (pH 7,4) 0,05 % Tween-20
Bicarbonatpuffer (pH 9,6)	30 mM Na ₂ CO ₃ 70 mM NaHCO ₃
Blockierungspuffer	1 % BSA in PBS-Puffer bzw. 2 % Milchpulver in PBS-Puffer

Material und Methoden

<i>Polyphenoloxidaseaktivität (PPO)</i>	
Extraktionspuffer (pH 6,5)	32 mM NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 18 mM Na ₂ HPO ₄ 0,25 % Triton-X-100 1 % PVPP
Phosphatpuffer (pH 6,5)	32 mM NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 18 mM Na ₂ HPO ₄
Pyrocatechin-Lösung	50 mM Pyrocatechin in Phosphatpuffer (pH 6,5)
<i>Gesamtpolyphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu</i>	
Standard-Lösung	1 mg/mL Gallussäure in 50% Methanol
Folinlösung	Folin-Reagenz 1:10 mit ddH ₂ O verdünnen
Natriumcarbonatlösung	1 M Na ₂ CO ₃
<i>Gesamtpolyphenolgehalt mittels FBB-Assay</i>	
FBB-Lösung	0,1 % FBB in ddH ₂ O 5 min Ultraschallbadbehandlung
Natriumhydroxid-Lösung	5 % NaOH in ddH ₂ O
<i>Analyse von Polyphenolen mittels LC-MS</i>	
Standard-Lösung	50 mg Biochanin A in 250 mL Methanol

2.1.5. Gentechnisch veränderte Organismen

Tabelle 6 Gentechnisch veränderte Organismen

Bakterienstamm	Hersteller
<i>E.coli</i> BL21 (DE3) pLysS pQE-70 Mal d 1.02	Hausinterner Bakterienstamm
<i>E.coli</i> BL21 (DE3) pLysS pQE-70 Bet v 1.01	Hausinterner Bakterienstamm
<i>E.coli</i> BL21 (DE3) pLysS pQE-70 Pru d 1	Hausinterner Bakterienstamm
<i>E.coli</i> BL21 (DE3) pLysS pQE-70 Fra a 1.02	Hausinterner Bakterienstamm

2.1.6. Antikörper und Enzyme

Tabelle 7 Antikörper

Antikörper	Konzentration	Hersteller
Anti-Mal d 1	929 µg/mL	Dauids Biotechnologie GmbH, Regensburg
Anti-Mal d 1	1200 µg/mL	Dauids Biotechnologie GmbH, Regensburg
Anti-Kaninchen-Alkalische Phosphatase (AP)	1 mg/mL	Carl Roth, Karlsruhe
Anti-Kaninchen-Meerrettich- Peroxidase (HRP)	4-11 µg/mL	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Tabelle 8 Enzyme

Enzyme	Hersteller
DNase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Lysozym	Fluka, Steinheim

2.1.7. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 9 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
96-well Mikrotiterplatte, Immunograde™ (ELISA)	Brand GmbH & Co.KG, Wertheim
96-well Mikrotiterplatte Greiner	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Transfermembran Roti PVDF	Carl Roth, Karlsruhe
Rotilabo® -Blottingpapier (Dicke 0,35 mm)	Carl Roth, Karlsruhe
ZelluTrans Dialyseschlauch MWCO: 3,5 kDa	Carl Roth, Karlsruhe
Telos Filtration Column	Kinesis Scientific Experts, Wertheim
Telos Column Caps	Kinesis Scientific Experts, Wertheim

2.1.8. Geräte

2.1.9. Flüssigkeitschromatographie-Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie

Tabelle 10 Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) Einstellungen

HPLC-System	Agilent 1100 Series, Agilent Technologies, Kalifornien, USA
Pumpe	Quaternary pump G1311A (Agilent)
Injektor	Sample injector G1313A (Agilent)
Injektionsvolumen	5 µL
Trennsäule	Luna, 3 u, C18(2), 100Å, 150 x 2 mm (Phenomenex, Aschaffenburg)
Vorsäule	Security Guard Cartridges C18 4 x 2 mm (Phenomenex)
Säulentemperatur	28 °C
Fließmittel	Fließmittel A: 0,1 % Ameisensäure in H ₂ O Fließmittel B: 0,1 % Ameisensäure in MeOH
Flussrate	0,2 mL/min
Gradient	0 – 50 % B in 30 min 50 – 100 % B in 5 min 100 % B for 15 min 100 – 0 % B in 5 min 0 % B for 10 min Laufzeit: 65 min
DAD	Diodenarray Detector G1315B (Agilent)
MS, Esquire 3000plus	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
Spraygas	Nitrogen (30,0 psi)
Trockengas	Nitrogen (9 L/min; 330 °C)
Auflösung	13000 <i>m/z</i> /s
Scanbereich	50-975 <i>m/z</i>
Polarität	Positiv, negativ; alternierend
ICC Target	30000 (positiv) or 1000 (negativ)
Max. Akkumulationszeit	200 ms
Zielmasse (SPS)	400 <i>m/z</i>
Kapillarenspannung	± 4000 V
Endplattenspannung	± 3500
MS/MS	Auto-tandem MS
Kollisionsgas	Helium (4,21 x 10 ⁻⁶ mbar)
Kollisionsspannung	1 V

Material und Methoden

Ionenfalle	
Skimmer	$\pm 40 \text{ V}$
Cap Exit	$\pm 121 \text{ V}$
Oct 1 DC	$\pm 12 \text{ V}$
Oct 2 DC	$\pm 1,7 \text{ V}$
Trap Drive	49,8
Otc RF	150 Vpp
Lens 1	$\pm 5 \text{ V}$
Lens 2	$\pm 60 \text{ V}$

2.1.10. Sonstige Geräte

Tabelle 11 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	Fedegari FVA3/A1	IBS Tecnomara, Fernwald
Milli-Q-Anlage	TKA MicroPure	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gefriertrocknungsanlage	P10K-L	Dieter Piatkowski Forschungsgeräte, Petershausen
Blotapparatur	V10-SDB	Biostep GmbH, Jahnsdorf
Elektrophoreseapparatur	MINI-Vertical Electrophoresis Unit CRTV100	Carl Roth, Karlsruhe
Spannungsgenerator	E835, CV245	Consort, Turnhout, Belgien
Spannungsgenerator	EV245	Consort, Turnhout, Belgien
Magnetrührer	RSM-01HS	Phoenix Instruments, Garbsen
Magnetrührer	RH basic 2	IKA, Staufen
Schüttler	DOS-10L	neoLab, Heidelberg
Analytische Waage	SCALTEC SPB61	SCALTEC Instruments, Heiligenstadt
Analytische Waage	Scout Pro SP U4001	Ophaus, Pine Brook
Präzisionswaage	TP 214	Denver Instrument, Bohemia
Kühlzentrifuge	Eppendorf 5415R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Rotina 380R	Hettich, Bäch (Schweiz)
Zentrifuge	Sigma 4K15C	Sigma-Aldrich, Weilheim
Mini-Zentrifuge	Argosflexifuge	Biozym, Oldendorf
Rotationsschüttler	Rotary Mixer	A. Hartenstein, Würzburg
Rotations-	RVC 2-18	Martin Christ GmbH, Osterode am Harz
Vakuumkonzentrator		Harz
Microplate reader	CLARIOstar	BMG Labtech, Ortenberg
NanoDrop	ND1000 Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie, Erlangen

Material und Methoden

Gerät	Modell	Hersteller
Mikrotiterplatten-Waschgerät	Columbus	TECAN, Männedorf, Schweiz
Photometer	evolution100	Thermo Electron Corporation
Mixer	Personal Blender PB 250	Tribest Corporation, Anaheim, USA
Vortexer	Vortex-Genie 2 G-560E	Scientific Industries, Bohemia
ULTRA TURRAX	T18 basic	IKA, Staufen
pH Meter	pH 50+ DHS	XS Instruments, Carpi
Ultraschallbad	Sonorex Super	BANDELIN electronic, Berlin
Ultraschall-Sonde	Sonoplus Ultraschall-Homogenisator	Bandelin Electronic, Berlin
Sterilbank	Hera Safe	Heraeus Holding, Hanau
Schüttelinkubator	3032	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Monolith	NT.115	Nanotemper Technologies GmbH, München
Vakuumbbeutelverschleißer	Model 9937	Finether, Guangdong, China

2.1.11. Software

Tabelle 12 Software

Software	Hersteller
ChemDraw, 20.1.1	PerkinElmer Informatics
Citavi 6	Swiss Academic Software, Schweiz
ClarioStar 5.21R2	BMG Labtech
MARS DataAnalysis Software 3.20R2	BMG Labtech
DataAnalysis 6.2	Bruker Daltonics
QuantAnalysis 6.2	Bruker Daltonics
Geneious Prime v. 2021.2.2	Biomatters Ltd, Auckland, Neuseeland
Rstudio 3.6	R Studio Team, Boston, USA
Sublime Text	Sublime HQ Pty Ltd, Sidney, Australien
MO.Control Software v1.6.1	Nanotemper Technologies GmbH, München
MO.Affinity Analysis Software v2.3	Nanotemper Technologies GmbH, München

2.2. Methoden

2.2.1. Plasmid-DNA-Extraktion

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte aus *E.coli* mit Hilfe des „Pure Yield Plasmid Miniprep System“. Alle verwendeten Puffer wurden vom Hersteller bereitgestellt. Es wurden 5 mL LB-Medium mit den Antibiotika Ampicillin (100 µg/mL) und Chloramphenicol (34 µg/mL) mit dem *E.coli* Stamm BL21 (DE3) pLysS pQE-70 Mal d 1.02 beimpft und über Nacht bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (4°C, 16000 g, 30 s) geerntet. Das Pellet wurde in 600 µL ddH₂O rückgelöst. Die Plasmid-Isolation erfolgte mit kleinen Modifikationen entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Zunächst wurde der Suspension 100 µL „Lysis Buffer“ zugegeben. Die Suspension wurde durch 6-maliges Invertieren gemischt. Anschließend wurden 350 µL „Neutralization Solution“ zugegeben, vermischt und zentrifugiert (3 min, 16000 g, 4 °C). Der Überstand wurde auf eine „Pure Yield Minicolumn“ gegeben und zentrifugiert (20 s, 16000 g, 4 °C). Es folgte nacheinander die Zugabe von 200 µL „Endotoxin Removal Wash“ und 400 µL „Column Wash“. Dazwischen inkubierten die Lösungen auf der Silica-Membran für jeweils fünf Minuten und wurden anschließend zentrifugiert (15 s, 16000 g, 4 °C). Die Elution erfolgte durch eine zweimalige Inkubation je fünf Minuten mit je 15 µL „Elution Buffer“ und Zentrifugation (15 s, 16000 g, 4 °C). Die Konzentration der extrahierten DNA wurde mittels NanoDrop bestimmt.

2.2.2. Herstellung des rekombinanten Proteins

2.2.2.1. Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Kultivierung von *E.coli* erfolgte auf einer LB-Agar-Platte mit den Antibiotika Ampicillin (100 µg/mL) und Chloramphenicol (34 µg/mL). Die Inkubation fand über Nacht bei 37°C im Brutschrank statt. Zur heterologen Expression von rekombinanten Proteinen wurden zunächst 25 mL LB-Medium mit den Antibiotika Ampicillin (100 µg/mL) und Chloramphenicol (34 µg/mL) mit einer Einzelkolonie des Stammes beimpft und bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden 1000 mL LB-Medium mit den Antibiotika Ampicillin (100 µg/mL) und Chloramphenicol (34 µg/mL) mit 15 mL Vorkultur beimpft und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 1 mL IPTG induziert und anschließend bei 18 °C und 150 rpm für weitere 18 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (15 min, 4°C, 5000 g) geerntet und die Bakterienpellets bei - 80 °C eingefroren.

2.2.2.2. Zellaufschluss

Bei -80 °C gelagerte Bakterienpellets wurden in 12 mL Bindungspuffer (2.1.4) resuspendiert. Es folgte der Zusatz von 60 µL PMSF (100 mM), 6 mg Lysozym, 240 µL MgCl₂ (50 mM) und 1 µL DNase. Die Suspension wurde 20 Minuten bei Raumtemperatur (RT) invertiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschall (3 x 1 min, 50 % Energie). Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (30 min, 4°C, 10000 g). Das Rohprotein-Extrakt mit dem löslichen Protein und anderen löslichen Zellbestandteilen, wurde in ein frisches Gefäß überführt. Der Rückstand enthielt die unlöslichen Proteine in Form von Einschlusskörpern („Inclusion Bodies“). Das rekombinante rMal d 1.02 wurde sowohl aus der löslichen als auch unlöslichen Fraktion isoliert und aufgereinigt.

2.2.2.3. Aufschluss Einschlusskörper

Der Rückstand mit den Einschlusskörpern aus 2.2.2.2 wurde in 12 mL Extraktionspuffer (2.1.4) resuspendiert und über Nacht im Rotationsschüttler bei 4°C inkubiert. Die Lösung wurde zentrifugiert (30 min, 4 °C, 21000 g) und der Überstand über Nacht bei 4 °C gegen Rückfaltungspuffer (2.1.4) dialysiert (MWCO 3,5 kDa). Anschließend wurde das Dialysat zentrifugiert (30 min, 4 °C, 21000 g) und der Überstand, der das Rohprotein der Einschlusskörper enthielt, abgetrennt und zur Aufreinigung eingesetzt.

2.2.2.4. Proteinaufreinigung mittels His-Tag-Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung erfolgte mittels Immobilisierter-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC). Dabei bindet der C-terminale 6x His-Tag reversibel an das mit Nickel-Ionen beladene Resin. Das erhaltene Rohprotein aus der löslichen Fraktion wurde auf das Resin gegeben und über Nacht bei 4 °C in dem Rotationsschüttler inkubiert. Das Rohprotein aus den Einschlusskörpern wurde ebenfalls auf das Resin gegeben und für 2 Stunden bei 4 °C in dem Rotationsschüttler inkubiert. Im Anschluss wurde das ungebundene Protein durch zweimaliges Waschen mit je 10 mL Bindungspuffer (2.1.4) entfernt. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch eine fünfmalige Inkubation je fünf Minuten mit je 400 µL Elutionspuffer. Die Elutionsfraktionen wurden getrennt voneinander aufgefangen. Das Resin wurde mit 10 mL Bindungspuffer gewaschen und auf 20 %iges Ethanol bei 4 °C gelagert. Die Proteinkonzentrationen jeder Elutionsfraktion wurde nach Bradford (2.2.3) bestimmt. Die Reinheit der einzelnen Fraktionen wurde mittels SDS-PAGE überprüft (2.2.4). Die Identität der isolierten Proteine wurde mittels Western-Blot-Verfahren analysiert (2.2.5). Alle

Elutionsfraktionen mit messbaren Proteinkonzentrationen wurden vereinigt und über Nacht bei 4 °C gegen Natriumcarbonatpuffer (2.1.4) dialysiert. Das gereinigte Protein wurde lyophilisiert und bei -20 °C gelagert.

2.2.2.5. *Regeneration His-Tag-Resin*

Das His-Tag-Resin wurde nach dreimaliger Verwendung regeneriert. Zunächst wurde das Resin zwei Mal je 5 Minuten bei RT mit 5 mL von Lösung I (2.1.4) inkubiert. In einem weiteren Schritt wurde das Resin in Lösung II (2.1.4) für 20 Minuten bei 4 °C in einem Rotationschüttler inkubiert und anschließend mit 10 mL ddH₂O und 10 mL Lösung III (2.1.4) gewaschen. Das Resin wurde dann für fünf Minuten bei RT mit Lösung 4 und 15 Minuten mit Lösung V (2.1.4) bei 4 °C auf dem Rotationsschüttler inkubiert. Zuletzt wurde das Resin nacheinander mit 5 mL von Lösung IV (2.1.4), 10 mL ddH₂O und 5 mL Equilibrierungspuffer (2.1.4) gespült.

2.2.3. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Elutionsfraktionen wurden 1:20 und ggf. 1:40 mit ddH₂O verdünnt. Drei technische Replikate von je 50 µL wurden auf eine 96-Well-Platte gegeben. Als Blindwert wurde 250 µL ddH₂O verwendet. Es wurden 200 µL Roti-Nanoquant-Lösung zu den Proteinverdünnungen gegeben. Nach einer fünfminütigen Inkubation erfolgte die photometrische Messung am Plate Reader bei 590 nm gegen die Wellenlänge von 450 nm. Die Proteinkonzentration wurde über eine Standardkurve in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 100 µg/mL mit BSA bestimmt.

2.2.4. SDS-PAGE

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte mittels denaturierender SDS-PAGE. Es wurde ein Polyacrylamid-Gel hergestellt. Dazu wurde ein 7%iges Sammelgel und ein 10%iges Trenngel nach Tabelle 13 eingesetzt. Die Proben wurden mit ddH₂O auf eine Proteinkonzentration von 3,5 µg verdünnt und mit 2 x Laemmli-Puffer versetzt. Anschließend wurden die Proben zur Denaturierung 5 Minuten bei 95 °C erhitzt. Es wurden je 30-40 µL Probe, sowie 6 µL Protein-Marker auf das Gel geladen und in 1 x Oberpuffer bei 100 V gelektrophoretisch getrennt. Die Proteinbanden wurden mit kolloidaler Färbelösung über Nacht visualisiert. Das Entfärben des Gels erfolgte durch mehrmaliges Waschen mit der Entfärbelösung (2.1.4).

Tabelle 13 Herstellung des SDS-PAGE-Gels

Gel	Herstellung
7 % Sammelgel (Menge für 2 Gele)	3,7 ml Wasser 1,4 ml 30 % Acrylamid 750 µl 1,5 M Tris (pH 8,8) 60 µl 10 % SDS 60 µl 10 % APS 10 µl TEMED
12 % Trenngel (Menge für 2 Gele)	4,9 ml Wasser 6 ml 30 % Acrylamid 3,8 ml 1,5 M Tris (pH 8,8) 150 µl 10 % SDS 150 µl 10 % APS 6 µl TEMED

2.2.5. Western Blot

Der immunospezifische Nachweis der rekombinanten Proteine erfolgte mittels Antikörperbasierten Verfahren des Western-Blots. Nach Auftrennung der Proteinproben mittels SDS-PAGE wurde das Gel für 10 Minuten in einem Semidry Blotting Puffer (2.1.4) inkubiert. Die PVDF-Membran wurde eine Minute in Ethanol aktiviert und weitere fünf Minuten in Semidry Blotting Puffer inkubiert. Vier Filterpapiere wurden mit Semidry Blotting Puffer benetzt. Von der Anode zur Kathode wurden nacheinander zwei Filterpapiere, die Membran, das SDS-PAGE-Gel und zwei weitere Filterpapiere gestapelt. Die Übertragung der Proteinbanden auf eine PVDF-Membran erfolgte bei $0,8 \text{ mA/cm}^2$ für 50 Minuten. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ in Blockierungspuffer (2.1.4) inkubiert. Es folgte das dreimalige Waschen à fünf Minuten mit einem Waschpuffer (2.1.4). In einem nächsten Schritt wurde die Membran in $0,75 \text{ } \mu\text{g/mL}$ polyklonalen Primärantikörper (Anti-Mal d 1) in Blockierungspuffer für eine Stunde bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Nach erneutem Waschen ($4 \times 5 \text{ min}$) wurde die Membran für eine Stunde bei RT in Blockierungspuffer mit $0,2 \text{ } \mu\text{g/mL}$ Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen-AP) inkubiert. Die Membran wurde anschließend gründlich mit Waschpuffer ($4 \times 5 \text{ min}$) und mit Detektionspuffer ($2 \times 5 \text{ min}$) (2.1.4) gespült. Schließlich wurde die Membran in 20 mL Detektionspuffer mit $50 \text{ } \mu\text{L}$ NBT und $25 \text{ } \mu\text{L}$ BCIP im Dunkeln entwickelt. Nach Visualisierung der Banden wurde die Farbreaktion durch Spülen mit ddH₂O gestoppt.

2.2.6. Bestimmung des Mal d 1 Gehaltes mittels indirekt kompetitiven ELISA

2.2.6.1. *Proteinextraktion aus Äpfeln*

Die Proteinextraktion erfolgte nach Romer et al. (2020). Es wurde 1 g Apfelpulver unter ständiger Kühlung mit flüssigem Stickstoff in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen eingewogen. Anschließend wurden 3 mL Extraktionspuffer zugeben und für 4 Stunden bei 4 °C in einem Rotationsschüttler inkubiert. Das Gemisch wurde zentrifugiert (30 min, 4 °C, 5525 g) und der Überstand in ein frisches Gefäß überführt. Der Extrakt wurde über Nacht gegen Natriumcarbonatpuffer dialysiert (MWCO 3,5 kDa). Nach der Dialyse wurde der dialysierte Extrakt zentrifugiert (10 min, 4 °C, 16000 g) und der Überstand wurde zur Analyse mittels indirekt kompetitiven ELISA eingesetzt. Bei jeder Probenextraktion wurde ein Apfelstandard mitgeführt, der in gleicher Weise wie die Proben extrahiert wurde. Damit wurden tagesabhängige Schwankungen ausgeglichen und eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse über den gesamten Messzeitraum von drei Jahren gewährleistet.

2.2.6.2. *Analyse des Mal d 1 Gehaltes mittels indirekt kompetitiven ELISA*

Die Quantifizierung des Mal d 1 Gehaltes erfolgte mit kleinen Modifikationen nach der beschriebenen Methode von Romer et al. (2020). Das rekombinante rMal d 1.02 aus den Einschlusskörpern wurde in einer Cysteinlösung (1 mM) rückgelöst. Die Konzentration wurde nach Bradford (2.2.3) oder mittels UV/VIS unter Verwendung eines Extinktionskoeffizienten von 0,849 mL mg⁻¹ cm⁻¹ bestimmt.

In einem ersten Schritt wurde eine 96-Well-Platte mit 100 µL rMal d 1.02 beschichtet. Die Beschichtungskonzentration war abhängig von der jeweiligen Proteincharge und betrug zwischen 0,3 und 0,5 µg/mL rMal d 1.02. Die Verdünnung auf die gewünschte Konzentration erfolgte mittels Bicarbonatpuffer (2.1.4). Für den Blindwert wurden zwei Wells mit je 100 µL Bicarbonatpuffer beschichtet. Die Platte wurde bei 4 °C über Nacht inkubiert. Es folgte ein dreimaliges Waschen mit je 300 µL PBS-T Puffer. Anschließend wurden die freien Bindungsstellen der Wells mit 200 µL einem 1 %igen BSA- bzw. 2 %igen Milchpulver-Blockierungspuffer für 1 Stunde bzw. 2 Stunden blockiert. Die Wells wurden erneut mit 300 µL PBS-T Puffer gewaschen. Es wurde eine Standardkurve mit den Konzentrationen 0,0002, 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10 und 75 µg/mL erstellt und je 50 µL in je zwei Wells überführt. Als Blindwert wurden 50 µL PBS-T verwendet. Jedes Apfelextrakt wurde in der Regel unverdünnt und in einer 1:1 Verdünnung verwendet. Dabei wurden je Verdünnung drei Replikate je 50 µL

in die Wells pipettiert. In Fällen von stark konzentrierten Proben wurden abweichende Verdünnungen hergestellt, um eine Quantifizierung des Mal d 1 Gehaltes im linearen Bereich zu gewährleisten. Zusätzlich wurde in jedes Well 50 μL polyklonaler Primärantikörper (anti-Mal d 1) in einer Konzentration von 0,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($C_{\text{anti-Mal d 1}} = 929 \mu\text{g}/\text{mL}$) bzw. 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($C_{\text{anti-Mal d 1}} = 1200 \mu\text{g}/\text{mL}$) pipettiert und für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Die Platte wurde viermal mit je 300 μL PBS-T Puffer gewaschen. Anschließend wurden 100 μL von 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Sekundärantikörper (anti-Kaninchen-HRP) in die Wells pipettiert und die Platte wurde für eine weitere Stunde bei RT inkubiert. Nach fünf Waschschrritten mit je 300 μL PBS-T wurde in jedes Well 100 μL des Substrats TMB pipettiert. Dabei kam es zu einem Farbumschlag von farblos zu blau. Die Farbintensität verlief indirekt proportional zum Mal d 1 Gehalt der Probe. Nach ausreichender Farbentwicklung wurde die enzymatische Reaktion in der Regel nach 5-10 Minuten durch Zugabe von 100 μL H_2SO_4 (2 M) gestoppt. Dabei kam es zu einem erneuten Farbumschlag von blau nach gelb. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen die Referenzwellenlänge von 620 nm am Plate Reader gemessen.

2.2.6.3. Datenanalyse

Die Mal d 1 Gehalte wurden in Form von Boxplots graphisch dargestellt. Zur Bestimmung von statistisch signifikanten Ergebnissen wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgelegt. Basierend auf der einfaktorielle Varianzanalyse wurden paarweise Vergleiche mittels Tukey-Kramer post-hoc Test (implementiert in der “TukeyHSD()” Funktion in RStudio) für unbalancierte Daten verwendet. Die statistische Datenanalyse erfolgte mit R (v3.6.3) (RStudio Team 2020).

2.2.7. Lagerungsexperimente

An der Hochschule Osnabrück wurden unter der Leitung von Herr Prof. Dr. Werner Dierend Lagerungsversuche durchgeführt. Dabei wurde der Einfluss von zwei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen auf den Mal d 1 Gehalt untersucht. In einer Ultra Low Oxygen (ULO) Lagerung wurden die Äpfel bei 2,5 °C unter kontrollierter Atmosphäre mit 1,5 % O_2 , 1 % CO_2 gelagert. Durch diese Bedingungen konnte der Reifung der Äpfel gezielt entgegengewirkt werden. Die Auslagerungstermine erfolgten über einen Zeitraum von 2-3 Monaten jeweils mit einem Abstand von etwa vier Wochen zueinander (Tabelle 14). Von jedem Genotyp wurden 10 Äpfel einvakuumiert (-20 °C) und zu einer Mischprobe verarbeitet. Bei der Kühlagerung (KL) wurden die Äpfel bei 4 °C unter normaler Atmosphäre gelagert. Die Genotypen aus dem KL wurden an drei Terminen im Abstand von etwa vier Wochen nach Erreichen der Genussreife

Material und Methoden

ausgelagert (Tabelle 15). Nach der Auslagerung wurden von jedem Genotyp Mischproben aus etwa drei Äpfeln erstellt. Diese wurden einvakuumiert und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 14 Auslagerungstermine (ULO-1, ULO-2, ULO-3, ULO-4) für die Lagerungsversuche unter ULO-Bedingungen

Erntejahr	Genotyp	ULO-1	ULO-2	ULO-3	ULO-4
2019	p78	16.01.2020	18.02.2020	30.03.2020	08.05.2020
	p92	23.01.2020	18.02.2020	30.03.2020	08.05.2020
	p168	09.01.2020	18.02.2020	30.03.2020	-
	p185	09.01.2020	18.02.2020	30.03.2020	08.05.2020
	P211	09.01.2020	18.02.2020	30.03.2020	08.05.2020
2020	p78	28.01.2021	25.02.2021	06.04.2021	-
	p92	28.01.2021	25.02.2021	06.04.2021	-
	p168	28.01.2021	25.02.2021	06.04.2021	-
	p185	28.01.2021	25.02.2021	06.04.2021	-
	p211	28.01.2021	25.02.2021	06.04.2021	-

Tabelle 15 Auslagerungstermine (KL-1, KL-2, KL-3) für die Lagerungsversuche unter KL-Bedingungen

Genotyp	Genussreife	KL-1	KL-2	KL-3
p8	13.12.2016	10.01.2017	07.02.2017	07.03.2017
p14	21.11.2016	10.01.2017	07.02.2017	07.03.2017
p19	13.12.2016	10.01.2017	07.02.2017	07.03.2017
p36	21.11.2016	10.01.2017	07.02.2017	07.03.2017
p78	29.11.2016	10.01.2017	07.02.2017	07.03.2017
p124	21.11.2016	10.01.2017	07.02.2017	07.03.2017
p125	21.11.2016	10.01.2017	07.02.2017	07.03.2017
p128	21.11.2016	10.01.2017	07.02.2017	07.03.2017
p149	04.11.2016	10.01.2017	07.02.2017	07.03.2017
p158	21.11.2016	10.01.2017	07.02.2017	07.03.2017

2.2.8. Orale Provokationstests

Die Humanstudie wurde an dem Allergie-Centrum Charité in Berlin unter der Leitung von Prof. Dr. med. Karl-Christian Bergmann durchgeführt (Becker et al. 2021; Chebib et al. 2022). Die Durchführung der Studie wurde durch die Ethikkommission der Charité (Nr. EA1/311/19) genehmigt. Die Studie fand außerhalb der Birkenpollensaison statt. Es nahmen ausschließlich Patienten mit einer Birkenpollenallergie und einem oralen Allergiesyndrom gegenüber Äpfeln teil. Die Studie umfasste 10 bis 21 Probanden, darunter Frauen und Männer in einem Alter zwischen 25 und 60 Jahren. Die Probanden verkosteten, unter medizinischer Beobachtung, im

Rahmen eines oralen Provokationstests verschiedene Apfel-Genotypen. Die Verkostung erfolgte schrittweise in aufsteigenden Apfelmengen von etwa 20 g, 40 g, 80 g und dem Apfelrest. Die Dokumentation der Symptome erfolgte 20 – 30 Minuten nach jeder Apfeldosis. Zur Bewertung der Symptome wurde eine Vier-Punkte Skala von null bis drei verwendet, wobei null das Fehlen von Symptomen beschreibt, während eine Symptomstärke von drei das Auftreten von schweren Symptomen anzeigt. In der Regel wurde der orale Provokationstest beim Auftreten von klinischen Symptomen mit einem Schweregrad von zwei abgebrochen. Für jeden Genotypen wurde der Mittelwert aller Sympompunkte berechnet, um eine Einteilung der Genotypen entsprechend ihres allergenen Potentials zu ermöglichen.

2.2.9. Polyphenoloxidaseaktivität

2.2.9.1. *Extraktion der Polyphenoloxidase*

Die Extraktion der Polyphenoloxidase (PPO) erfolgte nach Kschonsek et al. (2019a). Es wurde 1 g Probe eingewogen und mit 7,5 mL Extraktionspuffer (2.1.4) versetzt. Das Gemisch wurde für eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Die Probe wurde mit einem Ultraturrex homogenisiert und anschließend zentrifugiert (30 min, 5525 g, 4 °C). Der Überstand wurde abgenommen und erneut zentrifugiert (30 min, 21000 g, 4 °C). Anschließend wurde der klare Überstand für das PPO-Assay eingesetzt.

2.2.9.2. *Polyphenoloxidase-Assay*

Das PPO-Assay wurde nach Siguemoto und Gut (2017) durchgeführt. Dazu wurde 100 µL 50 mM Phosphatpuffer (pH 6,5) und 33 µL der Probe zusammen in je sechs Wells pipettiert. Die Mischung wurde bei RT für eine Minute inkubiert. 67 µL einer frisch zubereiteten Lösung von Pyrocatechin (50 mM) wurde zugegeben. Die Extinktion bei 420 nm wurde über einen Zeitraum von drei Minuten alle 10 s gemessen. Als Blindwert dienten 133 µL Phosphatpuffer und 67 µL Substrat. Die gemessenen Extinktionswerte wurden gegen die Zeit aufgetragen. Der lineare Bereich der Aktivitätskurve wurde verwendet, um die PPO-Aktivität zu berechnen (Units/min/g). Eine PPO Aktivitätseinheit wurde mit einer Absorptionzunahme von 0,001 pro Minute definiert.

2.2.10. Kolorimetrische Methoden zur Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes

2.2.10.1. *Extraktion der Polyphenole*

Die Extraktion der Polyphenole erfolgte nach Ring et al. (2013). Es wurde 0,5 g Probe in ein 1,5 mL Eppendorf Safe-Lock Tube eingewogen und mit 500 μ L Methanol versetzt. Das Gemisch wurde mittels Vortex homogenisiert (1 min), weitere 10 Minuten im Ultraschallbad behandelt, gefolgt von einer Zentrifugation bei 16000 g, 4°C, 20 Minuten. Der erhaltene Überstand wurde in ein neues 2 mL Gefäß überführt. Der Rückstand wurde drei weitere Male wie beschrieben extrahiert. Die jeweiligen Überstände wurden vereint und in einem Rotationsvakuumkonzentrator bis zur Trockene eingengt. Eine vollständige Trocknung des Rückstands erfolgte durch eine anschließende Gefriertrocknung. Der Rückstand wurde in 1 mL 50 %iges Methanol rückgelöst.

2.2.10.2. *Folin-Ciocalteu-Assay*

Die Folin-Ciocalteu-Analyse wurde zur Ermittlung des Gesamtpolyphenolgehaltes (PG) herangezogen. Die Bestimmung des PG erfolgte nach einer Methode von Attard (2013). In einer 96-Well Mikrotiterplatte wurde in jedes Well 10 μ L Probe, 100 μ L FC-Reagenz und 80 μ L Na₂CO₃ (1M) gegeben und 2 Stunden bei RT im Dunklen inkubiert. Als Blindwert wurden 10 μ L 50 %iges Methanol an Stelle von 10 μ L Probe eingesetzt. Jede Probe wurde unverdünnt als auch verdünnt (1:1) in je drei Wells pipettiert. Die Quantifizierung erfolgte über eine 6-Punkt-Kalibrierungsgerade mit Gallussäure als Standardsubstanz. Es wurde eine Stammlösung mit der Konzentration 1000 μ g/mL angesetzt. Die Konzentrationen wurden im Bereich zwischen 0 und 400 μ g/mL gewählt. Die Messung erfolgte bei 765 nm.

2.2.10.3. *Fast Blue B-Assay*

Das FBB-Assay wurde nach Lester et al. (2012) durchgeführt. Es wurden 1 mL Probe (1:10, 1:20 verdünnt), 100 μ L 0,1 % FBB-Lösung und 100 μ L 5% NaOH in ein 2 mL Gefäß pipettiert und 90 Minuten bei RT inkubiert. Als Blindwert wurde 1 mL 50 %iges Methanol verwendet. Als Standard für die Kalibrierung wurden sieben Lösungen mit Konzentrationen von 0 bis 600 μ g/mL Gallussäure (1000 μ g/mL) eingesetzt. Die Absorption wurde bei 420 nm bestimmt.

2.2.11. Qualitative und quantitative Bestimmung von Polyphenolen mittels LC-MS

2.2.11.1. *Extraktion der Polyphenole aus Äpfeln*

Die Extraktion der Polyphenole erfolgte nach Ring et al. (2013). Es wurden 0,5 g Apfelpulver in ein 1,5 mL Eppendorf Safe-Lock Tube eingewogen und mit 250 μ L einer methanolischen Lösung des internen Standards Biochanin A ($c= 0,2$ mg/mL) versetzt. Für die Extraktion von Polyphenolen aus Pollen wurden 0,05 g des Pollenmaterials eingewogen. Das Gemisch wurde mittels Vortex homogenisiert (1 min) und anschließend mit weiteren 250 μ L Methanol versetzt. Die Proben wurden eine Minute gevortext und weitere 10 Minuten im Ultraschallbad behandelt, gefolgt von einer Zentrifugation bei 16000 g, 4°C, 20 Minuten. Der erhaltene Überstand wurde in ein neues 2 mL Gefäß überführt. Der Rückstand wurde drei weitere Male wie beschrieben extrahiert. Die jeweiligen Überstände wurden gesammelt und vereint und in einem Rotationsvakuumkonzentrator bis zur Trockene eingengt. Eine vollständige Trocknung des Rückstands erfolgte durch eine anschließende Gefriertrocknung. Das Extrakt wurde in 35 μ L ddH₂O resuspendiert und mittels Vortex homogenisiert (1 min). Es folgte die Behandlung im Ultraschallbad (10 min) und die Zentrifugation (16000 g, 4°C, 20 min). Der klare Überstand wurde in ein 200 μ L Insert in einem 1,5 mL Braunglasfläschchen überführt und mittels LC-MS analysiert.

2.2.11.2. *Qualitative Bestimmung von Polyphenolen*

Alle Polyphenole wurden anhand von Retentionszeit, m/z -Werte und Fragmentierungsmuster identifiziert (Tabelle 16). Dazu wurden die erhaltenen Spektren mit einer internen Datenbank und geeigneten Literaturdaten (Malec et al. 2014; Alonso-Salces et al. 2004b; Balázs et al. 2012) abgeglichen, um eine sichere Zuordnung der Peaks zu gewährleisten.

Material und Methoden

Tabelle 16 Identifizierte Metabolite mittels LC-MS , ihre Klassen-Zuordnung, Retentionszeiten (t_R) und Fragmentierungsmuster.

Klasse	Metabolit	Abkürzung	t _R [min]	+/-	m/z	MS2
Flavanole	Catechin	Cat	20,3	-	289	245
	Epicatechin	Epi	24,3	-	289	245
	Procyanidin	Procy	29,6	-	577	425, 289, 451, 560
	Procyanidin B ₁	Procy B1	18,6	-	577	425, 289, 451, 560
	Procyanidin B ₂	Procy B2	21,7	-	577	425, 289, 451, 560
Flavonole	Quercetin-Galactosid	Qu-Gal	33,6	-	463	303
	Quercetin-Glucuronid	Qu-Glu	35,0	-	477	301
	Quercetin-Rhamnosid	Qu-Rh	36,3	-	447	301
	Quercetin-Rutinosid	Qu-Ru	33,7	-	609	301
	Quercetin-Xylosid	Qu-Xy	34,6	+	435	303
	Quercetin-Arabinosid	Qu-Ar	35,8	+	435	303
	3,4-Dihydroxyflavon	DHF	38,4	-	269	269, 225, 121
	Kaempferol-Arabinosid	Ka-Ar	37,3	-	417	285, 175
Anthocyane	Cyanidin-Hexosid 1	Cy-Hex 1	22,2	+	449	289
	Cyanidin-Hexosid 2	Cy-Hex2	24,2	+	449	289
	Cyanidin-Pentosid 1	Cy-Pen 1	24,3	+	419	287
	Cyanidin-Pentosid 2	Cy-Pen 2	26,8	+	419	287
	Cyanidin-Pentosid 3	Cy-Pen 3	28,6	+	419	287
	Cyanidin-Pentosid 4	Cy-Pen 4	32,1	+	419	287
	Cyanidin-Pentosid 5	Cy-Pen 5	33,8	+	419	287
	Cyanidin-Pentosid 6	Cy-Pen 6	37,9	+	419	287
Zimtsäurederivate (ZSD)	Chlorogensäure	Chlsre	22,6	-	353	191
	Chlorogensäure- Glucosid	Chlsre-Glc	32	-	515	470, 353
	Chlorogensäure-Dimer	Chlsre-Di	22,6	-	707	353
	Neochlorogensäure	Neochlsre	24,7	-	353	191, 173
	Cumaroyl-Chinasäure	Cu-Chsre	25,5	-	337	173
	Cumarsäure-Glucose- Ester	Cu-Glc-Es	21,3	-	325	163, 145, 187, 235, 267
	Ferulasäure-Glucose- Ester	Fe-Glc-Es	24,3	-	355	193, 217, 175

Material und Methoden

Klasse	Metabolit	Abkürzung	t _R [min]	+/-	m/z	MS2
	Dicumaryl-Hexose	Dic-Hex	37,6	-	471	307, 163, 325, 187, 145
Dihydrochalkone (DHC)	Phloridzin	Phl	34,2	-	435	273, 167
	Phloretin-2-Xylosyl- Glucosid	Phl-2-Xy- Glc	32,6	-	567	273, 167
Sonstige	Äpfelsäure	Äpfsre	3,1	-	133	133, 115
	Citronensäure	Citsre	5,1	-	191	173, 111
	Chinasäure	Chisre	2,3	-	191	191, 111, 173
	Tryptophan	Trp	15,5	-	205	188
	Phenylalanin	Phe	10,6	+	166	120
	Glutathion reduziert	GSH	4,0	+	308	179, 162, 233, 116
	Glutathion oxidiert	GSSG	8,5	+	613	484, 355
Interner Standard	Biochanin A		40,2		283	283

2.2.11.3. Quantitative Bestimmung von Polyphenolen

Die Quantifizierung der identifizierten Metabolite erfolgte über die MS1-Spur relativ zum internen Standard (IS) Biochanin A nach folgender Formel (1):

$$c_{rel} = \frac{\left(\frac{A_{Analyt}}{A_{IS}}\right)}{E} \times m_{IS} \quad (1)$$

Es gilt:

c_{rel}	relative Konzentration [ppm IS equ]
A_{Analyt}	Peakfläche Analyt [mAU]
A_{IS}	Peakfläche interner Standard [mAU]
E	Einwaage Probe [mg]
m_{IS}	Masse interner Standard [μ g]

2.2.12. Liganden-Bindungsstudien

2.2.12.1. *Microscale Thermophoresis*

Microscale Thermophoresis wurde durchgeführt, um Liganden von rMal d 1.02 zu identifizieren (Chebib und Schwab 2021). Das Protein rMal d 1.02 (aus der löslichen Fraktion, siehe 2.2.2.4) wurde mit einem His-Tag-Markierungskit RED-tris-NTA 2nd Generation (Nanotemper Technologies GmbH, München, Deutschland) markiert. Alle Lösungen wurden in 200 μ L Reaktionsgefäße angesetzt, um Adsorptionseffekte zu minimieren.

Die Markierung wurde gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Dabei wurde das Protein rMal d 1.02 bis zu einer Endkonzentration von etwa 960 nM in PBS-T-Puffer verdünnt. Ebenso wurde der Fluoreszenzfarbstoff RED-tris-NTA in PBS-T auf eine Endkonzentration von 100 nM verdünnt. Anschließend wurden 90 μ L rMal d 1.02 (~960 nM) mit 90 μ l RED-tris-NTA (100 nM) gemischt und 30 Minuten auf Eis im Dunklen inkubiert. Das markierte Protein wurde zentrifugiert (10 min, 4 °C und 15000 g) und der Überstand wurde in ein frisches Gefäß überführt.

Die MST-Messungen wurden mit fluoreszenzmarkierten rMal d 1.02 und folgenden Ligandenkandidaten durchgeführt: GSH, GSSG, Glycin, Glutaminsäure, Quercetin-3-O-rhamnosid, (+)-Catechin und (+/-)-Epicatechin. Dabei wurden GSH, GSSG, Glycin und Glutaminsäure in PBS-Puffer gelöst, während Quercetin-3-O-rhamnosid in Bicarbonat-Puffer gelöst wurde. (+)-Catechin und (+/-)-Epicatechin wurden in DMSO gelöst. Alle Liganden wurden in PBS-T bis zur jeweiligen Zielkonzentration verdünnt. Dadurch betrug in jedem Assay der Anteil des organischen Lösungsmittels unter 5 %.

Es wurde eine Verdünnungsreihe von jedem Liganden hergestellt. Dazu wurde in je fünfzehn 200 μ L Gefäße 10 μ L des Assaypuffers vorgelegt. Ein Gefäß enthielt 20 μ L des Liganden. Es wurde eine 1:2 serielle Verdünnungsreihe hergestellt, indem beginnend von dem Gefäß mit dem Liganden je 10 μ L in das nächste Gefäß überführt wurde. Anschließend wurden wiederum 10 μ L der vorausgegangenen Verdünnung ins nächste Reaktionsgefäß gegeben. Aus dem letzten Reaktionsgefäß wurden 10 μ L entnommen und verworfen.

Die Endkonzentration von GSSG betrug 100 μ M bis 3,05 nM und 500 μ M bis 15,25 nM. Für GSH, (+)-Catechin und (+/-)-Epicatechin betrug der Konzentrationsbereich zwischen 0,001 μ M bis 30,52 nM und für Quercetin-3-O-rhamnosid von 500 μ M bis 15,25 nM. Dagegen wurden die Aminosäuren Glutaminsäure und Glycin in einem Konzentrationsbereich von 12 mM bis 366 nM bzw. 24,29 mM bis 741,27 nM eingesetzt. Allen Verdünnungen wurden 10 μ l fluoreszenzmarkiertes rMal d 1.02 zugegeben. Die Reaktionen wurden auf Eis für

mindestens 30 Minuten inkubiert und anschließend jeweils in die Kapillare durch Kapillarkräfte überführt.

Alle Messungen wurden mit einem Monolith NT.115-Gerät bei 60 % LED und hoher MST-Leistung durchgeführt. Bei jeder Analyse wurde sichergestellt, dass die Intensität des fluoreszierenden Zielmoleküls über >200 Counts mit Variationen <20 % lag und keine Proteinaggregation auftrat. Die Messungen erfolgten in mindestens zwei voneinander unabhängigen technischen Replikaten. Für GSSG wurden zwei technische Replikate für jeden Konzentrationsbereich unabhängig voneinander pipettiert und die Messungen wurden bei einer MST-on Time von 20 s analysiert. Für GSH und Quercetin-3-O-rhamnosid wurden vier bzw. drei technische Replikate gemessen und analysiert. Hierbei wurde eine MST-on Time von 10 s verwendet. Drei voneinander unabhängige technische Replikate wurden von Catechin mit rMal d 1.02 gemessen und mit einer MST-on Time von 20 s analysiert.

(+)-Epicatechin und (-)-Epicatechin wurden auch jeweils dreifach analysiert, wobei die MST-on Time 20 s bzw. 2,5 s betragen. Glutaminsäure und Glycin wurden in einem einzigen Lauf bei einer MST-on Time von 20 s analysiert. Generell wurde die MST-On Time gewählt, die ein Signal-Rausch-Verhältnis von mindestens sechs erzielte und damit eine präzise Bestimmung der Dissoziationskonstante (K_d) ermöglichte.

Laut Herstellerprotokoll kommt es bei GSH in Konzentrationen über 10 mM zu Interferenzen mit dem Farbstoff RED-tris-NTA. Daher wurden Kontrollexperimente mit einem markierten Kontrollpeptid (His₆-Peptid) und GSH, GSSG und Cystein durchgeführt, um mögliche Interaktionen mit dem Markierungsfarbstoff zu analysieren. Das lyophilisierte Kontrollpeptid wurde in PBST-T rückgelöst und auf eine Endkonzentration von 200 nM verdünnt. RED-tris-NTA wurde in PBS-T auf eine Endkonzentration von 100 nM verdünnt. Anschließend wurden 90 µl des Peptids (200 nM) zu 90 µl des Farbstoffs (100 nM) gegeben und 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Eine 16 x 1:2 Verdünnungsreihe wurde wie bereits weiter oben beschrieben, hergestellt. Die Endkonzentration von GSH und Cystein betrug 0,001 µM bis 30,52 nM und von GSSG von 0,002 µM bis 61,04 nM. GSH, Cystein und GSSG wurden jeweils in einem Einzellauf bei einer MST-on Time von 5 s, 5 s bzw. 1,5 s analysiert. Der K_d wurde nach dem Massenwirkungsgesetz gemäß Formel (2) berechnet (<https://www.manualslib.com/manual/1556718/Nano-Temper-Monolith-Nt115.html>; zuletzt aufgerufen am 10. November 2021).

$$f_{conc} = \frac{Unbound + \frac{(Bound - Unbound) \times (Conc + TargetConc + K_d - \sqrt{(Conc + TargetConc + K_d)^2 - 4 \times Conc \times TargetConc}}{2 \times TargetConc}}{2 \times TargetConc}}{2 \times TargetConc} \quad (2)$$

Es gilt:

f_{conc} = Thermophoresesignal/ Anteil der teilweise gebunden ist

$Bound$ = Maximales Signal/ Gesättigter Protein-Ligand-Komplex

$Unbound$ = Niedrigstes Signal Fluoreszenzmarkiertes Proteins im ungebundenen Zustand

$Conc$ = Absolute Konzentration des Liganden

$TargetConc$ = Absolute Konzentration des fluoreszenzmarkierten Proteins

2.2.12.2. Molekulare Dockingexperimente

Es wurden in silico Experimente mittels AutoDock Vina v1.1.2 (<http://vina.scripps.edu/>; zuletzt aufgerufen am 22. September 2021) durchgeführt (Trott und Olson 2010). Dabei wurden die Komplexe aller bekannten Liganden (GSSG, GSH, (+)-Catechin, (+/-)-Epicatechin und Quercetin-3-O-rhamnosid) und rMal d 1.02 generiert. Das rekombinante Protein wurde mit Hilfe von SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interaktiv>; zuletzt aufgerufen am 26. Juli 2021) konstruiert. Die Vorbereitung des Proteins rMal d 1.02 und der Liganden auf das Docking wurden mit AutoDockTools v1.5.6 (<http://autodock.scripps.edu/resources/adt>; zuletzt aufgerufen am 22.09.2021) vorgenommen. Dabei wurden im Protein alle Wassermoleküle entfernt, Kollman-Ladungen berechnet und polare Wasserstoffe hinzugefügt. Die hydrophobe Tasche des Proteins wurde mit Hilfe von BiteNet (<https://sites.skoltech.ru/imolecule/tools/bitenet>; zuletzt aufgerufen am 4. August 2021) bestimmt (Kozlovskii und Popov 2021). Die Gitterbox (36/36/34) wurde über die hydrophobe Tasche des Proteins gelegt. Anschließend generierte AutoDockVina für jeden Liganden neun mögliche Konformationen im Komplex mit rMal d 1.02. Die Berechnung des K_d -Wertes mit den Bindungsenergien (ΔG) gemäß AutoDockVina erfolgte nach Gleichung (3) (Seutter von Loetzen et al. 2014). Die generierten Komplexe wurden mit Hilfe von Discovery Studio v21.1.0.20298 (<https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>; zuletzt aufgerufen am 22.09.2021) visualisiert.

$$K_d = e^{-\frac{\Delta G}{R \times T}} \quad (3)$$

Es gilt:

$R = 1,986 \text{ cal/mol} \cdot \text{K}$ und $T = 298,15 \text{ K}$

2.2.13. Proteomik-Analysen mittels LC-MS/MS

2.2.13.1. Proteinextraktion

Es wurde 1 g Apfelpulver eingewogen und nach 2.2.6.1 extrahiert. Der klare Extrakt wurde mit der vierfachen Menge an eiskaltem Aceton versetzt und über Nacht bei -20 °C inkubiert (Romer et al. 2020). Anschließend wurde das Sediment durch Zentrifugation (20 min, 4°C, 5525 g) abgetrennt. Das Sediment wurde fünfmal mit 1,5 mL eiskaltem Aceton (90 %) gewaschen. Zwischen jedem Waschschritt erfolgte eine fünfminütige Zentrifugation (4 °C, 16000 g). Das gewaschene Sediment wurde im Heizblock bei 38 °C getrocknet. Anschließend wurden die Proteine aus dem Rückstand in 100 µL 2 x Laemmli-Puffer resolubilisiert. Die Proben wurden fünf Minuten bei 95 °C erhitzt und für 20 Minuten zentrifugiert (16000 g, 4 °C). Der Überstand wurde abgenommen. Die weitere Probenvorbereitung erfolgte am Bayerischen Zentrum für Biomolekulare Massenspektrometrie (BayBioMS) gemäß Romer et al. (2020).

2.2.13.2. Sequenzierung der Proteinisoformen mittels LC-MS/MS

Die tryptischen Peptide wurden am BayBioMS-Zentrum mittels LC-MS/MS analysiert gemäß Romer et al. (2020).

2.2.13.3. Datenanalyse

Die Proteinidentifizierung erfolgte über die Suchmaschine MaxQuant (Cox und Mann 2008) mit einem Datenabgleich gegen eine FASTA-Datei, die das Proteom von *Malus domestica L. Borkh* enthielt (Chebib et al. 2022). Die Fasta Datei enthielt 52099 Proteinsequenzen und wurde vom National Center for Biotechnology Information (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) heruntergeladen (Romer et al. 2020). Die Suchparameter beinhalteten Massenänderungen für die Carbamidomethylierung an Cystein-Resten für die sichere Modifikation und für die Oxidation der Methionin-Reste als potenzielle Modifikation. Korrelationsanalysen wurden nach der Pearson Methode durchgeführt (Pearson 1895; Cohen 1977). Die hierarchische Clusteranalyse wurde nach der Methode von Ward durchgeführt (Ward 1963). Dabei ersetzte die Zahl sechs, ein Wert nahe der niedrigsten detektierten Intensität, fehlende Werte im LC-MS/MS-Datensatz. Die statistischen Analysen wurden mit R (v3.6.3) durchgeführt (RStudio Team 2020).

2.2.13.4. Erstellung des phylogenetischen Baums

Von allen Mal d Isoformen wurde ein phylogenetischer Baum nach dem Verfahren der Neighbour-Joining-Methode erstellt (Saitou und Nei 1987). Die Generierung des Baums erfolgte mit Geneious Prime (v. 2021.2.2) (<https://www.geneious.com>) und die Annotation mittels iTOL (v. 6; Letunic und Bork (2021)) (Chebib et al. 2022). Als genetisches Distanzmodell wurde Jukes-Cantor gewählt. Zur besseren Visualisierung wurden die Verzweigungen transformiert. Dadurch ist eine Angabe des Maßstabs nicht möglich. Die Unterteilung in Mal d 1 Gruppen erfolgte gemäß den Einträgen der NCBI-Datenbank. Bei Proteinisoformen für die keine Gruppenzuordnung gemäß NCBI-Datenbank möglich war, erfolgte die Zuordnung nach ihren phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnissen.

3. Ergebnisse

3.1. Herstellung und Reinigung des rekombinanten Proteins rMal d 1.02

Für die Bestimmung des Allergengehaltes mittels ELISA und für die Ligandenstudien mittels Microscale Thermophoresis wurde rekombinantes rMal d 1.02 in *E.coli* BL21 (DE3) pLysS Zellen produziert.

Im Gegensatz zu dem aus der löslichen Fraktion gewonnenen rMal d 1.02 wurde das rMal d 1.02 aus den Einschlusskörpern unter denaturierenden Bedingungen solubilisiert und in einem folgenden Dialyseschritt renaturiert. In beiden Fällen erfolgte die Aufreinigung mittels Metallaffinitätschromatographie. Abbildung 8 zeigt die qualitative Analyse der Proteine über SDS-Gelelektrophorese mit Coomassie-Färbung und den dazugehörigen Western Blot für (a) die Proteine aus der löslichen und (b) die Proteine aus der unlöslichen Fraktion.

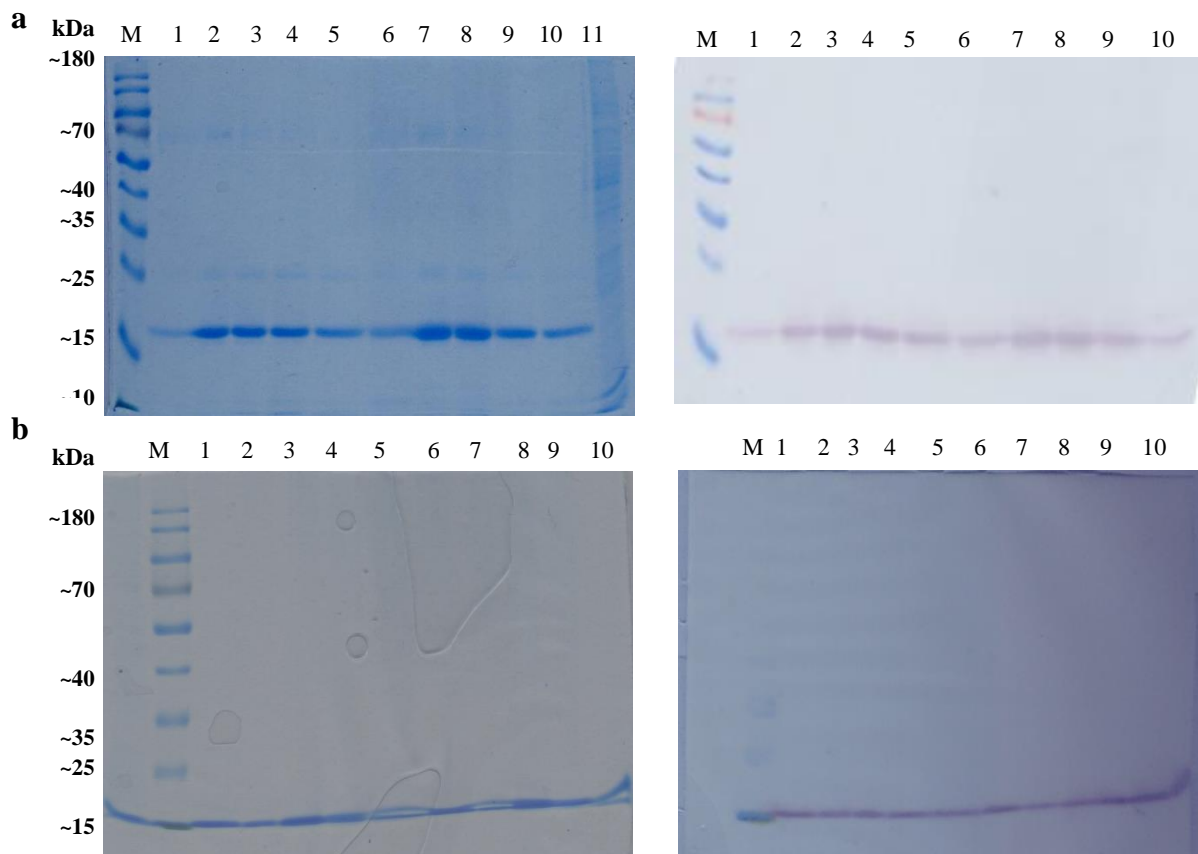


Abbildung 8 SDS-PAGE und Western-Blot von rMal d 1.02 der löslichen (a) und unlöslichen (b) Fraktion. (a) M: Marker; 1-5: Elutionen von Kultur 1; 6-10: Elutionen von Kultur 2; 11: Durchfluss. (b) M: Marker; 1-5: Elutionen von Kultur 1; 6-10: Elutionen von Kultur 2.

Die SDS-PAGE Analyse zeigt für die Proteine aus der löslichen Fraktion in allen Elutionsfraktionen weitere Banden neben der für Mal d 1 charakteristischen Bande bei ca. 18 kDa. Im Gegensatz dazu zeigt das Gel der SDS-PAGE von den Einschlusskörpern ausschließlich die Mal d 1 Bande in der jeweiligen Elutionsfraktion. Sowohl die Proteine aus der löslichen als auch unlöslichen Fraktion konnten mittels Western-Blot-Analyse eindeutig als Mal d 1 identifiziert werden. Das aus den Einschlusskörpern gewonnene Protein wurde aufgrund des hohen Reinheitsgrades sowohl zur Produktion des polyklonalen Antikörpers eingesetzt als auch zur Bestimmung des Allergengehaltes mittels indirekt kompetitiven ELISA. Dagegen wurde für die Ligandenstudien das Protein aus der löslichen Fraktion verwendet, da das rMal d 1.02 in dieser Fraktion bereits in nativer Form vorlag. Eine richtig gefaltete native Proteinstruktur besitzt die für die biologische Funktionalität wichtigen Ligandenbindungsstellen.

3.2. Bestimmung des Mal d 1 Gehaltes mittels indirekt kompetitiven ELISA

Im Rahmen dieser Arbeit wurden in Langzeitstudien Apfel-Genotypen über mehrere Jahre auf ihren Allergengehalt mittels indirekt kompetitiven ELISA untersucht, um die Abhängigkeit von Genotyp und Mal d 1 Gehalt zu analysieren und um solche Genotypen mit konstant niedrigen Mal d 1 Gehalten zu identifizieren. Anhand ausgewählter Genotypen wurde außerdem der Einfluss verschiedener Lagerungsbedingungen untersucht. Das allergene Potential verschiedener Genotypen wurde mit Hilfe von Humanstudien bewertet.

3.2.1. Mal d 1 Konzentrationen in Genotypen der Selektionsstufe 1

Die Selektionsstufe 1 enthält die anhand von verschiedenen Parametern von den Züchtern vorselektierten Nachkommen der Kreuzungspopulationen. Verschiedene Genotypen der ersten Selektionsstufe wurden in mehreren, zum Teil aufeinanderfolgenden, Jahren auf ihren Mal d 1 Gehalt untersucht. Abbildung 9 zeigt die Mal d 1 Konzentrationen von Genotypen in den Jahren 2017, 2019, 2020 und Abbildung 10 die Mal d 1 Gehalte in den Jahren 2018, 2019 und 2020. Weitere Ergebnisse aus der Selektionsstufe 1 sind im Anhang unter 5.3 aufgeführt. Es konnten signifikante Unterschiede im Allergengehalt zwischen den Genotypen und innerhalb eines Genotyps über mehrere Erntejahre beobachtet werden. Der Konzentrationsbereich für alle untersuchten Proben aus dem Jahr 2017 ($n = 85$) lag im Durchschnitt zwischen 0,38 und 13,5 μg Mal d 1/ g FG. Die Genotypen aus dem Jahr 2018 ($n = 107$) zeigten durchschnittliche Konzentrationen zwischen 0,54 und 38,07 μg Mal d 1/ g FG, aus dem Jahr 2019 ($n = 26$)

Ergebnisse

Konzentrationen zwischen 0,50 und 29,81 $\mu\text{g Mal d1/ g FG}$ und aus dem Jahr 2020 (n = 31) Konzentrationen zwischen 1,28 und 38,07 $\mu\text{g Mal d1/ g FG}$. Einige Genotypen zeigten über die Erntejahre 2017 bis 2020 einen Anstieg des Allergengehaltes (Genotyp 24-30, 39-77, 54-105, 24-56, 28-37, 50-157 und 48-38) (Abbildung 9). Während viele Genotypen vor allem zwischen den Erntejahren 2017 und 2019 einen Anstieg im Mal d 1 Gehalt verzeichneten, erwies sich der Mal d 1 Gehalt des Genotyps 24-30 zwischen den beiden Jahren als stabil. Weiterhin zeigten einige Genotypen in den Jahren 2018, 2019 und 2020 eine signifikante Zunahme des Mal d 1 Gehaltes (Genotyp 26-62, 26-14 und 21-55) (Abbildung 10). Andere Genotypen zeigten wiederum eine signifikante Abnahme des Allergengehaltes, wie etwa 26-39, 53-128, 27-8 und 49-131 (Abbildung 10). Es lässt sich kein allgemeingültiger Trend erkennen. Die Entwicklung des Mal d 1 Gehaltes ist maßgeblich vom Genotyp beeinflusst. Daneben konnte auch ein Umwelteinfluss festgestellt werden, was an der Variation der Mal d 1 Gehalte für den jeweiligen Genotypen über die verschiedenen Erntejahre erkennbar ist.

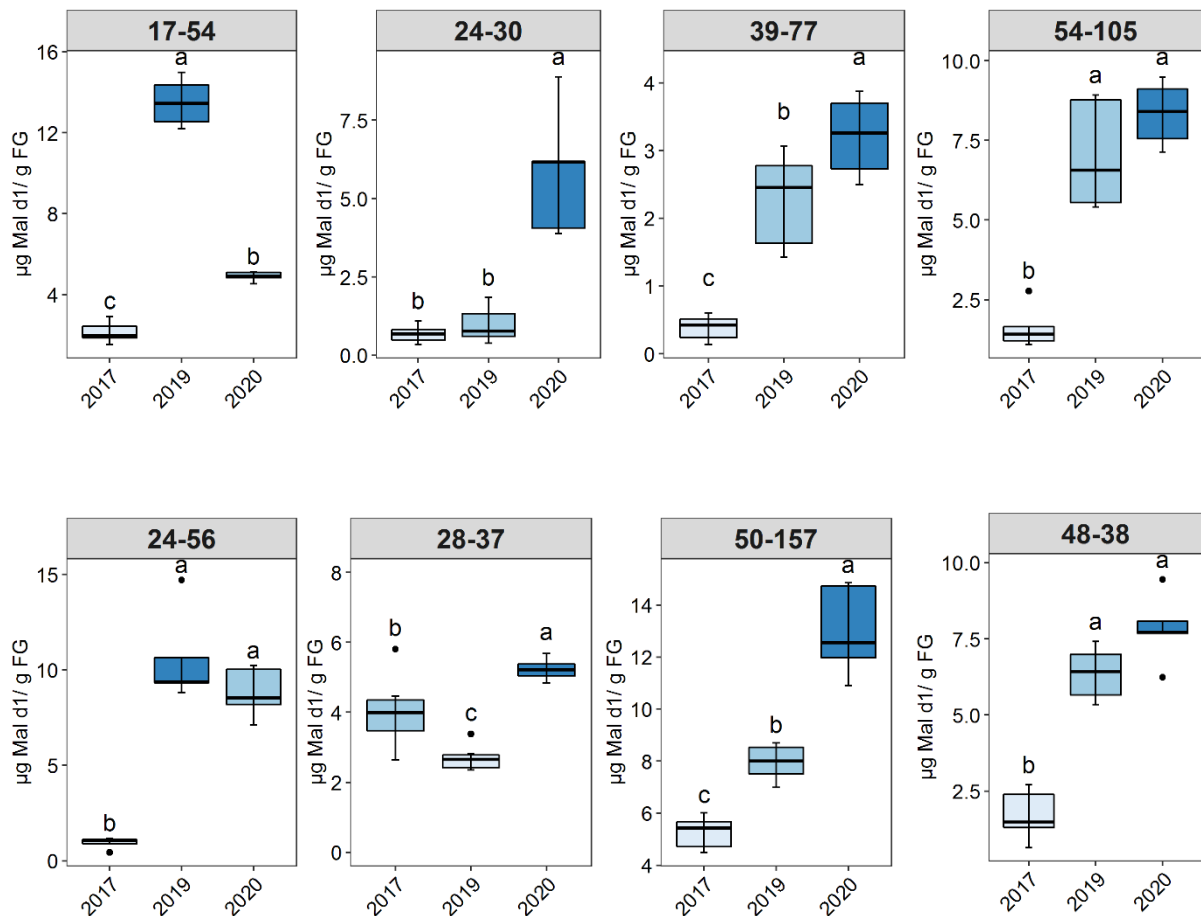


Abbildung 9 Mal d 1 Gehalte verschiedener Genotypen aus Selektionsstufe 1 in den Erntejahren 2017, 2019 und 2020. Die Boxen sind nach aufsteigendem Median von weiß über hellblau bis dunkelblau gefärbt. Paarweise Vergleiche wurde mit dem Post Hoc Test Tukey-Kramer HSD durchgeführt. Unterschiedliche Kennbuchstaben zeigen einen signifikanten Unterschied mit $p < 0,05$.

Ergebnisse

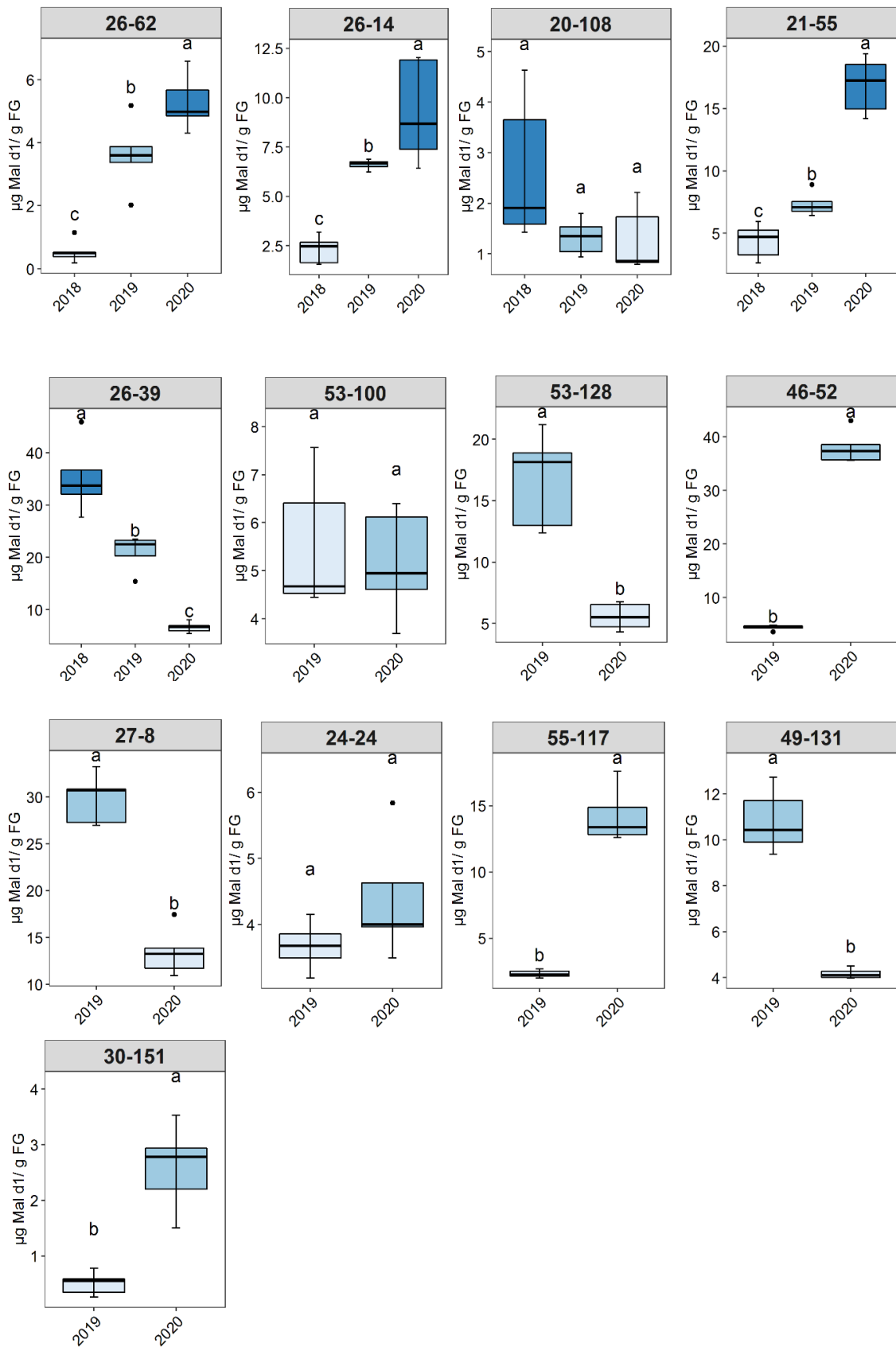


Abbildung 10 Mal d 1 Gehalte verschiedener Genotypen aus Selektionsstufe 1 in den Erntejahren 2018, 2019 und 2020. Die Boxen sind nach aufsteigendem Median von weiß über hellblau bis dunkelblau gefärbt. Paarweise Vergleiche wurde mit dem Post Hoc Test Tukey-Kramer HSD durchgeführt. Unterschiedliche Kennbuchstaben zeigen einen signifikanten Unterschied mit $p < 0,05$.

3.2.2. Mal d 1 Konzentrationen in Genotypen der Selektionsstufe 2

3.2.2.1. Ausgewählte Elternsorten und Apfel-Klone

Innerhalb der Selektionsstufe 2 wurden verschiedene Elternsorten aus dem Erntejahr 2018 auf ihren Mal d 1 Gehalt untersucht (Abbildung 11). Die Allergengehalte der Elternsorten variierten sehr stark mit Mal d 1 Gehalten zwischen 3,37 und 70,97 μg Mal d 1/ g FG. Die Sorten Delbarestivale, Fuji und Pinova sind Beispiele für Sorten mit einer niedrigen Mal d 1 Konzentration, während die Sorten Honeycrunch, Recolor und Retina die höchsten Gehalte aufwiesen.

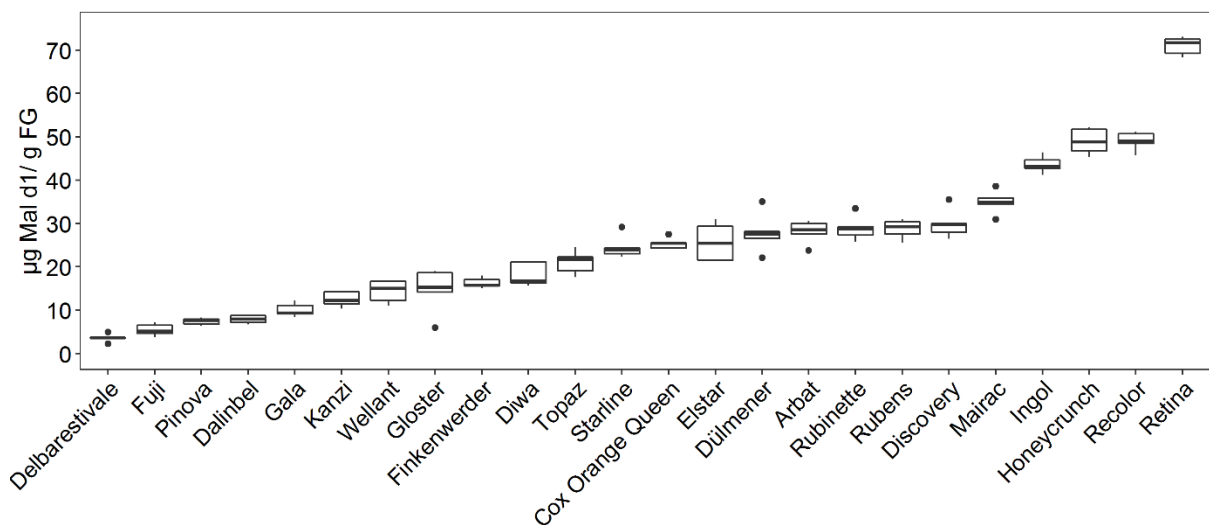


Abbildung 11 Mal d 1 Gehalte ausgewählter Genotypen der Selektionsstufe 2 aus dem Erntejahr 2018. Jede Box setzt sich aus den Bestimmungen von mindestens fünf technischen Replikaten zusammen.

3.2.2.2. Rotfleischige und weißfleischige Genotypen verschiedener Standorte

Weiterhin wurden neben weißfleischigen Genotypen auch rotfleischige Genotypen von verschiedenen Anbaugebieten auf ihren Mal d 1 Gehalt untersucht (Abbildung 12). Darunter waren neun weißfleischige und acht rotfleischige Proben aus Esteburg (Jork in Norddeutschland), 15 rotfleischige und zwei weißfleischige Genotypen aus Frankreich (Westfrankreich), sowie ein rotfleischiger Genotyp aus Italien und sechs weißfleischige Genotypen vom Standort Bodensee. Die ermittelten Mal d 1 Gehalte von rotfleischigen Äpfeln bewegten sich zwischen 0,23 und 30,56 $\mu\text{g}/\text{g}$ FG. Betrachtet man nur die untersuchten rotfleischigen Proben vom Standort Esteburg und Italien, lagen alle rotfleischigen Genotypen unter einer Mal d 1 Konzentration von 4 $\mu\text{g}/\text{g}$ FG. Die höchsten Gehalte konnten für rotfleischige Genotypen des Standortes Frankreich ermittelt werden. Dabei besitzen die sechs Genotypen RF-10, RF-13, RF-11, RF-14, RF-18, RF-17 Gehalte über 4 $\mu\text{g}/\text{g}$ FG. In der Gruppe

der weißfleischigen Äpfel wurden Gehalte zwischen 1,78 und 25,51 µg/g FG ermittelt. Dabei zeigten die Genotypen (WF-16, WF-12) der Standorte Frankreich und Bodensee die höchsten Gehalte.

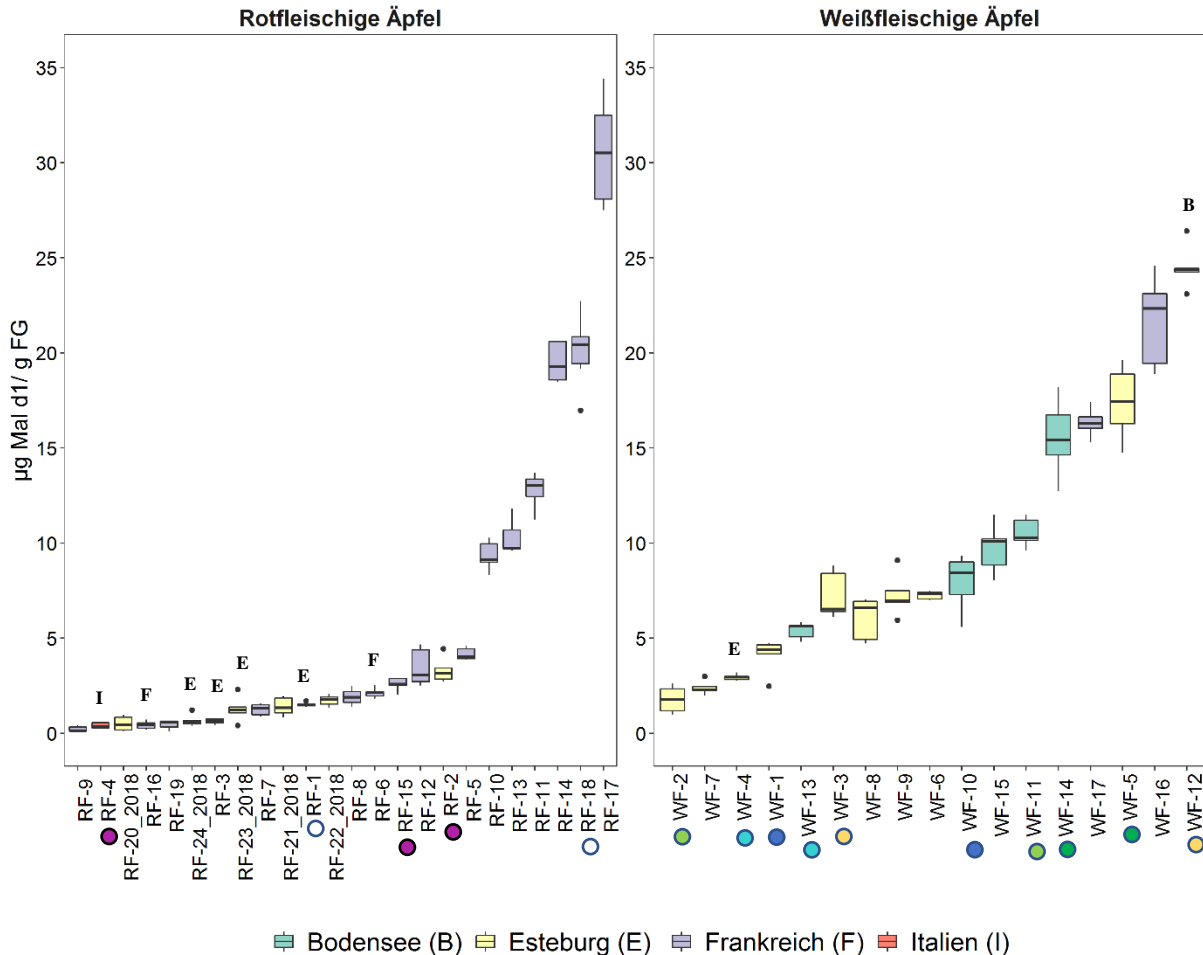


Abbildung 12 Rotfleischige (links) und weißfleischige (rechts) Äpfel aus dem Erntejahr 2018 und 2019 von den Standorten Bodensee (B), Esteburg (E), Frankreich (F) und Italien (I). Genotypen aus dem Erntejahr 2018 sind in der Bezeichnung kenntlich gemacht; alle übrigen Genotypen stammen aus dem Erntejahr 2019. Jede Box setzt sich aus den Bestimmungen von mindestens fünf technischen Replikaten zusammen. Identische Genotypen, die an unterschiedlichen Standorten angebaut wurden, sind mit einem Kreis derselben Farbe neben der Proben-Bezeichnung kenntlich gemacht.

Einige Genotypen wurden an verschiedenen Standorten angebaut und wiesen signifikante Unterschiede in ihrem Mal d 1 Gehalt auf. Der Mal d 1 Gehalt von RF-4 aus Italien zeigte einen signifikant niedrigeren Mal d 1 Gehalt als die gleichen Genotypen RF-2 und RF-15 der Standorte Esteburg und Frankreich. Auch der Genotyp RF-18 aus Frankreich wies höhere Mal d 1 Gehalte auf als der äquivalente Genotyp aus Esteburg. Weiterhin wurden von den Genotyp-Paaren WF-4 (Esteburg)/ WF-13 (Bodensee), WF-2 (Esteburg)/ WF-11 (Bodensee), WF-1 (Esteburg)/ WF-10 (Bodensee) und WF-3 (Esteburg)/ WF-12 (Bodensee) jeweils signifikant höhere Mal d 1 Gehalte für den Genotyp des Standortes Bodensee bestimmt.

3.2.3. Biologische Variabilität des Mal d 1 Gehaltes

Für die Beurteilung der biologischen Variabilität des Mal d 1 Gehaltes wurden je 10 biologische Replikate von sieben Genotypen über zwei Jahre auf ihren Allergengehalt untersucht (Abbildung 13, Abbildung 14, Abbildung 15). Weitere Ergebnisse zur intra-Variabilität des Mal d 1 Gehaltes sind im Anhang unter 5.5 zu finden. Der Genotyp p22 zeigte im Erntejahr 2019 durchschnittliche Allergengehalte zwischen 1,13 und 11,34 $\mu\text{g/g}$ FG und im Erntejahr 2020 Allergengehalte zwischen 7,06 und 17,46 $\mu\text{g/g}$ FG. Die Variabilität von p22 war über beide Jahre vergleichbar, auch wenn insgesamt höhere Mal d 1 Gehalte für das Erntejahr 2020 bestimmt wurden. Ähnlich verhielt es sich für den Genotyp p27, der in beiden Jahren ähnliche biologische Schwankungen zeigte (Abbildung 13). Die Mal d 1 Gehalte von den Genotypen p188, p143 und p34 im Jahr 2019 variierten um das bis zu 4-fache, wobei teilweise hohe Schwankungen zwischen den Einzelmesswerten beobachtet wurden (Abbildung 13, Abbildung 14). Im Erntejahr 2020 zeigten die Genotypen p188, p143 und p34 dagegen ähnliche Mal d 1 Gehalte zwischen den analysierten biologischen Replikaten (Abbildung 13, Abbildung 14). Im Gegensatz dazu wies der Genotyp p124 eine niedrigere intra-Variabilität mit Mal d 1 Gehalten zwischen 7,77 und 11,76 μg Mal d 1/g FG im Jahr 2019 auf, während im Erntejahr 2020 deutlich stärkere Variationen im Mal d 1 Gehalt mit Werten zwischen 4,38 und 15,71 μg Mal d 1/g FG ermittelt wurden (Abbildung 14). Die untersuchten Replikate des Genotyps p160 zeigten überwiegend konstant niedrige Werte über beide Erntejahre (Abbildung 15). Nur im Jahr 2019 wurde ein biologisches Replikat von p160 mit einem deutlich höheren Wert von über 10 $\mu\text{g/g}$ FG identifiziert. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die biologische Variabilität des Mal d 1 Gehaltes je nach Genotyp unterschiedlich stark variiert und für denselben Genotyp über zwei Erntejahre nicht immer in gleicher Weise ausgeprägt ist.

Ergebnisse

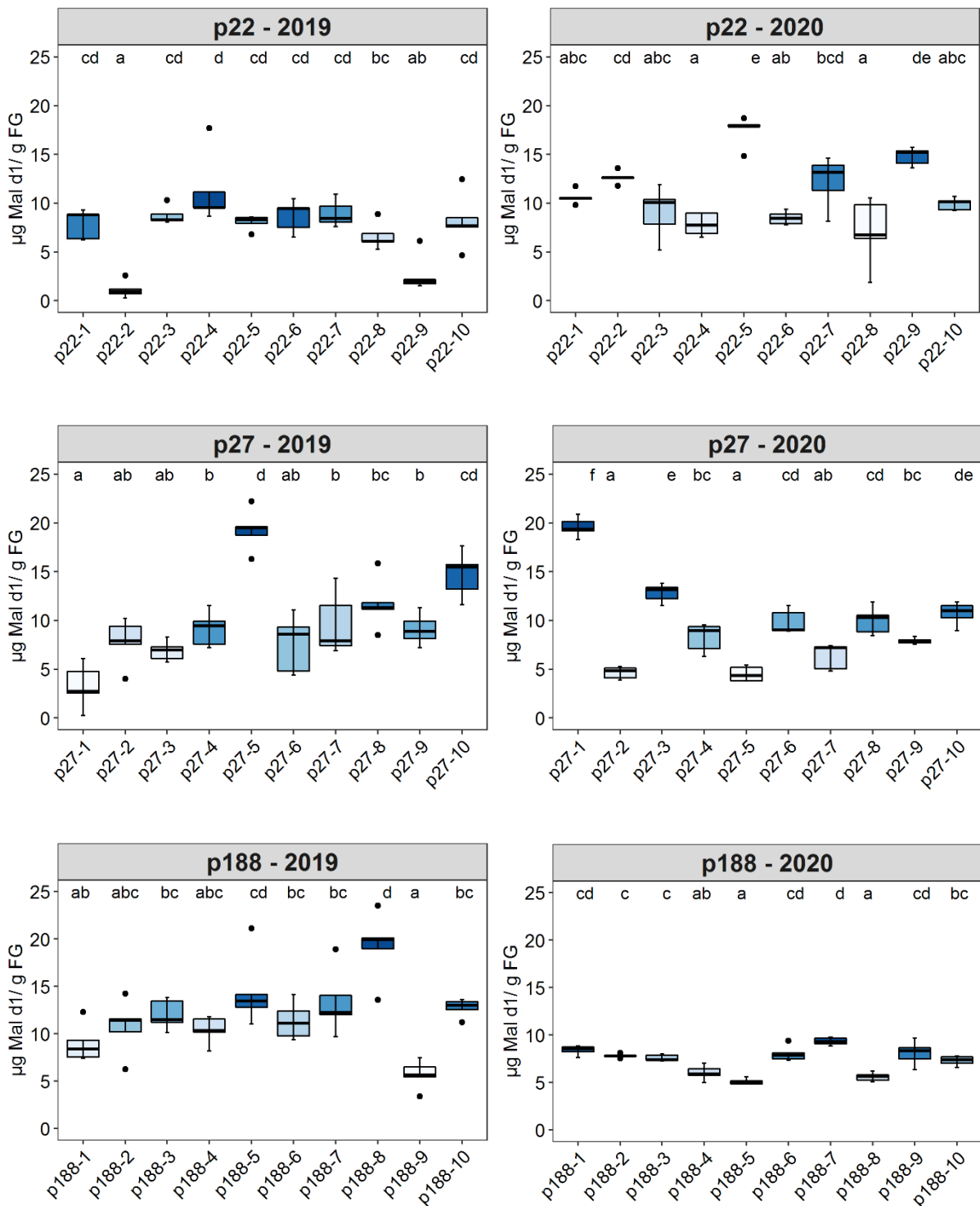


Abbildung 13 Mal d 1 Gehalte von zehn biologischen Replikaten der Genotypen p22, p27 und p188 über zwei Erntejahre (2019, 2020). Jede Box setzt sich aus den Bestimmungen von mindestens fünf technischen Replikaten zusammen. Die Boxen sind nach aufsteigendem Median von weiß über hellblau bis dunkelblau gefärbt. Paarweise Vergleiche wurden mit dem Post Hoc Test Tukey-Kramer HSD durchgeführt. Unterschiedliche Buchstaben zeigen einen signifikanten Unterschied mit $p < 0,05$.

Ergebnisse

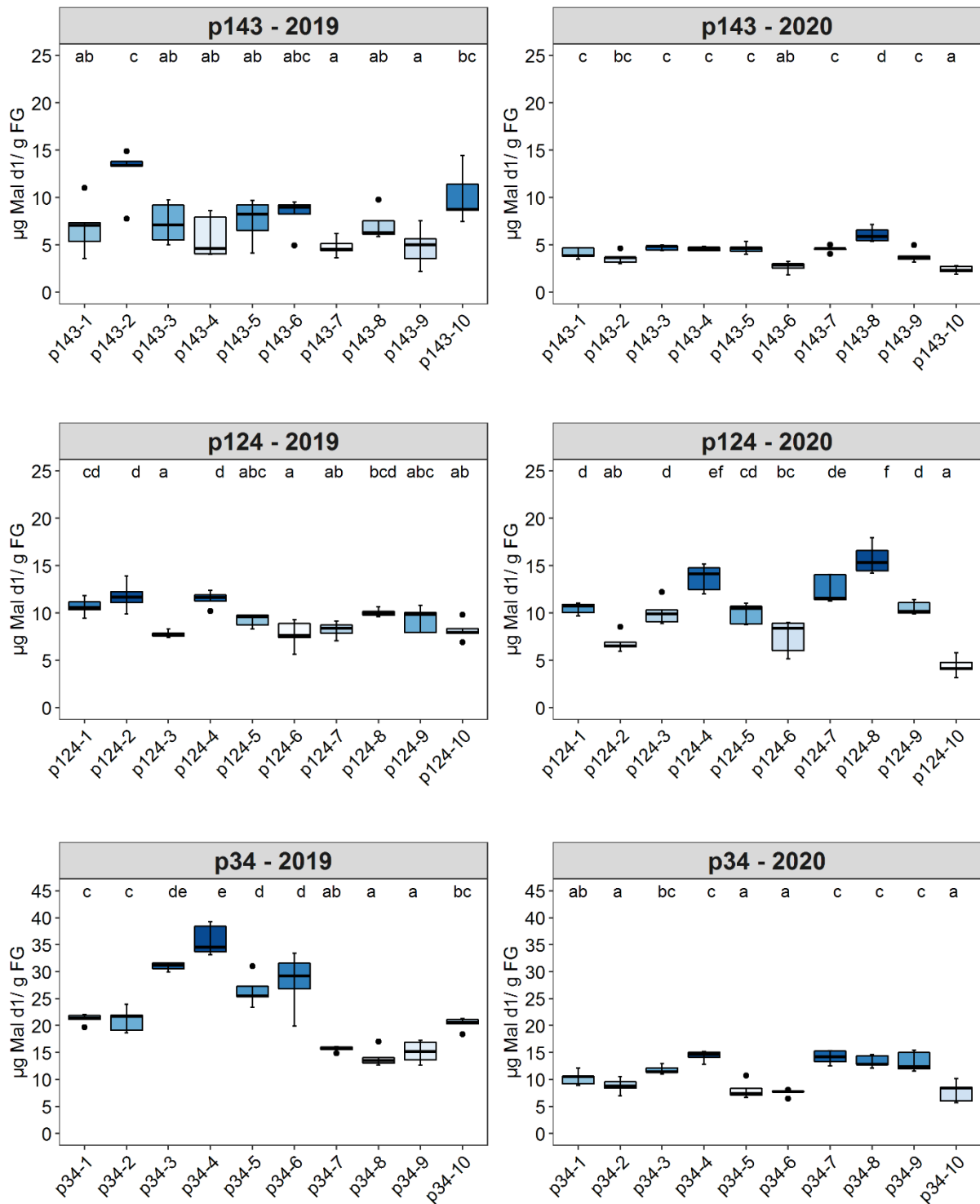


Abbildung 14 Mal d 1 Gehalte von zehn biologischen Replikaten der Genotypen p143, p124 und p34 über zwei Erntejahre (2019, 2020). Jede Box setzt sich aus den Bestimmungen von mindestens fünf technischen Replikaten zusammen. Die Boxen sind nach aufsteigendem Median von weiß über hellblau bis dunkelblau gefärbt. Paarweise Vergleiche wurden mit dem Post Hoc Test Tukey-Kramer HSD durchgeführt. Unterschiedliche Buchstaben zeigen einen signifikanten Unterschied mit $p < 0,05$.

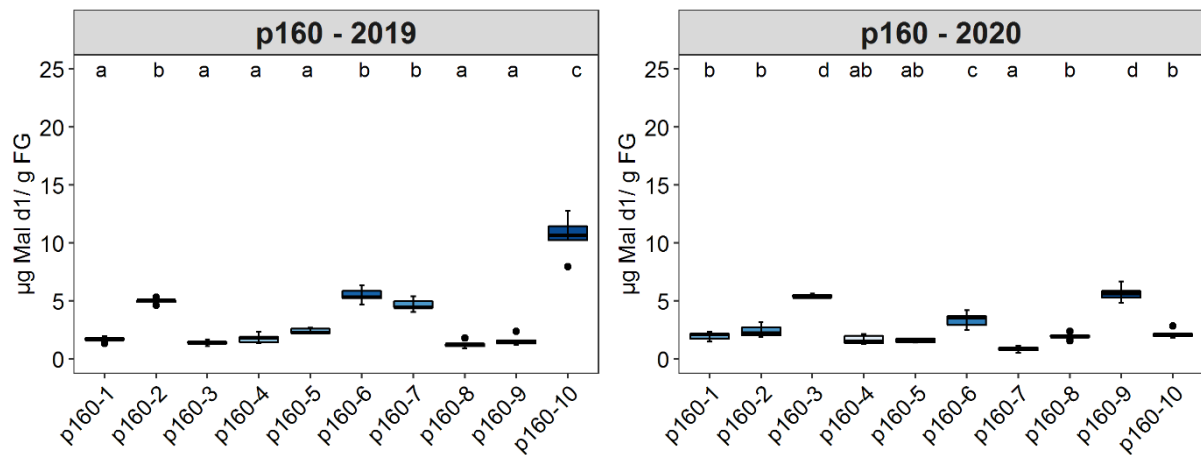


Abbildung 15 Mal d 1 Gehalte von zehn biologischen Replikaten des Genotyps p160 über zwei Erntejahre (2019, 2020). Jede Box setzt sich aus den Bestimmungen von mindestens fünf technischen Replikaten zusammen. Die Boxen sind nach aufsteigendem Median von weiß über hellblau bis dunkelblau gefärbt. Paarweise Vergleiche wurden mit dem Post Hoc Test Tukey-Kramer HSD durchgeführt. Unterschiedliche Buchstaben zeigen einen signifikanten Unterschied mit $p < 0,05$.

3.2.4. Einfluss der ULO-Lagerung auf den Mal d 1 Gehalt

Für eine kleine Auswahl von Genotypen wurde der Einfluss der Lagerung unter ULO-Bedingungen über zwei Erntejahre (2019, 2020) untersucht. Dabei wurde der Mal d 1 Gehalt im Jahr 2019 über vier (bzw. drei für p168) und im Jahr 2020 über drei Auslagerungstermine bestimmt (Abbildung 16). Die Genotypen p185, p211 und p168 zeigten über den gesamten Lagerungszeitraum kaum signifikante Unterschiede in ihren Mal d 1 Gehalten. Dabei konnten für die Genotypen p185 (2019, 2020) und p211 (2019) eine signifikante Abnahme des Mal d 1 Gehaltes ermittelt werden, während der Mal d 1 Gehalt von p168 signifikant zunahm.

Der Mal d 1 Gehalt von dem Genotyp p78 aus dem Erntejahr 2019 nahm zwischen dem ersten und zweiten Auslagerungstermin signifikant ab, zeigte jedoch keine weiteren signifikanten Unterschiede zwischen dem zweiten und vierten Auslagerungstermin. Im Jahr 2020 wurde für p78 zunächst eine Abnahme der Mal d 1 Konzentration von 5,1 auf 2,1 $\mu\text{g Mal d 1/g FG}$ festgestellt, gefolgt von einer Zunahme im dritten Auslagerungstermin mit einem Gehalt von 9,06 $\mu\text{g Mal d 1/g FG}$. Ähnlich verhielt es sich für den Genotyp p92. Im Jahr 2019 wurden vom ersten bis dritten Auslagerungstermin sinkende Tendenzen des Mal d 1 Gehaltes beobachtet, gefolgt von einer leichten Erhöhung, die sich jedoch nicht signifikant von dem Gehalt des ersten Auslagerungstermins unterschied. Im Folgejahr wurde für den Genotyp im Verlauf der Lagerung eine signifikante Erhöhung des Allergengehaltes von 10,96 auf 17,21 $\mu\text{g Mal d 1/g FG}$ bestimmt.

Ergebnisse

Insgesamt zeigten die ULO-Lagerungsversuche eine genotypabhängige Entwicklung des Mal d 1 Gehaltes mit zunehmender Lagerung, wobei in den meisten Fällen eine abnehmende Tendenz oder keine Veränderung des Mal d 1 Gehaltes festgestellt werden konnte.

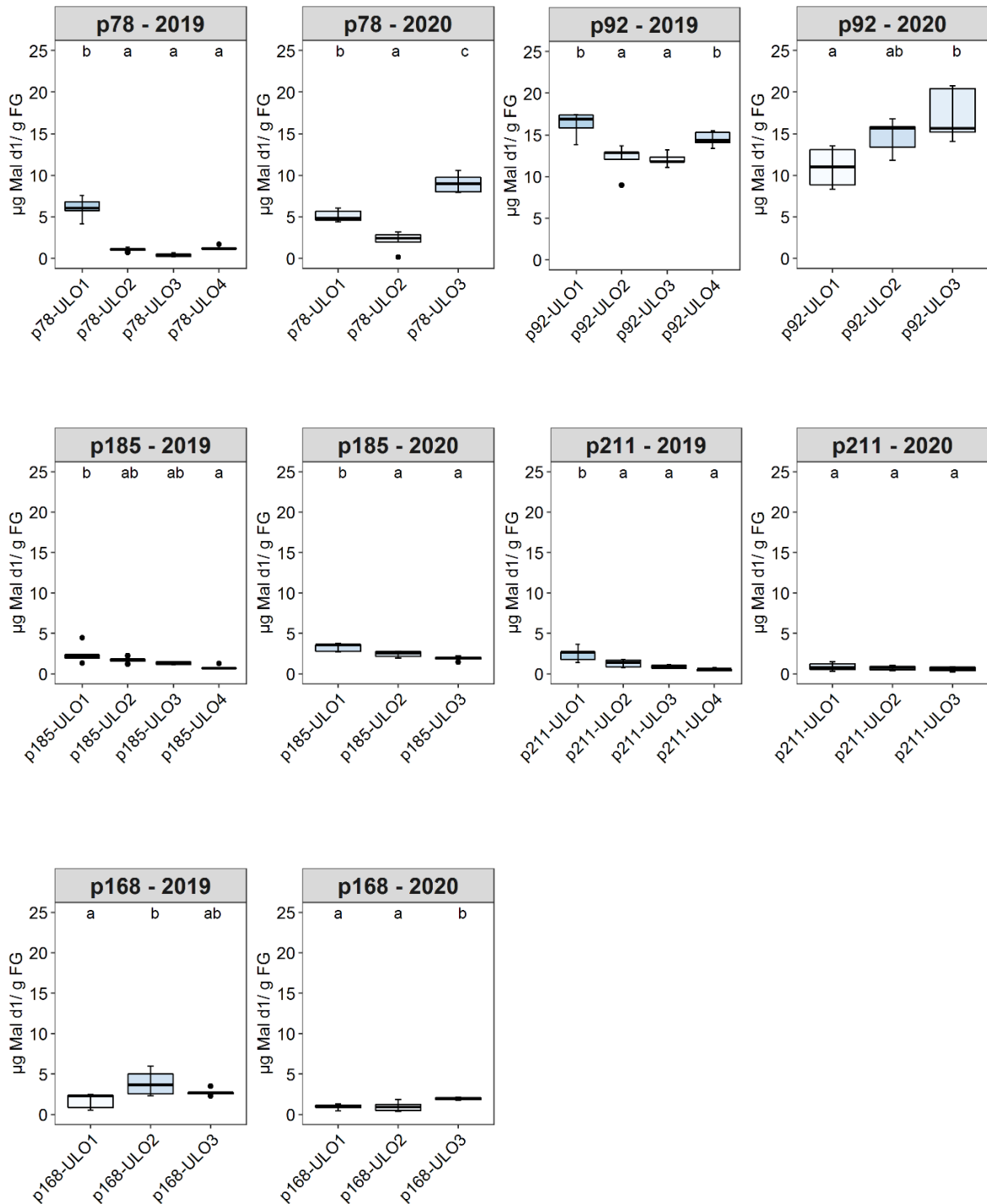


Abbildung 16 Mal d 1 Gehalte verschiedener Genotypen während der ULO-Lagerung. Im Jahr 2019 wurden von vier und im Jahr 2020 von drei Auslagerungsterminen die Mal d 1 Gehalte bestimmt. Jede Box setzt sich aus den Bestimmungen von mindestens fünf technischen Replikaten zusammen. Die Boxen sind nach aufsteigendem Median von weiß über hellblau bis dunkelblau gefärbt. Paarweise Vergleiche wurden mit dem Post Hoc Test Tukey-Kramer HSD durchgeführt. Unterschiedliche Buchstaben zeigen einen signifikanten Unterschied mit $p < 0,05$.

3.2.5. Einfluss der Kühlagerung auf die Mal d 1 Konzentration

Der Einfluss der Kühlagerung wurde anhand von zehn Genotypen aus dem Erntejahr 2016 untersucht (Abbildung 17). Dabei wurde die Genussreife der eingelagerten Äpfel bei dem ersten Auslagerungstermin bereits um etwa einen bis maximal zwei Monate überschritten. Die weitere Entwicklung des Mal d 1 Gehaltes wurde in den folgenden zwei Monaten an je zwei weiteren Auslagerungsterminen bestimmt. Die genauen Auslagerungstermine sind in Kapitel 2.2.7 (Tabelle 15) zu finden.

Es wurden signifikante Unterschiede zwischen den Mal d 1 Gehalten im Verlauf der Lagerung festgestellt. Die Genotypen p14, p78 und p149 zeigten eine signifikante Abnahme des Mal d 1 Gehaltes. Der Mal d 1 Gehalt von p14 sank auf etwa 40 %, von p149 auf 32 % und von p78 auf 17 % des ursprünglichen Gehaltes. Andere Genotypen wie p128 und p19 zeigten zunächst eine Zunahme ihres Mal d 1 Gehaltes, gefolgt von einer Abnahme im dritten Auslagerungstermin, wobei der hier bestimmte Gehalt signifikant höher war im Vergleich zu dem Wert aus dem ersten Auslagerungstermin. Die Genotypen p125, p158, p124 und p36 zeichneten sich über einen signifikanten Anstieg der Mal d 1 Konzentration aus. Dabei verdoppelten bis vervierfachten sich die Gehalte mit zunehmender Lagerung.

Zusammenfassend kam es je nach Genotyp zu einer Ab- bzw. Zunahme des Mal d 1 Gehaltes bei Überschreitung der Genussreife unter Kühlagerungsbedingungen.

Ergebnisse

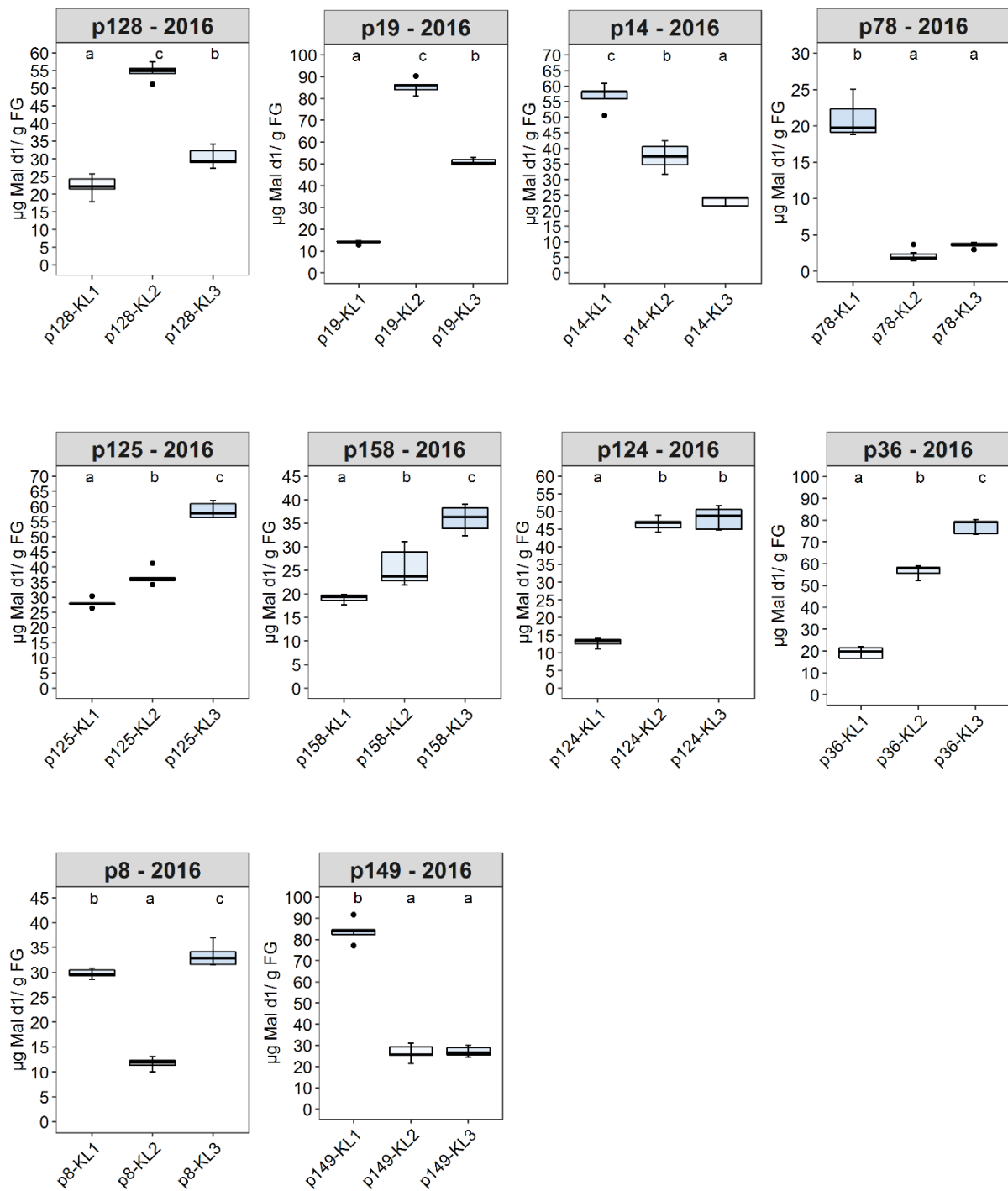


Abbildung 17 Entwicklung des Mal d1 Gehaltes von Genotypen aus dem Jahr 2016 mit zunehmender Lagerung über drei Auslagerungszeitpunkte unter Kühlagerungsbedingungen (KL1-3). Jede Box setzt sich aus den Bestimmungen von mindestens fünf technischen Replikaten zusammen. Die Boxen sind nach aufsteigendem Median von weiß über hellblau bis dunkelblau gefärbt. Paarweise Vergleiche wurden mit dem Post Hoc Test Tukey-Kramer HSD durchgeführt. Unterschiedliche Buchstaben zeigen einen signifikanten Unterschied mit $p < 0,05$.

3.2.6. Klinische Studie mittels oraler Provokationstests

Ausgewählte Genotypen wurden von Birkenpollenallergikern mit einem oralen Allergiesyndrom auf ihre Verträglichkeit mittels oraler Provokationstests an dem Allergie-Centrum-Charité in Berlin untersucht. Bei den üblichen Symptomen handelte es sich um Kribbeln, Jucken und Anschwellen von Lippen, Mund und Zunge, sowie dem Anschwellen der Mundschleimhaut. Diese können in der Intensität von Patient zu Patient stark variieren. In einer Skala von null bis drei bewerteten die Patienten die Stärke ihrer Symptome, wobei null das Ausbleiben von Symptomen und drei das Auftreten von besonders starken Symptomen beschreibt. Für die Auswertung der Humantests wurden die Gesamt-Symptome nach der Verkostung von 80 g und dem Apfelrest gemittelt und mit der jeweiligen gemessenen Mal d 1 Konzentration in Relation gesetzt. Fünf Genotypen, die sich bereits über mehrere Jahre durch einen niedrigen Allergen-Gehalt und eine gute Verträglichkeit auszeichneten, wurden von etwa 20 Probanden verkostet (Abbildung 18). Weiterhin wurden Humantests mit einer kleineren Probandenanzahl durchgeführt, um einen möglichen Mal d 1-Schwellenwert zu definieren, dessen Überschreitung mit einer erhöhten Symptomatik verbunden ist (Abbildung 19). Viele der Genotypen wurden von den Probanden gut vertragen, wie etwa p168, p185 und p92 (Abbildung 18). Dabei traten keine bis lediglich schwache Symptome auf. Die Mal d 1 Gehalte von gut verträglichen Genotypen lagen zwischen 1,35 und 22,08 $\mu\text{g/g}$ FG. Die Genotypen p211, p78, p197, p42, p128 und p9 wurden von den Patienten im Durchschnitt schlechter vertragen (Abbildung 18, Abbildung 19).

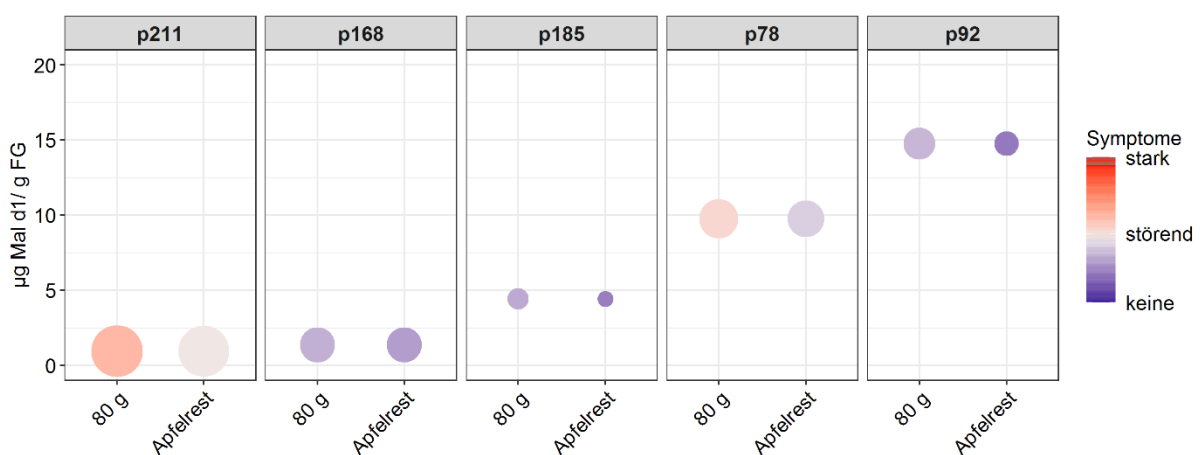


Abbildung 18 Ergebnisse der klinischen Studie mittels oraler Provokationstests. Die Farbe beschreibt die Symptom-Stärke und die Größe der Kreise die Inter-Patienten Variabilität.

Ergebnisse

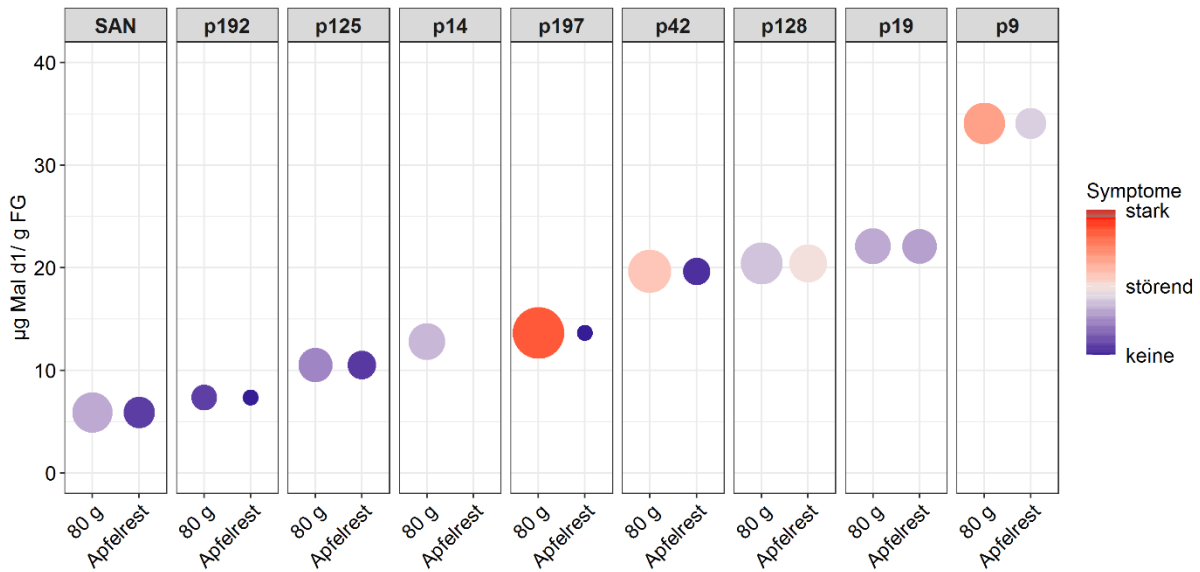


Abbildung 19 Ergebnisse der klinischen Studie mittels Provokationstests zur Ermittlung eines Schwellenwertes. Die Farbe beschreibt die Symptom-Stärke und die Größe der Kreise die Inter-Patienten Variabilität.

Es ist auffällig, dass einige der aufgeführten Genotypen nach dem Verzehr des Apfelrestes besser vertragen wurden als nach dem Verzehr von 80 g. Dabei muss beachtet werden, dass Patienten mit einer hohen Symptomatik die Verkostung nach 80 g abbrachen. Im Gegensatz dazu wurde p128 nach dem Verzehr von 80 g im Durchschnitt gut vertragen und erst der Verzehr des weiteren Apfelrestes führte zu einer stärkeren Symptomatik.

Der Genotyp p211 wies unter allen verkosteten Apfel-Genotypen den geringsten Mal d 1 Gehalt von unter 1 µg/g FG auf. Dieser Genotyp wurde im Durchschnitt zwar weniger gut vertragen, zeigte jedoch eine große inter-Patienten-Variabilität, indem einige Patienten keine und andere wiederum eine starke Symptomatik aufwiesen. Alle weiteren schlecht vertragenen Genotypen zeigten Allergengehalte von über 9 µg Mal d 1/g FG. Der Genotyp p197 löste bei den Patienten die gravierendsten Symptome aus. Allein 50 % der Patienten zeigten klinisch relevante Symptome.

Die Ergebnisse zeigen keinen Zusammenhang zwischen Allergengehalt und Verträglichkeit. Damit kann festgestellt werden, dass die Allergenität eines Genotyps nicht ausschließlich von dem Mal d 1 Gehalt abgeleitet werden kann. Es wurde gezeigt, dass Genotypen mit einem niedrigen Allergen-Gehalt nicht zwingend zu einer geringeren Allergenität führen, genauso wie Genotypen mit einem hohen Mal d 1 Gehalt, von Allergikern nicht unbedingt schlechter vertragen werden.

3.3. Polyphenole

Im Rahmen dieser Arbeit wurde von verschiedenen Genotypen der PG und ihre PPO-Aktivität mittels photometrischer Assays bestimmt. Die relative Quantifizierung von Polyphenolen erfolgte relativ zum internen Standard Biochanin A mittels LC-MS. Dabei wurden 30 Sekundärmetabolite aus den Klassen Flavanole, Flavonole, Anthocyane, ZSD und DHC identifiziert (Tabelle 16). Da der PG nur von einer kleinen Auswahl von Genotypen mittels photometrischem Assay bestimmt wurde, erfolgte die PG-Bestimmung für die mittels LC-MS gemessenen Proben durch Addition der Polyphenolgehalte. Der dabei ermittelte Wert wurde für die Korrelationsanalyse herangezogen.

3.3.1. Polyphenoloxidaseaktivität

Die PPO-Aktivität wurde von 38 Genotypen, die im Rahmen von Humanstudien getestet wurden (2018 (Romer et al. 2020), 2019), bestimmt (Abbildung 20). Abbildung 20 zeigt die verschiedenen Enzym-Aktivitäten der analysierten Genotypen in Abhängigkeit der mittleren Verträglichkeit gemäß den Humanstudien. Es konnten Unterschiede in der enzymatischen Aktivität zwischen verschiedenen Genotypen festgestellt werden. Für die Genotypen aus 2018 wurden PPO-Aktivitäten zwischen 143 und 2600 Units/min/g bestimmt (Abbildung 20 a). Die ermittelten PPO-Aktivitäten der Genotypen aus 2019 bewegten sich zwischen 449 und 2000 Units/min/g (Abbildung 20 b). Es konnte kein Zusammenhang zwischen PPO-Aktivität, Allergengehalt und Verträglichkeit festgestellt werden.

Ergebnisse

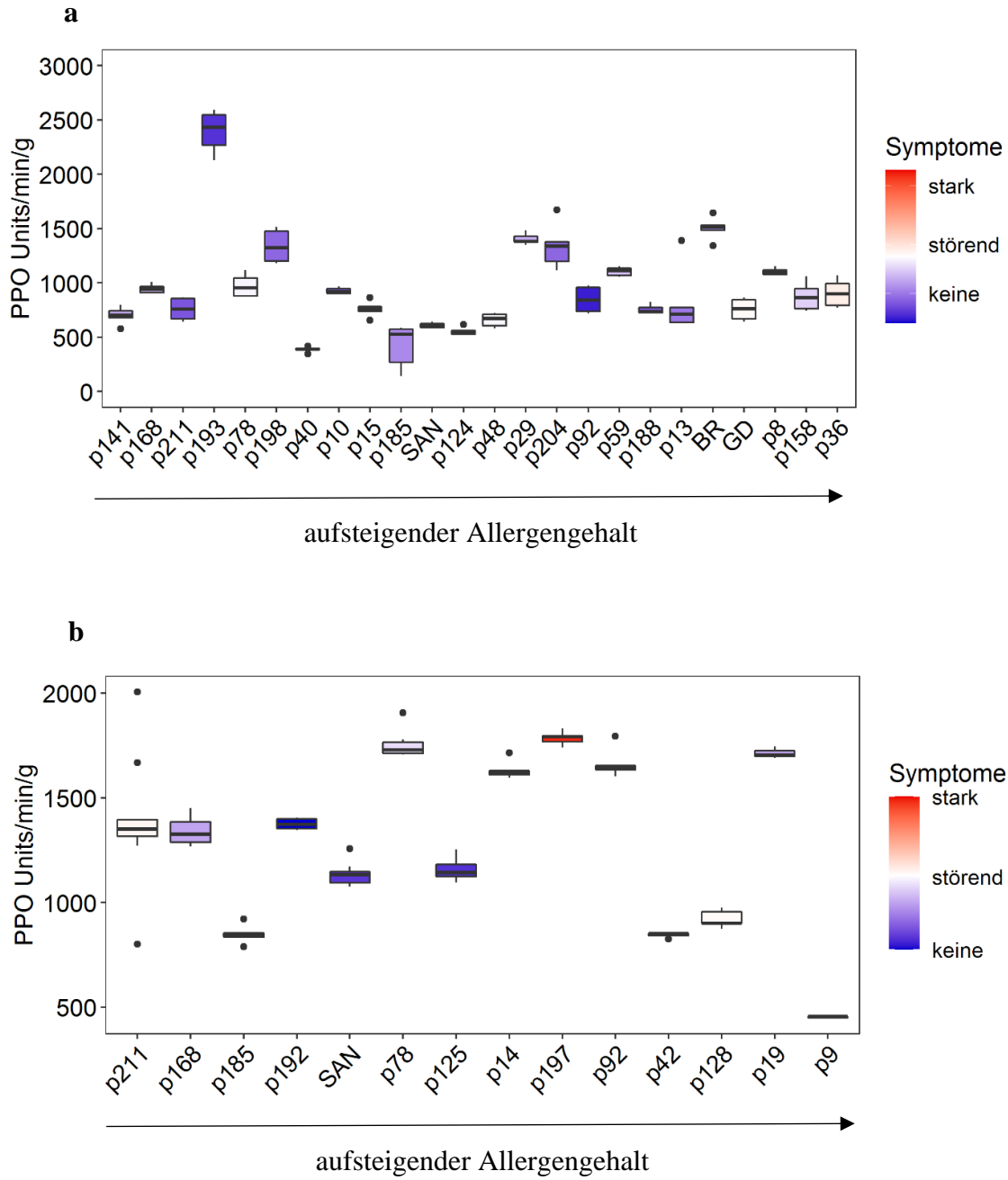


Abbildung 20 Polyphenoloxidaseaktivität verschiedener Apfelgenotypen aus dem Erntejahr 2018 (a) und 2019 (b). Alle Genotypen sind gemäß ihres Allergengehaltes nach aufsteigender Reihenfolge sortiert. Die Farbe der Boxen beschreibt die Symptom-Stärke. Allergengehalte und Symptom-Werte der Genotypen aus 2018 wurden von Romer et al. (2020) für die Bewertung herangezogen.

3.3.2. Gesamtpolyphenolgehalt

Weiterhin wurde der Gesamtpolyphenolgehalt (PG) von insgesamt 38 Genotypen bestimmt. Die Gehalte wurden unter Verwendung von zwei Assays ermittelt, dem FC-Assay und dem FBB-Assay. In Abbildung 21 (Genotypen aus dem Erntejahr 2018) und Abbildung 22 (Genotypen aus dem Erntejahr 2019) sind alle PG der einzelnen Genotypen in Abhängigkeit ihrer mittleren Verträglichkeit gemäß der Humanstudien 2018 (Romer et al. 2020) und 2019 zusammengefasst. Für die Genotypen aus 2018 wurden Gehalte zwischen 268 und 1274 μg Gallussäure Äquivalente (GAE)/g FG mittels FC-Assay (Abbildung 21a) und zwischen 611 und 4200 μg GAE/g FG mittels FBB-Assay (Abbildung 21b) quantifiziert. Die PG der Genotypen aus 2019 bewegen sich zwischen 207 und 1120 μg GAE/g FG gemäß FC-Assay (Abbildung 22a) und zwischen 762 und 5967 μg GAE/g FG gemäß FBB-Assay (Abbildung 22b). Die Ergebnisse aus dem FC- und FBB-Assay korrelierten signifikant positiv miteinander ($R=0,93$). Insgesamt sind die mittels FBB-Assay ermittelten Gehalte um bis zu 5-fach höher als die mittels FC-Assay bestimmten Konzentrationen. Die PG nach beiden Assays zeigten einen deutlichen Trend, nach dem die PG mit steigendem Allergengehalt zunahm. Dies konnte durch eine Korrelationsanalyse bestätigt werden. Sowohl für die ermittelten PG aus dem FC-Assay als auch für die aus dem FBB-Assay ergaben sich signifikante positive Korrelationen mit dem Allergengehalt mit Korrelationskoeffizienten von 0,72 und 0,76 (Abbildung 23a, b). Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen dem PG und der Verträglichkeit der einzelnen Genotypen ermittelt werden.

Ergebnisse

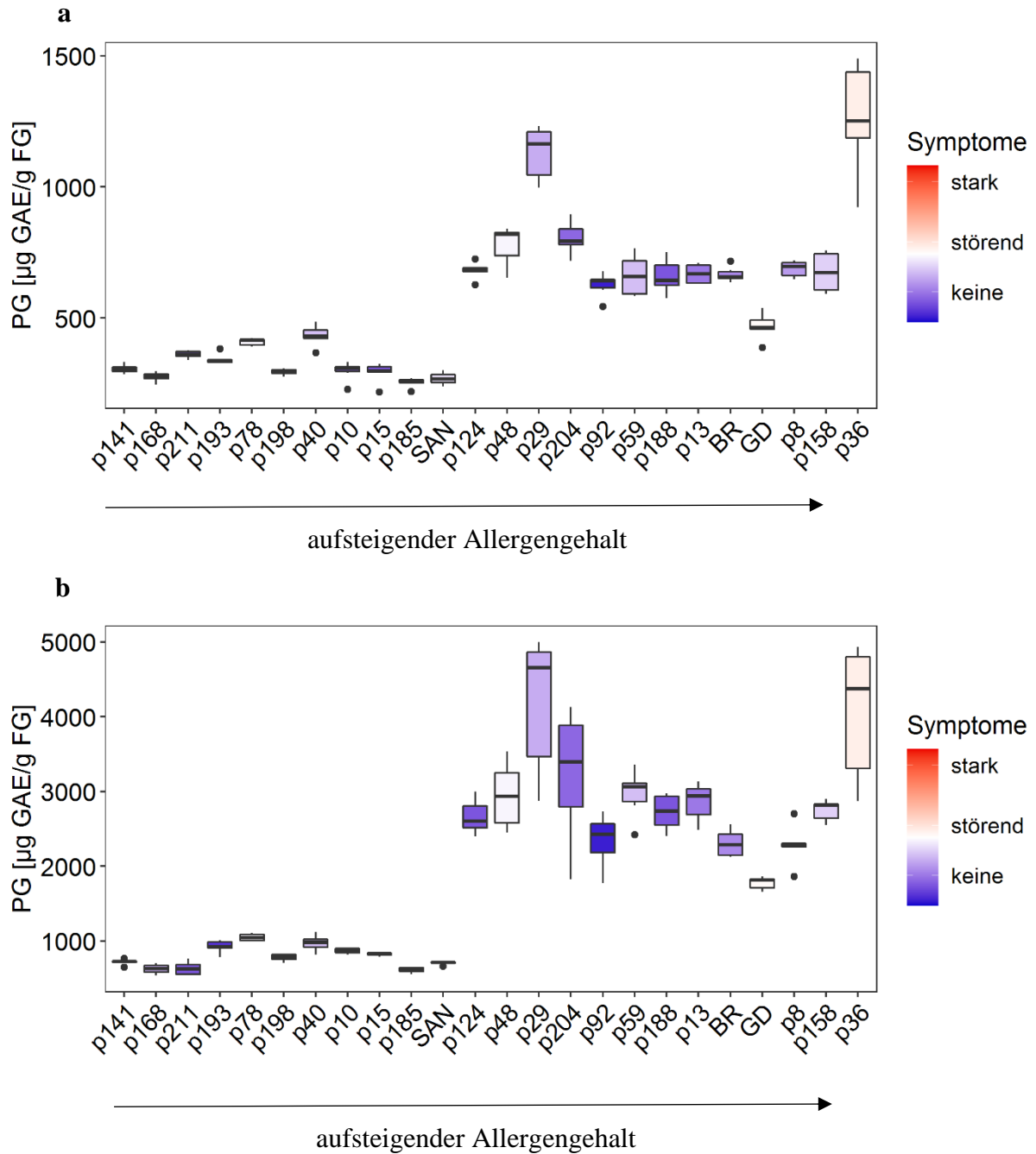


Abbildung 21 Gesamtpolyphenolgehalt (PG) verschiedener Apfelgenotypen aus dem Erntejahr 2018. Der PG wurde mittels FC-Assay (a) und FBB-Assay (b) bestimmt. Alle Genotypen sind gemäß ihres Allergengehaltes nach aufsteigender Reihenfolge sortiert. Die Farbe der Boxen beschreibt die Symptom-Stärke. Allergengehalte und Symptom-Werte der Genotypen aus 2018 wurden von Romer et al. (2020) für die Bewertung herangezogen.

Ergebnisse

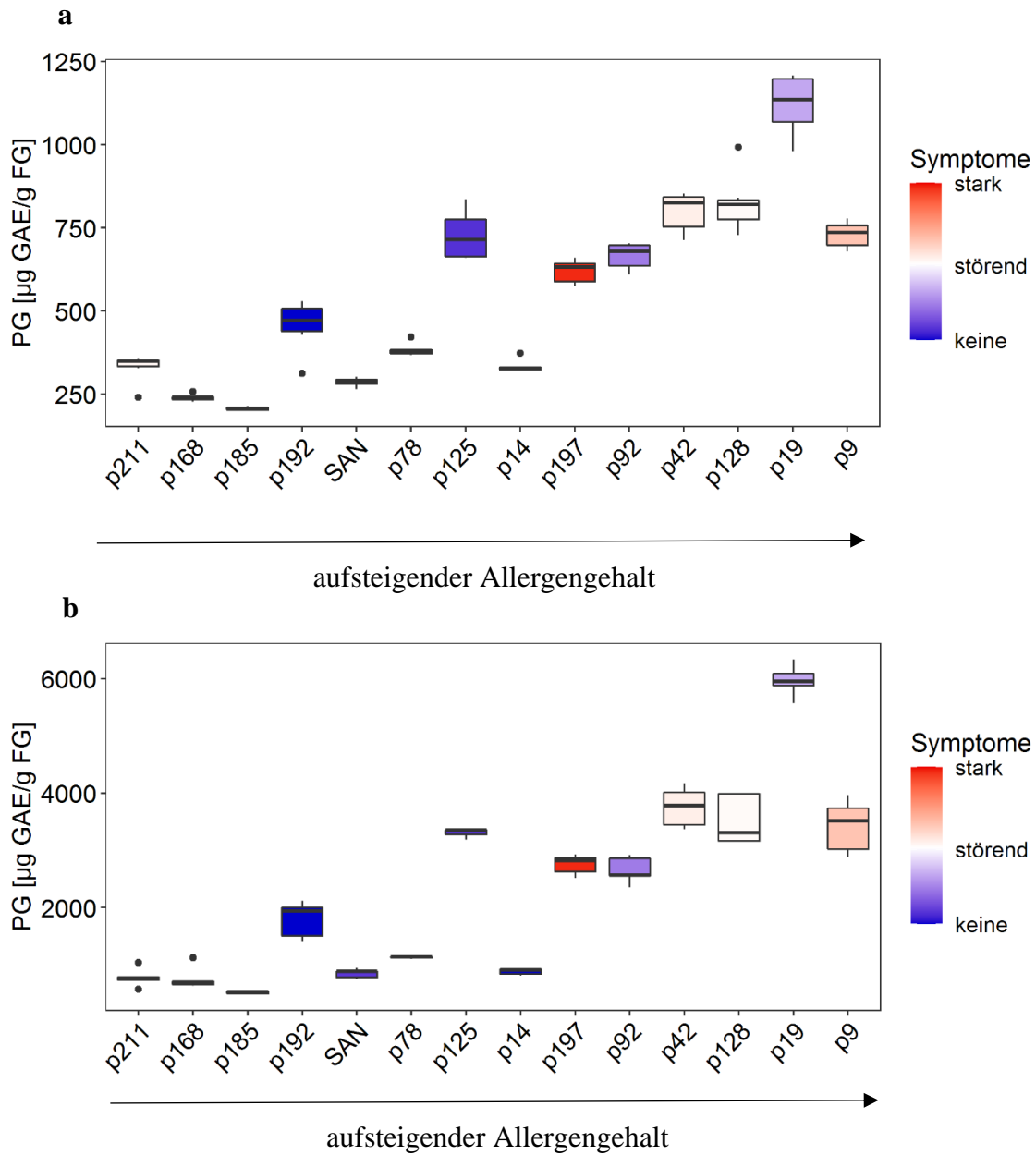


Abbildung 22 Gesamtpolyphenolgehalt (PG) verschiedener Apfelgenotypen aus dem Erntejahr 2019. Der PG wurde mittels FC-Assay (a) und FBB-Assay (b) bestimmt. Alle Genotypen sind gemäß ihres Allergengehaltes nach aufsteigender Reihenfolge sortiert. Die Farbe der Boxen beschreibt die Symptom-Stärke.

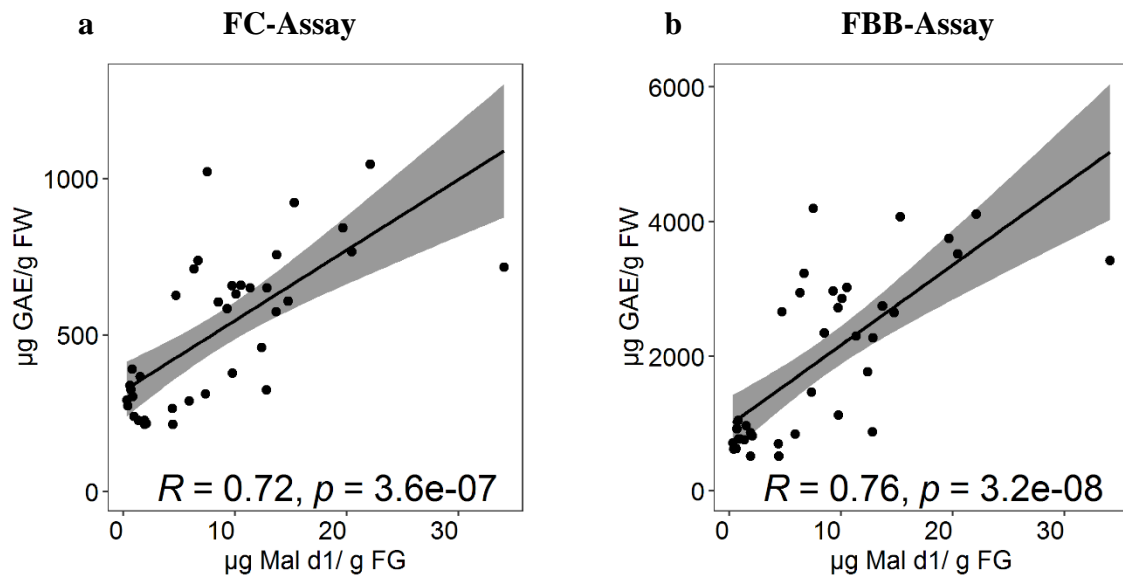


Abbildung 23 Spearman-Korrelationsanalyse zwischen dem Mal d 1 Gehalt und dem Gesamtpolyphenolgehalt mittels FC-Assay (a) und FBB-Assay (b). Allergengehalte von den Genotypen aus 2018 wurden von Romer et al. (2020) für die Berechnung herangezogen.

3.3.3. Quantifizierung der Polyphenole mittels LC-MS

Die Polyphenol-Verteilung wurde von insgesamt 60 Genotypen mittels LC-MS bestimmt. Diese umfassen weißfleischige und rotfleischige Äpfel der Standorte Osnabrück, Esteburg (Niedersachsen), Bodensee, Frankreich und Italien. Es wurden insgesamt 34 Polyphenole relativ zum internen Standard quantifiziert. Abbildung 24 zeigt in Form einer Heatmap die Polyphenol-Zusammensetzung aller analysierten Genotypen. Dabei steht eine rote Färbung für den höchsten quantifizierten Gehalt eines Metaboliten im Vergleich zu anderen Genotypen und blau für den geringsten quantifizierten Gehalt eines Metaboliten im Vergleich zu anderen Genotypen.

Im Folgenden wird auf die Polyphenolzusammensetzung der einzelnen analysierten Proben, sowie auf die Unterschiede zwischen weißfleischigen und rotfleischigen Genotypen hinsichtlich ihres Polyphenol-Profiles im Detail eingegangen.

Rotfleischige Genotypen der Standorte Esteburg, Italien und Frankreich fanden sich weitgehend in einem großen Cluster zusammen, obgleich dieses vereinzelt durch weißfleischige Proben unterbrochen wurde. Das Cluster ist in Abbildung 24 durch eine gestrichelte schwarze Umrandung hervorgehoben. Charakteristisch für dieses Cluster sind die auffallend niedrigen Flavan-3-ol-Gehalte. Die relativen Konzentrationen dieser Klasse bewegten sich für rotfleischige Äpfel zwischen 56 und 350 ppm IS equ. Davon ausgenommen sind die Genotypen RF-1_2019 (Esteburg) und RF-18_2019 (Frankreich) mit Gehalten von 738 und 709 ppm IS equ. Weißfleischige Proben innerhalb des Clusters wiesen Flavan-3-ol-Gehalte zwischen 82 und 109 ppm IS equ auf. Bei allen übrigen weißfleischigen Proben außerhalb des

Clusters wurden Konzentrationen zwischen 632 und 1185 ppm IS equ ermittelt, wobei die Genotypen p9, p92 und p128 (Osnabrück) aus dem Erntejahr 2019 die höchsten Gehalte zeigten.

In der Klasse der Flavonole ergab sich eine große Variation zwischen den einzelnen Genotypen. Ein Flavonol-spezifisches Muster zwischen rotfleischigen und weißfleischigen Äpfeln ließ sich nicht ableiten. Dabei wiesen die Genotypen RF-7_2019 (Frankreich), p9_2019 (Osnabrück) und p92_2019 (Osnabrück) die höchsten Flavonolgehalte mit bis zu 1042 ppm IS equ auf. Die niedrigsten Gehalte wurden für die Genotypen WF-10_2019 (Osnabrück), WF-2_2019 (Esteburg) und WF-5_2019 (Esteburg) ermittelt mit Werten von 180, 297 und 341 ppm IS equ. Für viele der untersuchten Proben machen die Metaboliten Qu-Gal und Qu-Ar mit 20-30 % den größten prozentualen Anteil am Gesamtflavonolgehalt aus. Weiterhin zeichneten sich die Proben aus Esteburg durch einheitlich niedrige Gehalte an Qu-Glu und besonders hohen Gehalten an Qu-Rh aus.

Als wichtigste Vertreter der Anthocyane konnten in den untersuchten Genotypen Cy-Hex 1, Cy-Hex 2, Cy-Pen 1, Cy-Pen 2, Cy-Pen 3, Cy-Pen 4 identifiziert und quantifiziert werden. Für die rotfleischigen Proben wurden hohe Gesamtanthocyan-Konzentrationen ermittelt. Sie wiesen Gesamtanthocyan-Gehalte von bis zu 2940 ppm IS equ auf. Die Proben RF-18_2019 (Frankreich), RF-11_2019 (Frankreich) und RF-8_2019 (Frankreich) zeigten die niedrigsten Konzentrationen mit 174, 323 und 326 ppm IS equ. Für weißfleischige Äpfel konnten Gehalte zwischen 134 und 1470 ppm IS equ bestimmt werden. Dabei waren die Cyanidin-Pentoside in weißfleischigen Genotypen deutlich weniger vertreten, wobei Cy-Pen 4 den mengenmäßig wichtigsten Metaboliten in dieser Klasse darstellte.

In der Gruppe der ZSD war Chlorogensäure der Hauptvertreter und machte durchschnittlich 40 % des ZSD-Gesamtgehaltes aus. Die Genotypen p9_2019 (Osnabrück) und p128_2019 (Osnabrück) enthielten besonders hohe ZSD-Gehalte. Obgleich sich für die Analyten Chlsre, Di-Chlsre und Neochlsre große Variationen zwischen den einzelnen Proben ergaben, waren die Substanzen Chlsre-Glc, Cu-Chsre und Cu-Glc-davon vergleichsweise wenig betroffen, nicht zuletzt auch wegen ihrer insgesamt geringeren Akkumulation.

Ergebnisse

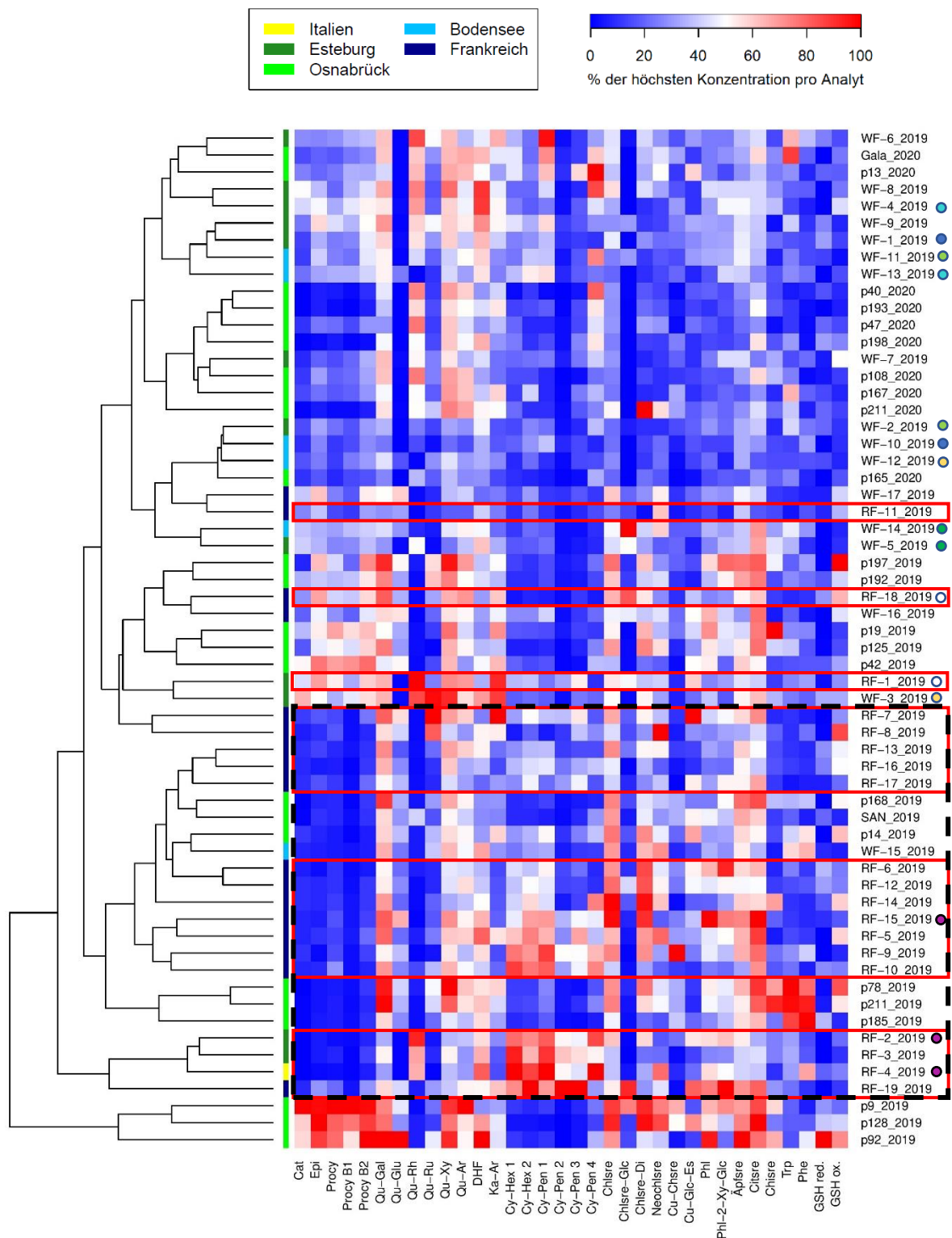


Abbildung 24 Heatmap der relativen Polyphenolgehalte von weißfleischigen (WF) und rotfleischigen (RF) Genotypen aus dem Erntejahr 2019 und 2020 von den Standorten Esteburg, Bodensee, Osnabrück, Frankreich und Italien. Die unterschiedlichen Standorte sind in der linken Spalte farblich gekennzeichnet. Die Farbskala der Metabolitgehalte umfasst die Werte 0 % (blau) bis 100 % (rot), wobei 100 % der höchsten relativen Konzentration innerhalb eines Metaboliten entspricht. Identische Genotypen, die an unterschiedlichen Standorten angebaut wurden, sind mit einem Kreis derselben Farbe neben der Proben-Bezeichnung kenntlich gemacht. Rotfleischige Genotypen sind mit einem roten Rechteck hervorgehoben.

Die Vertreter der DHC waren bis auf wenige Ausnahmen im oberen (543-649 ppm IS equ) und unteren (74-146 ppm IS equ) Konzentrationsbereich, in ähnlichen Gehalten in allen Proben enthalten. Die Proben p197_2019 (Osnabrück), p9_2019 (Osnabrück), RF-15_2019 (Frankreich), RF-19_2019 (Frankreich) und RF-6_2019 (Frankreich) enthielten in der Summe deutlich höhere DHC Gehalte (>500 ppm IS equ) als andere Proben. Dagegen waren die niedrigsten Konzentrationen mit 74 und 85 ppm IS equ in RF-12_2019 (Frankreich) und WF-13_2019 (Bodensee) zu finden.

Die Primärmetaboliten, wie Äpfsre und Citsre, variierten nur in geringem Ausmaß zwischen den einzelnen Proben. In den untersuchten Proben war Äpfsre in Konzentrationen zwischen 54 ppm IS equ in p165_2019 (Osnabrück) und 249 ppm IS equ in p168_2019 (Osnabrück) enthalten. Citsre wurde in relativen Konzentrationen zwischen 12 ppm IS equ in RF-11_2019 (Frankreich) und 71 ppm IS equ in p128_2019 (Osnabrück) und RF-15_2019 (Frankreich) bestimmt. Bei Chsre konnten Gehalte zwischen 6 ppm IS equ in WF-9_2019 (Esteburg) und 188 ppm IS equ in p19_2019 (Osnabrück) ermittelt werden.

Bei den Genotyp-Paaren RF-1_2019 (Esteburg) und RF-18_2019 (Frankreich), sowie RF-2_2019 (Esteburg), RF-4_2019 (Italien) und RF-15_2019 (Frankreich) handelt es sich jeweils um dieselben Genotypen von verschiedenen Standorten. Weitere Paare sind WF-2_2019 (Esteburg) und WF-11 (Bodensee), WF-1_2019 (Esteburg) und WF-10_2019 Bodensee, WF-3_2019 (Esteburg) und WF-12_2019 (Bodensee), WF-4_2019 (Esteburg) und WF-13_2019 (Bodensee), WF-5_2019 (Esteburg) und WF-14_2019 (Bodensee). Es zeigte sich, dass sich gleiche Genotypen von unterschiedlichen Anbaugebieten in ihrer Polyphenol-Zusammensetzung unterschieden. Einige Genotypen wie etwa WF-14_2019 (Bodensee) und WF-5_2019 (Esteburg), sowie RF-18_2019 (Frankreich) und RF-1_2019 (Esteburg) clusterten zusammen und besaßen damit ein ähnliches Metabolit-Profil. Im Gegensatz dazu clusterten die Proben WF-2_2019 aus Esteburg und WF-11_2019 vom Bodensee mit größerem Abstand zueinander, was auf ein unterschiedliches Polyphenol-Profil hinwies. Eine eindeutige Standort-Gruppierung kann demnach nicht abgeleitet werden. Für eine tiefergehende Analyse des Standort-Einflusses müsste die Probenanzahl pro Standort deutlich erhöht werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass in allen Analyt-Klassen die Synthese von Polyphenolen stark vom Genotyp und Phänotyp abhängig ist. Dabei ist zu erkennen, dass manche Genotypen hohe Gehalte innerhalb einer Substanzklasse oder über mehrere Klassen hinweg besitzen, wogegen andere nur einzelne Vertreter verschiedener Gruppen anreichern.

3.3.4. Einfluss der Kühlagerung auf die Polyphenol-Zusammensetzung

Der Einfluss der Kühlagerung auf das Polyphenolprofil wurde anhand von 10 Genotypen über drei Auslagerungszeitpunkte nach Erreichen der Genussreife untersucht. Im Folgenden werden die Gehalte einzelner Polyphenolgruppen über die Lagerungsstadien separat vorgestellt.

Die Gehalte der Flavan-3-ole der Genotypen p124, p125, p14 und p149 zeigten keine Unterschiede zwischen den einzelnen Lagerungsstadien (Abbildung 25). Anders verhielt es sich für die Genotypen p128, p19, p36 und p78. Hier kam es zu einer Abnahme der Flavan-3-ol-Gehalte, insbesondere der Procy B1 und/oder B2. Die Genotypen p8 und p158 zeigten eine Abnahme zwischen dem ersten und zweiten Auslagerungszeitpunkt, wobei der Flavan-3-ol-Gehalt zwischen dem zweiten und dritten Lagerungsstadium wiederum zunahm. In allen Genotypen blieben die Konzentrationen der Analyten Epi und Procy relativ konstant. Im Gegensatz zu Epi wurde Cat kaum akkumuliert.

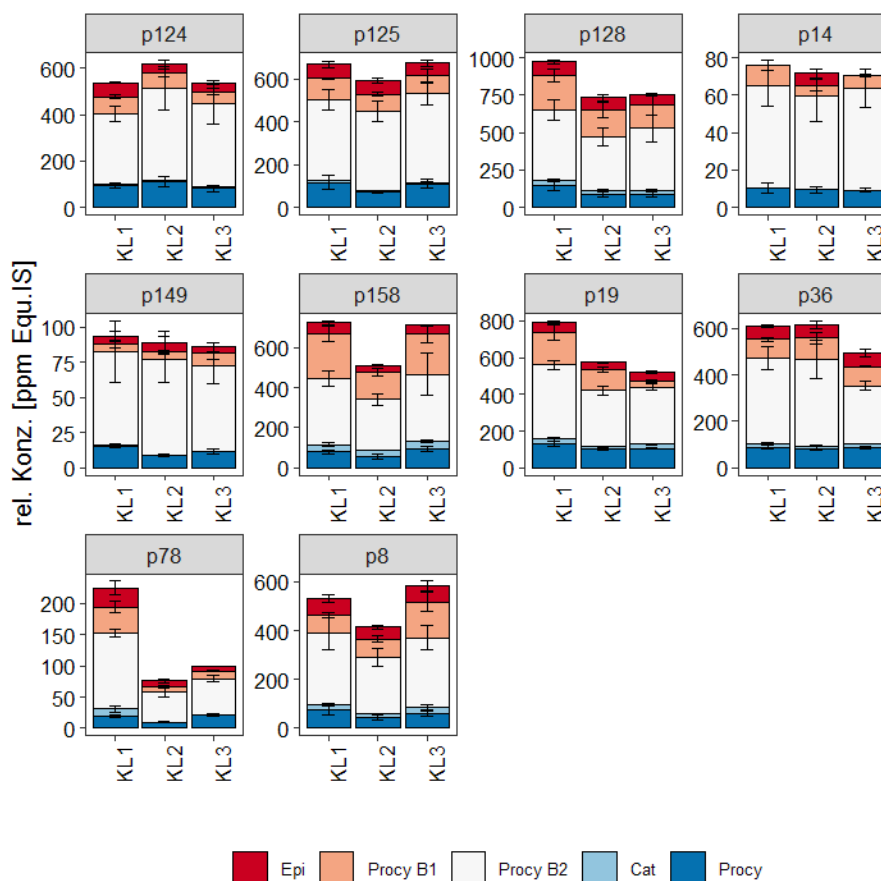


Abbildung 25 Relative Konzentrationen der Flavan-3-ole über drei Auslagerungszeitpunkte unter Kühlagerungsbedingungen (KL1-3) in 10 verschiedenen Genotypen.

Die Flavonol-Gehalte änderten sich nur unwesentlich in den Genotypen p128 und p36 während der Lagerung (Abbildung 26). Eine Konzentrationserhöhung wurde in den Genotypen p124 und p8 ermittelt, während eine Konzentrationsabnahme für p14, p149 und p19 festgestellt wurde.

Ergebnisse

Ähnlich wie bei den Flavan-3-olen kam es auch hier zwischen dem ersten und zweiten Auslagerungszeitpunkt oft zu einer Erhöhung der Flavonol-Gehalte, bevor diese im Lagerungsstadium KL-3 wieder abfielen (p125, p158, p78). Die Verhältnisse zwischen den Analyten verhielten sich weitestgehend konstant, wobei Qu-Gal den größten Anteil ausmachte.

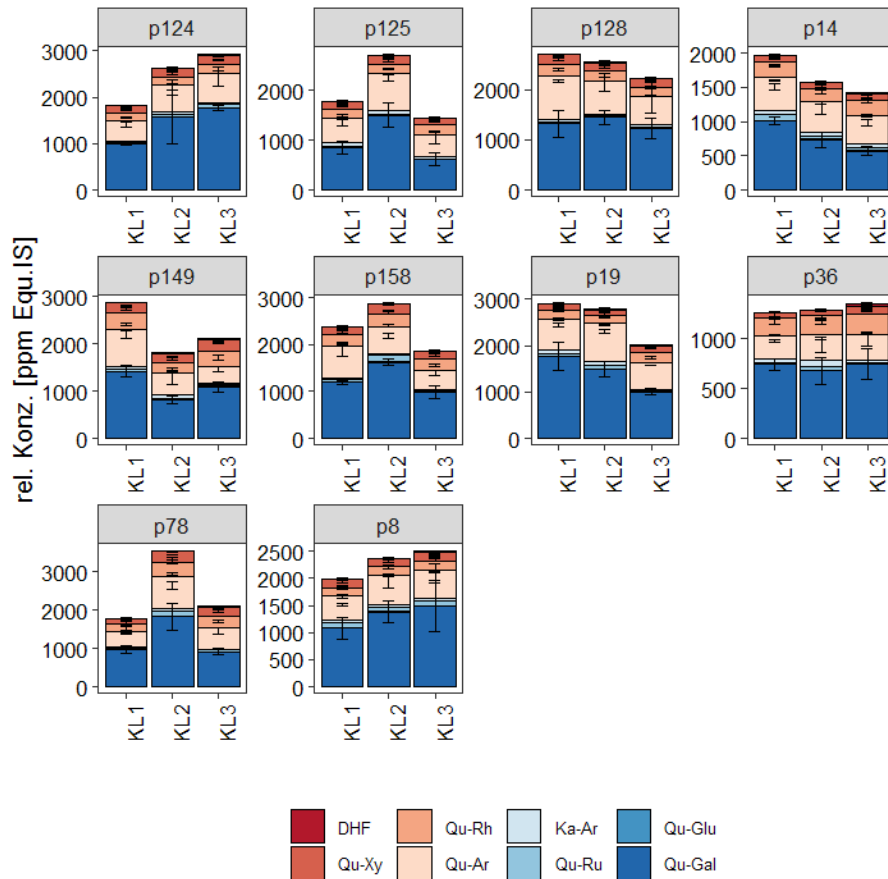


Abbildung 26 Relative Konzentrationen der Flavonole über drei Auslagerungszeitpunkte unter Kühlagerungsbedingungen (KL1-3) in 10 verschiedenen Genotypen.

Der Anthocyanengehalt nahm in den meisten Fällen während der Lagerung ab. Dabei verringerte sich vor allem der Gehalt an Cy-Pen 1-3 wie am Beispiel von p125 besonders gut zu erkennen ist (Abbildung 27).

Ergebnisse

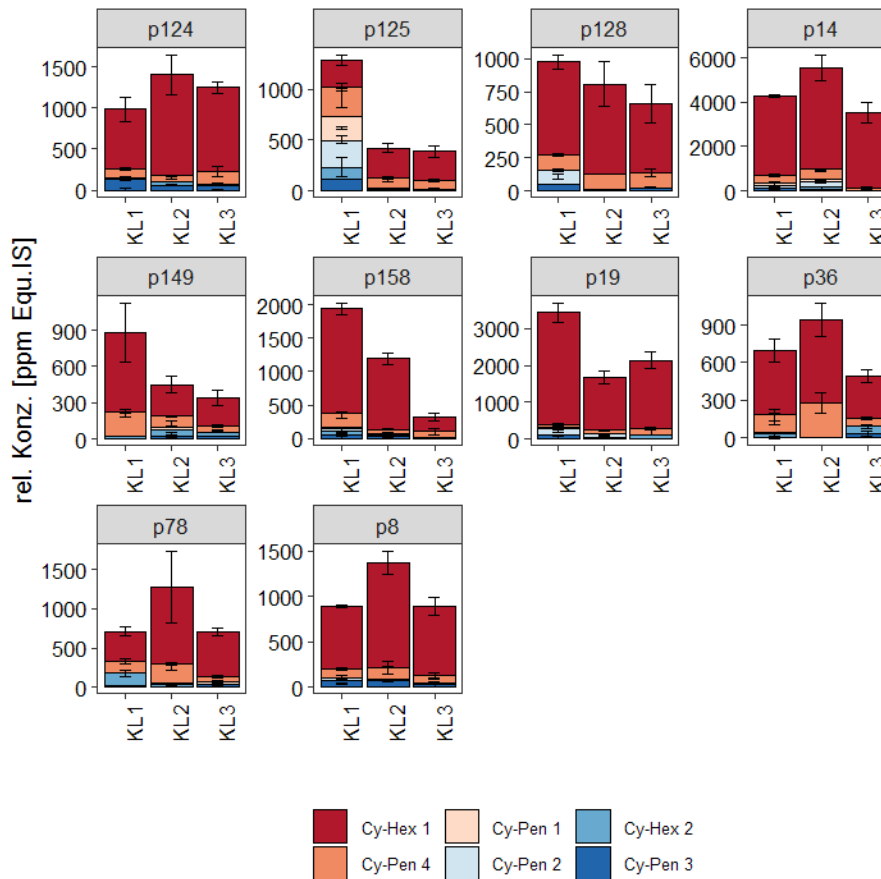


Abbildung 27 Relative Konzentrationen der Anthocyane über drei Auslagerungszeitpunkte unter Kühlagerungsbedingungen (KL1-3) in 10 verschiedenen Genotypen.

Die Synthese von GSH zeigte signifikante Unterschiede in verschiedenen Genotypen (Abbildung 28). Für p125 konnte eine signifikante Zunahme vom ersten bis zum zweiten Auslagerungszeitpunkt beobachtet werden, sowie eine signifikante Abnahme zwischen dem zweiten und dritten Auslagerungstermin. Die Genotypen p158 und p36 wiesen eine signifikante Zunahme an GSH vom ersten bis zum dritten Lagerungsstadium auf. Dagegen zeigte der Genotyp p8 eine deutliche Abnahme in der GSH-Konzentration. Für den Genotyp p78 nahm der Anteil an GSSG signifikant im Laufe der Lagerung zu.

Ergebnisse

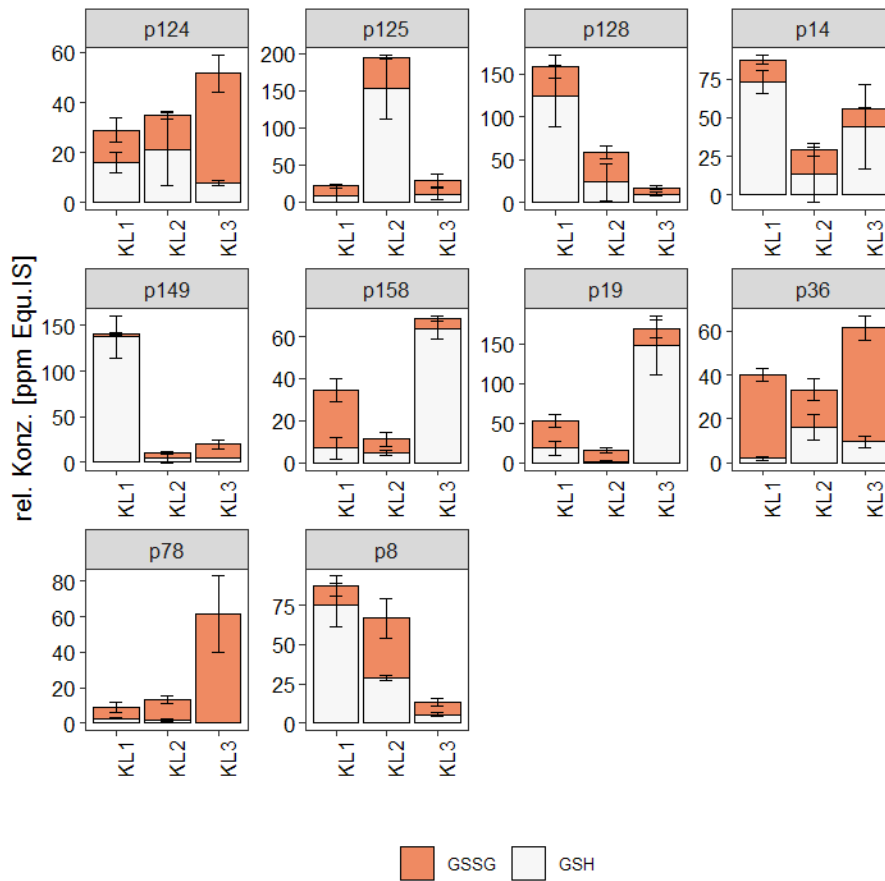


Abbildung 28 Relative Konzentrationen von GSH und GSSG über drei Auslagerungszeitpunkte unter Kühllagerungsbedingungen (KL1-3) in 10 verschiedenen Genotypen.

Die Substanzklassen DHC, ZSD und sonstige Polyphenole zeigten eine überwiegend gleichmäßige Polyphenol Akkumulation über alle Auslagerungszeitpunkte. Die entsprechenden Abbildungen sind im Anhang (Anhang Abbildung 11, Anhang Abbildung 12, Anhang Abbildung 13) zu finden.

3.3.5. Korrelationen

Für alle untersuchten Proben wurden Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman zwischen den relativen Metabolit-Gehalten, sowie zwischen den Metabolitgruppen, dem PG und dem Mal d 1 Gehalt berechnet (Abbildung 29). Der Rangkorrelationskoeffizient (R) kann zwischen +1 und -1 liegen. Je höher bzw. niedriger der Wert ist und sich an +1 bzw. -1 annähert, desto größer ist die direkte bzw. indirekte Korrelation. Abbildung 30 zeigt ergänzend zu Abbildung 29 einige Korrelationen mit den zugehörigen Korrelationskoeffizienten.

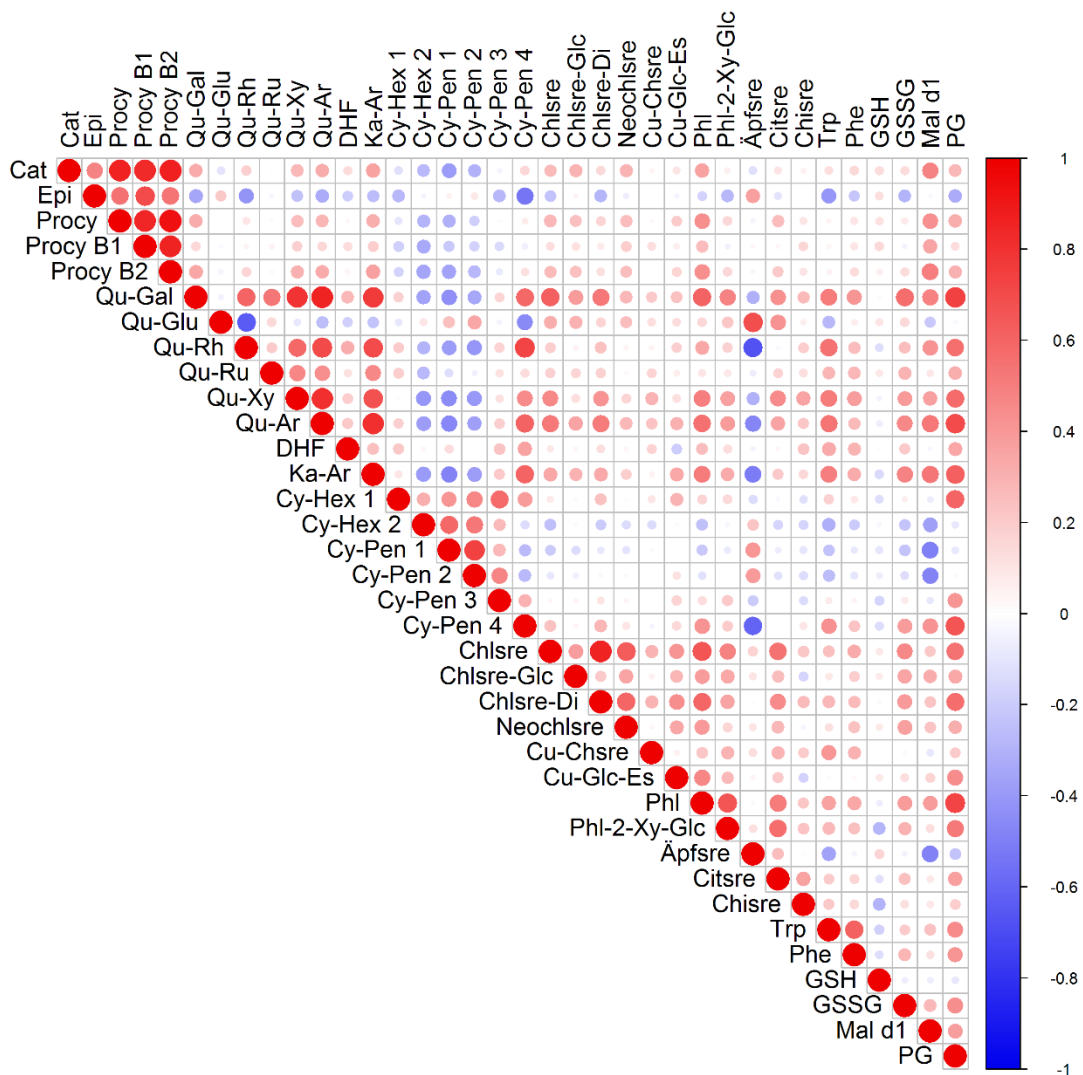


Abbildung 29 Korrelations-Matrix der Metabolit-Gehalte der untersuchten Genotypen nach Spearman. Die Punkte zeigen den Rangkorrelationskoeffizienten. Je besser er sich an +1 bzw. -1 annähert, desto dunkler sind die Punkte in Rot bzw. Blau eingefärbt. Rote Punkte zeigen einen direkten Zusammenhang an, während blaue Punkte auf eine indirekte Korrelation hinweisen. Je größer die Punkte sind, desto signifikanter ($p \leq 0,05$) ist die jeweilige Korrelation.

Zwischen den einzelnen Metaboliten wurden verschiedene positive Korrelationen identifiziert. In der Klasse der Flavan-3-ole ist ein auffälliges Korrelationsmuster zu erkennen. Dabei

korrelieren die einzelnen Mitglieder dieser Klasse stark signifikant untereinander. Mit steigenden Cat-Konzentrationen steigen auch die Gehalte an Procy, Procy B1 und Procy B2. Die Korrelationskoeffizienten liegen hier zwischen 0,84 und 0,87. Innerhalb der Procyanidine ergaben sich weitere signifikant positive Korrelationen mit Korrelationskoeffizienten zwischen 0,85 und 0,93. Der Zusammenhang zwischen Cat und Epi, sowie zwischen Epi und den Procyanidinen fiel etwas schwächer aus ($R=0,48-0,71$).

Innerhalb der Flavonole wiesen Qu-Gal und Qu-Ar mit $R=0,86$ die höchste Korrelation auf. Qu-Gal zeigte auch mit Qu-Rh, Qu-Ru, Qu-Xy und Ka-Ar einen signifikanten Zusammenhang mit $R=0,6-0,79$. Eine ähnlich gute Korrelation wiesen die weiteren Quercetin-Metabolite untereinander auf, wie beispielsweise Qu-Rh mit Qu-Xy ($R=0,59$), Qu-Ar ($R=0,71$) und Ka-Ar ($R=0,7$), sowie Qu-Xy mit Qu-Ar ($R=0,81$) und Ka-Ar ($R=0,68$).

Den stärksten Zusammenhang unter den Anthocyanen zeigte das Paar Cy-Pen1/ Cy-Pen 2 mit $R=0,74$. Weitere Korrelationen wurden jeweils zwischen Cy-Hex 1 und Cy-Hex 2, Cy-Pen 1, Cy-Pen 2, Cy-Pen 3, Cy-Pen 4 mit einem R von jeweils 0,32, 0,41, 0,47, 0,58, 0,39 identifiziert. Auch Cy-Hex 2 korrelierte mit den Pentosiden Cy-Pen 1 und Cy-Pen 2 ($R=0,50, 0,53$). Etwas schwächer fiel die Korrelation zwischen Cy-Pen 2 und Cy-Pen 3 ($R=0,48$) aus, sowie zwischen Cy-Pen 3 und Cy-Pen 4 ($R=0,3$).

In der Gruppe der ZSD fanden sich positive Korrelationen zwischen den Metabolit-Paaren Chlsre/ Chlsre-glc ($R=0,38$), Chlsre/Chlsre-Di ($R=0,85$), Chlsre/Neochlsre ($R=0,63$) und Chlsre-Di/ Neochlsre ($R=0,6$).

Für die beiden Mitglieder der DHC ergab sich ein direkter Zusammenhang mit $R=0,66$. Insgesamt kann festgehalten werden, dass sich stärkere Korrelationen zwischen den Metaboliten derselben Klasse zeigen als zwischen Metaboliten verschiedener Substanzklassen. Neben den Korrelationen innerhalb der Substanzklassen ergeben sich auch signifikante Zusammenhänge zwischen den Metaboliten und dem PG. Dieser korrelierte mit den Gehalten von Qu-Gal ($R=0,74$), Qu-Rh ($R=0,56$), Qu-Xy ($R=0,58$), Qu-Ar ($R=0,7$), Ka-Ar ($R=0,62$), Cy-Hex 1 ($R=0,6$), Cy-Pen 4 ($R=0,64$), Chlsre ($R=0,55$), Chlsre-Di ($R=0,57$), Phl ($R=0,73$) und Phl-2-Xy-Glc ($R=0,52$). Die aufgeführten Metabolite variieren in ihren Gehalten zwischen den Genotypen und eignen sich daher als mögliche Marker für hohe PG.

Für das gesamte Datenset wurden außerdem die Mal d 1 Gehalte bestimmt (3.2). Diese wurden herangezogen, um mögliche Korrelationen mit den quantifizierten Polyphenolen zu berechnen. Es ergaben sich einige positive Korrelationen zwischen Mal d 1 und einzelnen Metaboliten, sowie Metabolit-Klassen. Mal d 1 zeigt einen direkten Zusammenhang mit der Klasse der Flavan-3-ole ($R=0,42$). Dabei korrelieren Cat ($R=0,48$) und Procy B2 ($R=0,5$) am stärksten

mit dem Allergengehalt, während Epi keine Wechselwirkung mit Mal d 1 aufwies. Die Flavonole korrelierten ebenfalls stark mit dem Mal d 1 Gehalt ($R= 0,51$). Diese Korrelation wurde dabei von Qu-Gal ($R= 0,49$), Qu-Ar ($R= 0,53$) und Ka-Ar ($R= 0,54$) maßgeblich gesteuert. Eine signifikante Wechselwirkung mit dem Allergengehalt ist auch mit dem PG ($R= 0,38$) zu beobachten, auch wenn diese etwas schwächer ausfällt im Vergleich zu den bereits Aufgeführten. Neben den positiven Korrelationen ergaben sich zwischen Mal d 1 und Cy-Hex 2 ($R= -0,37$), Cy-Pen 1 ($R= -0,49$), Cy-Pen 2 ($R= -0,48$) und Äpfsre ($R= -0,49$) jeweils negative Korrelationen.

Ergebnisse

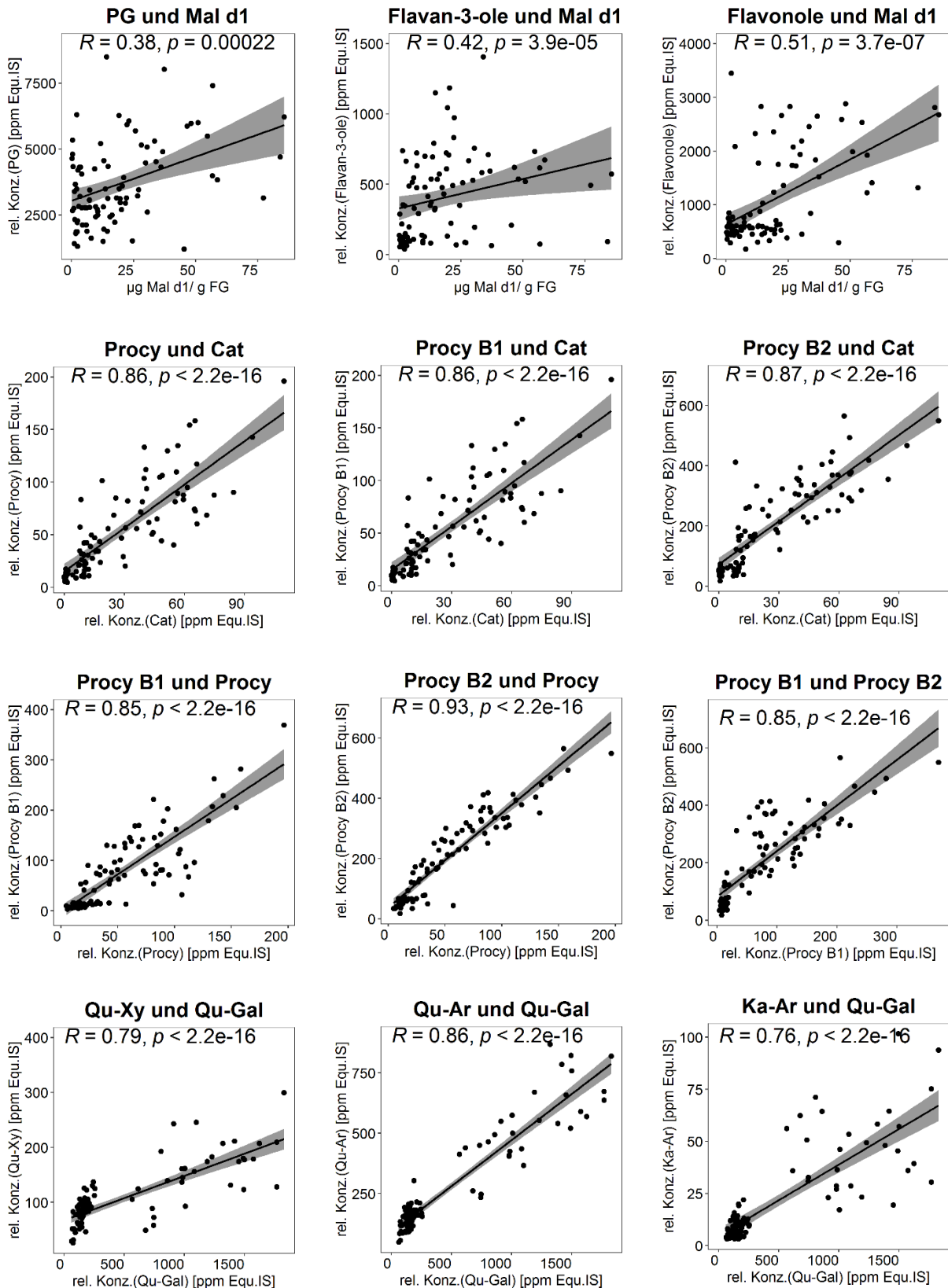


Abbildung 30 Korrelationen nach Spearman zwischen den Gehalten von verschiedenen Metaboliten, sowie zwischen den Gehalten von Metabolit-Klassen und Mal d 1.

3.4. Biophysikalische Charakterisierung von Protein-Ligand-Interaktionen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Liganden-Bindungsstudien zwischen dem rekombinanten Protein rMal d 1.02 und ausgewählten Flavonoiden, sowie Glutathion in reduzierter und oxidiert Form mittels Microscale Thermophoresis (MST) durchgeführt. Dazu wurde das rekombinante Protein fluoreszenzmarkiert. Die Analyse der Bindungsstärke der detektierten Bindungen erfolgte über die Bestimmung der jeweiligen Dissoziationskonstante (K_d). Die Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht (Chebib und Schwab 2021).

3.4.1. Quantitative Analyse der Ligand-Bindungsstudien

Die Durchführung von MST-Experimenten ermöglichte die Identifizierung von spezifischen Ligandenbindungen des Proteins rMal d 1.02 im niedrigen mikromolaren Bereich. Abbildung 31 und Abbildung 32 zeigen die gemessenen Kapillarscans, Thermophoresekurven (bzw. MST-Spuren) und Bindungskurven. Es wurden Kapillarscans durchgeführt, um unerwünschte Abweichungen in der Konzentration des Fluorophores und mögliche Adhäsionseffekte des Proteins an das Kapillarmaterial frühzeitig zu detektieren. Abbildung 31 und Abbildung 32 zeigen für alle Messungen gleichmäßige Kapillarscans mit Fluoreszenz Counts über 200, womit die Fluoreszenzintensität hoch genug ausfiel, um ausgewertet zu werden. Auch die Thermophoresekurven verliefen regelmäßig, weshalb mögliche Aggregationseffekte des Proteins ausgeschlossen wurden. Die erhobenen Daten lieferten zudem überwiegend Signal-Rausch-Verhältnisse (S/N) von über 10, was auf exzellente Assay-Bedingungen hinwies. Die MST-Messungen demonstrierten, dass (+)-Catechin an rMal d 1.02 mit einem K_d von $16,39 \pm 5,35 \mu\text{M}$ bindet (Abbildung 31), während (+)-Epicatechin und (-)-Epicatechin geringe Affinitäten zeigten mit K_d 's von $152,53 \pm 31,03 \mu\text{M}$ und $663,88 \pm 393,46 \mu\text{M}$ (Abbildung 32). Quercetin-3-rhamnosid bindet mit einem K_d von $29,51 \pm 7,75 \mu\text{M}$ an rMal d 1.02. Weiterhin wurde die Bindung von GSH und GSSG zu rMal d 1.02 detektiert. Dabei zeigte GSH eine mittlere Bindungsaffinität mit einem K_d von $35,79 \pm 12,76 \mu\text{M}$. Eine hohe Affinität zum Protein wurde für GSSG festgestellt mit einem niedrigen K_d -Wert von $157,21 \pm 87,74 \text{ nM}$. Die Bindungskurve von (+)-Catechin zeigt einen idealen sigmoidalen Kurvenverlauf mit einem auftretenden Plateau bei niedrigen und bei hohen Ligandenkonzentrationen. Bei niedrigen Ligandenkonzentrationen liegt das Protein ungebunden vor, während bei einer Erhöhung der Ligandenkonzentration die Sättigung des Proteins mit dem Liganden zunimmt. Viele der Bindungskurven zeigten keine oder kaum eine Sättigung im gebundenen Zustand, wie es

beispielweise bei (+/-)-Epicatechin der Fall war. Hier lag keine Sättigung im gebundenen Zustand vor. Dadurch resultierten höhere Standardabweichungen, die eine präzise Bestimmung des K_d -Wertes nicht erlaubten. Jedoch kann geschlussfolgert werden, dass (+/-)-Epicatechin im hohen mikromolaren Bereich an rMal d 1.02 bindet.

Für GSSG wurden zwei Konzentrationsbereiche mit 500 μM (I) und 100 μM (II) GSSG als höchste Assaykonzentration untersucht, da der Assay mit einer maximalen Ligandenkonzentration von 500 μM kaum ein Plateau im ungebundenen Zustand zeigte. Dies ist auf die hohe Affinität von GSSG zum Protein zurückzuführen. Ein deutlich ausgewogeneres Verhältnis zwischen den gebundenen und ungebundenen Zustand des Proteins wurde mit einer niedrigeren maximalen Ligandenkonzentration von 100 μM erreicht.

Weiterhin wurden die einzelnen Komponenten von GSH (Glycin, Glutaminsäure, Cystein) auf ihre Affinität zu rMal d 1.02 untersucht, um zu klären, ob eine Spezifität für die einzelnen Aminosäuren besteht. Es wurde keine Bindung von Glutaminsäure und lediglich eine schwache Bindung von Glycin detektiert (Abbildung 32). Die Bindungsaffinität von Cystein konnte nicht bestimmt werden, da eine Wechselwirkung zwischen dem fluoreszierenden Farbstoff und Cystein beobachtet wurde (Abbildung 33). Ein Kontrollexperiment zwischen einem fluoreszenzmarkierten Kontrollpeptid und Cystein bestätigte die Wechselwirkung, indem eine Bindungskurve erhalten wurde. Gemäß dem Herstellerprotokoll interferiert GSH in Konzentrationen unter 10 mM nicht mit dem fluoreszierenden Farbstoff. Zur Absicherung wurden Kontrollexperimente zwischen GSH, GSSG und fluoreszenzmarkiertem Kontrollpeptid durchgeführt. Hierbei konnten keine Interaktionen festgestellt werden (Abbildung 33).

Ergebnisse

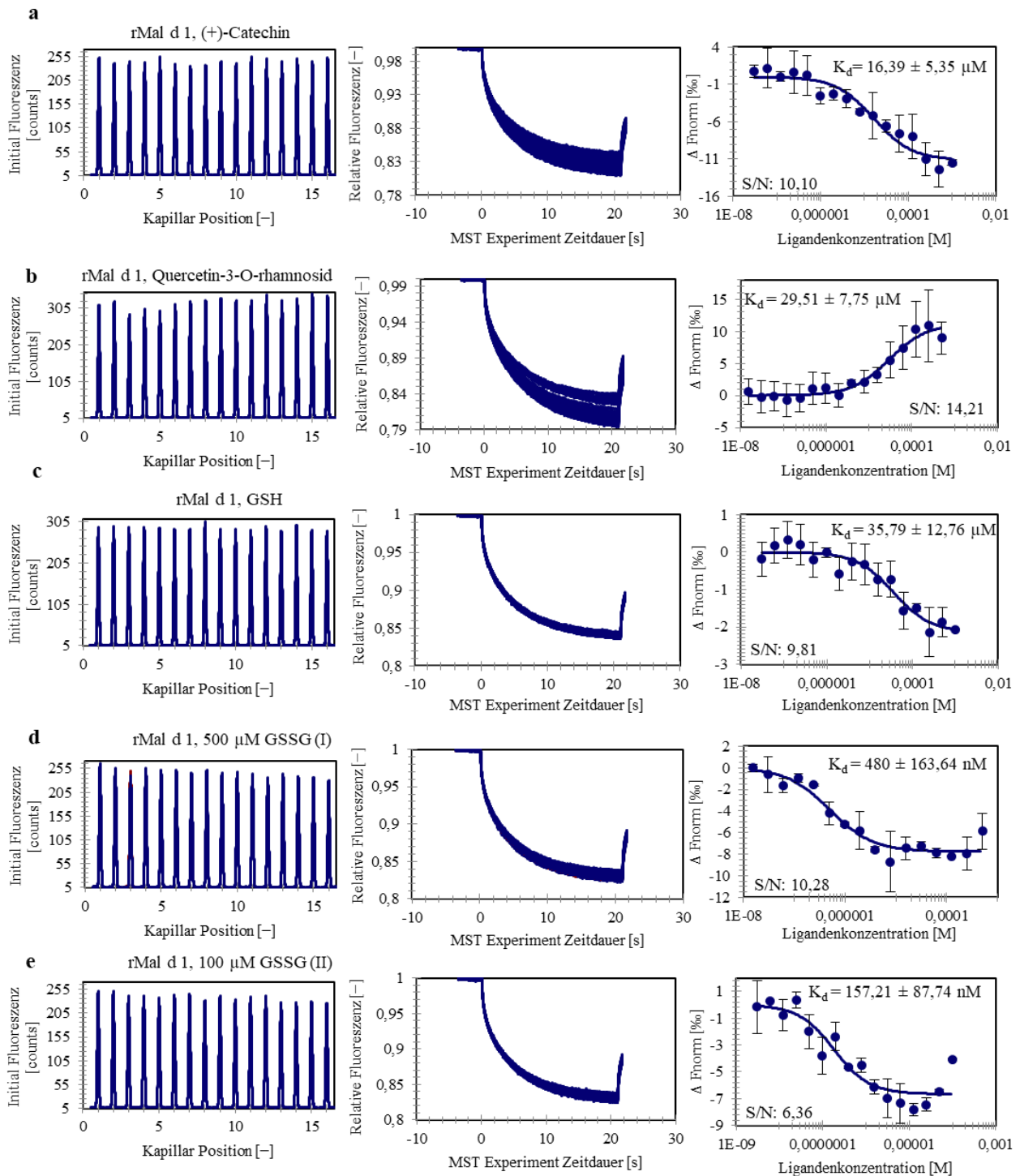


Abbildung 31 Die Wechselwirkung des Proteins rMal d 1.02 mit verschiedenen Liganden. Kapillarscan (links), MST-Spuren (Mitte) und Dosis-Wirkungskurven (rechts) von fluoreszenzmarkiertem rMal d 1.02 und (+)-Catechin (a), Quercetin-3-rhamnosid (b), GSH (c), GSSG (I) (d), und GSSG (II) (e). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der durchgeführten technischen Replikate an. Die jeweilige Dissoziationskonstante und das Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) sind in der Dosis-Wirkungskurve (rechts) angegeben (Chebib und Schwab 2021).

Ergebnisse

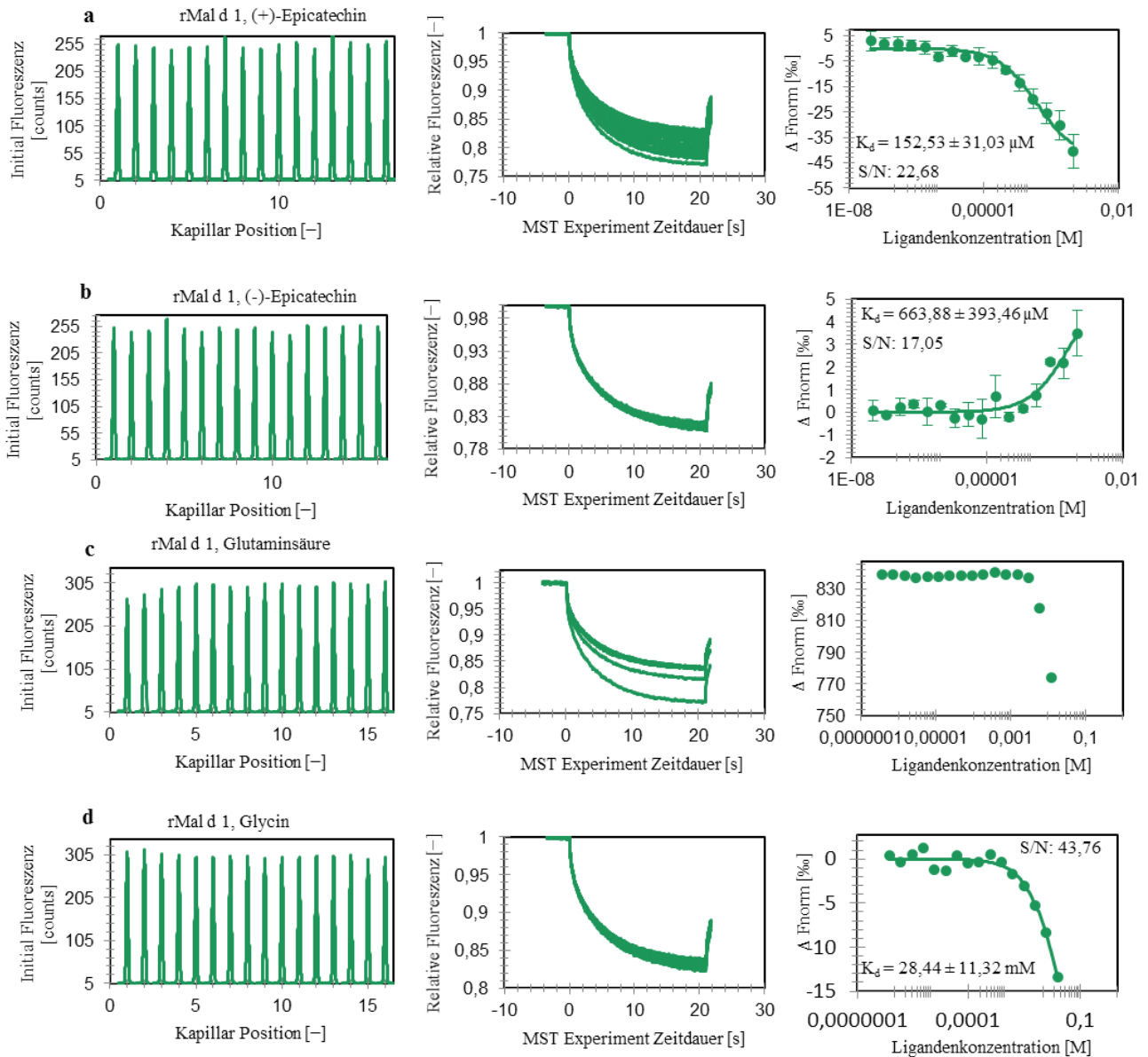


Abbildung 32 Die Wechselwirkung des Proteins rMal d 1.02 mit verschiedenen Liganden. Kapillarscan (links), MST-Spuren (Mitte) und Dosis-Wirkungskurven (rechts) von fluoreszenzmarkiertem rMal d 1.02 und (+)-Epicatechin (a), (-)-Epicatechin (b), Glutaminsäure (c) und Glycin (d). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der durchgeführten technischen Replikate an. Die jeweilige Dissoziationskonstante und das Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) sind in der Dosis-Wirkungskurve (rechts) angegeben (Chebib und Schwab 2021).

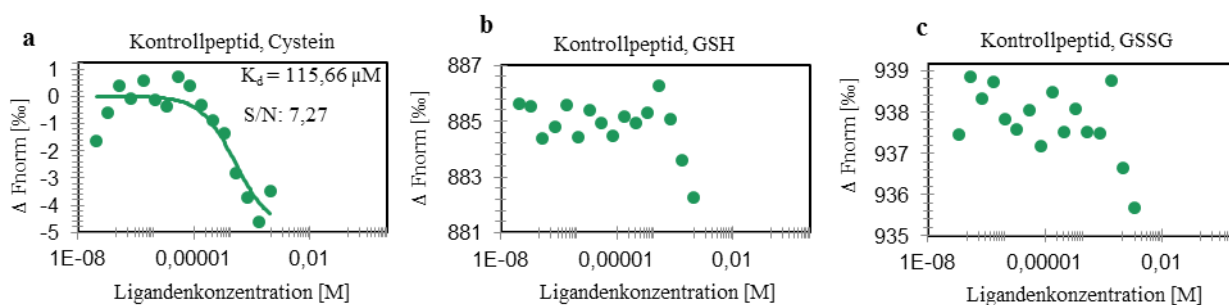


Abbildung 33 Kapillarscan (links), MST-Spuren (Mitte) und Dosis-Wirkungskurven (rechts) von fluoreszenzmarkiertem Kontrollpeptid und Cystein (a), GSH (b), GSSG (c). Die Dissoziationskonstante und das Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) ist in der Dosis-Wirkungskurve angegeben (Chebib und Schwab 2021).

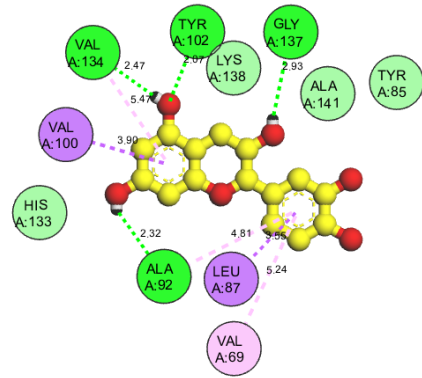
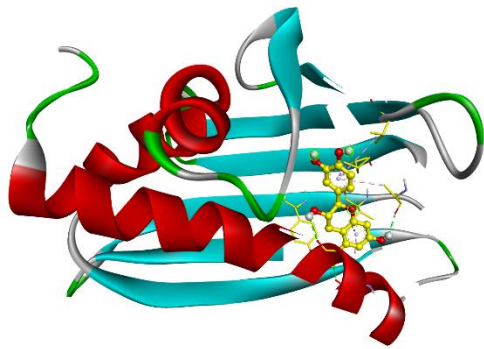
3.4.2. Molekulare Dockingexperimente

Um die in den experimentellen Untersuchungen beobachteten Ligandenbindungen *in silico* zu analysieren, wurden molekulare Dockingexperimente zwischen dem rekombinanten rMal d 1.02 und den verschiedenen Liganden (+)-Catechin, Quercetin-3-rhamnosid, (+)-Epicatechin, (-)-Epicatechin, GSH und GSSG durchgeführt. Für die Docking-Versuche wurde das Programm Autodock Vina verwendet. Die Ergebnisse der Docking-Simulationen wurden mit dem Programm Discovery Studio visualisiert und sind in Abbildung 34 und in Abbildung 35 zusammengefasst. Die K_d 's wurden aus den von AutoDock Vina bestimmten Bindungsenergien berechnet. Für alle untersuchten Liganden wurden niedrige K_d 's zwischen 0,25 und 14,35 μM ermittelt. Damit sind nahezu alle *in silico* bestimmten K_d 's niedriger als die experimentell bestimmten. Die erhaltenen Strukturen der verschiedenen Ligandkomplexe zeigen mögliche Eigenschaften des Bindungsmechanismus auf. Allgemein wurden die Moleküle in dem hydrophoben Hohlraum von rMal d 1.02 über hydrophobe Wechselwirkungen (π -Sigma, π -Alkyl) und polare Wechselwirkungen (Wasserstoffbrückenbindungen, van-der-Waals-Kräfte), die eine stark kohäsive Umgebung generieren, stabilisiert. Die Bindung von (+)-Catechin an rMal d 1.02 ergab sich durch Wasserstoffbrückenbindungen mit den Aminosäurereste Ala92, Val134, Tyr102 und Gly137. Das an rMal d 1.02 gebundene (+)-Epicatechin wurde durch Wechselwirkungen mit den Aminosäureresten Phe24, Lys138 und Ala141 stabilisiert, während die Bindung von (-)-Epicatechin durch Wechselwirkungen mit den Aminosäureresten Ala92, Val100, His133, Val134, Gly137 und Ala141 assoziiert ist. Die Interaktion zwischen Quercetin-3-rhamnosid und rMal d 1.02 wurde gemäß den Dockingexperimenten überwiegend durch Wasserstoffbrückenbindungen unterstützt. Außerdem wurden in allen Flavonoid-Komplexen π -Sigma und π -Alkyl Wechselwirkungen identifiziert, die die hydrophoben Wechselwirkungen des Liganden in der Bindungstasche von rMal d 1.02 begünstigen. Die hohe Affinität zwischen

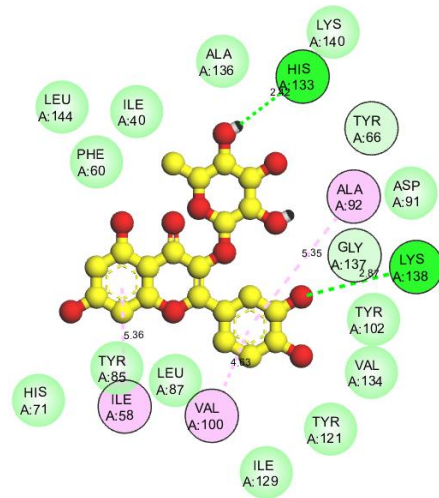
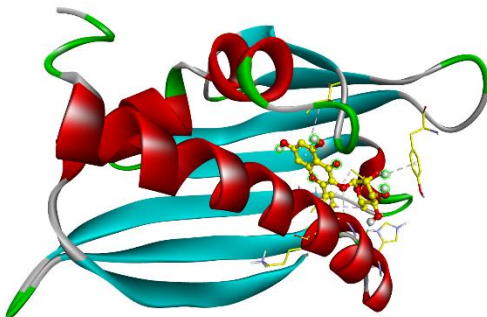
GSSG und rMal d 1.02 konnte auf insgesamt sieben Wasserstoffbrückenbindungen zurückgeführt werden. Dabei waren die Aminosäurereste Phe24, Tyr83, Lys86, Lys138 und Ala141 beteiligt. Letztere zeigte außerdem eine Alkyl-Interaktion mit der Disulfidbindung, die möglicherweise den Ligandentransfer zu der Bindungsstelle des Proteins begünstigt. Bei der Bildung des GSH-Protein-Komplexes sind lediglich drei Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt. Dies könnte die geringere Affinität von GSH, im Vergleich zu GSSG, zum Protein rMal d 1.02 erklären.

Es konnte gezeigt werden, dass hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen die Bindungsstrukturen begünstigen, wobei vor allem van-der Waals-Kräfte und π -Wechselwirkungen entscheidend zu der Stabilisierung der Flavonoid-Komplexe beitragen.

a $K_d = 0,81 \mu\text{M}$



b $K_d = 0,35 \mu\text{M}$



c $K_d = 0,25 \mu\text{M}$

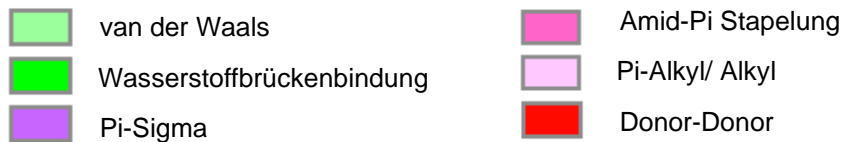
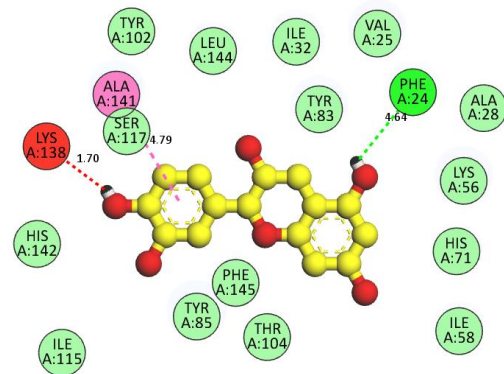
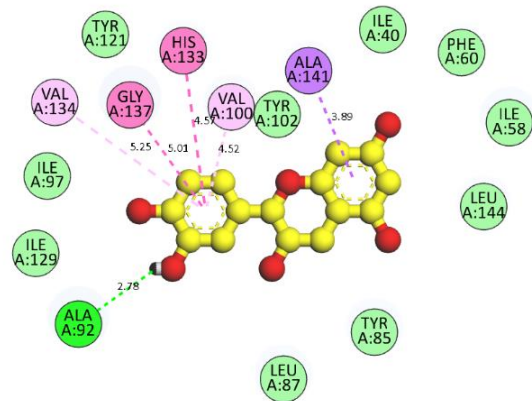
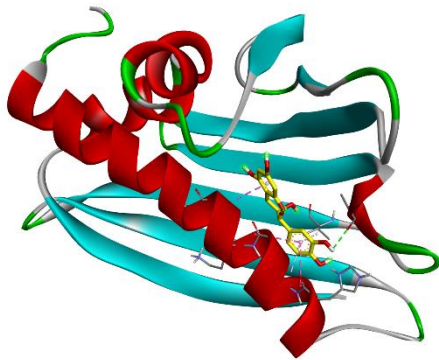
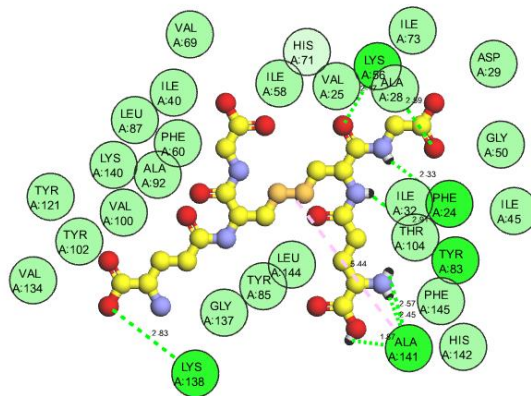
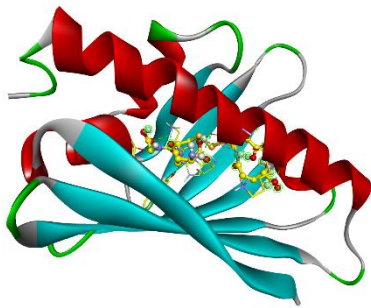


Abbildung 34 3D- (links) und 2D- (rechts) Wechselwirkungsmodell von rMal d 1.02 im Komplex mit (+)-Catechin (a), Quercetin-3-O-rhamnosid (b), (+)-Epicatechin (c) (Chebib und Schwab 2021).

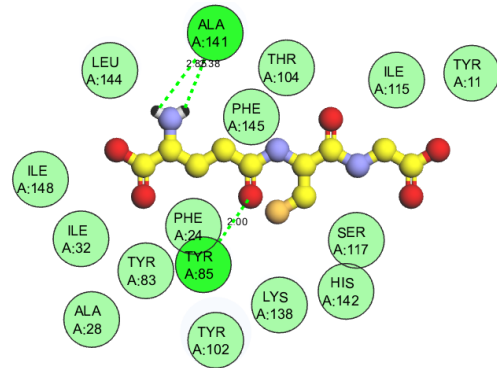
a $K_d = 0,69 \mu\text{M}$



b $K_d = 1,35 \mu\text{M}$



c $K_d = 14,35 \mu\text{M}$









- | | | | |
|---|---------------------------|---|-------------------|
|  | van der Waals |  | Amid-Pi Stapelung |
|  | Wasserstoffbrückenbindung |  | Pi-Alkyl/ Alkyl |
|  | Pi-Sigma |  | Donor-Donor |

Abbildung 35 3D- (links) und 2D- (rechts) Wechselwirkungsmodell von rMal d 1.02 im Komplex mit (-)-Epicatechin (a), GSSG (b) und GSH (c) (Chebib und Schwab 2021).

3.5. Proteomik-Analysen zur Identifizierung von Mal d Proteinen

Die Proteomik Untersuchungen mittels LC-MS/MS wurden am Bayerischen Zentrum für Biomolekulare Massenspektrometrie (BayBioMS) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht (Chebib et al. 2022).

3.5.1. Mal d Isoformen

Zur Identifizierung von Mal d Proteinen via LC-MS/MS wurden alle Proteinsequenzen von *Malus domestica L. Borkh* aus der NCBI (National Center for Biotechnology Information) Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) extrahiert und im Dateiformat FASTA zusammengefasst (Romer et al. 2020). Die FASTA-Datei setzte sich aus 113 Mal d 1 Isoformen, 10 Mal d 2 Proteinen, 9 Mal d 3 Proteinen und 15 Mal d 4 Proteinen zusammen (Abbildung 36). Innerhalb der Gruppen von Mal d 1.01 bis Mal d 1.11 bewegte sich die prozentuale Sequenzhomologie zwischen 94 und 99 % (Tabelle 17). Die Mal d 1.12 Proteine zeigten eine prozentuale paarweise Identität von nur 56 %.

Tabelle 17 Prozentuale Sequenzhomologie von Mal d 1-4 Isoformen innerhalb der jeweiligen Proteingruppe (Chebib et al. 2022). Die Berechnung der prozentualen paarweisen Identität erfolgte mittels Geneious Prime (v. 2021.1.1) (<https://www.geneious.com>).

Mal d 1-4	Paarweise Sequenzhomologie [%] zwischen den Isoformen einer Proteingruppe
Mal d 1.01	98
Mal d 1.02	99
Mal d 1.03	95
Mal d 1.04	97
Mal d 1.05	99
Mal d 1.06	94
Mal d 1.07	99
Mal d 1.08	-
Mal d 1.09	99
Mal d 1.10	99
Mal d 1.11	95
Mal d 1.12	56
Mal d 2	80
Mal d 3	81
Mal d 4	85

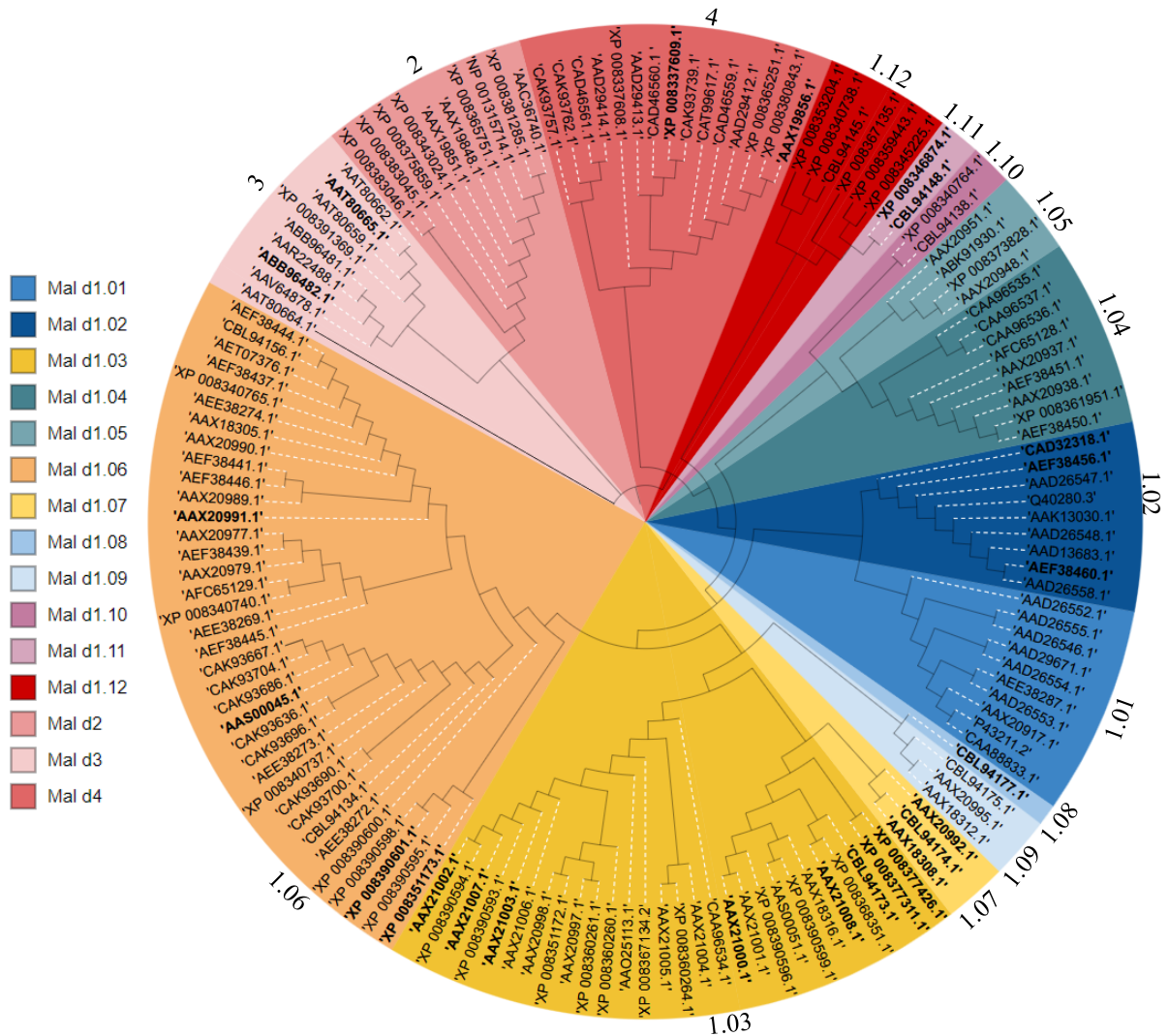


Abbildung 36 Phylogenetische Analyse von Mal d Proteinen und ihren Isoformen gemäß der NCBI-Datenbank (Chebib et al. 2022). Mal d-Gruppennummern sind in der Legende links und neben den Gruppen entsprechend angegeben. Isoformen, die durch mindestens ein spezifisches Peptid identifiziert wurden, sind fettgedruckt. Isoformen, die lediglich durch unspezifische Peptide detektiert wurden, sind durch gestrichelte Linien markiert. Der phylogenetische Baum wurde mit Geneious Prime (v. 2021.1.1) (<https://www.geneious.com>) erstellt und mit Hilfe von iTOL (v. 6; Letunic und Bork (2021)) annotiert (2.2.13.4).

3.5.2. LC-MS/MS Datenevaluierung

Im Rahmen von Proteomik-Analysen wurden 52 Apfel-Genotypen mittels LC-MS untersucht. Insgesamt wurden 50.941 tryptische Peptide identifiziert, wovon 195 Peptide Mal d 1, 17 Peptide Mal d 2, 14 Peptide Mal d 3 und 18 Peptide Mal d 4 zugeordnet werden konnten (Abbildung 37 a). Dabei war der Anteil von spezifischen Peptiden, die nur in einer einzigen Isoform enthalten sind, deutlich geringer. Für Mal d 1 wurden 40 spezifische Peptide detektiert, während lediglich 3 spezifische Peptide für Mal d 3 und 2 spezifische Peptide für Mal d 4 identifiziert wurden (Abbildung 37 a). Für einen Großteil der detektierten Peptide konnte keine eindeutige Peptid-Isoform Zuordnung getroffen werden. So sind 48 Peptide in zwei Isoformen,

17 Peptide in drei Isoformen, 20 Peptide in vier Isoformen und 66 Peptide in mindestens 10 Isoformen enthalten (Abbildung 37 b). Die Peptidlänge betrug für alle Peptide zwischen sieben und 37 Aminosäuren (Abbildung 37 c), wobei Peptide mit einer Aminosäureanzahl von 11, 14 und 15 am häufigsten vorhanden waren.

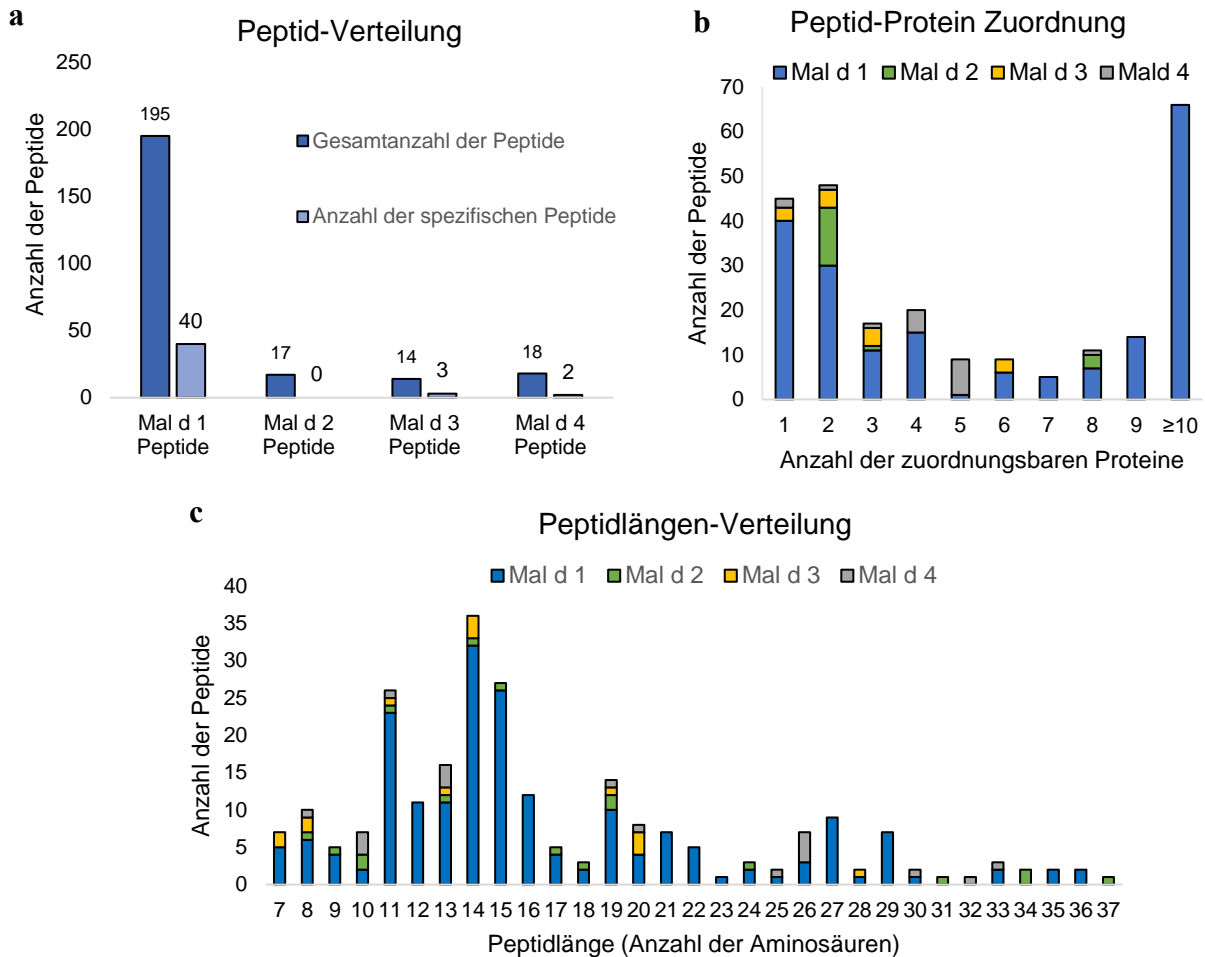


Abbildung 37 Allgemeine Informationen zu den detektierten Peptiden mittels LC-MS/MS (Chebib et al. 2022). Gesamtanzahl und Anzahl spezifischer Peptide der jeweiligen Proteine Mal d 2, Mal d 3 und Mal d 4 (a). Anzahl der Peptide, die einem oder mehreren Proteinen zugeordnet werden konnten (b). Peptidlängen-Verteilung (c).

Die Lokalisierung von Peptiden variierte innerhalb der Aminosäuresequenzen. Für Mal d 1 wurden Peptide aus allen Regionen der Sequenz erhalten (Abbildung 38). Hohe Peptidanzahlen dominierten die Positionen zwischen den Aminosäuren 19-33, 41-55, 41-56 und 105-115. Auch die detektierten Peptide von Mal d 2 deckten einen großen Teil der Primärstruktur ab, wobei in dem Bereich zwischen den Aminosäuren 1-26 und 89-162 keine Peptide detektiert wurden (Abbildung 39 a). Für Mal d 3 waren alle erhaltenen Peptide zwischen den Aminosäuren 43 und 115 lokalisiert (Abbildung 39 b). Mal d 4 zeigte eine relativ gleichmäßige Verteilung der identifizierten Peptide (Abbildung 39 c).

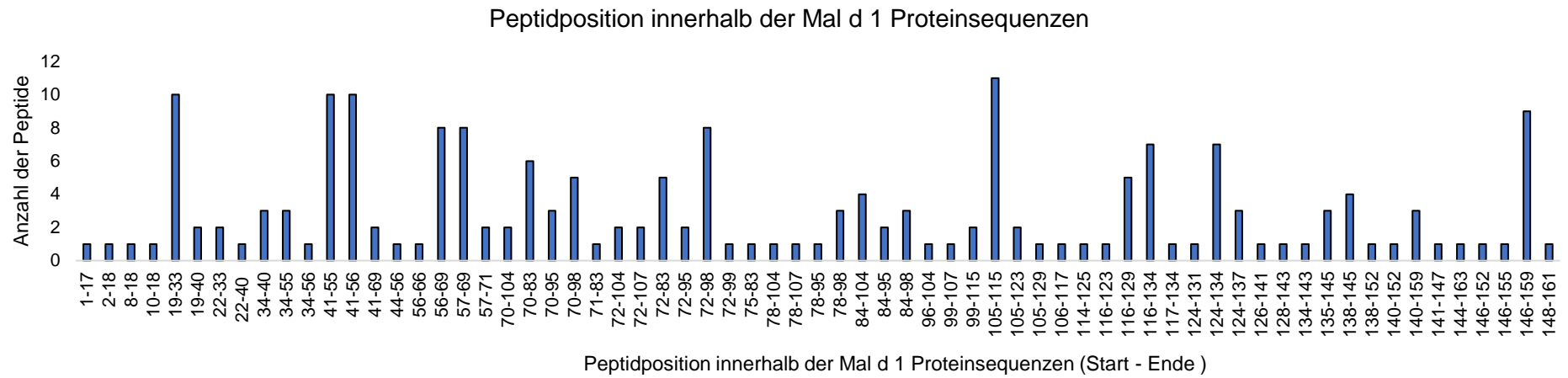


Abbildung 38 Peptidpositionen innerhalb von Mal d 1 Proteinsequenzen (Chebib et al. 2022).

Ergebnisse

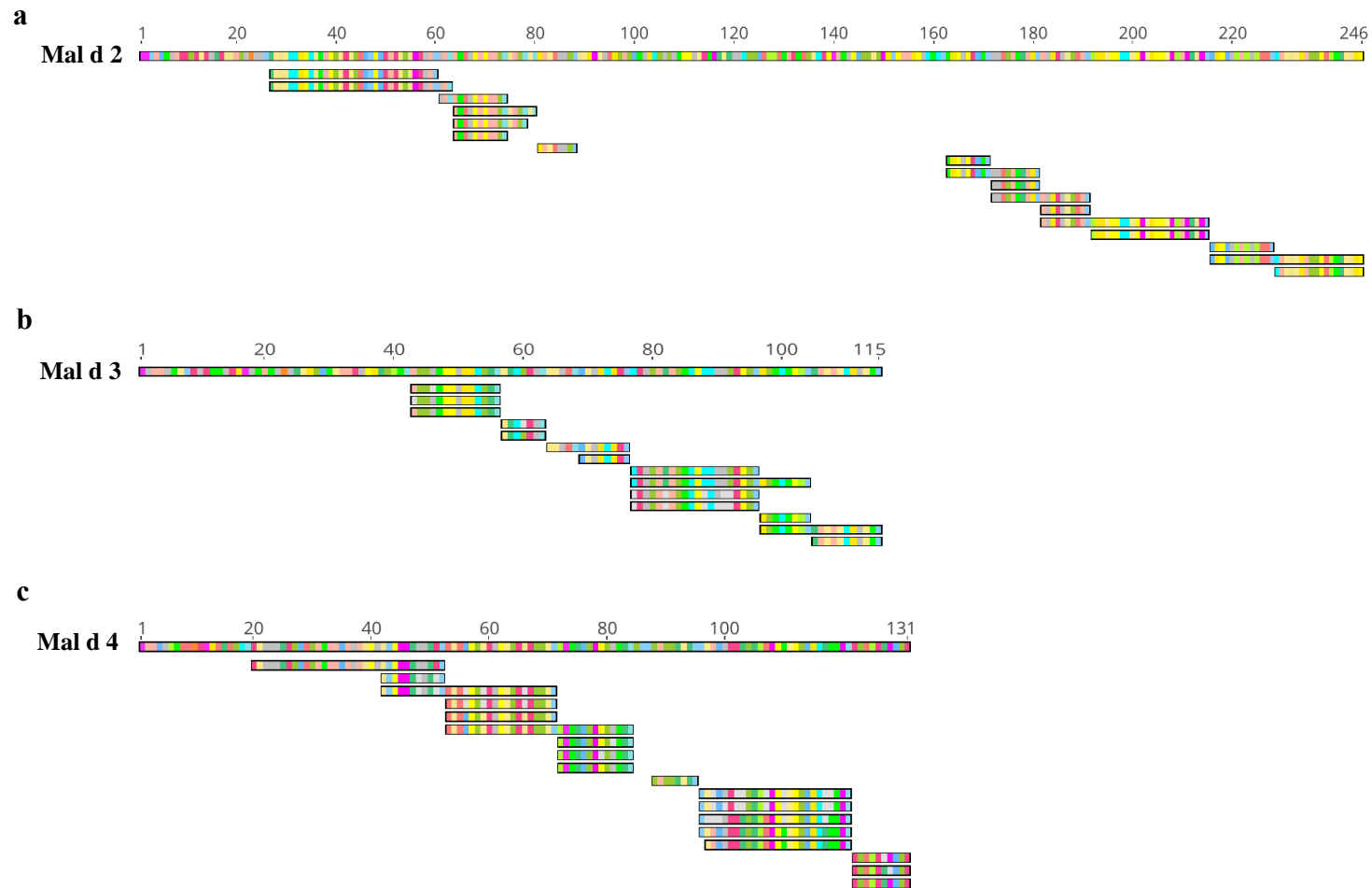



Abbildung 39 Peptidpositionen innerhalb von Mal d 2 (a), Mal d 3 (b) und Mal d 4 (c) (Chebib et al. 2022). Die Abbildungen wurden mit Geneious Prime (v. 2021.1.1) (<https://www.geneious.com>) generiert.

3.5.3. Definition von Genotyp-Gruppen

Für die statistische Auswertung der Proteomik-Messungen wurden alle untersuchten Genotypen in drei Gruppen unterteilt (Abbildung 40). Gruppe I umfasste alle gut verträglichen Genotypen mit einem Symptomwert von unter 1,4. Gruppe II enthielt alle Genotypen mit einem mittleren Symptomwert zwischen 1,4 und 1,7 und in Gruppe III wurden alle Genotypen mit einem mittleren Symptomwert von über 1,7 zusammengefasst. Die in vivo-Daten zu den Genotypen aus den Erntejahren 2017 und 2018 wurden von Romer et al. (2020) herangezogen.



	Gruppe I	Gruppe II	Gruppe III
2017	p10, p22, p92, p13, p40, p185, p59, p193, p198	BR*, p158, p204, p141, p8, p188, p124	p211, p167, p36, p29, p160
2018	p10, p15, BR*, p13, p185, p204, p124, p211, p8, p193, p188, p141, p198, p92	P40, p29, p59, P158, SAN, p168	p78, p17, p36, p48, GD*
2019	p168, p92, p185, SAN*	p78	p211

*BR- Braeburn, SAN- Santana, GD- Golden Delicious

Abbildung 40 Einteilung der analysierten Genotypen gemäß ihres allergenen Potentials (Chebib et al. 2022). Genotypen der Gruppe I besitzen einen mittleren Symptomwert von < 1,4, der Gruppe II einen mittleren Symptomwert zwischen 1,4 und 1,7 und der Gruppe III einen mittleren Symptomwert von über 1,7.

3.5.4. Hierarchische Clusteranalyse

Es wurde eine hierarchische Clusteranalyse basierend auf den LC-MS/MS Daten angefertigt. Dabei wurden Proben mit ähnlichen Peptidmustern zusammengefasst und in Cluster gruppiert (Abbildung 41). Innerhalb eines Clusters zeigen die Genotypen ein ähnliches Mal d Peptidmuster. Für alle Genotypen wurden je zwei biologische Replikate untersucht. Die Proben des Erntejahres 2017 zeigten einige Variationen zwischen den Replikaten hinsichtlich ihres Peptidprofils, während die Replikate der analysierten Proben aus den Erntejahren 2018 und 2019 nahezu vollständig zusammenclusterten. Im Dendrogramm wurden Proben, die gemäß der Humanstudien ein niedriges, mittleres und hohes allergenes Potential besitzen, entsprechend jeweils blau, schwarz und rot markiert (Abbildung 41). Die Proben aus dem Erntejahr 2017 wurden getrennt von den Proben aus den Erntejahren 2018 und 2019 mittels

LC-MS/MS untersucht und wurden deshalb auch in der Clusteranalyse getrennt voneinander betrachtet, um Batch-Effekte zu vermeiden. In beiden Dendrogrammen ergaben sich zwei Hauptcluster, wobei Cluster 2 in zwei weitere Subcluster unterteilt werden konnte.

Abbildung 41 a zeigt das Dendrogramm der Proben aus dem Erntejahr 2017. Cluster 1 zeigte sowohl Genotypen mit einem niedrigen (p22-1, p13-2 und p92-2) als auch hohen (p29-1, p29-2, p167-2 und p36-1) allergenen Potential. Das Subcluster 2.1 enthielt die schlecht verträglichen Genotypen p211 (p211-1 und p211-2), p167-1 und p36-2. Zwischen diesen Genotypen waren auch die gut verträglichen Genotypen wie p185 (p185-1 und p185-2) und p10 (p10-1 und p10-2) zu finden. Beide Genotypen besitzen niedrige Mal d 1 Gehalte von unter 1 µg/g FG, während die schlecht verträglichen Genotypen in demselben Cluster auch deutlich höhere Allergengehalte zeigten (Romer et al. 2020). Obgleich alle Genotypen innerhalb dieses Clusters in der Humanstudie von Allergikern unterschiedlich gut vertragen wurden, zeigten sie in der Clusteranalyse eine ähnliche Mal d Peptidzusammensetzung. Dies lässt darauf schließen, dass bereits geringe Abweichungen im Peptidmuster und damit auch in der Isoformverteilung zu drastischen Unterschieden in der Verträglichkeit von Apfel-Genotypen führen kann. Alternativ könnten weitere Faktoren für die Allergenität entscheidend sein.

Die Clusteranalyse der Genotypen aus dem Erntejahr 2018 und 2019 zeigte nur wenige gut und mittelmäßig verträgliche Genotypen in Cluster 1 (Abbildung 41 b). Der Großteil der untersuchten Proben war in Cluster 2 zu finden. Das Subcluster 2.1 enthielt die schlecht verträglichen Genotypen p78_2018 (p78-1 und p78-2) und p211_2019 (p22-1 und p211-2). Alle weiteren Genotypen mit einem hohen allergenen Potential waren in Subcluster 2.2 zu finden. Dabei clusterten GD (GD-1 und GD-2) und p48_2018 (p48-1 und p48-2), sowie p17_2018 (p17-1 und p17-2) und p36_2018 (p36-1 und p36-2) zusammen. Weiterhin clusterten auch dieselben Genotypen aus zwei unterschiedlichen Erntejahren zusammen, wie es beispielsweise für SAN (SAN-1 und SAN-2) (Subcluster 2.2) und p211 (p211-1 und p211-2) (Subcluster 2.1) aus den Erntejahren 2018 und 2019 der Fall war. Interessanterweise zeichnete sich SAN trotz nahezu gleicher Peptidzusammensetzung durch unterschiedliche allergene Potentiale in beiden Jahren aus. Daneben waren nicht alle Genotypen in ihrer Peptidverteilung über zwei Erntejahre stabil. Dies zeigte sich bei den Genotypen p92 (p92-1 und p92-2) und p78 (p78-1 und p78-2), die aus verschiedenen Erntejahren im Dendrogramm auch durch größere Distanzen getrennt waren und damit entsprechend größere Unterschiede in ihrem Peptidprofil aufwiesen.

Die Clusteranalyse zeigte, dass die Peptidzusammensetzung je nach Genotyp unterschiedlich stark variierte, wobei eine eindeutige Differenzierung von Genotypen hinsichtlich ihres allergenen Potential basierend auf dem Peptidmuster nicht möglich war.

Ergebnisse

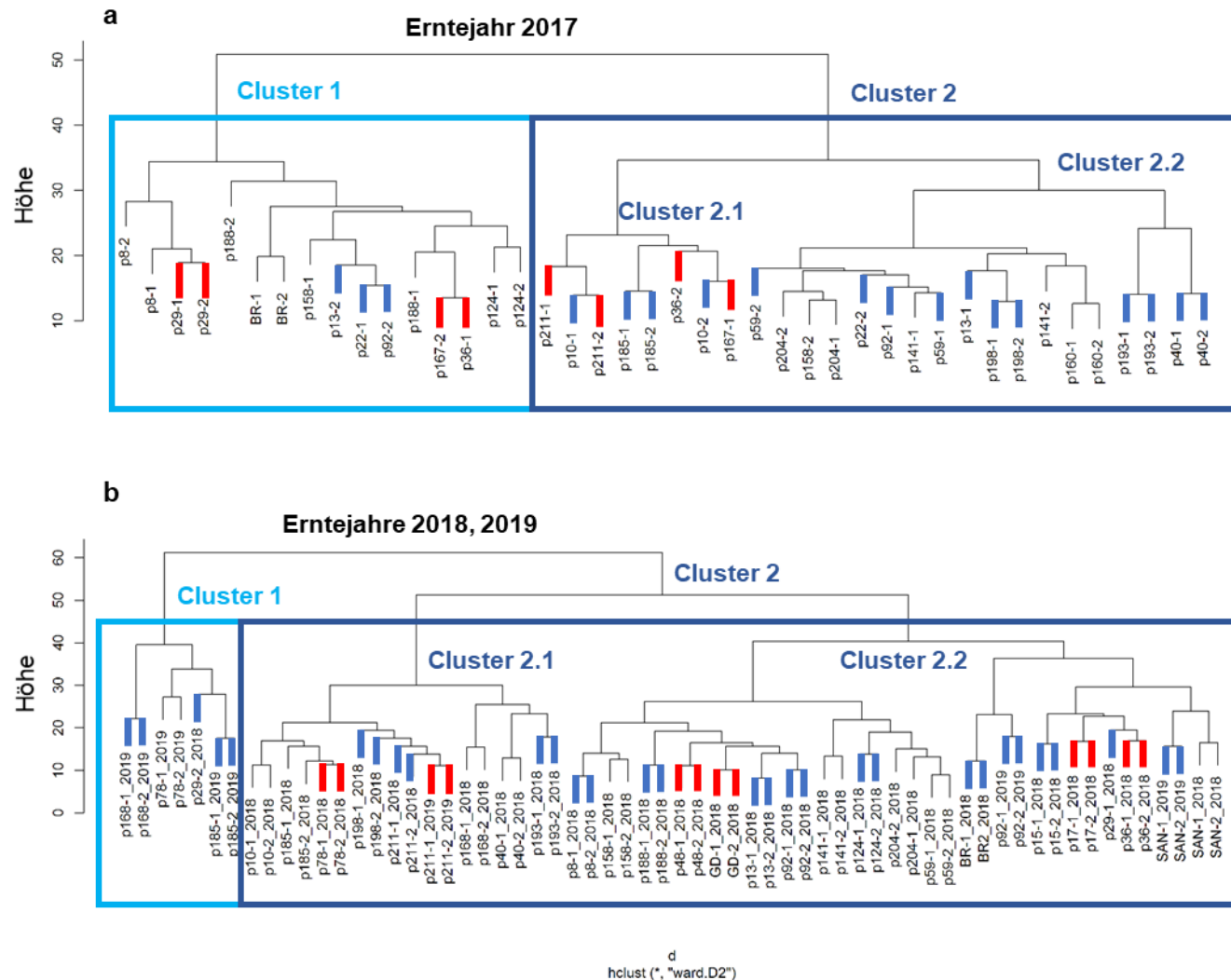


Abbildung 41 Hierarchische Clusteranalyse aus den detektierten Peptidintensitäten der analysierten Genotypen des Erntejahres 2017 (a) und des Erntejahres 2018, 2019 (b) (Chebib et al. 2022). Die Distanzen wurden mit dem Ward.d2-Verfahren berechnet. Farbige Rechtecke zeigen die identifizierten Cluster an. Es wurden zwei Hauptcluster (1, 2) erhalten. Cluster 2 wurde in die Subcluster 2.1 und 2.2 weiter unterteilt. Genotypen, die gemäß Humanstudie schlecht vertragen wurden, sind rot markiert und Genotypen, die gut vertragen wurden, sind blau markiert.

3.5.5. LC-MS/MS Analyse von verschiedenen Apfelproteinextrakten

Im Rahmen von Proteomikanalysen wurden Proteinextrakte von verschiedenen Genotypen nach tryptischen Verdau mittels LC-MS/MS auf ihre Peptidzusammensetzung untersucht.

3.5.5.1. Identifizierung von spezifischen Peptiden

In 52 Apfel-Genotypen wurden insgesamt 21 Mal d 1, zwei Mal d 3 und zwei Mal d 4 Proteine durch die Detektion von spezifischen Peptiden eindeutig nachgewiesen (Tabelle 18). Spezifische Peptidsequenzen kommen nur in einem einzigen Mal d-Protein vor, jedoch können aus einem Mal d-Protein wiederum mehrere spezifische Proteine hervorgehen. Die Identifizierung der Peptide erfolgte über den sogenannten Andromeda Score. Andromeda ist eine Peptidsuchmaschine, die eine zuverlässige Identifizierung von Peptiden durch LC-MS/MS Rohdaten erlaubt. Für die meisten spezifischen Peptide lag der Andromeda Score > 60 , womit eine Identifizierung mit hoher Konfidenz gewährleistet war. Ein großer Anteil der detektierten spezifischen Peptide konnte Isoformen der Gruppe Mal d 1.03 zugeordnet werden. Diese Peptide waren in der Aminosäuresequenz vor allem zwischen den Aminosäuren in Position 105 und 115 lokalisiert und unterschieden sich lediglich in einzelnen Aminosäuren. Keine spezifischen Peptide, jedoch eine Reihe von unspezifischen Peptiden wurden für die Gruppe von Mal d 1.01 detektiert. Für Mal d 1.12 konnten weder spezifische noch andere Peptide identifiziert werden.

In den meisten Genotypen konnten zwischen einer und fünfzehn Mal d 1 Isoformen über spezifische Peptide eindeutig identifiziert werden. Lediglich für den Genotyp p193 (2018) konnten keine spezifischen Peptide detektiert werden. Jedoch konnte durch eine Reihe von unspezifischen Peptidsequenzen auf das Vorkommen von verschiedenen Isoformen in p193 (2018) geschlossen werden. Wie bereits erwähnt besitzen die Mal d 1 Isoformen eine hohe Sequenzhomologie, wodurch die Detektion von spezifischen Peptiden und damit auch die Differenzierung zwischen den Isoformen erschwert wird. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass in den analysierten Genotypen deutlich mehr Isoformen vorhanden sind, als die durch spezifische Peptide eindeutig identifizierten. Die Isoformen XP_008390601.1 und AAX21002.1 wurden in nahezu allen Genotypen eindeutig nachgewiesen und lassen daher vermuten, dass sie zu den häufig exprimierten Mal d 1 Isoformen zählen.

Ergebnisse

Tabelle 18 Identifizierte Mal d Proteine in 52 Apfel-Genotypen (Malus x domestica L. Borkh) (Chebib et al. 2022). Für jedes detektierte spezifische Peptid ist das zugehörige Protein, seine Proteingruppe, die prozentuale Sequenzidentität zu Bet v 1 a und der Andromeda Score angegeben.

Protein/ NCBI Eintrag	Protein- gruppe	Sequenz- identität mit Bet v 1 a [%]	Spezifische Peptide (Sequenzposition)	Andromeda Score
CAD32318.1	Mal d 1.02	57	GVVITYENEYTSSEIPPPR (2-18)	98,90
AEF38456.1	Mal d 1.02	56	LFMAFVLDADNLIPK (19-33)	84,19
AEF38460.1	Mal d 1.02	56	NITFGEQSQYGYVK (56-69)	240,8
XP_008377426.1	Mal d 1.03	59	HKIDGVDKDNFVYK (70-83)	45,86
			LVAYGSGSVIK (105-115)	108,57
AAX21000.1	Mal d 1.03	56	LMASGSGCVIK (105-115)	94,31
			HRIDGVDKDNLVYK (70-83)	139,66
			IDGVDKDNLVYK (72-83)	185,99
AAX21003.1	Mal d 1.03	60	LVAAGSGSVIK (105-115)	123,86
AAX21002.1	Mal d 1.03	60	LVAASSGSVIK (105-115)	116,73
AAX21008.1	Mal d 1.03	59	LVASDNNGSIK (105-115)	134,25
			STSHYYTKGDVEIKEEHVK (116-134)	263,31
CBL94173.1	Mal d 1.03	60	LVASDSGSIK (105-115)	88,39
AAX21007.1	Mal d 1.03	60	LVASSNGSVIK (105-115)	143,03
XP_008377311.1	Mal d 1.03	57	YSVIEGDAITETIEK (84-98)	191,26
			YSVIEGDAITETIEKISYETK (84-104)	48,23
AAX20991.1	Mal d 1.06	53	LYNALVLDADNLILK (19-33)	118,9
XP_008351173.1	Mal d 1.06	56	HKVDGIDKDNFVYK (70-83)	217,88
			VDGIDKDNFVYK (72-83)	176,78
XP_008390601.1	Mal d 1.06	56	STSHYHTKEDVEIK (116-129)	78,19
			STSHYHTKEDVEIKEEHVK (116-134)	226,65
			EDVEIKEEHVK (124-134)	276,57
AAS00045.1	Mal d 1.06	55	LYYALVLDADNLLPK (19-33)	215,08
			VGKDKAHDLFK (135-145)	49,28
			DKAHDLFK (138-145)	161,79
AAX18308.1	Mal d 1.07	60	HRIDGVDKENFVYQYSVIEGDAISETI EK (70-98)	62,38
CBL94174.1	Mal d 1.07	60	HRIDGVDKDNFVYQYSVIEGDAISETI EK (70-98)	213,84
AAX20992.1	Mal d 1.07	59	HKIDGVDKDNFVYQYSVIEGDAISETI EK (70-98)	154,66
CBL94177.1	Mal d 1.08	58	LFNATALDGDDELIAK (19-33)	168,02
			SIEILEGDGGVGTQVK (41-58)	246,26
			IIFGEGSTNGYVK (57-69)	128,35
			RIDVIDKDNFVYK (71-83)	124,07
			IDVIDKDNFVYK (72-83)	143,97
			ISYETTLVASGSGSIK (99-115)	152,16
			GDVEINEEHLK (124-134)	153,97
CBL94148.1	Mal d 1.11	33	MFNALILDHNICPK (19-33)	180,18
			IDALDKEALSCTYTFIESDATDHLLDK LEYITYDVK (72-107)	101,34
			EALSCTYTFIESDATDHLLDKLEYITY DVK (78-107)	108,75
XP_008346874.1	Mal d 1.11	34	MFNALILDHNLCPK (19-33)	179,35
			IDALDKEALSCSYTFIESDASDHLM KLEYITYDVK (72-107)	112,72
ABB96482.1	Mal d 3	-	NGGAVPPACCNGIR (43-56)	148,96
			TINSLAR (57-63)	166,34
AAT80665.1	Mal d 3	-	SLAGSVSGVNPNGNVESLPGK (77-96)	308,20
AAX19856.1	Mal d 4	-	KTGQDLVFGIYEEPLTPGQCNMIVER (96-121)	144,18
XP_008337609.1	Mal d 4	-	LGDYLVVEQGL (122-131)	174,92

3.5.5.2. Allergenprofil von Apfel-Genotypen

Im Rahmen von statistischen Untersuchungen wurden signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen in Hinblick auf ihre Peptid- und Isoformzusammensetzung ermittelt.

Dominierende Peptide in Gruppe I- und Gruppe III-Genotypen

Dabei wurde zunächst ein gepaarter Student's t-test zwischen den detektierten Peptidintensitäten von Gruppe I (gut vertragene)- und Gruppe III (schlecht vertragene)-Genotypen durchgeführt, um mögliche Peptid-/ Isoform-Einflüsse auf das allergene Potential von Genotypen zu untersuchen. Die relative Quantifizierung von Peptiden erfolgte über den „fold change“. Als „fold change“ ist die relative Veränderung der Peptidexpression im Vergleich von zwei Gruppen definiert. Je höher der „fold change“ ausfällt, desto differentieller sind die entsprechenden Peptide zwischen den Gruppen exprimiert. Die statistische Signifikanz wurde mit $p < 0,1$ festgelegt.

Einige Peptide waren in den Gruppe III-Genotypen deutlich stärker angereichert als in den Gruppe I-Genotypen. Die Ergebnisse sind in Form von Beeswarm Boxplots dargestellt (Abbildung 42, Abbildung 43). Die Peptidsequenzen DFDEPGSLAPTGLHLGGTK (Aminosäuren (AS) 53-71), GDVEIKEEQVK (AS 124-134) and HRIDGLDKDNFVYK (AS 70-83) waren mit „fold changes“ von jeweils 1,5, 2,8 and 9,5 in Gruppe III-Äpfeln häufiger vertreten im Vergleich zu Gruppe I-Äpfeln des Erntejahres 2017 (Abbildung 42). Diese Peptide sind zwar nicht spezifisch für eine Isoform, können aber jeweils kleineren Gruppen von Isoformen zugeordnet werden (Abbildung 42). Auch die Peptide INFGEGSTYSYVK (AS 57-69), KINFGEGSTYSYVK (AS 56-69), LYNAFVLDADNLIPK (AS 19-33) und TVEILEGDGGVGTIKK (AS 41-56) waren in der Gruppe III stärker angereichert als in der Gruppe I und kommen in mehr als 20 verschiedenen Isoformen vor. Dabei können die Peptide INFGEGSTYSYVK (AS 57-69), KINFGEGSTYSYVK (AS 56-69) und LYNAFVLDADNLIPK (AS 19-33) den Mal d 1 Gruppen 1.03 und 1.07 zugeordnet werden, während das Peptid TVEILEGDGGVGTIKK (AS 41-56) ausschließlich in Mal d 1.06 Isoformen vorkommt.

In den Gruppe III-Äpfeln aus dem Erntejahr 2018 waren die Peptide GDVEIKEEHVKAGK (AS 124-137), KITFGEGSQYGYVK (AS 56-69) und LIESYLKGHPDAYN (AS 146-159) mit „fold changes“ von 2,1, 1,9 und 3 in hohem Maß angereichert (Abbildung 43). Die genannten Peptide sind in mindestens 10 Isoformen enthalten. Des Weiteren ist das Peptid HAEILEGDGGPGTIKK (AS 41-56) in Gruppe III-Äpfeln vertreten und ist ausschließlich in sieben Mal d 1.02 Isoformen zu finden. Das einzige Peptid, dass in Gruppe I-Äpfeln höher

Ergebnisse

angereichert war als in Gruppe III-Äpfeln, ist QINFTEASPMK (AS 56-66) und kann den beiden Isoformen CBL94148.1, XP_008346874.1 aus der Gruppe von Mal d 1.11 zugeordnet werden (Abbildung 43).

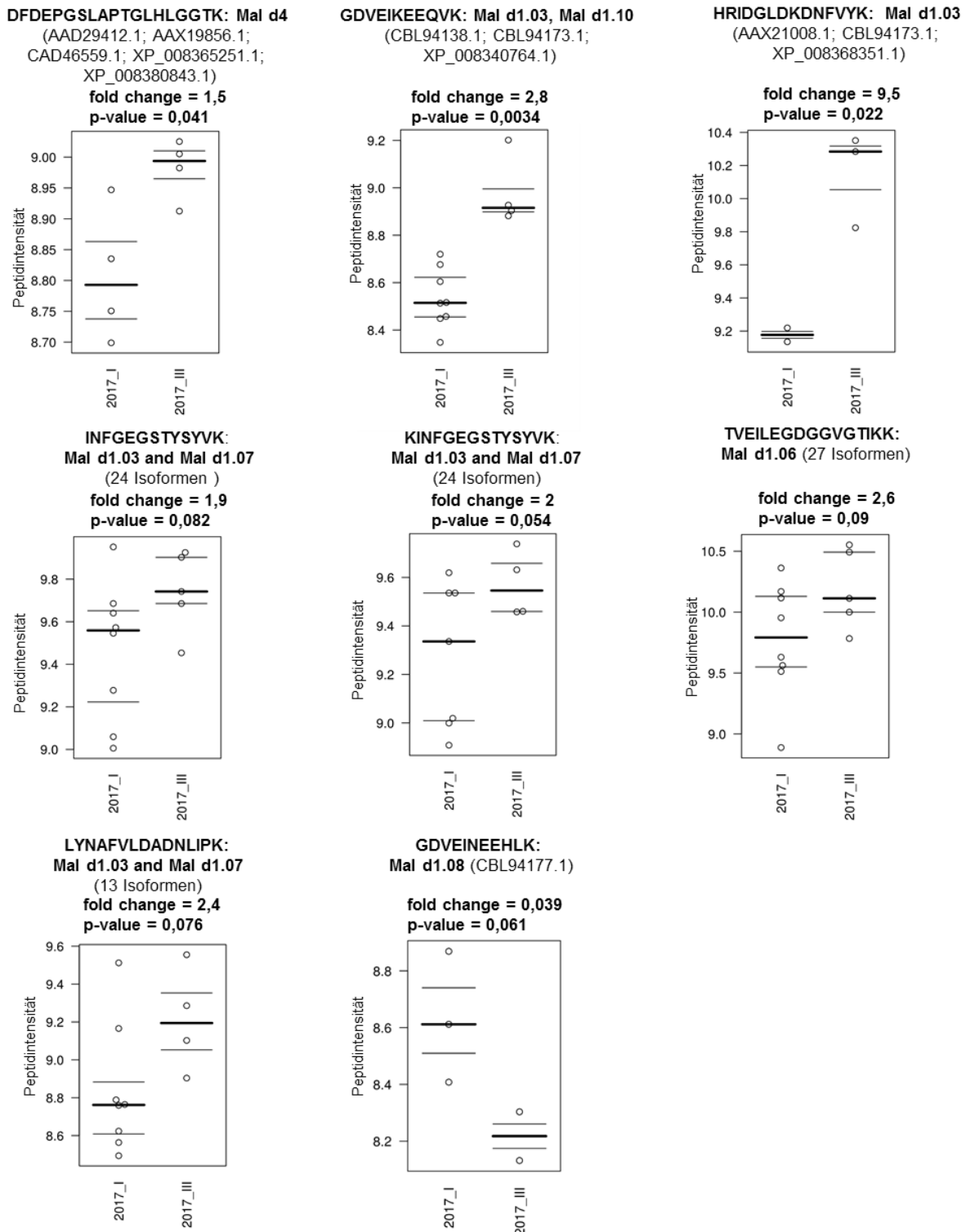


Abbildung 42 Beeswarm Boxplots der durchgeführten t-test Analysen zwischen Gruppe I- und Gruppe III-Genotypen des Erntejahres 2017 (Chebib et al. 2022).

Ergebnisse

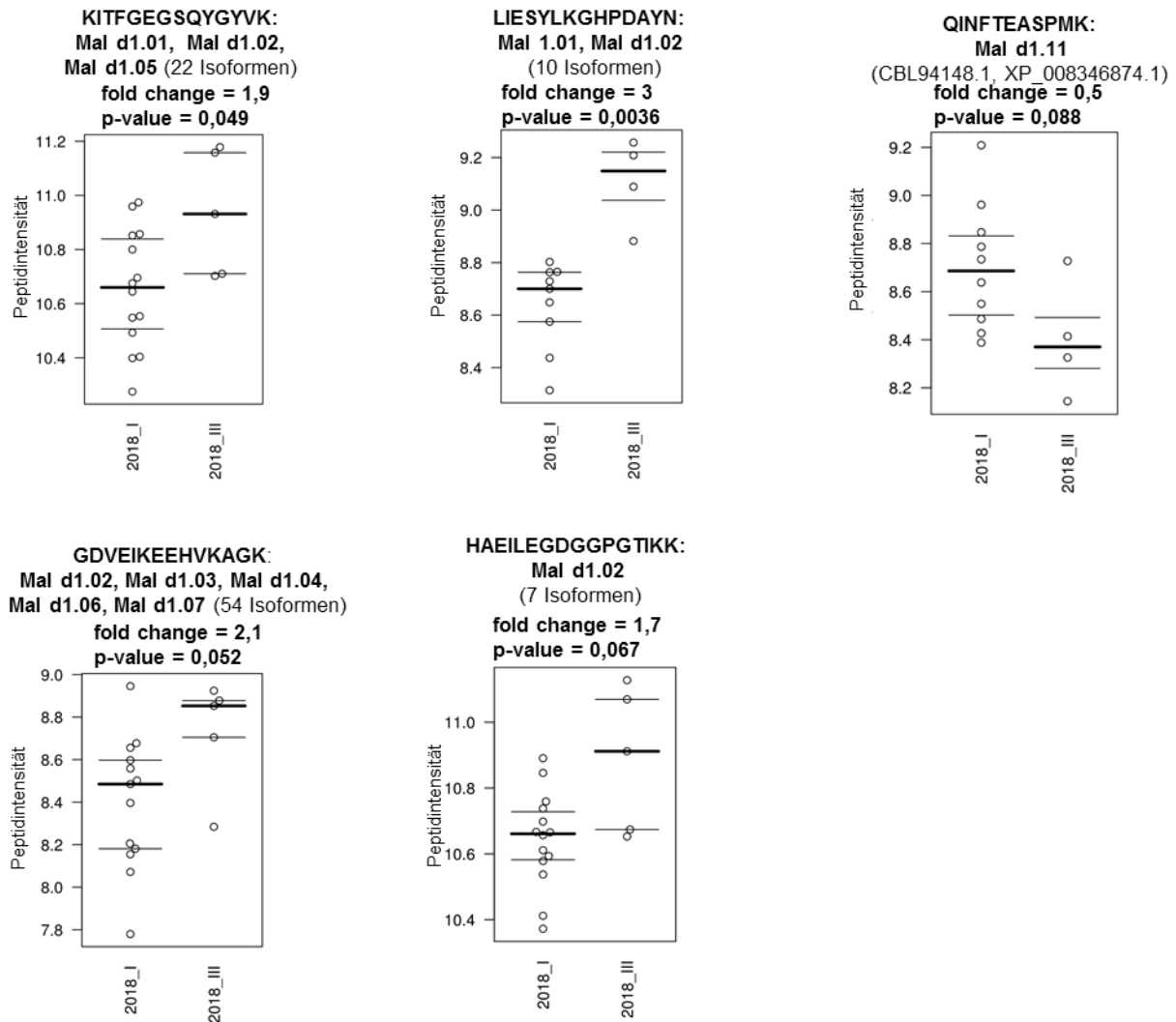


Abbildung 43 Beeswarm Boxplots der durchgeführten t-test Analysen zwischen Gruppe I- und Gruppe III-Genotypen des Erntejahres 2018 (Chebib et al. 2022).

Spezifisches Peptidmuster von einzelnen Genotypen

In einem nächsten Schritt wurden weitere statistische Vergleiche durchgeführt. Dabei wurde ein spezielles Augenmerk auf das Vorkommen von Isoform-spezifischen Peptiden gelegt, um detaillierte Isoformprofile von den einzelnen Genotypen zu erstellen. Für das Profil aus stark angereicherten Peptiden von Gruppe III-Genotypen, wurden die Peptidintensitäten der Gruppe I (gut vertragene)-Genotypen mit den jeweiligen Peptidintensitäten der einzelnen Genotypen der Gruppe III (allergene Genotypen) mittels gepaarten Student's t-test verglichen (Tabelle 19). Weiterhin wurden die Peptidintensitäten der Gruppe III-Genotypen mit den jeweiligen Peptidintensitäten der einzelnen Genotypen der Gruppe I verglichen, um hoch angereicherte spezifische Peptide in Gruppe I-Genotypen zu identifizieren (Tabelle 20, Tabelle 21). Zuletzt wurden außerdem die Peptidintensitäten der Gruppe I-Genotypen mit den jeweiligen Peptidintensitäten von den einzelnen Genotypen der Gruppe II (mittelmäßig vertragene

Genotypen) statistisch verglichen, um stark angereicherte Peptide in den mittelmäßig vertragenen Genotypen zu erfassen (Anhang Tabelle 2). Die statistische Signifikanz wurde mit $p < 0,05$ festgelegt.

Die Mal d 1-Isoform AAX21008.1 war in einigen allergenen Genotypen der Gruppe III (p36, p167, p29 und p48) um das mindestens 2,5 fache häufiger vorhanden im Vergleich zu Gruppe I (Tabelle 19). Die Identifizierung der Isoform AAX21008.1 erfolgte über zwei spezifische Peptide (LVASDNGSIK (AS105-115) und STSHYYTKGDVEIKEEHVK (116-134)). Dabei war mindestens eines der Peptide in den entsprechenden allergenen Genotypen stärker angereichert als in Gruppe I. Daneben zeigten auch zwei Gruppe II-Genotypen (p8 (2017) und p78 (2019)) hohe „fold changes“ der AAX21008.1 assoziierten Peptide (Anhang Tabelle 2).

Die Mal d 1.03-Isoform AAX21002.1, die über das spezifische Peptid LVAASSGSVIK (105-115) nachgewiesen wurde, war in den Genotypen p8 (2017), p29 (2017), p78 (2018) und p17 (2018) mit „fold changes“ von mindestens 12 häufiger vorhanden als in Gruppe I Genotypen (Tabelle 19).

Einige allergene Genotypen (p29 (2017), p78 (2018) und p36 (2018)) zeigten zudem signifikant höhere Gehalte der Peptide HKVDGIDKDNFVYK (AS 70-83), VDGIDKDNFVYK (AS 72-83) aus der Mal d 1.06 Isoform XP_008351173.1 im Vergleich zu Gruppe I (Tabelle 19). Das Peptid HKVDGIDKDNFVYK (AS 70-83) war außerdem in der Sorte SAN (2018) aus der Gruppe der mittelmäßig vertragenen Genotypen leicht stärker angereichert als in Gruppe I.

Weiterhin war mindestens eines der spezifischen Peptide LYYALVLDADNLLPK (AS 19-33) und DKAHDLFK (AS 138-145) aus der Isoform AAS00045.1 in p29 (2017), GD (2018), in p78 (2018) und in p78 (2019) im Vergleich zu Gruppe I stärker vertreten (Tabelle 19, Anhang Tabelle 2). Im Gegensatz dazu waren die spezifischen Peptide von AAS00045.1 mit „fold changes“ von unter 5 auch in einigen gut verträglichen Genotypen (z. B. p198 (2017) und p13 (2017)) vorhanden (Tabelle 20).

Die unspezifischen Peptide TVEILEGDGSVGTIK (41-55) und TVEILEGDGSVGTIKK (41-56) können den beiden Isoformen AAS00045.1 und AAX20977.1 zugeordnet werden und waren in einigen Gruppe I (p185 (2017), p198 (2017) und p10 (2017)) und Gruppe III-Genotypen (p211 (2017), p29 (2017), p78(2018), GD (2018) und p36 (2018)) mit „fold changes“ zwischen 3,09 und 12,59 zu finden (Tabelle 19).

Die Mal d 1.02 Isoform AEF38460.1 wurde über das Peptid NITFGEGSQYGYVK (56-69) identifiziert. Dieses Peptid wurde von dem Genotyp p40 in beiden Erntejahren (2017, 2018) in hohem Maß angereichert (Tabelle 20, Anhang Tabelle 2). Interessanterweise wurde p40 im Jahr

2017 von Allergikern im Durchschnitt gut vertragen, während derselbe Genotyp 2018 nur noch mittelmäßig vertragen wurde.

Die spezifischen Peptide aus Mal d 1.11 Isoformen zeigten hohe „fold changes“ in Gruppe I- und Gruppe II-Genotypen. Die Isoform CBL94148.1 wurde durch die drei spezifischen Peptide MFNALILDAHNICPK (AS 19-33), IDALDKEALSCTYTFIESDATDHLLEDKLEYITYDVK (AS 72-107) und EALSCTYTFIESDATDHLLEDKLEYITYDVK (AS 78-107) identifiziert (Tabelle 18). Einige gut verträgliche Genotypen aus dem Erntejahr 2018 zeigten für das Peptid MFNALILDAHNICPK (AS 19-33) hohe Gehalte. Daneben war auch die Isoform XP_008346874.1, die durch zwei spezifische Peptide identifiziert wurde, in drei gut verträglichen Genotypen stark angereichert (p92-2018, p204-2018 und p141-2018) (Tabelle 21). Im Erntejahr 2017 wiesen einige der gut verträglichen Äpfel hohe „fold changes“ gegenüber Peptiden auf, die mit beiden Isoformen aus der Mal d 1.11 Gruppe assoziiert sind (Tabelle 20). Dies lässt darauf schließen, dass mindestens eine der beiden Mal d 1.11 Proteine in den Gruppe I Genotypen von 2017 stark angereichert war. Des Weiteren waren die unspezifischen Peptide aus den Mal d 1.11 Proteinen in vier Gruppe II-Genotypen (p8 (2017), p59 (2018), p158 (2018) und SAN (2018)) hoch angereichert (Anhang Tabelle 2).

In den untersuchten Genotypen wurden neben Mal d 1 auch zwei Mal d 3 Proteine und zwei Mal d 4 Proteine mittels spezifischer Peptide identifiziert. Für die Apfelallergene Mal d 2-4 wurden vor allem unspezifische Peptide erhalten, die auf das Vorkommen verschiedener Mal d 2-4 Proteine hinweisen (Tabelle 19, Tabelle 20, Tabelle 21, Anhang Tabelle 2). Für Mal d 2 konnte für die beiden Proteine AAC36740.1 und NP_001315714.1 kein Isoform-spezifisches Peptid identifiziert werden. Die unspezifischen Peptide (Tabelle 19, Tabelle 20, Tabelle 21) waren in verschiedenen Genotypen wie p29 (2017), p78 (2017) (Tabelle 2) und p13 (2017) stark angereichert (Tabelle 19, Tabelle 20, Tabelle 21, Anhang Tabelle 2).

Das Mal d 3 Protein AAT80665.1 wurde über das spezifische Peptid SLAGSVSGVNPNGNVESESLPGK (AS 77-96) identifiziert. Dieses Peptid zeigte hohe Gehalte in den Genotypen p17 (2018) und p185 (2018) (Tabelle 19, Tabelle 21). Die spezifischen Peptide NGGAVPPACCNGIR (AS 43-56) und TINSLAR (AS 57-63) wurden aus dem Mal d 3 Protein ABB96482.1 gebildet. Mindestens einer dieser Peptide akkumulierte in den Genotypen p185 (2018) (Tabelle 21) und SAN (2018) (Anhang Tabelle 2).

Das spezifische Mal d 4 assoziierte Peptid LGDYLVEQGL (AS 122-131) wurde in den Genotypen p15 (2018), p10 (2018) und p185 (2018) signifikant stärker angereichert im Vergleich zu Gruppe III (Tabelle 21). In p36 (2018) war es mit einem „fold change“ von 3,24 häufiger zu finden im Vergleich zu Gruppe I (Tabelle 19).

Das unspezifische Peptid KSTMALLIGIYDEPMTPGQCNMVVER (AS 96-121), das mit einer Gruppe von zwei Mal d 4-Proteinen (AAX19860.1, XP_008337609.1) assoziiert werden kann, zeigte hohe Gehalte in mehreren Gruppe I Genotypen des Erntejahres 2018 (Tabelle 21).

Ergebnisse

Tabelle 19 Hoch angereicherte Peptide in Gruppe III-Genotypen aus drei Erntejahren (2017, 2018, 2019) (Chebib et al. 2022). Es sind stark angereicherte Peptide mit einem statistisch signifikanten p-Wert (<0,05) gezeigt, die aus einer t-test Analyse zwischen den Peptidintensitäten der einzelnen Genotypen aus Gruppe III und der gesamten Gruppe I resultierten. Spezifische Peptide sind fettgedruckt.

Peptidsequenz (Position innerhalb der Aminosäuresequenz)	Protein/ NCBI Eintrag	Erntejahr Genotyp Mal d 1 [µg/g FW]	2017					2018			2019	
			p160	P211	p36	p167	p29	p48	p78	GD	p17	p36
		Mal d 1	-	-	-	-	-	-	-	8,33±1,10	-	0,67±0,31
HKVDGIDKDNFVYK (70-83)	XP_008351173.1	Mal d 1.06					44,67		5,37			12,02
VDGIDKDNFVYK (72-83)							2,51					4,47
LVASSNGSVIK (105-115)	AAX21007.1	Mal d 1.03										4,17
LVASDNGSIIK (105-115)	AAX21008.1	Mal d 1.03			3,98	4,79	29,51	3,98				
STSHYYTKGDVEIKEEHVK (116-134)						2,57						
LYYALVLDADNLLPK (19-33)	AAS00045.1	Mal d 1.06							2,82	5,62		
DKAHDLFK (138-145)							3,02					
LVAASSGGSVIK (105-115)	AAX21002.1	Mal d 1.03					58,88		15,49		18,20	
LVAAGSGSVIK (105-115)	AAX21003.1	Mal d 1.03						4,27				
GDFEIKEK (124-131)	AEF38445.1	Mal d 1.06										
	AFC65129.1	Mal d 1.06										
TVEILEGDGSGVTIK (41-55)	AAS00045.1	Mal d 1.06										
TVEILEGDGSGVTIKK (41-56)	AAX20977.1	Mal d 1.03		4,17					3,72	3,63		3,09
VTFGEGSQLGFVK (57-69)	AAX20977.1	Mal d 1.03		12,59					5,31	4,37		
LVASPDGGSIVK (106-117)	CBL94138.1	Mal d 1.10			2,57							
SDVEIKEEHVK (124-134)	XP_008340764.1	Mal d 1.10				2,88					3,55	
	AAX20997.1	Mal d 1.03						2,95				
	CAA96534.1	Mal d 1.03										
LIESYLDHPDAYN (146-159)	AAD26552.1	Mal d 1.01		16,98	11,22	11,48						2,82
	AAD26553.1	Mal d 1.01										
	AAD26554.1	Mal d 1.01										
	AAD29671.1	Mal d 1.01										
	AAX20917.1	Mal d 1.01										
	AEE38287.1	Mal d 1.01										
	P43211.2	Mal d 1.01										
	CAD32318.1	Mal d 1.02										
QAEILEGNGGPGTIK (41-55)	AAD26552.1	Mal d 1.01										3,09
QAEILEGNGGPGTIKK (41-56)	AAD29671.1	Mal d 1.01					12,30					3,31
	AAD26554.1	Mal d 1.01		5,50			7,76					
	AAD26553.1	Mal d 1.01										
	AEE38287.1	Mal d 1.01										
	AAD26546.1	Mal d 1.01										
	AAD26555.1	Mal d 1.01										
	AAX20917.1	Mal d 1.01										
	CAA88833.1	Mal d 1.01										
	P43211.2	Mal d 1.01										
VCPAPLQVK (162-170)	AAC36740.1	Mal d 2					11,30		3,31			
SACLAFGDSKYCCTPPNNTPETCPPEYSEIFEK (181-214)	NP_001315714.1								29,51			2,63
YCCTPPNNTPETCPPEYSEIFEK (191-214)									6,92			

Ergebnisse

Peptidsequenz (Position innerhalb der Aminosäuresequenz)	Protein/ NCBI Eintrag	Erntejahr Genotyp Mal d 1 [µg/g FW] Protein- gruppe	2017						2018			2019	
			p160	P211	p36	p167	p29	p48	p78	GD	p17	p36	P211
			-	-	-	-	-	-	-	-	8,33±1,10	-	0,67±0,31
ITFTNNCPNTVWPGTLTGDQKPQLSLTGFELASKASR (27-63)													
SLAGSVSGVNPNGNVESLPGK (77-96)	AAT80665.1	Mal d 3									5,75		2,51
LGDYLVEQGL (122-131)	XP_008337609.1	Mal d 4										3,24	
KTGQALVFGIYEPLTPGQCNMIVER (96-121)	XP_008365251.1	Mal d 4									4,90		
	AAD29412.1	Mal d 4											

Tabelle 20 Hoch angereicherte Peptide in Gruppe I-Genotypen des Erntejahres 2017 (Chebib et al. 2022). Es sind stark angereicherte Peptide mit einem statistisch signifikanten p-Wert (<0,05) gezeigt, die aus einer t-test Analyse zwischen den Peptidintensitäten der einzelnen Genotypen aus Gruppe I und der gesamten Gruppe III resultierten. Spezifische Peptide sind fettgedruckt.

Peptidsequenz (Position innerhalb der Aminosäuresequenz)	Protein/ NCBI Eintrag	Erntejahr Genotyp Proteingruppe	2017										
			p185	p92	p40	p193	p22	p59	p198	p13	p10		
EDVEIKEEHVK (124-134)	XP_008390601.1	Mal d 1.06	6,03		2,95			3,98	3,24				4,68
STSHYHTKEDVEIKEEHVK (116-134)											3,31		
LYYALVLDADNLLPK (19-33)	AAS00045.1	Mal d 1.06									4,57		
DKAHDLFK (138-145)										4,07			6,03
LVAASSGSGVIK (105-115)	AAX21002.1	Mal d 1.03	138,04										
LVAAGSGSGVIK (105-115)	AAX21003.1	Mal d 1.03	19,95										3,55
NITFGEQSQYGYVK (56-69)	AEF38460.1	Mal d 1.02			1122								
GDVEIKEK (124-131)	AEF38445.1	Mal d 1.06	6,03										
	AFC65129.1	Mal d 1.06											
TVEILEGDGSGVTIK (41-55)	AAS00045.1	Mal d 1.06	4,47						4,47				11,22
	AAX20977.1	Mal d 1.03											
FVTQVTPQR (10-18)	CBL94148.1	Mal d 1.11		6,92		4,68	7,76						
SIEFLSGSGEVGTIK (41-55)	XP_008346874.1	Mal d 1.11					2,57						
QINFTEASPMK (56-66)							5,50	3,09					
LEYITYDVK (99-107)				2,88									
AIGMYEVLEAYLMAHPR (144-160)				5,13									
SDVEIKEEHVK (124-134)	AAX20997.1	Mal d 1.03	10,96	5,50					4,37	4,47	3,31		
	CAA96534.1	Mal d 1.03											
VCPAPLQVK (162-170)	AAC36740.1	Mal d 2									9,77		
	NP_001315714.1												

Ergebnisse

Tabelle 21 Hoch angereicherte Peptide in Gruppe I-Genotypen des Erntejahres 2018 (Chebib et al. 2022). Es sind stark angereicherte Peptide mit einem statistisch signifikanten p-Wert (<0,05) gezeigt, die aus einer t-test Analyse zwischen den Peptidintensitäten der einzelnen Genotypen aus Gruppe I und der gesamten Gruppe III resultierten. Spezifische Peptide sind fettgedruckt.

Peptidsequenz (Position innerhalb der Aminosäuresequenz)	Protein/ NCBI Eintrag	Erntejahr		2018													
		Genotyp	Protein- gruppe	p92	p193	p124	P211	p15	p188	p10	p204	p198	p13	BR	p185	p8	p141
EDVEIKEEHVK (124-134)	XP_008390601.1	Mal d	1.06					7,24									6,46
STSHYHTKEDVEIKEEHVK (116-134)				2,88		3,63					8,51						7,94
HKVDGIDKDNFVYK (70-83)	XP_008351173.1	Mal d	1.06								6,46						
LVASSNGSVIK (105-115)	AAX21007.1	Mal d	1.03														3,72
STSHYYTKGDVEIKEEHVK (116-134)	AAX21008.1	Mal d	1.03									7,41					
LYYALVLDADNLLPK (19-33)	AAS00045.1	Mal d	1.03										2,51				
DKAHDLFK (138-145)									3,89								
HRIDGVDKDNLVYK (70-83)	AAX21000.1	Mal d	1.03														14,45
IDGVDKDNLVYK (72-83)																	7,24
LMASGSGCVIK (105-115)																	3,72
LVAAGSGSVIK (105-115)	AAX21003.1	Mal d	1.03														
SIEILEGDGGVGTQVK (41-58)	CBL94177.1	Mal d	1.08					3,16									
IIFGEGSTNGYVK (58-69)																	2,63
LFNATALDGDELIAM (19-33)								4,37									2,88
GDVEINEEHLK (124-134)																	4,07
HKIDGVDKDNFVYQYSVIEGDAISETIEK (70-98)	AAX20992.1	Mal d	1.07									5,25					
MFNALILDAHNICPK (19-33)	CBL94148.1	Mal d	1.11			5,37		6,92			6,92					3,39	9,33
MFNALILDShNLCPK (19-33)	XP_008346874.1	Mal d	1.11	3,80							3,55					2,75	7,59
GDFEIKEK (124-131)	AEF38445.1	Mal d	1.06							9,33			4,27				
	AFC65129.1	Mal d	1.06														
STEILGGNGGVGTIK (41-55)	AAX21001.1	Mal d	1.03														9,55
	AAX21000.1	Mal d	1.03														
FVTQVTPQR (10-18)	CBL94148.1	Mal d	1.11					3,72			4,27						4,57
LMFSSIK (34-40)	XP_008346874.1	Mal d	1.11								5,01						
SIEFLSGSGEVGTIK (41-55)		Mal d	1.11	3,72		4,57					5,89			3,80			7,94
QINFTEASPMK (56-66)		Mal d	1.11			5,13					3,89			3,39		3,02	9,12
GGCICHLTSTYK (114-125)				5,25		6,17		5,89			5,37						10,96
DDIQIKEEDIELGKDR (128-143)														3,55			
AIGMYEVLEAYLMAHPR (144-160)						2,82					4,17						3,47

Ergebnisse

Peptidsequenz (Position innerhalb der Aminosäuresequenz)	Protein/ NCBI Eintrag	Erntejahr Genotyp Protein- gruppe	2018														
			p92	p193	p124	P211	p15	p188	p10	p204	p198	p13	BR	p185	p8	p141	
			AFILDADNLIPK (22-33)	CBL94138.1	Mal d						3,39						
GIEILEGNGGVGTIK (41-55)	XP_008340764.1	1.10 Mal d						3,09									2,75
KVTFGEGSQLGFVK (56-69)		1.10 Mal d						10,72									
LVASPDGGSIVK (106-117)		1.10 Mal d												3,09			
LIENYLLEHK (146-155)	XP_008360261.1	1.03 Mal d					4,78										
LIENYLLEHKDAYN (146-159)	AAX20997.1	1.03 Mal d					10,47										
		1.03 Mal d															
SDVEIKEEHVK (124-134)	AAX20997.1	1.03 Mal d					12,59										
	CAA96534.1	1.03 Mal d															
		1.03 Mal d															
ITFTNNCPNTVWPGTLTGDKPQLSLTGFELASKASR (27-63)	AAC36740.1	Mal d 2				4,37											
	NP_001315714.1																
ASRSVDAPSPWVSGR (60-73)				4,07													
VCPAPLQVK (162-170)				10,96	4,47	3,55				6,76							
VCPAPLQVKAADGSVISCK (162-180)				3,98	3,63	3,89				3,47							
YCCTPPNNTPETCPTEYSEIFEK (191-214)				28,18	10,23	6,46				21,38							
SLAGSVSGVNPNGNVESLPGK (77-96)	AAT80665.1	Mal d 3													3,31		
NGGAVPPACCNGIR (43-56)	ABB96482.1	Mal d 3													3,16		
TINSLAR (57-63)															4,17		
LG DY LVEQGL (122-131)	XP_008337609.1	Mal d 4					4,68		4,07						3,16		
KTGQDLVFGIYEEPLTPGQCNMIVER (96-121)	AAX19856.1	Mal d 4															3,16
KSTMALLIGIYDEPMTPGQCNMVVER (96-121)	AAX19860.1	Mal d 4	9,77						10	12,02	9,12	4,57	5,88	7,59	13,80		
	XP_008337609.1																
	XP_008365251.1	Mal d 4															19,05
KTGQALVFGIYEEPLTPGQCNMIVER (96-121)	AAD29412.1	Mal d 4															

3.5.6. Korrelationen

Eine Korrelationsanalyse nach Pearson ergab ausschließlich negative Korrelationen zwischen der Peptidintensität und dem mittels ELISA ermittelten Mal d 1 Gehalt (Abbildung 44), sowie negative und eine positive Korrelation zwischen der Peptidintensität und dem mittleren Symptomwert gemäß den oralen Provokationstests (Abbildung 45). Für die Bestimmung der Korrelationen wurden einige Mal d 1 Gehalte und mittlere Symptomwerte von Genotypen aus einer vorangegangenen Arbeit herangezogen (Romer et al. 2020).

Es wurden zwei negative Korrelationen mit Koeffizienten von $-0,85$ und $-0,66$ für die Peptide IDVIDKDNFVYK und IIFGEGSTNGYVK aus Mal d 1.08 (CBL94177.1) mit dem Mal d 1 Gehalt identifiziert (Abbildung 44). Beide genannten Peptide zeigten zudem negative Korrelationen mit dem mittleren Symptomwert (Abbildung 45). Auch GDVEINEEHLK aus der Isoform CBL94177.1 korrelierte negativ mit dem mittleren Symptomwert (Abbildung 45). Für verschiedene unspezifische Peptide aus den Mal d 2 Isoformen AAC36740.1 und NP_001315714.1 wurden drei signifikant negative Korrelationen ($R=-0,82$, $-0,73$, $-0,65$) mit dem Mal d 1 Gehalt (Abbildung 44), sowie eine weitere negative Korrelation mit dem mittleren Symptomwert ($R=-0,4$) identifiziert (Abbildung 45).

Drei Peptide aus Mal d 3 Proteinen zeigten signifikant negative Korrelationen ($R= -0,74$, $-0,63$, $-0,55$) mit dem Mal d 1 Gehalt (Abbildung 44). Dabei war das Peptid SLAGSVSGVNPNGNAESLPGK (AS 77-96) spezifisch für die Proteine AAT80659.1 und AAT80662.1. Diese beiden Proteine sind auch mit dem Peptid SGGPVPPACCNGIR (AS 43-56) assoziiert, wobei dieses zusätzlich in dem Protein AAT80665.1 zu finden ist. Eine schwach negative Korrelation zwischen den detektierten Peptidintensitäten und mit dem mittleren Symptomwert wurde für ISTSTNCATVK (AS 105-115) identifiziert (Abbildung 45).

Für Mal d 4 zeigte sich eine negative Korrelation ($R= -0,49$) zwischen der Peptidintensität von KTGQALVFGIYEEPLTPGQCNMIVER (AS 96-121) und dem Mal d 1 Gehalt. Dieses ist nicht spezifisch und in insgesamt drei Mal d 4 Proteinen zu finden (Abbildung 44). Eine positive Korrelation mit dem mittleren Symptomwert wurde für das Peptid YMVIQGEPGVVIR (AS 72-84), das in fünf Proteinen vorkommt, ermittelt (Abbildung 45).

Ergebnisse

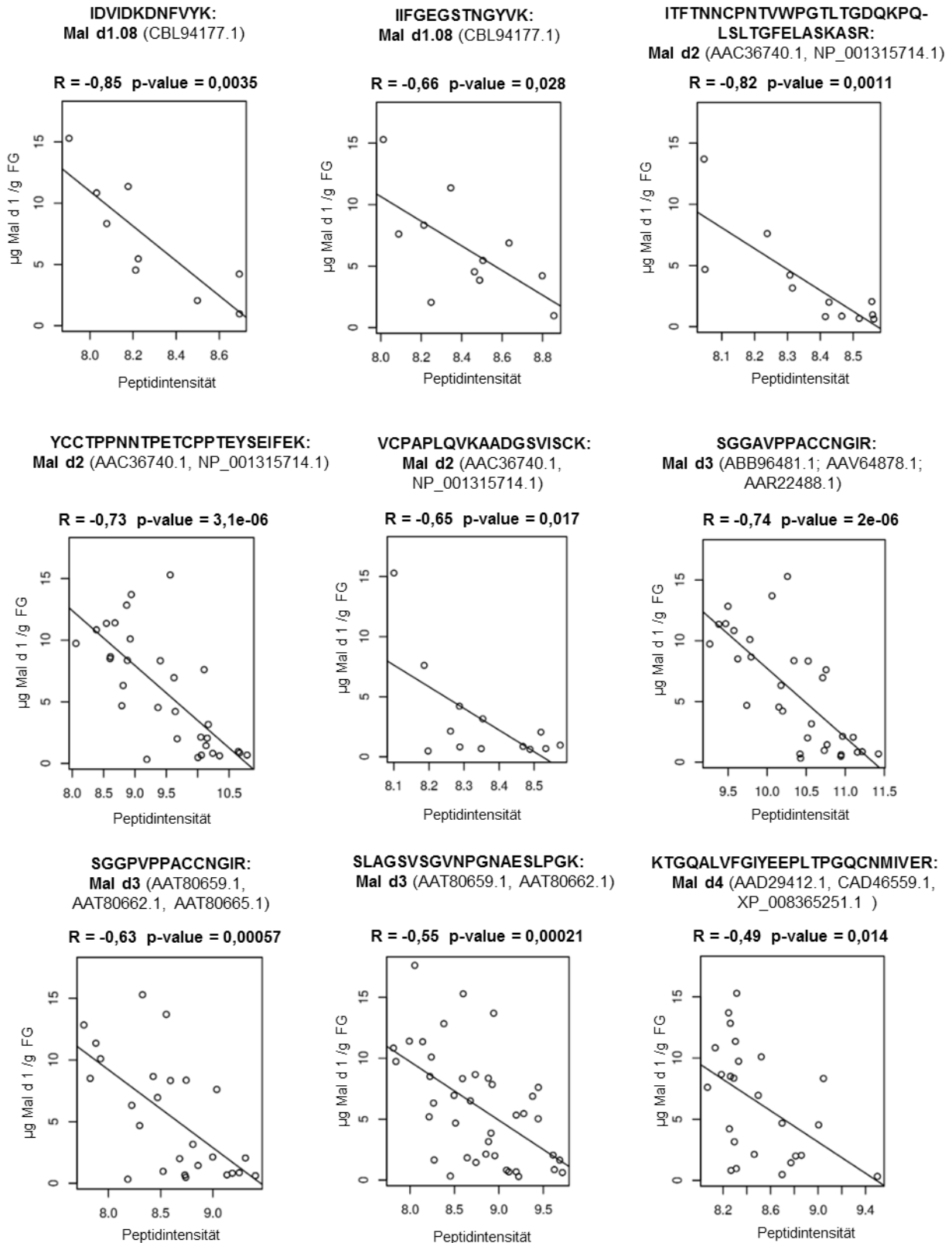


Abbildung 44 Korrelationsanalyse zwischen dem Mal d 1 Gehalt und der Peptidintensität (Chebib et al. 2022).

Ergebnisse

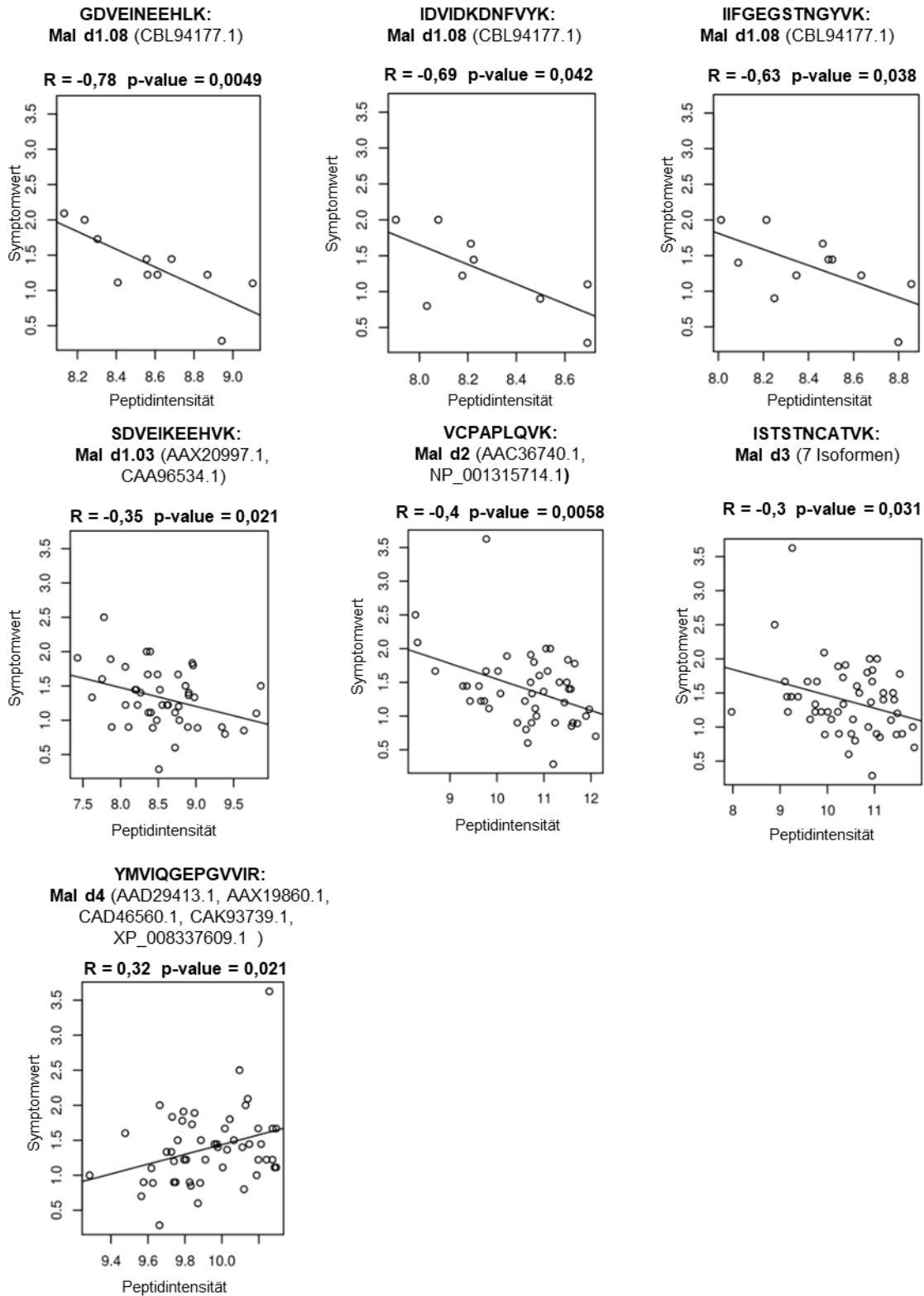


Abbildung 45 Korrelationsanalyse zwischen dem mittleren Symptomwert aus den oralen Provokationstests und der Peptidintensität (Chebib et al. 2022).

4. Diskussion

4.1. Herstellung und Reinigung des rekombinanten Proteins

rMal d 1.02

Rekombinantes rMal d 1.02 wurde als His₆-Tag-markiertes Protein in *E.coli* BL21 (DE3) pLysS heterolog produziert. Aufgrund des angefügten His₆-Tags unterscheidet sich das Molekulargewicht von rMal d 1.02 mit 18,8 kDa geringfügig von der nativen Form mit 17,5 kDa. Der eingesetzte Bakterienstamm enthält außerdem das Plasmid pLysS zur Produktion von T7 Lysozym, welches die basale Expression des Ziel-Gens reduziert (Joseph et al. 2015). Eine uneingeschränkte basale Expression kann das Wachstum der Zellen beeinflussen und damit zu einer verringerte Proteinkonzentration führen.

Das rekombinante Proteinexpressionssystem von *E.coli* ermöglicht ein rasches Wachstum zu hohen Zelldichten in geeigneten kostengünstigen Substratmedien (Costa et al. 2014). Dies stellt für die Wirtszelle oft eine Stresssituation dar, die in vivo zu einer Fehlfaltung der Proteine und der damit verbundenen Aggregation zu Einschlusskörpern führen kann (Schumann und Ferreira 2004; Sevastyanovich et al. 2010). Gerade hohe Proteinkonzentrationen im Zytoplasma von *E.coli* können einer korrekten Faltung entgegenstehen und die Bildung von Einschlusskörpern begünstigen (Sørensen und Mortensen 2005). Während lösliche Proteine in einem nativen, funktionellen Zustand vorliegen, sind Proteine aus Einschlusskörpern oft biologisch inaktiv.

Für die Freisetzung von löslichen Proteinen bzw. unlöslichen Proteinaggregate aus den *E.coli* Bakterien ist ein Zellaufschluss durch z.B. Ultraschall notwendig, da *E.coli* über keinen nativen äußeren Membrantransporter verfügt (Ehgartner et al. 2017; Francetic et al. 2000). Die Herstellung von rekombinanten Proteinen aus Einschlusskörpern wird in vielen Fällen bevorzugt, da diese in hohen Konzentrationen im Zytoplasma der Zellen akkumulieren (Baneyx und Mujacic 2004; Choi et al. 2006). Ihre Isolierung führt zu hohen Proteinkonzentrationen mit einem hohen Reinheitsgrad. Die aus Einschlusskörpern gewonnenen Proteine können durch Dialyse gegen einen geeigneten Puffer in ihre native, biologisch aktive Form renaturieren (Singh und Panda 2005). Die Aufreinigung des Zielproteins mittels immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie über den Carboxy-terminalen His-Tag lieferte das Zielprotein rMal d 1.02 in löslicher Form als auch rückgefaltet aus der unlöslichen Fraktion mit unterschiedlichen Reinheitsgraden, wie in einer SDS-PAGE Analyse gezeigt werden konnte (Abbildung 8). Dabei zeigte das lösliche Protein leichte Verunreinigungen, die vermutlich auf bakterielle Proteine zurückzuführen sind. Im antikörperbasierten Verfahren des Western-Blots

waren keine weiteren Banden neben der des Zielproteins sichtbar. Dennoch wurde für die ELISA-Messungen das Protein aus den Einschlusskörpern verwendet, um unspezifische Signale vorzubeugen. Für die Ligandenstudien wurde jedoch das Protein aus der löslichen Fraktion verwendet, da hier ein His-Tag spezifisches Labeling-Verfahren angewendet wurde, bei dem eine hohe Reinheit der Proteinfraction nicht erforderlich ist. Stattdessen wurde die Tatsache, dass das lösliche Protein bereits in seiner biologisch aktiven Form vorliegt, als vorteilhaft für die Bindungsstudien beurteilt.

4.2. Quantifizierung der Mal d 1 Konzentration in verschiedenen Apfel-Genotypen mittels ELISA

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Apfel-Genotypen hinsichtlich ihres allergenen Potentials charakterisiert. Dabei wurde zunächst der Mal d 1 Gehalt von Apfel-Genotypen mittels indirekt kompetitiven ELISA unter Verwendung eines polyklonalen Antikörpers quantifiziert. Bereits in früheren Studien fand diese Methode bei der Bestimmung von Allergenen standardmäßig Anwendung (Kurze et al. 2018a; Kurze et al. 2018b; Picchi et al. 2019; Romer et al. 2020). Ein polyklonaler Primärantikörper wurde durch Immunisierung von Kaninchen mit dem rekombinanten rMal d 1.02 gewonnen. Dieser stellt eine Mischpopulation von Antikörpern dar, die alle eine Mal d 1-Spezifität aufweisen, sich allerdings in ihren Epitopspezifitäten unterscheiden und daher eine Vielzahl von verschiedenen Epitopen von Mal d 1-Isoformen erkennen können (Paris et al. 2017; Pagliarani et al. 2012; Gao et al. 2008; Stills 2012). Die Funktionsweise des polyklonalen Antikörpers wurde in einer Kreuzreaktion mit weiteren PR-10 Proteinen überprüft (Anhang Abbildung 1). Zu diesem Zweck wurden die rekombinanten Proteine Bet v 1, Pru d 1 und Fra a 1 hergestellt. Mal d 1 weist mit Bet v 1, Pru d 1 und Fra a 1 eine prozentuale Sequenzhomologie von 57 %, 88 %, und 78 % auf (Geneious Prime (v. 2021.1.1) (<https://www.geneious.com>)). In einer Western Blot- und ELISA-Analyse detektierte der polyklonale Antikörper sowohl das rekombinante rBet v 1 als auch die weiteren Bet v 1 Homologen rPru d 1 und rFra a 1 (Anhang Abbildung 1, Anhang Tabelle 1). Die Nachweisstärke erfolgte in Abhängigkeit ihrer jeweiligen Sequenzhomologie zu Mal d 1. Damit konnte eine zuverlässige Detektion der Mal d 1 Isoformen und eine präzise Erfassung des Mal d 1 Gehaltes gewährleistet werden.

4.2.1. Umwelt- und Genotypeffekt auf die Mal d 1 Gehalte

Allgemein wurden zwischen den Erntejahren der Kreuzungspopulation an dem Standort Osnabrück große Unterschiede in den Allergenkonzentrationen der Genotypen ermittelt. Die Variationen der Mal d 1 Gehalte verschiedener Genotypen desselben Standortes und Erntejahres können auf den Genotyp bzw. auf die genetischen Dispositionen zurückgeführt werden, was bereits in vorangegangenen Studien beobachtet wurde (Zuidmeer et al. 2006; Matthes und Schmitz-Eiberger 2009; Romer et al. 2020). In der vorliegenden Arbeit wurde die Fruchtschale zusammen mit dem Fruchtfleisch analysiert. Für die meisten Genotypen wurden Mal d 1 Gehalte zwischen 0,1 und 50 µg/g FG bestimmt, wobei einzelne Genotypen auch höhere Gehalte bis etwa 120 µg/g FG aufwiesen. Der ermittelte Konzentrationsbereich stimmt in etwa mit dem von Romer (2021) bestimmten unter Verwendung derselben Methodik überein. Weitere Studien ermittelten Mal d 1 Gehalte im Fruchtfleisch zwischen 3,8 und 72,5 µg/g FG mittels indirekt kompetitiven Assay (Sancho et al. 2006a) und zwischen 25,9 und 78,9 µg/g FG mittels direktem ELISA (Groth et al. 2021b). Diese große Variation des Allergengehaltes zwischen verschiedenen Apfel-Genotypen wurde für die Gehalte an Bet v 1-homologen Proteine, wie Pru d 1 in Pflaumen (Picchi et al. 2019), Fra a 1 in Erdbeeren (Kurze et al. 2018a) und Sola I 4 in Tomaten (Kurze et al. 2018b) nicht festgestellt.

Innerhalb eines Genotyps konnte eine hohe intra-Variabilität des Mal d 1 Gehaltes von bis zu Faktor 10 ermittelt werden (3.2.3). In einer Studie von Asero et al. (2006) zeigten die Untersuchungen der Sorte Jonagold und Golden Delicious jeweils innerhalb einer Sorte etwas geringere biologische Schwankungen um das bis zu fünf-fache, während eine intra-Variabilität mit einem Faktor von bis zu 20 ermittelt wurde. Eine wesentliche Rolle bei der Mal d 1-Expression spielt zum einen die Position des Apfelbaumes und zum anderen die Position der Frucht innerhalb des Baumes (Sonnen-/Schattenseite) (Sancho et al. 2006b). Um diesen Effekt zu berücksichtigen, wurden von allen Genotypen, bis auf solche die im Rahmen von Kapitel 3.2.3 auf ihre biologische Variabilität untersucht wurden, jeweils eine Mischprobe aus mindestens drei Früchten erstellt. Dabei wurden Früchte sowohl von der Sonnen- als auch Schattenseite des Baumes verwendet.

Weiterhin wird die Regulation der Mal d 1-Expression von biotischen (Pilze, Viren, Bakterien) und abiotischen (Kälte, Hitze, Trockenheit, Salzgehalt) Faktoren beeinflusst (Pühringer et al. 2000; Beuning et al. 2004; Atkinson et al. 1996; Botton et al. 2008), wobei die Bildung von PR-10 Proteine durch verschiedene Phytohormone induziert wird. Phytohormone wie Salicylsäure und Jasmonsäure sind an der Regulierung der Signaltransduktionswege als

Reaktion auf biotischen Stress beteiligt, während Abscisinsäure und Ethylen die Signaltransduktionswege als Reaktion auf abiotischen Stress regulieren (Agarwal und Agarwal 2014). Die differenzierte Expression von PR-10-Genen als Reaktion auf Phytohormone weist auf unterschiedliche Regulierungsmechanismen der Signaltransduktionswege hin (Wang et al. 1999; Agarwal und Agarwal 2014).

In den letzten Jahrzehnten kam es in Europa im Zuge der globalen Erwärmung zu starken Klimaveränderungen (Metzger et al. 2006). Botton et al. (2008) ermittelten bei der Untersuchung der Auswirkungen von Wasserknappheit und dem daraus resultierenden Wasserstress für die Pflanzen zwar eine deutliche Verringerung des vegetativen Wachstums von Apfelbäumen und der Fruchtgröße, jedoch kaum eine Veränderung der Gen-Transkription von Mal d 1. Lediglich die Genexpression von Mal d 1.04 nahm signifikant zu. Matthes und Schmitz-Eiberger (2009) berichteten über höhere Mal d 1 Gehalte für Standorte mit niedrigen Niederschlagsraten und hoher Sonneneinstrahlung.

Bei einem Vergleich der Wetterdaten von den analysierten Erntejahren war das Erntejahr 2017 durch einen gemäßigten Sommer mit hohen Niederschlagsraten geprägt (Deutscher Wetterdienst 2017). In den beiden Jahren 2018 und 2019 wurden hingegen die heißesten Sommer seit dem Beginn der Messungen 1881 verzeichnet (Deutscher Wetterdienst 2018; Deutscher Wetterdienst 2019). Auch im Jahr 2020 zeichnete sich der Sommer durch eine große Hitzewelle aus (Deutscher Wetterdienst 2020). Dieser Temperaturstress führte bei einem Vergleich der Mal d 1 Gehalte verschiedener Elternsorten aus dem Jahr 2016 und 2017 (Romer 2021) zu deutlich höheren Gehalten im Jahr 2018. Während die Sorten Gloster, Finkenwerder, Elstar, Cox Orange, Topaz, Ingol, RubINETTE und Honeycrunch sowohl im Jahr 2016 als auch im Jahr 2017 Mal d 1 Gehalte unter 10 µg/g FG aufwiesen (Romer 2021), wurden für diese Sorten im Jahr 2018 weitaus höhere Gehalte zwischen 10 und 71 µg/g FG detektiert (3.2.2.1). Ein ähnlicher Effekt zeigte sich bei den Genotypen der Selektionsstufe 1. Auch hier nahmen die Allergengehalte von einigen Genotypen (z.B. 24-30, 39-77 und 54-105) zwischen 2017 und 2020 signifikant zu (3.2.1). Andere Genotypen aus der Selektionsstufe 1, wie 20-108, 53-100 und 24-24, wurden kaum von den extremen Wetterbedingungen beeinflusst und wiederum andere zeigten (z.B. 27-8, 49-131 und 26-39) eine Abnahme des Mal d 1 Gehaltes.

Die bestimmten Mal d 1 Gehalte von den Genotypen der Standorten Esteburg, Frankreich, Bodensee und Italien sind mit Gehalten zwischen 0,23 und 30,56 µg/g FG mit solchen der Genotypen des Standortes Osnabrück vergleichbar. Rotfleischige Genotypen zeigten dabei bis auf wenige Ausnahmen eine generelle Tendenz zu niedrigen Mal d 1 Gehalten. In bisherigen Studien wurde der Mal d 1 Gehalt von rotfleischigen Äpfeln nicht bestimmt. Allerdings wurde

ihr allergenes Potential mit Hilfe von Hautpricktests und oralen Provokationstests bewertet (Nothegger et al. 2020). Dabei zeigten rotfleischige Äpfel ein geringeres allergenes Potential im Vergleich zu verschiedenen weißfleischigen Sorten. Einige Genotypen, die an mehreren Standorten angebaut wurden, wiesen signifikante Unterschiede auf. Es wurde für den Genotyp RF-4 aus Italien ein signifikant niedriger Gehalt ermittelt als für den gleichen Genotyp aus Esteburg und Frankreich, was in der unterschiedlichen klimatischen Beschaffenheit begründet sein kann. Auch in einer Studie von Zuidmeer et al. (2006) wurden signifikante Unterschiede von fünf Apfelsorten, die in Italien und in den Niederlanden kultiviert wurden, ermittelt. Dabei wurden für die am Standort Italien angebauten Sorten signifikant geringere Mal d 1 Gehalte ermittelt im Vergleich zu denselben Sorten am niederländischen Standort.

Interessanterweise besitzen Genotypen vom Bodensee höhere Mal d 1 Gehalte, obwohl das Klima dieses Standortes als mildes, nahezu mediterranes Klima beschrieben wird.

Weiterhin beeinflussen die Kultivierungsart und Kultivierungsbedingungen (z.B. Stickstoffgehalt des Bodens) den Mal d 1 Gehalt maßgeblich (Wang et al. 2019). Biologisch angebaute Äpfel zeigen deutlich höhere Gehalte an Mal d 1 als solche aus konventioneller Produktion (Fernández-Rivas et al. 2006). Grund hierfür ist die höhere Anfälligkeit von biologisch angebauten Bäumen gegenüber Pathogenen. Daneben stellt auch die Biofortifikation ein wesentlicher Einflussfaktor dar. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass eine Selen-Biofortifikation von Äpfeln zu geringeren Mal d 1 Gehalten führen kann (Groth et al. 2021b). Der Einfluss von verschiedenen Lagerungsbedingungen auf die Mal d 1 Konzentration wird im folgenden Abschnitt erläutert (4.2.2).

4.2.2. Stabilität von Mal d 1 während der Lagerung

Äpfel sind saisonale Früchte, deren kommerzielle Qualität durch geeignete Lagerungsbedingungen sichergestellt werden kann. Eine Lagerung von Äpfeln in kontrollierter Atmosphäre (ULO) mit einer geringen O₂-Konzentration und erhöhter CO₂-Konzentration führt zu einer erhöhten Lagerungsfähigkeit, einer verringerten Ethylensynthese und einer gleichbleibenden Fruchtqualität (Kader 1995; Gwanpua et al. 2012). In einigen Genotypen führte diese Lagerungsform erwartungsgemäß zu einem konstanten bis verringerten Mal d 1 Gehalt (p78-2019, p92-2019, p185-2019, p185-2020, p211-2019 und p211-2020). Andere Genotypen zeigten eine leichte Erhöhung (p78-2020, p92-2020, p168-2019 und p168-2020) (Abbildung 16). Letztere Beobachtung kann auf die durch Lagerung induzierten Stresssituationen, aufgrund von erhöhten CO₂- und niedrigen O₂-Gehalten, zurückgeführt werden. Vorangegangene Studien berichteten über eine Zunahme des Allergengehaltes unter

kontrollierter Atmosphäre (Sancho et al. 2006a; Kiewning et al. 2012). Im Gegensatz dazu stellten Bolhaar et al. (2005a) eine 15 %-ige Senkung der Allergenität der unter kontrollierter Atmosphäre gelagerten Genotypen fest. Dabei bestimmten sie allerdings nicht den Mal d 1 Gehalt, sondern untersuchten lediglich die Verträglichkeit mit Hilfe von Hautpricktests. Weiterhin verzeichnete Romer (2021) für einige Genotypen sowohl eine Zunahme als auch Abnahme im Mal d 1 Gehalt während der Lagerung unter kontrollierter Atmosphäre.

Die Apfelfreifeung steht in engem Zusammenhang mit der Ethylenbiosynthese, die die Lagerfähigkeit der Frucht beeinflusst (Lay-Yee et al. 1990; Brady und O'Connell 1976; Yang et al. 2012; Zheng et al. 2013; Botton et al. 2008). Durch eine geeignete Lagerungsform der Äpfel können Erweichungs- und Alterungsprozesse verlangsamt werden, indem Atmungsprozesse und enzymatische Aktivitäten verringert werden und folglich die Haltbarkeit von Früchten erhöht wird. Der Einfluss der Kühllagerung auf den Mal d 1 Gehalt wurde über einen Zeitraum von drei Monaten nach Erreichen der Genussreife anhand von 10 Genotypen untersucht (Abbildung 17). Dabei zeigten die meisten Genotypen einen signifikanten Anstieg ihres Allergengehaltes. Lediglich die Genotypen p78, p14 und p149 wiesen eine signifikante Abnahme ihres Mal d 1 Gehaltes auf. In einer Studie von Sancho et al. (2006b) wurde eine Erhöhung des Mal d 1 Gehaltes in allen untersuchten Kultivaren über einen Zeitraum von fünf Monaten unter Kühllagerungsbedingungen festgestellt. Auch Matthes und Schmitz-Eiberger (2009) ermittelten eine Zunahme des Mal d 1 Gehaltes in einem Ablauf von drei Monaten unter Kühllagerungsbedingungen. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Kiewning et al. (2012) überein, die erhöhte Mal d 1 Gehalte über einen Lagerungszeitraum von neun Monaten berichteten. Die prozentuale Zunahme von Mal d 1 im Verhältnis zum Gesamtprotein-Gehalt im Laufe der Lagerung wies auf eine durch Kältestress induzierte Mal d 1-Expression hin (Matthes und Schmitz-Eiberger 2009). In einer früheren Studie von Hsieh et al. (1995) wurde zwar ein Anstieg der Mal d 1 Konzentration während der Fruchtreifung beobachtet, es konnte jedoch keine Korrelation zwischen dem Mal d 1 Gehalt und der Expression des Enzymes 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäureoxidase aus der Ethylenbiosynthese nachgewiesen werden. Stattdessen wurde postuliert, dass Mal d 1 nicht durch während der Lagerung auftretende Seneszenzprozesse beeinflusst wird, sondern durch Resistenzfaktoren gegen verschiedene Krankheiten (Matthes und Schmitz-Eiberger 2009). Diese Vermutung wurde durch Ergebnisse von Pühringer et al. (2000) unterstützt, die eine durch biotische Stressfaktoren induzierte Mal d 1-Expression feststellten. Im Gegensatz dazu wurde wiederum eine Hochregulierung eines Proteins, das eine 90 %ige Sequenzhomologie zu Mal d 1 aufweist, als Reaktion auf Ethylen

beobachtet (Atkinson et al. 1996). In weiteren Studien wurde bestätigt, dass die Bildung und Regulierung von Allergenen von der Fruchtreifung und Ethylenbehandlung beeinflusst wird (Shi et al. 2014; Yang et al. 2012; Zheng et al. 2013). Eine Verlängerung der Lagerungsfähigkeit von Äpfeln wurde durch die Behandlung mit 1-MCP, ein synthetisches Cyclopropen erreicht (Baritelle et al. 2001; Rupasinghe et al. 2000; Kiewning et al. 2013a). Dabei wurde dem Voranschreiten des Reifeprozesses durch Inhibierung der Ethylen-Biosynthese entgegengewirkt. Zudem wurden im Vergleich zu unbehandelten Früchten, signifikant geringere Mal d 1 Konzentrationen in 1-MCP behandelten Früchten ermittelt (Kiewning et al. 2013a).

4.2.3. Allergenes Potential von verschiedenen Apfel-Genotypen

Für die Charakterisierung des allergenen Potentials von Apfel-Genotypen ist neben der Quantifizierung des Allergengehaltes auch die Bewertung von Apfelsorten mittels in-vivo Studien wichtig. Die klinischen Studien auf die in dieser Arbeit Bezug genommen werden, wurden von dem Europäischen Zentrum für Allergieforschung durchgeführt (Becker et al. 2021). In dieser Arbeit, wie auch in früheren Studien konnte bisher kein Zusammenhang zwischen der Mal d 1 Konzentration und der Verträglichkeit festgestellt werden (Asero et al. 2006; Vlieg-Boerstra et al. 2011; Romer et al. 2020; Becker et al. 2021). Im Mittelpunkt der in-vivo Untersuchungen stehen dabei die Methoden des Hautpricktests und orale Provokationstests. Der Hautpricktest erfordert die Anwendung spezifischer und im Idealfall standardisierter Allergenextrakte, positive Kontrollen (z.B. Histamin; Quaddel > 3 mm) und negative Kontrollen (Quaddel < 3 mm) (Heinzerling et al. 2013). Das Testergebnis wird nach 15-20 Minuten abgelesen und ausgewertet, wobei ein positives Ergebnis mit dem Auftreten einer Quaddel von ≥ 3 mm Durchmesser definiert ist (Heinzerling et al. 2013). Die Konzentration und Zusammensetzung der Allergenextrakte sind wichtige Faktoren, die den Hautpricktest beeinflussen können (Sancho et al. 2006b). Bei Hautpricktests mit frischen Äpfeln spielt außerdem die Einstichtiefe der Nadel in den Apfel gefolgt von der Haut des Patienten, sowie die Allergenmenge, die von der Nadel aufgenommen und in die Haut übertragen wird eine wesentliche Rolle (Sancho et al. 2006b). Der orale Provokationstest gilt gemäß der Leitlinie der deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie als bevorzugte Methode bzw. Gold-Standard in der Diagnostik von Nahrungsmittelallergien (Niggemann et al. 2006). Mit diesem Testverfahren ist es möglich, zu klären, ob ein vermutetes Allergen Symptome auslöst. Dabei wird das Allergen z.B. durch orale Verabreichung auf die Schleimhaut des Patienten aufgebracht. In einer Studie von Bolhaar et al. (2005a) wurden 21

Äpfel mittels Hautpricktest und zwei Äpfel mittels oraler Provokationstests bei neun Patienten getestet. Die Ergebnisse beider Testverfahren stimmten überein. Allgemein zeigten jedoch verschiedene Studien kaum eine Korrelation zwischen den Ergebnissen der Hautpricktests und der oralen Provokationstests (Vlieg-Boerstra et al. 2011; Kootstra et al. 2007; Asero et al. 2006; Clark und Ewan 2003). Dabei ist ein wesentlicher Einflussfaktor die intra-Variabilität des Allergengehaltes, da dieser innerhalb eines Apfels stark variieren kann (3.2.3) (Asero et al. 2006). Bei der Durchführung von Hautpricktests mit frischen Äpfeln kommt lediglich eine geringe Apfelmenge unbekannter Allergenkonzentration zum Einsatz (Anagnostou 2020).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden in klinischen Studien orale Provokationstests durchgeführt (Becker et al. 2021). Die Standardsorte SAN und der Genotyp p125 wurden von den Allergikern am besten vertragen. Bereits in der Vergangenheit hat sich SAN als hypoallergene Apfelsorte hervorgetan (van der Maas und Schenk 2009; Bolhaar et al. 2005a; Kootstra et al. 2007; Romer et al. 2020). Die Genotypen p211, p197, p14 und p19 wurden im Durchschnitt von den Allergikern schlecht vertragen. Dabei besitzt p211 den niedrigsten Allergengehalt mit 0,95 µg/g FG, während p197, p14 und p19 Mal d 1 Gehalte über 10 µg/g FG besitzen. Nach dem Verzehr von 80 g p211, p197, p14, p19 zeigten jeweils 53 %, 38 %, 44 % und 55 % der Patienten keine Symptome, während jeweils 26 %, 38 %, 11 % und 18 % der Patienten über starke Symptome (≥ 3) berichteten. Einige Patienten haben die Verkostung nach 80 g abgebrochen, weshalb die durchschnittlichen Symptomwerte nach dem Apfelrest in vielen Fällen, wie etwa bei p197 und p42, geringer ausfielen. Bei vielen Genotypen, wie auch bei p211 und p197 zeigten Patienten starke Unterschiede, die von keinen bis zu sehr starken allergischen Reaktionen mit hohen Symptom-Werten reichten. Dabei ist zu beachten, dass die individuellen Schwellenwerte der Allergiker, die eine allergische Reaktion auslösen können, stark variieren (Richter et al. 2009). Dies kann zum Teil auf das Vorkommen von T-Zell-Epitopen, die sich von Patient zu Patient unterscheiden, zurückgeführt werden (Uehara et al. 2001). Eine möglichst große Testgruppe ist daher für die Erzielung von repräsentativen Symptomwerten, die zur Einschätzung des allergenen Potentials von Apfel-Genotypen herangezogen werden, ein wesentlicher Faktor. Auch die intra-Variabilität des Allergengehaltes eines Genotyps spielt eine wichtige Rolle. Die Genotypen p197 und p19 zeigten beispielweise hohe biologische Schwankungen hinsichtlich ihres Allergengehaltes über verschiedene biologische Replikate (5.5). Das Vorkommen von verschiedenen Isoformen und deren Anteil am Gesamt-Allergengehalt kann unterschiedliche Immunreaktionen hervorrufen, da einige Mal d 1-Isoformen eine stärkere IgE-Reaktion bewirken als andere (Son et al. 1999; Bolhaar et al. 2005a; Kitzmüller et al. 2015). Weitere Einflussfaktoren wie etwa das Reifestadium der

Äpfel oder die Lagerungsdauer, sowie Lagerungsart wurden in dieser Studie konstant gehalten und können daher bei der Beurteilung vernachlässigt werden. Auch eine Reaktion der Allergiker auf die weiteren im Apfel vorkommenden Allergene, Mal d 2, Mal d 3 und Mal d 4, ist zwar möglich, jedoch eher unwahrscheinlich, da ausschließlich Patienten mit einer Birkenpollen-assoziierten Apfelallergie in der Studie involviert waren.

Die Auswertung der klinischen Studien zeigen, dass der Allergengehalt nicht ausschließlich für die Bewertung des allergenen Potentials herangezogen werden kann, da Genotypen auch mit niedrigen Mal d 1 Gehalten eine erhöhte Symptomatik bei Allergikern auslösen können. Auf der Suche nach allergikerfreundlichen Apfelsorten sind klinische Studien mittels oralen Provokationstests unverzichtbar.

4.3. Polyphenoloxidase-Aktivität

Das Enzym PPO ist eine Oxidoreduktase und hauptverantwortlich für die enzymatische Bräunung in Früchten und dem damit einhergehenden Qualitätsverlust durch Entwicklung von unangenehmen sensorischen Eigenschaften (Yoruk und Marshall 2003). Phenolische Substrate werden durch das Enzym PPO in einem zweistufigen Prozess durch Hydroxylierung von Monophenolen zu Diphenolen, gefolgt von der Oxidation von Diphenolen zu o-Chinone umgewandelt. Diese hochreaktiven Chinone polymerisieren mit anderen Chinonen, Aminosäuren und Proteinen zu farbigen Endprodukten, auch bekannt als Melanine. Die enzymatische Bräunung ist eine Art Schutzmechanismus des Apfels gegen Pathogenbefall, indem die gebildeten Melanine antibakterielle und antimykotische Eigenschaften aufweisen (Adam et al. 2016; Felton 2005). Das Enzym selbst ist in Plastiden lokalisiert, während sich seine Substrate in den Vakuolen befinden. Damit treten sie erst miteinander in Kontakt, wenn Zellen z.B. durch mechanische Prozesse aufgebrochen werden, und damit die Bräunungsreaktion initiiert wird (Harel et al. 1964; Tsurutani et al. 2002). Diese ist von dem PG und/ oder der PPO-Aktivität abhängig und kann je nach Apfelsorte variieren (Coseteng und Lee 1987; Holderbaum et al. 2010). Auch in der vorliegenden Arbeit ergab die Untersuchung von insgesamt 38 Genotypen Unterschiede in der PPO-Aktivität (3.3.1). Die bestimmten Enzymaktivitäten sind mit solchen aus vorherigen Studien vergleichbar (Rocha und Morais 2001; Holderbaum et al. 2010; Schmitz-Eiberger und Matthes 2011). Die bei der Bräunungsreaktion gebildeten hochreaktiven o-Chinone können nukleophile Seitenketten von Aminosäuren modifizieren, wodurch Epitope des Proteins maskiert werden und damit zu einem Allergenitätsverlust des Proteins führen (Kschonsek et al. 2019a; Rudeschko et al. 1995a; Rudeschko et al. 1995b). In diesem Zusammenhang wurden neben Polyphenol-Substrate auch

die strukturähnlichen Tyrosine als mögliche PPO-Substrate diskutiert, deren oxidierte Form kovalent an Cystein, Lysin oder Tyrosin binden können und damit ebenfalls eine Änderung der Tertiärstruktur des Proteins induzieren (Chung et al. 2005; Wu et al. 2016). Für das Bet v 1 Homolog Pru av 1, wurde eine Senkung der IgE-Reaktivität berichtet im Zuge der PPO gesteuerten Oxidation von Polyphenolen (Gruber et al. 2004). Die Untersuchungen von Garcia et al. (2007) zeigten, dass die Zugabe von PPO zu einem Apfelextrakt, alleine, als auch zusammen mit dem Substrat Catechin, die Bindung von IgE an das Protein Mal d 1 herabsetzt. Dies wurde durch die Ergebnisse von Ahmed et al. (2018) bestätigt, die zeigen, dass die Zugabe von Tyrosin und Kaffeesäure die Vernetzung von Proteinen verstärkt und die resultierende Konformationsänderung zu einem verringerten allergenen Potential führt. Kiewning et al. (2013b) zeigten, dass eine hohe PPO-Aktivität mit einer verringerten Mal d 1 Konzentration einhergeht. Kschonsek et al. (2019a) stellten wiederum fest, dass eine hohe PPO-Aktivität zu einer verringerten Allergenität in verschiedenen Apfelsorten führt. Groth et al. (2021a) konnten keinen Zusammenhang zwischen Mal d 1 Gehalt und PPO-Aktivität ermitteln. Auch im Rahmen der vorliegenden Studie konnte weder eine Korrelation mit dem Allergengehalt noch mit der Verträglichkeit der jeweiligen Genotypen festgestellt werden. Es ist möglich, dass eine solche Korrelation Genotyp spezifisch ist und neben der PPO-Aktivität weitere Faktoren das Allergenniveau und die Allergenität eines Genotyps beeinflussen.

4.4. Gesamtpolyphenolgehalt

Flavonoide sind natürliche Antioxidantien und besitzen wichtige physiologische Funktionen innerhalb der Pflanze, wie die Regulierung des Auxintransports, Allelopathie, Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies, UV-Schutz, biotische und abiotische Abwehr, sowie Pigmentierung von Blüten und Früchten, was die Anziehung von potenziellen Bestäubern erleichtert (Winkel-Shirley 2001). Der PG zwischen den untersuchten Apfel-Genotypen variierte zwischen 207 und 1270 $\mu\text{g GAE/g FG}$ gemäß FC-Assay und zwischen 611 und 5967 $\mu\text{g GAE/g FG}$ gemäß FBB-Assay. Vorausgegangene Studien ermittelten den PG in Äpfeln ausschließlich mittels FC-Assay und bestimmten Gehalte im niedrigen bis mittleren $\mu\text{g GAE/g}$ -Bereich (Schmitz-Eiberger und Matthes 2011; Kschonsek et al. 2019a; Groth et al. 2021a). Das FC-Assay wird routinemäßig für verschiedene pflanzliche Matrices eingesetzt, um den PG zu bestimmen. Es stellt ein kolorimetrisches Verfahren zur indirekten Bestimmung von phenolischen Substanzen dar. Der zu Grunde liegende Mechanismus beruht auf der Oxidation von phenolischen Verbindungen im alkalischen Milieu durch das FC-Reagenz, eine Lösung aus Molybdätophosphorsäure und Wolframatophosphorsäure, wobei es selbst zu Wolframoxid und

Molybdänoxid reduziert wird (Singleton et al. 1999; Medina 2011b). Dabei können zahlreiche Substanzen, wie etwa Proteine, Aminosäuren, aromatische Amine, Zucker und Ascorbinsäure interferieren, weshalb dieses Assay eine besonders geringe Spezifität aufweist (Prior et al. 2005). Gerade bei der Bestimmung des PG in Früchten erscheint diese Methode ungeeignet, angesichts der natürlich vorkommenden Gehalte an nicht-phenolischen Antioxidantien und reduzierenden Substanzen. Der FBB-Assay beruht auf der spezifischen Kopplung zwischen der Diazoniumgruppe des FBB-Reagenzes und des aromatischen Rings mit aktivierter Hydroxygruppe des phenolischen Restes unter Bildung eines stabilen Azo-Komplexes (Medina 2011b). Dadurch werden mögliche Wechselwirkungen mit anderen Substanzen wie etwa Ascorbinsäure vorgebeugt. Außerdem zeichnet sich der FBB-Assay im Vergleich zum FC-Assay durch höhere GAE-Äquivalenzwerte aus (Medina 2011a). Medina (2011a) bestimmte in verschiedenen Früchten deutlich höhere PG mittels FBB-Assay als mit dem herkömmlichen FC-Assay. Dies konnte durch eine Studie von Lester et al. (2012) bestätigt werden, die 2,9-fach höhere PG in Erdbeeren nach dem FBB-Assay bestimmten. Auch im Rahmen dieser Studie sind die Gehalte aus dem FBB-Assay bis zu 5-fach höher im Vergleich zu denen aus dem FC-Assay (Abbildung 21, Abbildung 22). Damit kann festgestellt werden, dass bisherige Untersuchungen den PG in Äpfeln deutlich unterschätzt haben. Daneben konnte in dieser Arbeit eine signifikant positive Korrelation zwischen dem Mal d 1 Gehalt und dem PG ermittelt werden, jedoch nicht zwischen dem PG und der Verträglichkeit eines Genotyps. Diese Ergebnisse stehen in Diskrepanz zu vorhergegangenen Untersuchungen, die keinen direkten Zusammenhang zwischen dem Allergengehalt und PG finden konnten und darüber hinaus oft eine geringere Allergenität mit einem höheren PG postulierten bzw. nachwiesen (Rudeschko et al. 1995b; Kschonsek et al. 2019b; Groth et al. 2021a). Letzteres wird vor allem in Bezug auf die PPO-Aktivität diskutiert, indem wie bereits in 4.3 erwähnt, oxidierte Polyphenole irreversible Komplexe mit Proteinen bilden können und damit antiallergische Eigenschaften aufweisen (Chung und Champagne 2009). Darauf aufbauend berichteten Schmitz-Eiberger und Matthes (2011), dass ein hoher PG in Verbindung mit einer hohen PPO-Aktivität die Extrahierbarkeit von Mal d 1 herabsetzt. Einige der in dieser Arbeit untersuchten Genotypen wie etwa p36 und p48, sowie p197 und p9, wurden gemäß den Humanstudien 2018 (Romer et al. 2020) und 2019 (3.2.6) von den Patienten nicht gut vertragen, trotz eines hohen PG (3.3.2). Betrachtet man jedoch neben dem PG auch die PPO-Aktivität (3.3.1) kann beispielsweise nur für p197 eine hohe PPO-Aktivität und für p9 eine sehr niedrige Enzymaktivität beobachtet werden, während p36 und p48 Enzymaktivitäten im mittleren Bereich aufwiesen. Wie stark der PG und die PPO-Aktivität die Allergenität eines Genotyps beeinflussen scheint vom jeweiligen

Genotyp abhängig zu sein. Grundsätzlich muss festgehalten werden, dass die ermittelte Korrelation zwischen Allergengehalt und PG einer geringen Allergenität eines Genotyps nicht zwingend entgegensteht. Polyphenole können die Antigenpräsentation durch dendritische Zellen beeinflussen, indem sie den redoxsensitiven Signaltransduktionsweg modulieren und MHCII-transfizierte Fibroblasten inhibieren (Gong und Chen 2003). Daneben bewirken Polyphenole, insbesondere Flavone, eine Suppression der FcεRI-Expression und besitzen damit eine inhibierende Wirkung auf die Degranulation von Mastzellen und basophile Granulozyten (Yano et al. 2005).

4.5. Polyphenol-Zusammensetzung von Äpfeln

Die genetische Variabilität zwischen einzelnen Genotypen ist wichtig für die Apfelsortenselektion und die Einführung neuer kommerzieller Hybride. Dabei sollten nicht nur organoleptischen Eigenschaften und das Resistenzverhalten gegenüber Krankheitserregern eine Rolle spielen, sondern auch nutritive Eigenschaften, wie etwa die Verteilung der Sekundärmetaboliten, beachtet werden.

Polyphenole sind wichtige sekundäre Pflanzenstoffe und sind ernährungsphysiologisch von besonderem Interesse. Die Gehalte und die Zusammensetzung von Polyphenolen variieren je nach Genotyp, Fruchtkompartiment (Schale, Fruchtfleisch, Kerne, Trester), Umwelteinflüssen, Ernte, Verarbeitung und Lagerung (Heimler et al. 2017; van der Sluis et al. 2001). Umweltfaktoren können pedoklimatisch sein und z.B. Bodenart, Sonneneinstrahlung und Niederschlag betreffen, sowie agronomischer Art sein und die Bewässerungstechnik oder den Einsatz von Düngemitteln betreffen (Macheix et al. 2018; Sannomaru et al. 1998; Manach et al. 2004). Gerade bei der Sonnenexposition spielt die Position der Frucht im Blätterdach eine wesentliche Rolle, da Lichtintensität und -zusammensetzung im Innen- und Außenbereich der Baumkronen unterschiedlich sind (Guidi et al. 2008; Kviklys et al. 2022; Awad et al. 2000). Weiterhin hat die Nährstoffversorgung des Bodens einen wesentlichen Einfluss. Awad und Jager (2002) stellten fest, dass die Stickstoff-Düngung mit verringerten Konzentrationen von Anthocyanen, Catechinen und dem Gesamtpolyphenolgehalt verbunden ist. Dagegen wurde bei der Düngung mit Calcium eine Zunahme von Anthocyanen und Gesamt-Flavonoiden beobachtet (Awad und Jager 2000).

Innerhalb der untersuchten Proben ergaben sich Unterschiede hinsichtlich der Polyphenolbiosynthese. Dabei kann für Genotypen desselben Standortes und Erntejahres von ähnlichen Umweltbedingungen ausgegangen werden. Hier auftretende Schwankungen spiegeln maßgeblich den Einfluss des Genotyps wider. Bei den in Äpfeln identifizierten Polyphenolen

handelt es sich um Vertreter der Klassen Flavan-3-ole, Flavonole, Anthocyane, ZSD und DHC, sowie weitere Metabolite wie etwa Äpfre, Citsre, GSH und GSSG. Die in dieser Studie identifizierten Metabolite stimmen mit denen aus vorangegangenen Studien überein (Malec et al. 2014; Wang et al. 2015; Bars-Cortina et al. 2017; Romer et al. 2020; Kalinowska et al. 2014). Die Biosynthese von Flavonoiden in Äpfeln umfasst den enzymatisch katalysierten Shikimisäure- und Acetat-Malonat-Biosyntheseweg (Babenko et al. 2019). Flavonoide liegen in Form von Glykosiden vor und werden mit Zuckern wie Galaktose, Glukose, Rhamnose, Xylose, Arabinose und Rutinose gebildet. Im Gegensatz dazu, sind Flavan-3-ole nicht in glykosylierter Form enthalten. In dieser Arbeit wurde das Fruchtfleisch zusammen mit der Schale des jeweiligen Genotyps analysiert. Es ist bereits bekannt, dass die Fruchtschale über einen höheren Polyphenolgehalt verfügt und darüber hinaus auch Unterschiede hinsichtlich ihrer Zusammensetzung zeigt (Kschonsek et al. 2018; Francini und Sebastiani 2013). In der Fruchtschale sind vorwiegend Flavonole bzw. die Flavonolglykoside und Anthocyane enthalten (Giomaro et al. 2014; Francini und Sebastiani 2013). Gerade die Anthocyane können sortenabhängig auch in höheren Konzentrationen im Fruchtfleisch vorliegen. Dies ist in z.B. rotfleischigen Äpfeln der Fall. Dagegen sind die ZSD, DHC und Flavonole sowohl in der Fruchtschale als auch im Fruchtfleisch lokalisiert, wobei höhere Gehalte der ZSD im Fruchtfleisch zu finden sind (Awad und Jager 2000; Awad et al. 2000).

In der Klasse der Flavan-3-ole machte Procyanidin B2 in allen Genotypen mit 30 bis 62 % den größten Anteil aus. Bei einem Vergleich der Monomere ist Epicatechin in höheren Konzentrationen vorhanden, was mit früheren Studien übereinstimmt (Han et al. 2019; Romer et al. 2020). Das Flavanol-Profil von weiß- und rotfleischigen Äpfeln zeigt, dass rotfleischige über einen besonders niedrigen Flavan-3-ol-Gehalt und einen erhöhten Anthocyan-Gehalt verfügen. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen von Bars-Cortina et al. (2017) überein. Die geringen Flavan-3-ol-Konzentrationen sind möglicherweise in einer kompetitiven Synthese zwischen Anthocyanen und Proanthocyanidinen begründet, da diese Metabolite über dieselben Zwischenstufen im Biosyntheseweg gebildet werden (Henry-Kirk et al. 2012; Bars-Cortina et al. 2017). Dabei stellen Leukoanthocyanidine die Vorstufe von Flavan-3-olen und Anthocyanidinen dar. Reduktasen wie die Leukoanthocyanidin Reduktase führen zur enzymatischen Bildung von Flavan-3-olen, während die Anthocyanidin Synthasen die Bildung von Anthocyanidinen bewirken. Demnach kann eine Konkurrenzreaktion um das Substrat zwischen der Anthocyanidin Synthase, sowie der Leukoanthocyanidin Reduktase zu geringen Gehalten von Flavan-3-olen führen.

In den untersuchten Proben wurde in der Gruppe der Flavonole eine Vielzahl von Quercetin-Derivaten quantifiziert, die die Hauptkomponenten der Flavonole darstellen (Tsao et al. 2003; Boyer und Liu 2004; Kahle et al. 2005). Unter den Quercetin-Derivaten sind Qu-Gal und Qu-Ar am häufigsten vertreten. Andere Analyten wie DHF und Ka-Ar machen einen Anteil von unter 5% des Gesamt-Flavonol-Gehaltes aus. Quercetine, sind hauptsächlich in der Apfelschale zu finden und nur in Spuren im Fruchtfleisch vorhanden (Veberic et al. 2010; Bondonno et al. 2020). Externe Einflüsse wie etwa Sonneneinstrahlung oder oxidative Prozesse führen zu einer Erhöhung der Flavonol-Konzentrationen, da ihre Biosynthese durch Licht initiiert wird (Guidi et al. 2008; Henry-Kirk et al. 2018).

In allen Proben konnte eine Vielzahl von Anthocyan-Metaboliten identifiziert werden. Die Bildung von Anthocyanen ist stark temperaturabhängig, wobei hohe Temperaturen die Synthese dieser Substanzklasse unterdrücken (Honda et al. 2014; Saure 1990). Auch eine unzureichende Lichtexposition kann zu verminderten Anthocyan-Gehalten bis hin zu einer ausbleibenden Anthocyan-Synthese führen (Arakawa 1991; Honda und Moriya 2018). Im Gegensatz dazu, ist eine Licht-/Sonnenexposition nicht für die Anthocyan-Produktion im Fruchtfleisch von rotfleischigen Äpfeln notwendig (Honda und Moriya 2018). Hier kommt es bei ausreichender Sonnenexposition lediglich zu einer erhöhten Akkumulierung. In rotfleischigen Äpfeln vom Typ 1 sorgt das Gene MdMYB10 für eine umfangreiche Akkumulation von Anthocyanen in der gesamten Pflanze einschließlich der Stämme, Blätter, Blüten, sowie der Frucht (Fruchtschale und Fruchtfleisch) (Umemura et al. 2013). Bei rotfleischigen Äpfeln vom Typ 2 ist das Gen MdMYB110a beteiligt und führt ausschließlich zu einer Rotfärbung des Fruchtfleisches. Alle anderen Organe der Typ-2 Pflanze unterscheiden sich nicht von herkömmlichen Apfelbäumen. Bei den untersuchten Proben handelt es sich um eine Mischung aus Typ 1 und Typ 2 Äpfel. Cyanidin galaktosid (Idaein) ist ein typisches in der Fruchtschale des Apfels vorkommendes Anthocyanin (Vrhovsek et al. 2004; Romer et al. 2020). Die durchgeführten Untersuchungen lassen vermuten, dass es sich bei Cy-Hex 1 um das Cyanidin galaktosid handelt. Cyanidin galaktosid wurde bereits mehrfach in der Literatur als Hauptbestandteil der Anthocyane in Äpfeln beschrieben. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass erwartungsgemäß rotfleischige Äpfel in ihren Anthocyan-Gehalten den weißfleischigen überlegen sind mit bis zu 4-fach höheren Konzentrationen.

DHC sind überwiegend in Äpfel zu finden. In rotfleischigen Äpfel wurden in einer vorangegangenen Studie hohe Gehalte von Phl-2-Xy-Glc quantifiziert (Bars-Cortina et al. 2017). Die vorliegenden Ergebnisse zeigten keine Auftrennung von weißfleischigen und rotfleischigen Genotypen anhand ihres Gehaltes von Phl-2-Xy-Glc.

Ein Hauptvertreter der ZSD in Äpfeln stellt die Chlsre dar, ein Hydroxyzimtsäureester aus Kaffeesäure und Chinasäure (Manach et al. 2004). In allen untersuchten Proben machte Chlsre einen Anteil zwischen 33 und 63 % aus. Chlsre fungiert als antioxidativer Radikalfänger und besitzt antimykotische Eigenschaften (Sawa et al. 1999; Harborne 1994). Die Anreicherung von Chlsre ist schorrfinfektionsabhängig und nimmt mit dem Grad der Infektion deutlich zu (Harborne 1994). Bars-Cortina et al. (2017) haben höhere Gehalte von Chlsre in rotfleischigen Genotypen im Vergleich zu weißfleischigen nachgewiesen. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden, da sowohl rotfleischige als auch weißfleischige Genotypen einen ähnlichen Konzentrationsbereich aufwiesen. Weiterhin konnte Neochlsre als Isomer der Chlsre identifiziert werden und macht bis zu 36 % des Gesamtgehaltes dieser Substanzklasse aus.

4.5.1. Stabilität von Polyphenolen

Da Äpfel über das gesamte Jahr vertrieben werden, ist es wichtig den Einfluss der Lagerung auf die verschiedenen Metaboliten zu untersuchen. Bei der Lagerung kann es zu Veränderungen des Gehaltes der bioaktiven Bestandteile durch Stoffwechselabbau, Atmung- und Synthesevorgänge kommen. Alle Substanzklassen zeigten kaum signifikante Unterschiede zwischen den Lagerungsstadien. Dabei erwiesen sich die Klassen der ZSD und DHC als besonders robust. Auch die Flavanole und Flavonole zeigten sich relativ konstant. Zu einer starken Abnahme der Flavanole kam es im Genotyp p78. Anthocyane zeigten allgemein einen abnehmenden Trend über alle Stadien. Oft konnte innerhalb verschiedener Substanzklassen eine Zunahme der Gehalte zwischen dem ersten und zweiten Stadium beobachtet werden. Mehrere Studien untersuchten bereits die Auswirkungen der Kühllagerung auf die Polyphenol-Zusammensetzung von Äpfeln (Awad und Jager 2000; van der Sluis et al. 2001; van der Sluis et al. 2003; Awad und Jager 2003; Napolitano et al. 2004; Veberic et al. 2010). Dabei konnte gezeigt werden, dass Polyphenole während der Lagerung weitestgehend stabil sind. Awad und Jager (2000) konnten keine Veränderungen im Flavonoid-Gehalt während der Kühllagerung über einen Zeitraum von 32 Wochen feststellen. Dies stimmt mit den Ergebnissen von van der Sluis et al. (2001) überein, die kaum Veränderungen feststellten und lediglich über eine geringe Abnahme der Cat und Epi Konzentrationen berichteten. In vorliegender Arbeit (Abbildung 25) und auch in früheren Studien konnte mit zunehmender Lagerung eine Abnahme der monomeren Catechine beobachtet werden (Burda et al. 1990; Guyot et al. 2003; Piretti et al. 1996). Weiterhin konnten Golding et al. (2001) und Carbone et al. (2011) nur geringfügige signifikante Änderungen in den Metabolit-Konzentrationen beobachten. Dagegen ermittelten Lattanzio et al. (2001) eine Zunahme der Polyphenolsynthese in GD innerhalb der ersten 60 Tage der

Lagerung. Napolitano et al. (2004) konnten im Verlauf der Lagerung steigende Gehalte von Cat und Phl nachweisen. Leja et al. (2003) zeigten eine signifikante Erhöhung des PG während der Kühlung. Im Gegensatz dazu wiesen Tarozzi et al. (2004) eine Abnahme des Polyphenolgehaltes unter Kühlungbedingungen nach.

Eine Zunahme des Polyphenolgehaltes kann möglicherweise auf die vermehrte Ethylenbildung zurückgeführt werden. Dieses Phytohormon stimuliert die Aktivität des Schlüsselenzyms Phenylalanin-Ammonium-Lyase, welches die Polyphenolsynthese einleitet (Napolitano et al. 2004). In anderen Früchten konnten niedrige Temperaturen mit einer steigenden Phenylalanin-Ammonium-Lyase-Aktivität in Verbindung gebracht werden (Martínez-Téllez und Lafuente 1997; Tomás-Barberán und Espín 2001). Weiterhin kann eine Zunahme der Polyphenolkonzentrationen bei niedrigen Temperaturen auf eine geringere PPO-Aktivität zurückgeführt werden, wodurch Oxidationsprozesse in geringerem Umfang ablaufen (Leja et al. 2003). In jedem Fall spielt der Genotyp ebenfalls eine wichtige Rolle für das stabile Vorkommen von bestimmten phenolischen Verbindungen über längere Lagerzeiträume.

4.5.2. Korrelationen von Metaboliten

Für alle quantifizierten Polyphenolgehalte wurde eine Korrelationsanalyse nach Spearman durchgeführt. In der Gruppe der Flavanole konnten einige signifikant positive Korrelationen identifiziert werden. Dabei korrelierten die Gehalte der Monomere Catechin und Epicatechin mit den Gehalten von Procyanidin, Procyanidin B1 und B2 stets miteinander. Die Procyanidine zeigen untereinander ebenfalls stark signifikante Zusammenhänge. Dies konnte bereits in einer Studie von Romer et al. (2020) gezeigt werden. Die Korrelation zwischen den Monomeren und Oligomeren/ Polymeren ist vermutlich in der Substratverfügbarkeit begründet. Procyanidine, auch bekannt als kondensierte Tannine, können in Typ-B und Typ-A Procyanidine unterschieden werden (Hellström et al. 2009; Dixon et al. 2005; Santos-Buelga und Scalbert 2000). Bei Typ-B Procyanidine handelt es sich um Oligomere und Polymere, die über C4-C8 oder C4-C6 interflavan Bindungen verknüpft sind. Typ-A Procyanidine verfügen über eine Etherbindung in der Form C2-O-C5 oder C2-O-C7. Es ist bekannt, dass in Äpfeln Typ-B Procyanidine in Form von Dimeren (Procyanidin B1: Epicatechin-(4 β -8)-catechin; Procyanidin B2: Epicatechin-(4 β -8)-epicatechin; Procyanidin B5: Epicatechin-(4 β -6)-epicatechin), Trimere (Procyanidin C1: Epicatechin-(4 β -8)-epicatechin-(4 β -8)-epicatechin) und einem Tetramer (Epicatechin-(4 β -8)-epicatechin-(4 β -8)-epicatechin-(4 β -8)-epicatechin) vorkommen (Shoji et al. 2003). (-)-Epicatechin-Monomere treten als Verlängerungs- oder terminale Einheiten auf, während (+)-Catechine ausschließlich terminal vorkommen. In den untersuchten Genotypen

konnten lediglich die Dimere qualifiziert und quantifiziert werden. Das durchschnittliche Vorkommen der Oligomere und Polymere ist abhängig vom Genotyp und weniger von Anbau, Reife, Erntejahr oder Lagerung (Alonso-Salces et al. 2004a; Sanoner et al. 1999; Guyot et al. 2002). Der durchschnittliche Polymerisierungsgrad liegt nach einer Studie von Le Bourvellec et al. (2006) zwischen 2,5 und 65,5. Dagegen liegt der Polymerisierungsgrad beispielsweise in Erdbeeren zwischen 3,4 und 5,8 (Buendía et al. 2010) und in Pflaumen zwischen 5 und 9 (Nunes et al. 2008). Die große Schwankungsbreite des Polymerisierungsgrades in Äpfel weist auf eine ungerichtete Polymerisierung hin. Der genaue Mechanismus der Polymerisierung ist bisher nicht geklärt (James et al. 2017).

Ebenso konnten einige positive Korrelationen in der Gruppe der Flavonole identifiziert werden. Dabei zeigten sowohl Qu-Gal, als auch Qu-Rh einen besonders starken Zusammenhang mit Qu-Ar und Qu-Xy. Die Aglykone der Flavonoide sind in Pflanzen nicht stabil und werden daher im letzten Schritt der Biosynthese über eine enzymatische Katalysereaktion von UDP-Glukose mittels der Flavonoid Glycosyltransferase (UGT) glykosyliert (Davies et al. 2003; Sun et al. 2015). Die positiven Korrelationen weisen auf eine gleichmäßige Akkumulation der genannten Quercetin-Derivate hin. Dies gilt nicht für Qu-Glu, da dieses Flavonol vorwiegend schwach negative Korrelationen mit den anderen Mitgliedern dieser Klasse zeigt.

Einige Metabolite wie Qu-Gal, Qu-Rh, Qu-Xy, Qu-Ar, Ka-Ar, Cy-Hex 1, Cy-Pen 4, Chlsre, Chlsre-Di, Phl und Phl-2-Xy-Glc korrelierten signifikant positiv mit dem PG. Gerade für die Apfelmzüchtung erscheint dies besonders interessant, indem einzelne Metabolite als Marker für einen höheren PG genutzt werden könnten. Außerdem könnten diese Metabolite in der Züchtung gezielt beeinflusst werden, um einen höheren PG zu erzielen.

Die Korrelationsanalyse zeigt, dass mit steigenden Flavan-3-ol- und Flavonol-Gehalten, die Akkumulation von Anthocyanen abnimmt. Bei einer erhöhten Synthese von verschiedenen Metaboliten kommt es zu Engpässen der zur Verfügung stehenden Biomasse, die dadurch an anderen Abzweigungen des Biosynthesewegs fehlt, wodurch geringere Mengen der betroffenen Metabolitklassen gebildet werden (Ring et al. 2013).

Weiterhin wurden zahlreiche positive Korrelationen zwischen den verschiedenen Flavonol-Metaboliten und GSSG festgestellt. Ebenso ergaben sich positive Korrelationen zwischen den Vertretern der ZSD und GSSG. Keine Wechselwirkungen konnten mit der reduzierten Form von GSH gezeigt werden. Innerhalb der Pflanze sind regulatorische Mechanismen des Flavonoid-Transportes weitestgehend ungeklärt. Mögliche Zusammenhänge zwischen GSSG und Flavonoiden werden in 4.6.3 erläutert.

Polyphenole wurden in der Vergangenheit bereits oft in Zusammenhang mit einer verringerten Allergenität diskutiert (Kiewning et al. 2013b; Kschonsek et al. 2019a). In dieser Arbeit konnte eine Korrelation zwischen Mal d 1 und der Flavonoid-Synthese festgestellt werden, indem positive Korrelationen zwischen Mal d 1 und den Mitgliedern der Flavan-3-ole und Flavonole, als auch jeweils in der Summe der Flavan-3-ole und Flavonole festgestellt wurden. Eine Korrelation zwischen Mal d 1 und Flavanolen wurde bereits in einer Studie von Romer et al. (2020) nachgewiesen. In einer früheren Studie wurde für die Flavan-3-ole und vor allem für die Procyanidine mit einem hohem Polymerisierungsgrad eine stabilisierende Wirkung auf Proteine gezeigt (Prigent et al. 2009). Die hohe Anzahl an Hydroxygruppen der Procyanidine ermöglicht es ihnen an mehrere Protein-Bindungsstellen gleichzeitig anzudocken.

Weiterhin korreliert Mal d 1 mit dem PG in einer ähnlichen Ausprägung wie mit den Flavanolen, obgleich die Korrelation mit dem PG deutlich schwächer ausfällt als wie die in 3.3.2 dargelegte. Die Diskrepanzen können in einer unvollständigen Identifizierung der Polyphenole in dem LC-MS-Datenset begründet sein. Weitere Aspekte zu dem Zusammenhang zwischen Flavonoiden und Mal d 1 werden in 4.6 diskutiert.

4.6. Biophysikalische Charakterisierung von Protein-Ligand-Interaktionen

PR-10 Proteine sind in Pflanzen weit verbreitet, jedoch ist ihre physiologische Funktion bisher nicht geklärt. Die in dieser Studie präsentierten Daten zeigen, dass rekombinantes rMal d 1.02 Flavonoide und GSH in reduzierter und oxidierte Form bindet.

Teile der Diskussion wurden bereits veröffentlicht (Chebib und Schwab 2021).

4.6.1. Molekulare Dockingexperimente

Die Struktur von Mal d 1 weist einen hydrophoben Hohlraum im Inneren des Proteins auf, der von einem siebensträngigen, antiparallelen β -Faltblatt, zwei kurze V-förmig angeordnete α -Helices und einer C-terminalen α -Helix umschlossen wird (Ahammer et al. 2017a). In dieser Kavität binden pflanzliche Nahrungsmittelallergene der PR-10 Proteinfamilie überwiegend Flavonoide und andere Pflanzeninhaltsstoffe (Fernandes et al. 2013). Der Hohlraum im Proteininneren ist über zwei Eingänge zugänglich, zum einen in der N-terminalen Hälfte von Helix α_3 zusammen mit dem Schleifenbereich zwischen den Strängen β_3 - β_4 und β_5 - β_6 , deren beteiligte Aminosäurereste einen amphiphilen Zugangsweg formen (Ahammer et al. 2017a). Ein zweiter Zugang ist am β -Faltblatt zwischen Helix α_3 und Strang β_1 zu finden. Je nach Protein kann sich die Größe der hydrophoben Tasche unterscheiden. So besitzt der Hohlraum

von Mal d 1.0101 ein Volumen von etwa 2200 Å³, von Fra a 1E ein Volumen von etwa 3600 Å³ und von Bet v 1 a ein Volumen von 2800 Å³ (Ahammer et al. 2017a; Fernandes et al. 2013). Durch Bindung von Liganden kann sich das Volumen des Hohlraumes vergrößern. Für Pru av 1 wurde eine Bindung von mehreren Liganden gleichzeitig festgestellt (Neudecker et al. 2001). Eine gleichzeitige Aufnahme von unterschiedlichen Liganden wäre auch für Mal d 1 denkbar. Kristallstrukturen von PR-10 Proteine zeigten, dass der Hohlraum mit Lösungsmittelmolekülen, Liganden und Pufferkomponenten gefüllt ist (Fernandes et al. 2013). Die Anwesenheit von Wassermolekülen spielt für die Ligandenbindung eine wesentliche Rolle. Die im Hohlraum vorhandenen Wassermoleküle können Wasserstoffbrücken zum Protein ausbilden und Wasserstoffbrücken-Wechselwirkungen bei der Ligandenbindung vermitteln. Bei der Ligandenbindung werden Wassermoleküle aus der Bindungstasche verdrängt. Die molekularen Dockingexperimente zeigten, dass die Protein-Ligand-Komplexe durch hydrophobe und polare Wechselwirkungen stabilisiert werden. Der Aminosäurerest Tyr83, nahm eine Schlüsselrolle bei der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen im GSSG-rMal d 1.02-Komplex ein. Tyr83 wurde bereits in früheren Studien als wichtiger Aminosäurerest bei der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen identifiziert, wie beispielsweise in den Komplexen von Bet v 1 a-Naringenin (Seutter von Loetzen et al. 2014; Seutter von Loetzen et al. 2015) und in Bet v 1-8-Anilinonaphthalin-1-sulfonsäure (ANS) (Kofler et al. 2012). Allgemein sind verschiedene Konformationen des Liganden innerhalb des Hohlraumes möglich. Dies erklärt die teilweise großen Unterschiede zwischen den experimentellen und in silico bestimmten Bindungsaffinitäten.

4.6.2. Bindung von Flavonoiden an rMal d 1.02

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass rekombinantes rMal d 1.02 (+)-Catechin und Quercetin-3-rhamnosid mit hoher Affinität im niedrigen mikromolaren Bereich bindet. Bereits mehrere Studien konnten Flavonoide als physiologisch wichtige Liganden für verschiedene PR-10 Proteine und ihre Isoformen identifizieren (Tabelle 22) (Kofler et al. 2012; Mogensen et al. 2002; Soh et al. 2019; Seutter von Loetzen et al. 2014; Seutter von Loetzen et al. 2015; Casañal et al. 2013; Jacob et al. 2019; Zubini et al. 2009). Die Bindungsaffinität von Naringenin zu Bet v 1 a, m und d wurde mit K_d 's von 60,6 µM, 28,1 µM und 37,7 µM bestimmt (Kofler et al. 2012; Seutter von Loetzen et al. 2015). Seutter von Loetzen et al. (2014) wiesen die Bindung von Quercetin-3-O-sophorosid zu Bet v 1 a mit einer hohen Bindungsaffinität nach, die sich in einem niedrigen K_d -Wert von 0,57 µM widerspiegelte (Seutter von Loetzen et al. 2014). Für die physiologische Bedeutung des Komplexes wurde eine UV-Schutzfunktion

der Birkenpollen-DNA und eine Rolle bei der Induktion des Pollenschlauchwachstums postuliert. Weiterhin binden Bet v 1 a, m und d Quercetin mit K_d 's von 9,2 μM , 26,5 μM und 10,2 μM (Seutter von Loetzen et al. 2015). Damit wurde festgestellt, dass der Zuckerrest des Flavonols das Bindungsverhalten maßgeblich beeinflusst, indem eine höhere Bindungsaffinität durch den Sophorose-Rest von Quercetin-3-O-sophorosid im Vergleich zum Aglykon Quercetin nachgewiesen wurde (Seutter von Loetzen et al. 2014). Weiterhin können geringe Variationen in der stereochemischen Beschaffenheit bereits mit veränderten Liganden-Bindungsaffinitäten einhergehen (Seutter von Loetzen et al. 2014; Seutter von Loetzen et al. 2015). Die Verknüpfung eines Galaktosid-Restes im Vergleich zu einem Glukose-Rest an Quercetin führte zu einer gesteigerten Affinität zu Bet v 1 a (Seutter von Loetzen et al. 2014). Im Gegensatz dazu wurde keine veränderte Interaktion zwischen den Flavonoid-Glykosiden und der Isoform Bet v 1 m beobachtet. Damit zeigen Isoformen ein spezifisches Bindungsverhalten, das durch ihre strukturellen Eigenschaften beeinflusst wird. Innerhalb dieser Arbeit wurden für die Diastereomere Catechin und Epicatechin und für die Enantiomere von Epicatechin signifikant unterschiedliche K_d -Werte ermittelt. Unterschiedliche Isoform-Spezifitäten gegenüber Liganden wurde auch für Fra a 1 berichtet. Die Bindung von Quercetin-3-O-glucuronid, Myricetin und (+)-Catechin an Fra a 1 E, Fra a 2 und Fra a 3 wurde mit Affinitäten von 5,3 μM , 19,5 μM und 8,9 μM gezeigt (Casañal et al. 2013). Für Fra a 1 Proteine wurde daher eine Transportfunktion dieser Metabolite bzw. eine regulatorische Funktion des Metabolitentransports in der Flavonoid-Biosynthese angenommen (Muñoz et al. 2010; Casañal et al. 2013). Eine ähnliche Funktion ist ebenso für Mal d 1 denkbar, wonach das Protein als Transporteinheit den Sekundärmetabolismus möglicherweise reguliert (Chebib und Schwab 2021).

4.6.3. GSH und GSSG im Komplex mit rMal d 1.02

Die reduzierte Form von Glutathion setzt sich aus den Aminosäuren L-Glutaminsäure, L-Cystein und Glycin zusammen. Das Antioxidans GSH ist an der Detoxifizierung von Xenobiotika, Metall- und Schwermetallen und reaktiven Sauerstoffspezies beteiligt (Ketterer et al. 1983). Letztere können durch unterschiedlichste Umweltbedingungen, wie etwa Temperaturänderungen und Nährstoffmangel gebildet werden. Bei der Neutralisation der reaktiven Sauerstoffspezies fungiert GSH in mehreren Redoxreaktionen als Elektronendonator und wird dabei selbst in seine oxidierte Form GSSG umgewandelt. GSSG kann durch die Glutathionreduktase unter Verbrauch von NADPH wieder reduziert werden (Meister 1988). In Äpfeln werden hohe Konzentrationen von GSH durch hohe Temperaturen und starke

Sonneneinstrahlung induziert (Zhang et al. 2008). Ein hoher GSH Spiegel begünstigt wiederum die Bildung von verschiedenen Pflanzenhormonen wie Abscisinsäure, Auxin und Jasmonsäure (Cheng et al. 2015). GSH kann auch S-Konjugate mit reaktiven freien Protein-Thiolgruppen bilden im Zuge von posttranslationalen Modifikationen zum Schutz gegen Oxidation und Inaktivierung durch Radikale. Eine S-Glutathionylierung wurde beispielsweise für das PR-10 c Protein aus der Birke gezeigt (Koistinen et al. 2005). Das rekombinante Apfelallergen rMal d 1.02 besitzt keine Cysteinreste (Anhang 5.1), weshalb eine S-Glutathionylierung durch die Bindung von GSH ausgeschlossen werden kann. Weiterhin kann GSH auch die Proteinsynthese regulieren, wie es bereits für die Transkription der Chalconsynthase gezeigt wurde (Wingate et al. 1988).

Die Flavonoidbiosynthese findet auf der zytoplasmatischen Seite des Endoplasmatischen Retikulums statt (Zhao und Dixon 2009). Anschließend erfolgt der Flavonoidtransport in andere Zellkompartimente. In der Vakuole akkumulieren Anthocyane, glykosylierte Flavonole, und Proanthocyanidine. Für den Transport von Flavonoiden wird der Membrantransport und der Vesikel vermittelte Transport diskutiert (Zhao 2015). Daneben gilt die Glutathion-S-Transferase (GST) als zytoplasmatisches Flavonoid-Trägerprotein *in vivo* und steuert den Flavonoidtransport zur Vakuole (Marrs et al. 1995; Mueller et al. 2000; Zhao 2015; Jiang et al. 2019). GSTs sind Enzyme, die zur Detoxifizierung von exogenen Substraten die Konjugation von GSH an elektrophile Moleküle katalysieren und eine wichtige Rolle bei dem Transport von hydrophoben Verbindungen spielen (Dixon et al. 2010). Ursprünglich wurde für den Transport von Flavonoiden die Bildung eines GSH konjugierten Flavonoid-Komplexes angenommen, dessen Identifizierung bisher nicht gelungen ist (Mueller et al. 2000; Behrens et al. 2019; Marrs et al. 1995). Stattdessen wird eine Wechselwirkung zwischen dem Enzym GST und dem Flavonoid Substrat postuliert (Zhao 2015). Dabei wird vermutet, dass ABC-Transporter an dem vakuolen Transport von Flavonoiden aus der Zelle verantwortlich sind. Es konnten bereits ABC-Transporter identifiziert werden, die für den Transport von Anthocyanen eine Rolle spielen. Das GST-Protein VvABCC1 transportiert Malvidin-3-O-glukosid, wobei dieser Mechanismus von der Anwesenheit von GSH reguliert wird (Francisco et al. 2013). Ein weiterer GSH abhängiger Transport stellt die Aufnahme von Cyanidin-3-glukosid durch AtABCC2 dar. AtTT19 in Arabidopsis und AN9 in Petunien wurden als Trägerproteine für den Transport von Anthocyanen und Proanthocyanen aus dem Zytosol in die Vakuole identifiziert (Kitamura et al. 2004; Mueller et al. 2000).

Diskussion

Tabelle 22 Identifizierte Liganden von PR-10 Proteinen (modifiziert nach Chebib und Schwab 2021).

Pflanze	Protein	Ligand	Kd [μ M]	Methode	Literatur
Birke	Bet v 1 a	ANS	18,5	NMR, Fluoreszenz	(Kofler et al. 2012; Mogensen et al. 2002)
		Deoxycholat	58,8	NMR, SAW ¹	(Soh et al. 2019; Kofler et al. 2012)
		Quercetin	31,4	NMR	(Seutter von Loetzen et al. 2014; Seutter von Loetzen et al. 2015)
			9,2	UV/VIS	(Seutter von Loetzen et al. 2015)
		Quercetin-3-O-sophorosid	0,57	Fluoreszenz	(Seutter von Loetzen et al. 2014; Seutter von Loetzen et al. 2015)
		Quercetin-3-O-galactosid	<5	NMR	(Seutter von Loetzen et al. 2015)
		Quercetin-3-O-glucosid	288,4	NMR	(Seutter von Loetzen et al. 2014; Seutter von Loetzen et al. 2015)
		Fisetin	14,3	UV/VIS	(Seutter von Loetzen et al. 2015)
		Myricetin	14,6	NMR	(Seutter von Loetzen et al. 2015)
	Naringenin	60,6	UV/VIS	(Seutter von Loetzen et al. 2015)	
	Bet v 1 m	Quercetin	65,8	NMR	(Seutter von Loetzen et al. 2015)
			26,5	UV/VIS	(Seutter von Loetzen et al. 2015)
		Quercetin-3-O-galactoside	<5	NMR	(Seutter von Loetzen et al. 2015)
		Quercetin-3-O-glucoside	<5	NMR	(Seutter von Loetzen et al. 2015)
		Fisetin	68,6	UV/VIS	(Seutter von Loetzen et al. 2015)
		Myricetin	99,3	NMR	(Seutter von Loetzen et al. 2015)
		Naringenin	28,1	UV/VIS	(Seutter von Loetzen et al. 2015)
	Bet v 1 d	Quercetin	10,2	UV/VIS	(Seutter von Loetzen et al. 2015)
		Fisetin	13,9	UV/VIS	(Seutter von Loetzen et al. 2015)
		Myricetin	1,2	UV/VIS	(Seutter von Loetzen et al. 2015)
		Naringenin	37,7	UV/VIS	(Seutter von Loetzen et al. 2015)
Erdbeere	Fra a 1 E	Quercetin-3-O-glucuronid	5,3	ITC ²	(Casañal et al. 2013)
	Fra a 2	Myricetin	19,5	ITC ²	(Casañal et al. 2013)
	Fra a 3	(+)-Catechin	8,9	ITC	(Casañal et al. 2013)
Haselnuss	Cor a 1	Quercetin-3-O-(2-O- β -D-glucopyranosyl)- β -D-galactopyranosid	<5	NMR	(Jacob et al. 2019)
Pfirsich	Pru p 1.0101	Zeatin	9,4	ITC	(Zubini et al. 2009)

¹ Akustischer Oberflächenwellensensor (engl. surface acoustic wave) (SAW)

² Isotherme Titrationskalorimetrie (engl. isothermal titration calorimetry) (ITC)

Zusammenhängende Aspekte zwischen PR-10 Proteinen, GST und GSH/ GSSG werden im Folgenden erläutert (Abbildung 46) (Chebib und Schwab 2021). In einer früheren Studie wurde festgestellt, dass im Vergleich zu roten Erdbeeren, im weißen Phänotyp, der keine Anthocyane bildete, das PR-10 Proteins Fra a 1 herunterreguliert war (Hjernø et al. 2006). Neben Fra a 1 waren außerdem relevante Enzyme aus dem Flavonoid-Biosyntheseweg herabreguliert, wie etwa die Chalcon-Synthase, Dihydroflavonol-Reduktase und Flavonon-3-Hydroxylase (Hjernø et al. 2006). Darüber hinaus führte die RNAi-Herabregulierung der Fra a 1-Genexpression in transient transformierten Erdbeeren zu einer verminderten Flavonoid-Biosynthese, was die Bildung von weißen Erdbeerfrüchten zur Folge hatte (Muñoz et al. 2010). Damit wurden Fra a 1-Gene eine Bedeutung für die Farbgebung in Erdbeeren zugeschrieben. Jedoch wurde in weiteren Untersuchungen von roten und weißen Erdbeeren für weiße Phänotypen (mit niedriger Enzymexpression) keine konstant niedrigen Fra a 1-Konzentrationen ermittelt (Franz-Oberdorf et al. 2017; Kurze et al. 2018a). Für die Herabregulation der mit der Anthocyanbiosynthese assoziierten Gene dürften deshalb verschiedene Faktoren verantwortlich sein.

Eine Transkriptomanalyse zeigte, dass die Expression des Anthocyanidin-Glucosyltransferase-Gens und einer GST entscheidend für die Anthocyanbildung in Erdbeeren ist (Härtl et al. 2017). Bei Mais führte der Verlust der GST-Funktion (Bronze-2) zu einem Phänotyp mit sichtbarem Pigmentverlust (Goodman et al. 2004). Daneben haben weitere Studien einen Zusammenhang zwischen dem Verlust der GST-Funktion und einer Verringerung der Anthocyanidin-Akkumulation in Verbindung mit einem Farbverlust in verschiedenen Pflanzen postuliert, wie z.B. MdGST in Apfel, VviGST4 in Trauben, LcGST4 in Litschi, RAP in Erdbeeren und PpGST1 in Pfirsich (El-Sharkawy et al. 2015; Pérez-Díaz et al. 2016; Hu et al. 2016; Luo et al. 2018; Zhao et al. 2020). Vor kurzem wurde berichtet, dass die spezifische Herunterregulation des PR-10-Proteins Fra a 1.02, eine verringerte GSH-Konzentration und eine Herunterregulierung von GST in den transgenen Früchten auslöst (Orozco-Navarrete et al. 2021). Die identifizierte Interaktion zwischen GSH, GSSG und rMal d 1.02 zeigt einen weiteren Zusammenhang mit der Flavonoid-Biosynthese auf. Es ist möglich, dass GSH in reduzierter und oxidierte Form gebunden an Mal d 1 als entscheidender Co-Faktor bei dem Transport von Flavonoiden in die Ziel-Kompartimente der Zelle fungiert (Chebib und Schwab 2021). Auf diesem Wege können die Flavonoide nach ihrer Freisetzung aus den Transporteinheiten wichtigen biosynthetischen Enzymen zur Verfügung gestellt werden.

Pru p 1 in Pfirsich jedoch zu keinen Konformationsänderungen im Bereich der glycinreichen Region (Eidelpes et al. 2021).

Weiterhin wurde gezeigt, dass Proteine im Komplex mit Liganden eine erhöhte Stabilität gegenüber proteolytischem Abbau aufweisen und damit indirekt eine erhöhte Allergenität besitzen (Soh et al. 2019). Auch in Bet v 1 führte die Bindung von Deoxycholat zu einer Stabilisierung der konformationellen IgE-Epitope (Asam et al. 2014). Basierend darauf wurde angenommen, dass Patienten in der Sensibilisierungsphase sowohl Ligand-gebundenem Bet v 1 als auch freiem Bet v 1 ausgesetzt sind. Im Allgemeinen führte die Ligandenbindung bei Bet v 1 und Fra a 1 zu kompakten Proteinstrukturen mit geringer struktureller Flexibilität (Casañal et al. 2013; Grutsch et al. 2014). Für die Isoformen des Haselnussallergens Cor a 1.04 wurde eine negative Korrelation zwischen der konformativen Flexibilität und der IgE-Bindung ermittelt (Führer et al. 2021). Dabei korrelierte die IgE-Reaktivität mit der Versteifung des Proteinrückgrats, wobei die strukturell flexibelste Isoform Cor a 1.0404 das niedrigste IgE-Bindungspotential aufweist, während die Isoform Cor a 1.0401 mit dem rigidesten Rückgrat die höchste IgE-Reaktivität zeigt. Auch für Bet v 1 Isoformen wurden verschiedene strukturelle Flexibilitäten gezeigt (Grutsch et al. 2017; Wagner et al. 2008; Smole et al. 2010). Bet v 1.0102 verfügt über eine dynamische Proteinstruktur und eine geringe IgE-Bindungskapazität, während das strukturell wenig flexible Bet v 1.0101 eine hohe IgE-Reaktivität aufweist.

Generell sind Proteine oft an natürliche Lipide gebunden und können das Immunsystem aktivieren (Abós-Gracia et al. 2013; Bublin et al. 2014). Wie Bet v 1 ist auch Mal d 1 in der Lage an Phospholipidmembranen zu binden und unterliegt dabei selbst strukturellen Änderungen (Mogensen et al. 2007). Die Fähigkeit von Bet v 1 und Mal d 1 zur Permeabilisierung von Membranen könnte eine Möglichkeit darstellen Schleimhäute leichter zu durchqueren. Bet v 1 kann durch das Bindegewebeepithel von Allergikern mit Hilfe von stark exprimierten Rezeptoren transportiert werden (Lingwood und Simons 2010; Renkonen et al. 2009). Für Quercetin-3-O-sophorosid, der natürliche Ligand von Bet v 1, wurde postuliert, dass dieser den allergischen Sensibilisierungsprozess beeinflusst, indem er nach Lipidkontakt aus dem Protein freigesetzt wird (Seutter von Loetzen et al. 2014). Nach Freisetzung des Liganden, übernimmt dieser möglicherweise eine Rolle bei der Signalübertragung und induziert die Bildung von Allergen-spezifischem IgE (Agati et al. 2013).

Inwieweit die in dieser Arbeit identifizierten Liganden die Allergenität von Mal d 1 modulieren, muss in Folgestudien anhand von hyperallergenen und hypoallergenen Isoformen untersucht werden. Dafür muss jedoch zunächst geklärt werden, ob die identifizierten Liganden auch an

natürlich vorkommenden Mal d 1.02 binden und ob weitere Isoformen ein ähnliches Bindungsverhalten aufweisen.

4.7. Mal d Proteine in verschiedenen Apfel-Genotypen

Äpfel unterscheiden sich in ihrer qualitativen und quantitativen Mal d-Proteinzusammensetzung, wobei vermutlich nicht alle Mal d-Proteine von klinischer Relevanz sind. Das Apfelgenom enthält die genetische Information für verschiedene Mal d 1 Isoformen und Varianten, die durch Genduplikationen und alternatives Spleißen gebildet wurden. Für das Genom von GD wurden insgesamt 31 Gene beschrieben, die für verschiedene Isoformen kodieren (Pagliarani et al. 2012). Diese genetischen Informationen stimmen nicht zwangsläufig qualitativ mit den davon abgeleiteten Proteinen, sowie der tatsächlichen Proteinkomposition in pflanzlichen Zellen oder Geweben überein. Vermutlich handelt es sich bei vielen der in den öffentlichen Datenbanken beschriebenen Proteinsequenzen um allelische Isoformen, sowie unspezifische Artefakte, die durch PCR-Mutationen oder durch das Reannealing unvollständig amplifizierter Fragmente entstanden sind (Schenk et al. 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 52 Genotypen hinsichtlich ihres Peptid- und Isoformprofils untersucht. Alle Genotypen wurden in vorangegangenen Humanstudien mittels oraler Provokationstests allergologisch bewertet (Romer et al. 2020), weshalb Rückschlüsse auf das allergene Potential von Mal d 1-Isoformen möglich waren.

Teile der Diskussion wurden bereits veröffentlicht (Chebib et al. 2022).

4.7.1. Mal d 1 Isoformen mit hypoallergenen und hyperallergenen Eigenschaften

Die Proteomik-Untersuchungen ergaben signifikante Unterschiede in den Peptidprofilen der analysierten Apfel-Genotypen. Die Proteinfamilie von Mal d 1 umfasst insgesamt 113 Mitglieder (Romer et al. 2020). In allen analysierten Genotypen wurde die Expression von 21 Mal d 1 Isoformen durch die Detektion von spezifischen Peptiden eindeutig nachgewiesen. In jedem Genotyp sind zwischen einer und 15 Mal d 1 Isoformen vorhanden. Die tatsächliche Anzahl von Mal d 1 Isoformen auf Proteinebene ist vermutlich viel höher, da eine Vielzahl von unspezifischen Peptiden detektiert wurde, die auf die Anwesenheit weiterer Isoformen schließen lässt. In Birkenpollen wurde die Expression von vier bis sechs Bet v 1 Isoformen bestätigt und das Vorkommen weiterer 15 Isoformen vermutet, die aufgrund von fehlenden spezifischen Peptiden nicht eindeutig nachgewiesen werden konnten (Schenk et al. 2009). Damit sind allergische Individuen in der Regel einer Vielzahl von verschiedenen

Proteinisoformen mit unterschiedlicher IgE-Reaktivität ausgesetzt, wobei vermutlich nicht alle exprimierten Isoformen von klinischer Relevanz sind.

In vorangegangenen Studien wurden unterschiedliche IgE-Reaktivitäten für das Birkenpollenallergens Bet v 1 und seine Isoformen mittels Immunoblots ermittelt. Entsprechend konnten neun Bet v 1-Isoformen in drei Gruppen von Isoformen mit niedriger (Bet v 1 d), mittelmäßiger (Bet v 1 c) und hoher (Bet v 1 a) IgE-Reaktivität eingeteilt werden (Ferreira et al. 1996; Swoboda et al. 1995a). In Hautpricktests konnten für Isoformen aus der Gruppe mit niedriger IgE-Reaktivität eine signifikant geringere immunologische Reaktion gezeigt werden (Ferreira et al. 1996). Das unterschiedliche IgE-Bindungsverhalten von Bet v 1 Isoformen weist darauf hin, dass PR-10 Isoformen im Allgemeinen in ihrer Allergenität variieren und einige PR-10 Proteine kein IgE binden.

Das Vorkommen von verschiedenen Mal d 1-Isoformen wurde in der Vergangenheit bereits mehrfach auf Transkriptionsebene beschrieben, wobei ihre Expression auf Proteinebene in den meisten Fällen ausblieb (Puehringer 2003; Gao et al. 2005). Durch ortsspezifische Mutagenese wurden Mutanten von Mal d 1-Proteinen auf hypoallergene Eigenschaften untersucht (Son et al. 1999; Bolhaar et al. 2005b). Verschiedene Mal d 1-Gene und ihre allelischen Varianten wurden mit einem niedrigen und hohen allergenen Potential in Verbindung gebracht (Tabelle 23) (Vegro et al. 2016; Pagliarani et al. 2012; Gao et al. 2008). Entscheidende Faktoren, die dazu führen, dass einige Isoformen eine geringere und andere eine höhere IgE-Reaktivität aufweisen, wurden bis zu diesem Zeitpunkt nicht vollständig aufgeklärt.

Tabelle 23 Hypoallergene und hyperallergene Mal d 1 Gene, ihre allelischen Varianten und ihre zugehörigen Proteine (Chebib et al. 2022).

Hypoallergene Varianten		Hyperallergene Varianten	
Allel	Referenzsequenz/ NCBI Eintrag	Allel	Referenzsequenz/ NCBI Eintrag
Mal d 1.03C01 ¹	AAX18316.1	Mal d 1.03A ³	AAX20997.1
Mal d 1.03C02 ¹	AAX21000.1	Mal d 1.03D ³	AAX21002.1
			AAX21003.1
Mal d 1.03C03 ¹	AAX21001.1	Mal d 1.03E ³	AAX21004.1
			AAX21005.1
Mal d 1.06A02 ²	CBL94134.1	Mal d 1.0404 ²	AEF38451.1
Mal d 11A ¹	CBL94148.1	Mal d 1.06A01 ²	AEE38273.1
			CAK93636.1
Mal d 11B ¹	XP_008346874.1	Mal d 1.06B ²	AFC65129.1
			AEF38439.1
			AAX20977.1

¹ Pagliarani et al. 2012

² Gao et al. 2008

³ Vegro et al. 2016

Frühere Studien berichteten, dass die Isoformen Mal d 1 a (NCBI-Eintrag: P43211.2; Mal d 1.01) und Mal d 1 b (NCBI-Eintrag: Q40280.3; Mal d 1.02) auf Transkriptionsebene zu den am häufigsten exprimierten Isoformen in Äpfeln zählen (Helsper et al. 2002; Puehringer 2003; Son et al. 1999; Szabó und Takács 2018; Beuning et al. 2004). Beide Isoformen konnten in dieser Studie nicht eindeutig identifiziert werden, jedoch wurden zahlreiche unspezifische Peptide detektiert, die ihre Expression auf Proteinebene vermuten lassen. Insgesamt wurden 23 bzw. 29 unspezifische Peptide bestimmt, die möglicherweise aus den Isoformen von P43211.2 bzw. Q40280.3 resultierten (Abbildung 47, Abbildung 48 b). Die Mitglieder der Proteinfamilien von Mal d 1.01 und Mal d 1.02 zeichnen sich untereinander durch einen hohen Konservierungsgrad mit Sequenzhomologien von 98-99 % aus, wodurch eine Detektion von spezifischen Peptiden schwierig ist. Für beide Gruppen wurden hyperallergene Eigenschaften postuliert, da ihre Gene in hypoallergenen Sorten vergleichsweise weniger exprimiert wurden (Paris et al. 2017). Während Mal d 1.01 und Mal d 1.02 zu den weitverbreitetsten Isoformen gehören, sind Vertreter von Mal d 1.12 am wenigsten exprimiert, was mit den vorliegenden Ergebnissen übereinstimmt, da weder spezifische noch unspezifische Peptide für diese Gruppe detektiert wurden (Paris et al. 2017).

4.7.2. Strukturelle Eigenschaften von Epitopen in Mal d 1 Proteinen

Die Allergenität von Proteinen wird durch deren IgE bindende Molekülabschnitte, sog. Epitope bestimmt, die für die klinische Reaktivität von entscheidender Bedeutung sind. Geringe Veränderungen der Oberflächenstruktur der Proteine und den damit einhergehenden IgE-Epitopen können eine Veränderung der IgE-Bindungskapazität bewirken.

Im Allgemeinen zeichnen sich PR-10 Proteine durch ein gemeinsames hochkonserviertes Strukturmotiv aus mit der Sequenzabfolge G-X-G-G-X-G-X (AS 46-52) (Ahammer et al. 2017a). In dieser Region treten nur wenige Aminosäuresubstitutionen innerhalb der Mal d 1 Proteinsequenzen auf. Beispielsweise besitzen einige Mal d 1.06 Proteine wie AAS00045.1 und AAX20977.1 an Stelle von G-49 ein Serin, während CBL94148.1 (Mal d 1.11) und XP_008346874.1 (Mal d 1.11) in dieser Position eine Glutaminsäure aufweisen.

Für Bet v 1 wurde gezeigt, dass das Fab-Fragment eines monoklonalen murinen IgG1-Antikörpers BV16 an Bet v 1 in der „P-Schleifen“-Region bindet (Mirza et al. 2000). Der Aminosäurerest Glu-45 ist an der Wasserstoffbrückenbindung zu den Stickstoffatomen der Fab-Fragmente H1 und H3 CDR der variablen Domäne der schweren Kette bei der Bildung des Komplexes beteiligt und spielt damit eine entscheidende Rolle in dem IgE-Bindungsmechanismus. In Punktmutationen führte eine Substitution von Glu-45 durch ein

Serin zu einer 50%igen Reduktion der IgE-Bindungskapazität. Dies weist darauf hin, dass das P-Schleifenmotiv als wichtiges IgE-Epitop fungiert (Spangfort et al. 2003).

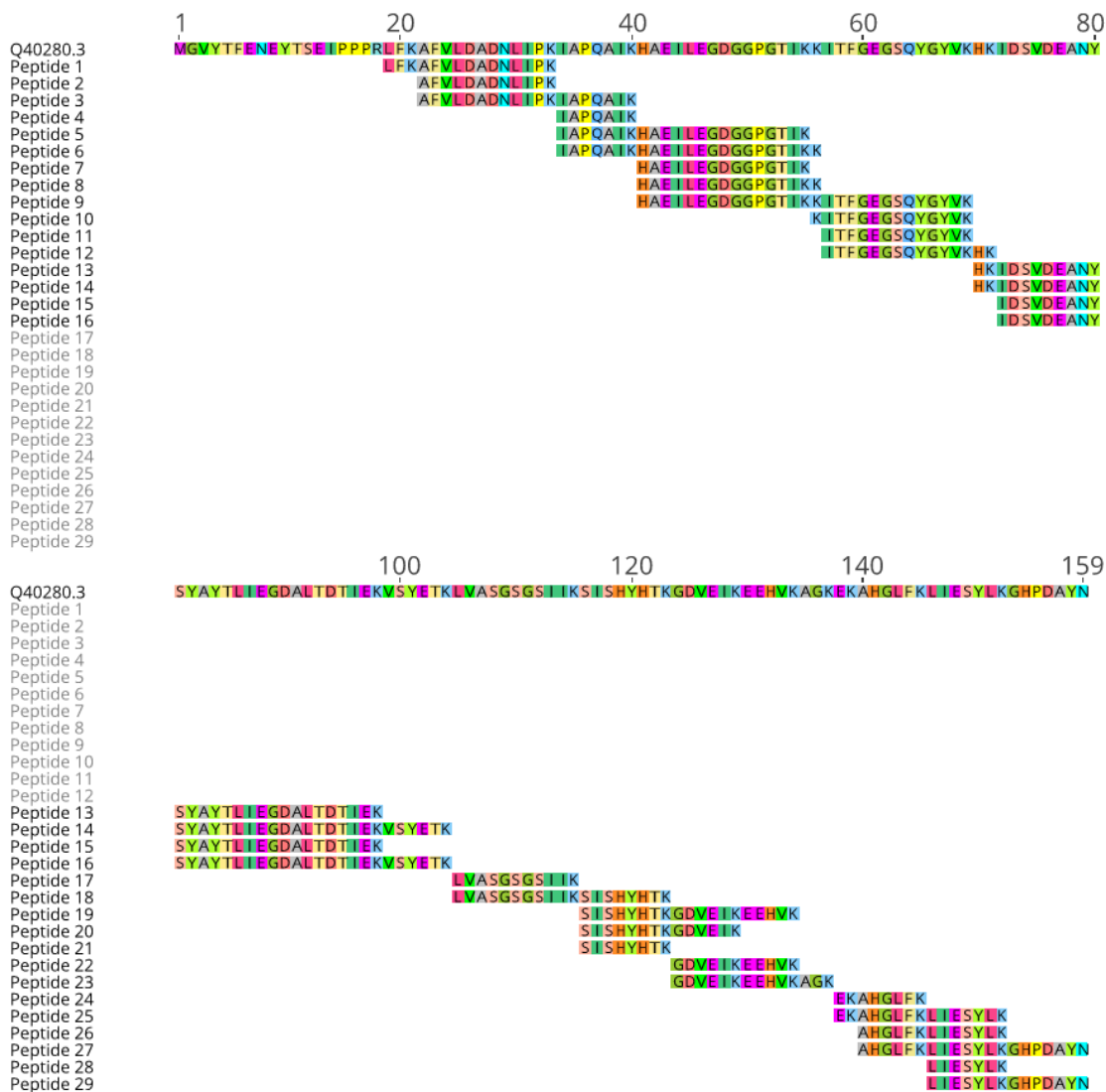


Abbildung 47 Alignment der Mal d 1.02 Isoform Q40280.3 und den detektierten unspezifischen Peptiden, die möglicherweise aus Q40280.3 entstanden sind (Geneious Prime (v. 2021.1.1) (<https://www.geneious.com>)) (Chebib et al. 2022).

Auch für das Bet v 1-homologe Protein Pru av 1, das Hauptallergen der Kirsche, wurde die glycinreiche Region als B-Zell-Epitop beschrieben (Neudecker et al. 2003). In dieser Arbeit wurden mehrere Peptide identifiziert, wie TVEILEGDGSVGTIK (AS 40-55), TVEILEGDGSVGTIKK (AS 40-56) und GIEILEGNNGVGTIK (AS 40-55), die das Strukturmotiv mit der Schlüsselaminosäure Glu-45 enthielten. In einer vorangegangenen Studie wurden bereits ähnliche Peptide detektiert (Romer et al. 2020). Allerdings konnten Holm et al. (2001) keine Bindung von BV16 an zwei Mal d 1-Isoformen nachweisen, obwohl beide Isoformen den konservierten Glu-45-Rest enthielten.

Weitere Aminosäurereste sind für die Bildung von Epitopen und der damit einhergehenden IgE-Reaktivität wichtig. Eine gezielte Veränderung von Epitopen z.B. durch einen Austausch bestimmter Aminosäuren kann die IgE-Bindung modifizieren. Eine ortsspezifische Mutagenese ergab, dass die Aminosäurereste Thr-10, Thr-57, Ser-111 und Thr-112 entscheidend für die IgE-Reaktivität sind (Son et al. 1999; Ma et al. 2006). Die genannten Aminosäurereste wurden in einigen Isoformen, die in dieser Arbeit über spezifische Peptide identifiziert wurden, nachgewiesen (Tabelle 24). Dabei besitzen die Isoformen AEF38456.1, AEF38460.1 und CAD32318.1 drei von den vier entscheidenden Aminosäureresten (Thr-10, Thr-57 und Ser-11). Die Aminosäurereste Ser-111 und Thr-10 charakterisieren die Mal d 1-Isoformen AAX21002.1 und AAX21008.1, die in allergenen Genotypen dominieren (Tabelle 19). Auch die Isoformen CBL94138.1, CBL94173.1, XP_008340764.1 und XP_008368351.1 besitzen die wichtigen Aminosäurereste Ser-111 und Thr-10. Die Detektion von unspezifischen Peptiden zeigt, dass mindestens einer der genannten Isoformen in schlecht vertragenen Genotypen stark angereichert ist (Abbildung 42). Im Gegensatz dazu dominieren in Genotypen mit einem niedrigen allergenen Potential die Isoformen CBL94148.1 und XP_008346874.1, die keine der genannten Aminosäurereste enthalten (Tabelle 20, Tabelle 21). Zudem zeigen diese Isoformen lediglich eine 33-34 %ige Sequenzhomologie zu Bet v 1. Damit ist das Auftreten von gemeinsamen IgE-Epitopen unwahrscheinlich und kann eine gute Verträglichkeit von Genotypen erklären, die diese Isoformen akkumulieren.

Neben der Erzeugung von Allergenmutanten stellt auch die Oligomerisierung von Allergenen einen natürlichen Mechanismus zur Maskierung des allergenen Potentials von Isoformen dar (Pagliarani et al. 2012). Im Gegensatz zu Bet v 1.01 neigt Bet v 1.04 durch ein Cystein an Position 113 zur Bildung von Proteinaggregaten (z.B. über intermolekulare Disulfidbindungen), die eine Art immunologische Schutzfunktion generieren (Zaborsky et al. 2010). Ähnliche Eigenschaften können auch den Mal d 1.11 Isoformen und der Isoform AAX21000.1 zugeschrieben werden, da diese in einer ähnlichen Position einen Cystein-Rest aufweisen (Pagliarani et al. 2012). Die Isoform AAX21000.1 weist mit 56% eine vergleichbar hohe Sequenzhomologie zu Bet v 1 auf, obgleich die Aminosäuresequenz keine der genannten für die IgE-Erkennung wichtigen Aminosäurereste (Tabelle 24) enthält. Daher ist AAX21000.1 möglicherweise mit einem niedrigen allergenen Potential verbunden.

Des Weiteren könnte es sich auch bei dem Protein CBL94177.1 um eine hypoallergene Isoform handeln, da mehrere negative Korrelationen zwischen den CBL94177.1 assoziierten Peptiden und dem Allergehalt, sowie den mittleren Symptomwerten gefunden wurden (Abbildung

44, Abbildung 45). Weiterhin identifizierten Romer et al. (2020) die Isoform CBL94177.1 in der gut verträglichen Sorte SAN.

Trotz der möglichen hypoallergenen Eigenschaften von Mal d 1.08 und Mal d 1.11 muss beachtet werden, dass die individuellen Schwellenwerte von allergischen Individuen variieren. Damit können Isoformen, die für einige Allergiker hypoallergen sind, für andere dennoch von immunologischer Relevanz sein (Schenk et al. 2008).

Tabelle 24 Analyse von wichtigen Aminosäuren für die B-Zell-Epitop Formatierung in den identifizierten Mal d 1 Isoformen (Chebib et al. 2022).

Protein/ NCBI Eintrag	Thr-10 ¹	Glu-45 ²	Thr-57 ¹	Ser-111 ³	Thr-112 ¹
CAD32318.1	+	+	+	+	-
AEF38456.1	+	+	+	+	-
AEF38460.1	+	+	+	+	-
XP_008377426.1	+	+	-	+	-
AAX21000.1	-	-	-	-	-
AAX21003.1	+	+	-	+	-
AAX21002.1	+	+	-	+	-
AAX21008.1	+	+	-	+	-
CBL94173.1	+	+	-	+	-
AAX21007.1	+	+	-	+	-
AAX20991.1	-	+	-	+	-
AAX18308.1	+	+	-	+	-
CBL94174.1	+	+	-	+	-
AAX20992.1	+	+	-	+	-
CBL94177.1	+	+	-	+	-
CBL94148.1	-	-	-	-	-
XP_008351173.1	-	+	-	+	-
XP_008390601.1	-	+	-	+	-
XP_008377311.1	-	+	-	+	-
AAS00045.1	-	+	-	+	-
XP_008346874.1	-	-	-	-	-

¹ Ma et al. (2006)

² Spangfort et al. (2003)

³ Son et al. (1999)

In vorangegangenen Studien wurde Mal d 1.06A als wichtige Determinante für die immunologische Reaktion bestimmt (Gao et al. 2008; Paris et al. 2017). Gao et al. (2008) untersuchten den Zusammenhang zwischen der Alleldiversität von Mal d 1 und der Allergenität. Die Ergebnisse zeigten, dass das Allel Mal d 1.06A01 einzeln oder zusammen mit dem Allel Mal d 1.06A03 in hyperallergenen Sorten wie GD vorhanden war, während das Allel Mal d 1.06A02 ausschließlich in der gut verträglichen Sorte SAN nachgewiesen wurde. Auch moderat vertragene Sorten wie Prima und Fuji enthielten die vermeintlich allergenen Allele Mal d 1.06A01 und Mal d 1.06A03.

Erst kürzlich wurde über eine signifikant positive Korrelation zwischen dem Allel Mal d 1.06A01 und der Immunreaktivität von Patientenseren berichtet (Siekierzynska et al. 2021).

Zusätzlich ermittelten Siekierzynska et al. (2021) eine positive Korrelation zwischen der Expression von Mal d 1.06A01 und dem Mal d 1 Proteingehalt. Die drei Varianten von Mal d 1.06A unterscheiden sich jeweils in einer hydrophoben Aminosäure 13 V/I und 135 V/A (Gao et al. 2008). Die Aminosäure 13 V/I ist in dem Schleifenbereich von dem Strang β_1 und der Helix α_1 umgeben, während 135 V/A in der Helix α_3 lokalisiert ist. Diese Unterschiede beeinflussen möglicherweise die Epitopkonformation. Die Isoform AAS00045.1, die zur Gruppe der Mal d 1.06-Proteine gehört, war in der schlecht verträglichen Sorte GD (2018) stark angereichert (Tabelle 19). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Romer et al. (2020) und zeigt, dass die Akkumulation von Isoformen innerhalb einer Apfelsorte über verschiedene Erntejahre hinweg stabil sein kann. Die Isoform AAS00045.1 stammt zwar nicht von dem Allel Mal d 1.06A01, besitzt jedoch wie die Isoformen von Mal d 1.06A01 einen Valinrest an Position 13 und 135, der möglicherweise für die Epitopkonformation entscheidend ist (Gao et al. 2008). In dieser Arbeit akkumulierten auch einige gut verträgliche Genotypen die Isoform AAS00045.1 (Tabelle 20, Tabelle 21). Generell muss beachtet werden, dass das Auftreten von allergischen Reaktionen in gewissem Maße auch von dem Expressionsniveau der einzelnen Isoformen im Genotyp abhängig ist. Der Gesamtallergengehalt ist dabei als Beurteilungsgrundlage nicht ausreichend, da sich dieser aus den Konzentrationen verschiedener Mal d 1 Isoformen zusammensetzt.

Jahn-Schmid et al. (2005) identifizierten zwei T-Zell-Epitope von Bet v 1, die zwischen den AS 112-123 und 142-156 lokalisiert sind. Die T-Zell aktivierende Region Bet v 1₁₁₂₋₁₂₃ wurde von 40 % der Probanden erkannt, während 61 % der Patienten auf das Epitop Bet v 1₁₄₂₋₁₅₆ reagierten (Jahn-Schmid et al. 2005). Letzteres gilt daher als Haupt-T-Zell-Epitop. Für das Epitop in der Region 142-156 wurde außerdem eine Aktivierung von T-Lymphozyten festgestellt, die eine Zytokinausschüttung induzieren (IL-4, IL-5). Weiterhin wurden Kreuzreaktionen von Bet v 1₁₄₂₋₁₅₆ reaktiven T-Zell-Linien mit Mal d 1₁₄₁₋₁₅₅ festgestellt. Dabei induzierte Mal d 1₁₄₁₋₁₅₅ eine Proliferation in 30 % der getesteten T-Zell-Linien (Jahn-Schmid et al. 2005). In einer ähnlichen Region wurde für das Peptid LFKLIESYLKDHPDAYN, das sich in der Region zwischen den AS 142-158 in Mal d 1 befindet, eine T-Zell-Aktivierung festgestellt (Geroldinger-Simic et al. 2013). In dieser Arbeit wurden zwei ähnliche Peptide detektiert (AHGLFKLIESYLKDHPDAYN (AS 140-159) und LIESYLKDHPDAYN (AS 146-159)), die innerhalb der berichteten Region lokalisiert sind und für mehrere Proteine von Mal d 1.01 spezifisch sind. Das Peptid LIESYLKDHPDAYN war mit „fold changes“ > 10 in drei allergenen Genotypen des Erntejahres 2017 (p211, p36, p167) und mit einem „fold change“ von 2,82 in p36 im Jahr 2018 in hohem Maß angereichert (Tabelle 19).

Geroldinger-Simic et al. (2013) identifizierten den Sequenzabschnitt QAEILEGNGGPG (AS 40-51), der sich innerhalb der hochkonservierten glycinreichen Schleifenregion befindet, als T-Zell-Epitop von Mal d 1 (Geroldinger-Simic et al. 2013). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten zwei ähnliche Peptide (Tabelle 19), die sich nur in der Peptidlänge von dem berichteten unterscheiden und der Gruppe von Mal d 1.01-Proteine zugeordnet werden können. Diese Peptide wurden in den schlecht verträglichen Genotypen p211 (2017), p29 (2017) und p36 (2018) stark angereichert (Tabelle 19). Weiterhin sind diese Peptide mit sequenziellen B-Zell-Epitop-Eigenschaften gemäß einem Epitop-Vorhersage-Programm (<http://tools.iedb.org/bcell/>) assoziiert (Abbildung 48) (Jespersen et al. 2017). Daneben wurde ein B-Zell-Epitop von Bet v 1 beschrieben, dass die Sequenz NIEGNGGPGTIKK in der Region 44-56 abdeckt (Zhang et al. 2018) und eine ~90%-ige Sequenzidentität mit den hier detektierten Mal d 1-Peptiden (AS 41-55/56 QAEILEGNGGPGTIK/K) zeigt (www.iedb.org, Organismus: *Betula verrucosa*). Es ist wahrscheinlich, dass Isoformen, die diese Peptidsequenzen in der entsprechenden Region enthalten, mit einem höheren allergenen Potenzial in Verbindung gebracht werden können. Dennoch muss berücksichtigt werden, dass T-Zell-Epitope in der Regel Patient-spezifisch variieren und vom menschlichen Leukozytenantigenensystem abhängig sind (Uehara et al. 2001).

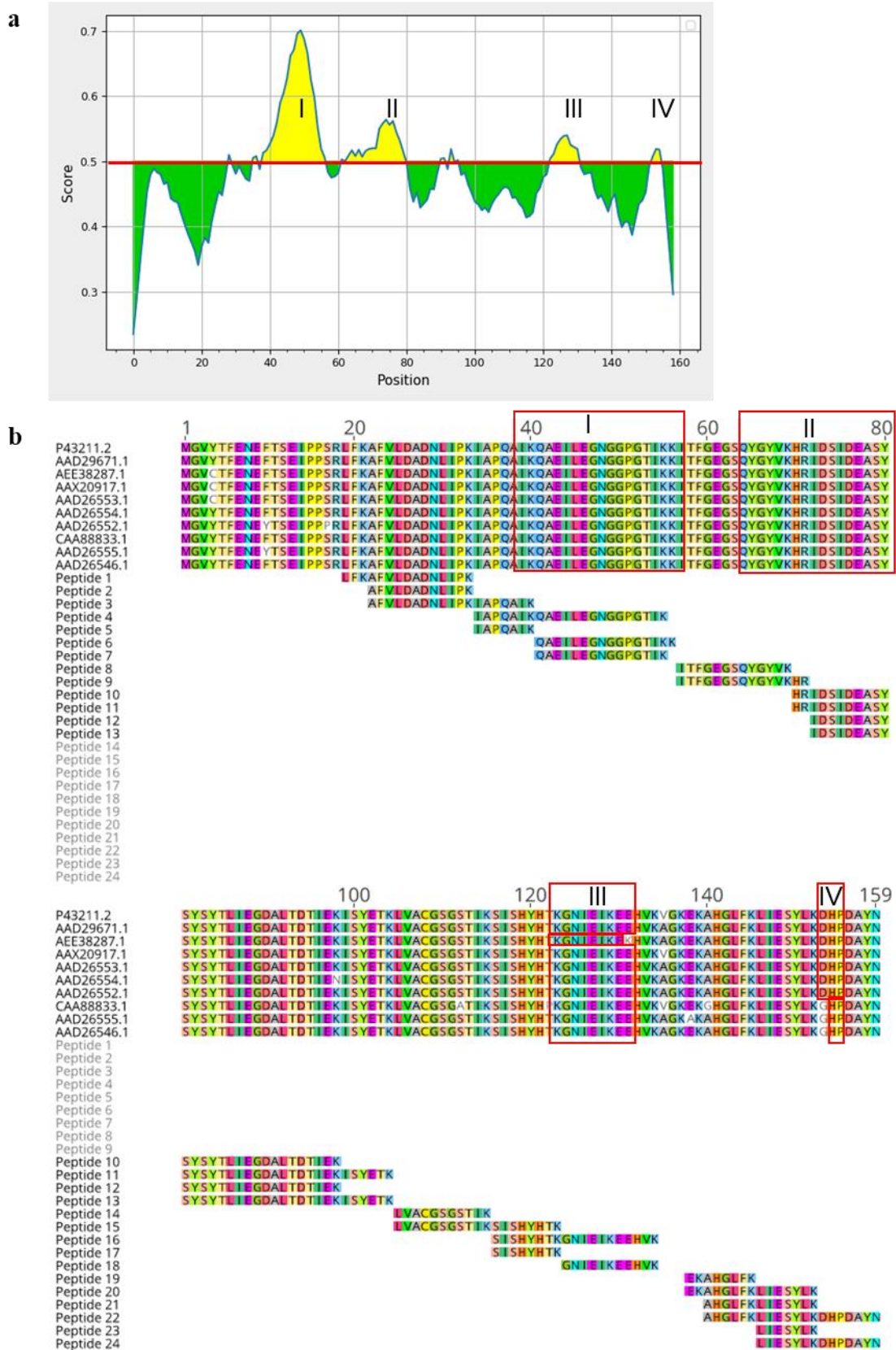


Abbildung 48 Vorhergesagte Epitope der Isoform AAD29671.1 aus der Gruppe der Mal d 1.01-Proteine. Gelbe Regionen im Diagramm entsprechen den vorhergesagten Epitopen gemäß [iedb.org](http://tools.iedb.org/bcell/) (<http://tools.iedb.org/bcell/>). Der Schwellenwert von 0,5 ist mit einer roten Linie hervorgehoben (a). Alignment der Aminosäuresequenzen von Mal d 1.01-Proteinen und den identifizierten Peptiden mittels LC-MS/MS (Geneious Prime (v. 2021.1.1) (<https://www.geneious.com>)) (b). Vorhergesagte Epitope (I-IV) aus (a) sind rot markiert (b) (Chebib et al. 2022).

4.7.3. Die Apfelallergene Mal d 2, Mal d 3 und Mal d 4

In dieser Arbeit wurden neben Mal d 1 auch die Allergene Mal d 2, Mal d 3 und Mal d 4 identifiziert. Bisher ist die klinische Relevanz von Mal d 2, Mal d 3 und Mal d 4 noch nicht vollständig untersucht.

Mal d 2 wurde von fünf unspezifischen Peptiden nachgewiesen, die in einer Gruppe von zwei Thaumatin-ähnlichen Proteinen (ASC36740.1, NP_001315714.1) vorkommen (Tabelle 19, Tabelle 20, Tabelle 21). Das Protein NP_001315714.1 wurde bereits in einer früheren Studie identifiziert (Guarino et al. 2007). Weiterhin wurde berichtet, dass der Einfluss von Mal d 2 auf die Allergenität einer Sorte im Vergleich zu anderen Allergenen gering ist (Fernández-Rivas et al. 2006). Mehrere Studien berichteten, dass Mal d 2 eine Rolle in der Pathogenabwehr der Pflanze einnimmt (Ibeas et al. 2000; Venisse et al. 2002; Han et al. 2004; Velazhahan und Muthukrishnan 2003). Die Primärstruktur von Thaumatin-ähnlichen Proteinen zeichnet sich durch zahlreiche konservierte Cysteine aus, die in der Lage sind Disulfidbindungen auszubilden und daher gegenüber Hitze und Proteasen resistent sind (Breiteneder 2004). In dem Protein NP_001315714.1 sind drei Cysteine enthalten, während in AAC36740.1 sechzehn Cysteine vorhanden sind. Rückfaltungsstudien von Mal d 2 führten zu der Annahme, dass IgE-bindende Epitope größtenteils im Inneren des Proteins lokalisiert sind. Eine Erkennung der IgE-bindenden Epitope von IgE-Antikörpern ist daher unwahrscheinlich (Marzban et al. 2009).

Bei Mal d 3, handelt es sich um ein unspezifisches Lipidtransferprotein (nLTP), dessen Anreicherung durch verschiedene Umweltbedingungen initiiert wird. In der Regel nimmt die Mal d 3-Konzentration in Äpfeln mit dem Reifegrad zu und ist von der Lagerungsart und -dauer abhängig (Sancho et al. 2006b). Die nLTPs sind an der Lipidmembransynthese beteiligt und sind zudem als PR-14-Proteine in der Pathogenabwehr von Pflanzen involviert (Egger et al. 2010; Salcedo et al. 2004). Allergien gegen Mal d 3 sind überwiegend im Mittelmeerraum Südeuropas angesiedelt (Bartra et al. 2016). Die prozentuale Sequenzidentität von Mal d 3 mit weiteren pflanzlichen nLTPs, wie Fra a 3 in Erdbeeren, Api g 2 in Sellerie, Prud du 3 in Mandeln oder Pyr c 4 in Birnen beträgt zwischen 40 und 55 % (Bernardi et al. 2011). Konformationelle IgE-Epitope sind in der Tertiärstruktur konserviert, weshalb eine Kreuzreaktivität zwischen nLTPs unterschiedlicher Pflanzenarten prävalent ist (Scheurer et al. 2021). Verschiedene vorgeschlagene B-Zell-Epitope aus anderen nLTPs, wie TSTN (AS 107-110) in Erdnüssen, TTPDRQA (AS 64-70) in Pfirsich und LPGKC (AS 93-97) in Linsen, sind auch in den Mal d 3 Proteinen zu finden (Mishra und Kumar 2021). In dieser Arbeit wurden die Mal d 3 Proteine AAT80665.1 und ABB96482.1 identifiziert. Darüber hinaus wurden viele

unspezifische Mal d 3-assoziierten Peptide nachgewiesen. Das Protein AAT80665.1 enthält alle drei genannten B-Zell-Epitope, während ABB96482.1 lediglich die sequenziellen Epitope TSTN (AS 107-110) und LPGKC (AS 93-97) in seiner Primärstruktur aufweist. Die Tertiärstruktur von nLTPs wird durch Disulfidbrücken stabilisiert und macht sie gegen proteolytischen oder thermischen Abbau widerstandsfähig, wodurch sie in nativer IgE-aktiven Form zytotoxische Effektorzellen aktivieren können. Generell muss beachtet werden, dass Birkenpollenallergiker mit einem oralen Allergiesyndrom weniger von einer gegen Mal d 3 gerichteten Allergie betroffen sind. Fernández-Rivas et al. (2006) berichteten, dass Patienten, die gegen Bet v 1 sensibilisiert sind, ein 3,5-fach geringeres Risiko für eine IgE-vermittelte Reaktion auf Mal d 3 aufweisen.

Ein weiteres identifiziertes Allergen ist das Profilin Mal d 4, ein zytosolisches G-Aktin-bindendes Protein, das neben der Aktivierung und Polymerisation des Aktins an intrazellulären Transportprozessen beteiligt ist und eine Schlüsselrolle bei der Zellverlängerung und der Aufrechterhaltung der Zellform einnimmt (Ramachandran et al. 2000; Witke 2004; Carlsson et al. 1977). Die Vertreter von pflanzlichen Profilinen weisen einen hohen Grad an Sequenzidentität auf und begünstigen damit Kreuzreaktionen zwischen Profilinen aus verschiedenen Pflanzenarten (Tabelle 17). Mal d 4 kann mit Bet v 2-spezifischen IgE-Antikörpern kreuzreagieren und allergische Symptome auslösen (Valenta et al. 1991). Vorangegangene Studien berichteten, dass mögliche Epitope von Profilinen mit Ligandenbindungsstellen überlappen (Asturias et al. 2002; Fedorov et al. 1997). Zwei IgE-reaktive Epitope wurden identifiziert, die in der N- und C-terminalen Helix lokalisiert sind und sich mit Bindungsstellen für prolinreiche Liganden bzw. Aktin überschneiden. Sterische Hinderungen schließen eine gleichzeitige Bindung von Liganden und IgE-Antikörpern aus. Dies zeigt, dass das native Profilin in freier und ungebundener Form für die Sensibilisierung und anschließende allergische Reaktion verantwortlich ist. Fedorov et al. (1997) berichteten über ein weiteres Epitop, welches zwischen den Aminosäuren 30 und 50 lokalisiert ist. Daneben wurde ein Konformationsepitop mit der Aminosäurekomposition $S_2W_3A_5Y_6D_9H_{10}T_{11}P_{112}G_{113}Q_{114}N_{116}M_{117}R_{121}L_{122}$ für das Profilin Cuc m 2 in Melone beschrieben (Tordesillas et al. 2010). Dabei reagierten gegen Cuc m 2 sensibilisierte Patienten auch auf das Birkenpollenprofilin Bet v 2, da die homologen Reste von Bet v 2 eine nahezu identische Sequenz wie das beschriebene Konformationsepitop aufweisen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Proteine XP_008337609.1 und AAX19856.1 eindeutig identifiziert (Tabelle 18). Diese besitzen ebenfalls das Konformationsepitop aus Cuc m 2, wobei XP_008337609.1 an Position 5 an Stelle eines Alanins ein Threonin enthält. In den schlecht verträglichen

Genotypen von 2017 war das unspezifische Peptid DFDEPGSLAPTGLHLGGTK (AS 53-71) stark angereichert, welches in fünf Mal d 4 Proteinen vorkommt. Diese umfassen auch das Protein AAX19856.1. Alle Proteine enthielten mit 93-100 %ige Übereinstimmung das Konformationsepitop. In der Regel sind die allergischen Symptome als Reaktion auf Mal d 4 mild, da Profiline gegen Hitze und Pepsinverdauung nicht stabil sind (Zuidmeer et al. 2008). Bei einer Kreuzreaktion spielen wichtige Faktoren, wie die Affinität der Antigen-Antikörper-Interaktion und die Spezifität des Antikörpers eine wichtige Rolle (Mishra und Kumar 2021). Die IgE-Bindungsfähigkeit von Profilinen wurde nur bei 10 bis 30 % der gegen Bet v 1 sensibilisierten Patienten beobachtet, was darauf hinweist, dass sie beim Birken-Rosaceae-Frucht-Syndrom eine untergeordnete Rolle spielen (Breiteneder und Radauer 2004). Dies stimmt mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein, da Mal d 4-assoziierte Peptide leicht signifikant positiv mit dem mittleren Symptomwert von Bet v 1- und Mal d 1-sensibilisierten Patienten korrelierten (Abbildung 45).

Das Vorkommen von Mal d 2, Mal d 3 und Mal d 4 kann nicht direkt mit den erhobenen in-vivo Daten in Verbindung gebracht werden, da alle beteiligten Patienten gegen Bet v 1 sensibilisiert und gegen Äpfel allergisch waren. Dies weist darauf hin, dass die allergischen Symptome hauptsächlich auf die IgE-Reaktivität von Mal d 1-Proteinen zurückzuführen sind. Dennoch ist es nicht auszuschließen, dass die Allergene Mal d 2-4 zu der allergischen Reaktion der Patienten in geringen Maßen beigetragen haben.

4.7.4. Grenzen von Proteomik

Die proteomische Untersuchung allergener Proteinisoformen in Äpfeln erwies sich als besondere analytische Herausforderung. Die Identifizierung von Isoformen beruht auf dem Nachweis von spezifischen Peptidsequenzen, die ausschließlich einer Proteinisoform zugeordnet werden können. Jedoch weisen Isoformen eine hohe Sequenzhomologie auf, insbesondere die Isoformen, die von demselben Allel abstammen. Daher ist die Anzahl der möglichen Isoform-spezifischen Peptide oft auf ein oder sehr wenige Peptide pro Proteinisoform beschränkt. Bei der Mehrzahl der detektierten Peptide handelt es sich um unspezifische Sequenzabschnitte, die mit mehreren verschiedenen Proteinen übereinstimmen. Weiterhin kann es bei verschiedenen Schritten der Analytik zu einem Verlust von spezifischen Peptiden kommen, wie etwa bei der Probenvorbereitung (unvollständige Lyse und Solubilisierung der Proteine), dem enzymatischen Verdau, bei der Peptidionisierung oder durch Massenbereichsbeschränkungen (Stastna und van Eyk 2012).

Bei der Probenaufarbeitung wurde Trypsin eingesetzt. Trypsin ist eine Protease mit hoher katalytischer Aktivität, die Peptide mit den basischen Aminosäuren Arginin oder Lysin am C-terminalen Ende der Peptidkette freisetzt und ideal für die kollisionsinduzierte Dissoziation in der Tandem-Massenspektrometrie ist (Kiser et al. 2009; Dupree et al. 2020). Bei Verwendung von Trypsin, besitzen in der Regel 56 % aller generierten Peptide eine Länge von ≤ 6 AS, die zu klein sind um von massenspektrometrischen Verfahren erfasst zu werden (Tsiatsiani und Heck 2015). Darüber hinaus ist es bei der Verwendung von nur einer Protease wie Trypsin oft nicht möglich eine vollständige Proteinsequenzabdeckung zu erreichen, da bestimmte Sequenzbereiche möglicherweise nicht genügend oder zu viele Trypsin-Spaltstellen aufweisen. Werden stattdessen mehrere Enzyme eingesetzt, um die Probe zu verdauen, können durch unterschiedliche Enzymschnittstellen verschiedene Peptide erzeugt werden, wodurch die Wahrscheinlichkeit von Isoform-spezifischen Sequenzen erhöht wird (Stastna und van Eyk 2012).

Darüber hinaus hängt die Identifizierung von Mal d-Peptiden stark von der Qualität des Apfel-Referenzproteoms ab, insbesondere von der Genom-Annotation auf Isoformebene. Die MS-Spektren wurden mit einer FASTA-Datei, die das Apfelreferenzproteom aus bestehenden Proteindatenbanken enthielt, abgeglichen. In verschiedenen Datenbanken kann ein Protein mit identischer Aminosäuresequenz verschiedene Proteinamen und Eintragsnummern haben. Diese Redundanzen erschweren eine eindeutige Proteinidentifizierung und eine einheitliche wissenschaftliche Berichterstattung (Stastna und van Eyk 2012), können aber durch Sequenzvergleiche herausgefiltert werden.

Weiterhin ist zu beachten, dass die durchgeführte statistische Analyse auf Gruppen von Genotypen mit ähnlichen mittleren Symptomwerten aus der Humanstudie basiert. Der Mittelwert der Symptomwerte ergab sich aus den individuellen Patientenempfindungen. Dabei dokumentierten die getesteten Allergiker ihre allergischen Symptome und bewerteten sie in einer entsprechenden Punkteskala. Die beobachteten Symptomwerte für mehrere Genotypen zeigten insgesamt hohe Varianzen zwischen den Patienten (Anhang Abbildung 14). Bei einigen Genotypen könnte dies zu einem Anstieg der mittleren Symptomwerte geführt haben, obwohl diese Genotypen von einem Großteil der Patienten toleriert wurden, wie es z.B. für den Genotyp p211 in den Erntejahren 2017 und 2019 der Fall war. Folglich ist es möglich, dass die Unterteilung der Genotypen anhand von den berichteten Symptomwerten der Patienten, aber auch anhand des mittleren Symptomwertes, mit Fehlern behaftet ist und die Ergebnisse der statistischen Analyse negativ beeinflusst haben.

4.8. Abschließende Schlussfolgerung

Hypoallergene Apfelsorten leisten einen wertvollen Beitrag zum Allergenmanagement und zur Lebensmittelsicherheit. Die Auswahl von gut verträglichen Apfelsorten ist begrenzt und beschränkt sich auf wenige Sorten wie SAN und Elise (Vlieg-Boerstra et al. 2011). Das Züchtungsvorhaben von weiteren hypoallergenen Sorten erforderte eine genaue Untersuchung verschiedener Allergenitätsdeterminanten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der Allergengehalt je nach Genotyp variiert und von verschiedenen Umweltfaktoren wie etwa dem Klima abhängig ist. Weiterhin konnten Polyphenole und insbesondere die Klasse der Flavan-3-ole in Zusammenhang mit Mal d 1 gebracht werden. Diese Beobachtungen bestätigen die Ergebnisse einer vorangegangenen Arbeit (Romer 2021). Die Tatsache, dass außerdem einige Sekundärmetabolite positiv mit dem Gesamtpolyphenolgehalt korrelierten, kann ausgenutzt werden, um gezielt polyphenolreiche Apfelsorten zu züchten.

Durch die Bindung von (+)-Catechin und Quercetin-3-rhamnosid an rekombinantes rMal d 1.02 kann angenommen werden, dass Mal d 1 als Transporteinheit im Flavonoid-Biosyntheseweg beteiligt ist. Ebenso weist die Bildung der GSH/GSSG-Protein-Komplexe auf eine Co-Transport- und Regulationsfunktion des Proteins in der Glutathion-S-Transferase vermittelte Anthocyan-Akkumulation in Äpfeln hin. Diese Ergebnisse dienen als Grundlage für weitere Studien, um das Ligandenbindungsverhalten von natürlichem Mal d 1 und seinen Isoformen zu untersuchen. Weiterhin muss in Folgestudien geklärt werden, ob eine Ligandenbindung die Allergenität des Proteins moduliert.

Die Proteomik-Analysen mittels LC-MS/MS ermöglichten ein schnelles Screening und die relative Quantifizierung von Mal d 1 Isoformen in Äpfeln. Es konnte gezeigt werden, dass Äpfel eine Mischung aus verschiedenen Mal d 1 Isoformen enthalten. Je nach Genotyp waren bis zu 15 Isoformen gleichzeitig akkumuliert. Die Identität und Anzahl von Isoformen sind entscheidend für das allergene Potential einer Apfelsorte, da sich Isoformen in ihrer IgE-Reaktivität unterscheiden. Für die Gruppe von Mal d 1.08 und Mal d 1.11 konnten niedrige IgE-Bindungsaffinitäten postuliert werden, während Mal d 1.01 Isoformen und die Isoformen AAX21002.1 und AAX21008.1 aus der Gruppe von Mal d 1.03 möglicherweise mit einem hohen allergenen Potential assoziiert sind. Diese Isoformen stellen vielversprechende Kandidaten für eine weiterführende Untersuchung ihrer immunologischen Eigenschaften mittels Hautpricktests dar. Die identifizierten Peptidsequenzen können gezielt für die Züchtung

von Apfel-Genotypen mit einem reduzierten allergenen Potential eingesetzt werden, indem die natürliche Variationsbreite für die Selektion ausgenutzt wird.

5. Anhang

5.1. Isolierung von Plasmid-DNA

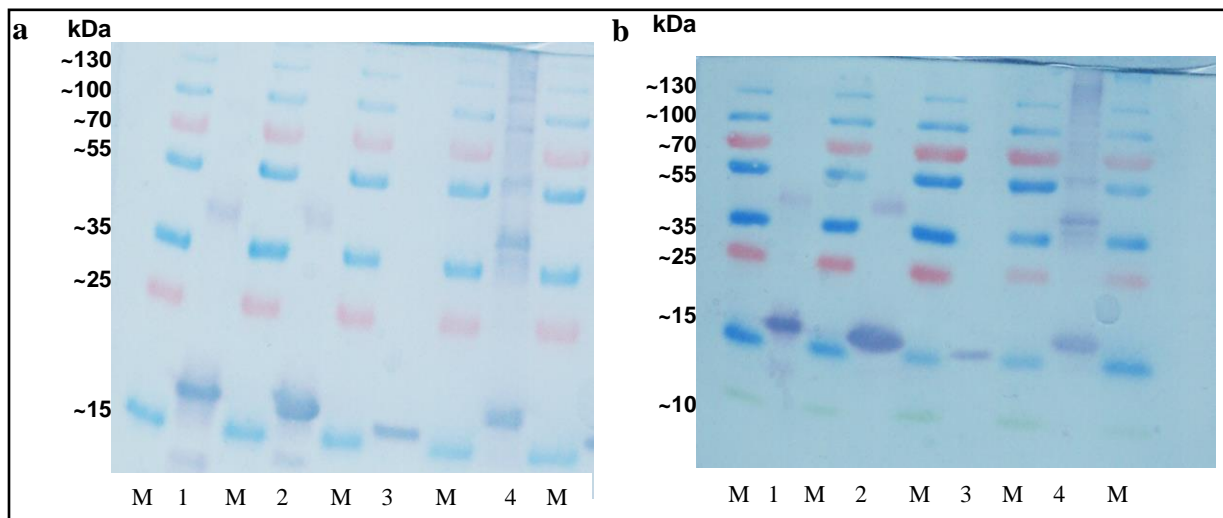
DNA-Sequenz von rMal d 1.02

AATTTATTTGCTTTGTGAGCGGATAACAATTATAATAGATTCAATTGTGAGCGGA
TAACAATTTACACAGAATTCATTAAGAGGAGAAATTAAGCATGCTTGGTGTCT
ACACATTTGAGAACGAGTACACCTCTGAGATTCCACCACCAAGATTGTTCAAGGC
CTTTGTCCTCGATGCTGATAACCTCATCCCCAAGATTGCACCCCAGGCAATCAAG
CACGCTGAGATCCTTGAAGGAGACGGTGGCCCTGGAACCATCAAGAAGATCACT
TTTGGTGAAGGCAGCCAATACGGCTACGTGAAGCACAAAGATCGACTCGGTTGAC
GAGGCAAACACTCATAACGCCTACACTTTGATTGAAGGAGATGCTTTGACAGACA
CCATTGAGAAGGTCTCTTACGAGACCAAGTTGGTGGCATCTGGAAGTGGTTCCAT
CATCAAGAGTATCAGCCACTACCACACCAAGGGTGATGTTGAGATCAAGGAAGA
GCACGTCAAGGCTGGCAAAGAGAAGGCTCATGGTTTGTTC AAGCTTATTGAGAGC
TACCTCAAGGACCACCCCGACGCATAACAACAGATCTCATCACCATCACCATCACT
AAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCCAGTAATGACCTCAGA
ACTCCATCTGGATTTGTT CAGAACGCTCGGTTGCCGCCGGGCGTTTTTTATTGGTG
AGAATCCAAGCTAGCTTGGCGAGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAAATGGAG
AAAAAATCACTGGATATAACCACCGTTGATATATCCCAATGGCATCGTAAAGAAC
ATTTTGAGGCATTT CAGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTCAGCTG
GATATTACGGCCTTTTTAAAGACCGTAAAGAAAATAAGCACAAATTTTATCCGGCC
TTATTCC

Aminosäuresequenz von rMal d 1.02

MLGVYTFENEY TSEIPPPRLFKA FVLDADNLIPKIAPQA IKHAEILEGDGGPGTIKKITF
GEGSQYGYVKHKIDS VDEANYSYAYTLIEGDALTDTIEKVS YETKLVASGSGSIIKSIS
HYHTKGDVEIKEEHVKAGKEKAHGLFKLIESYLKDHPDAYNRSHHHHHH*

5.2. Polyklonaler Antikörper



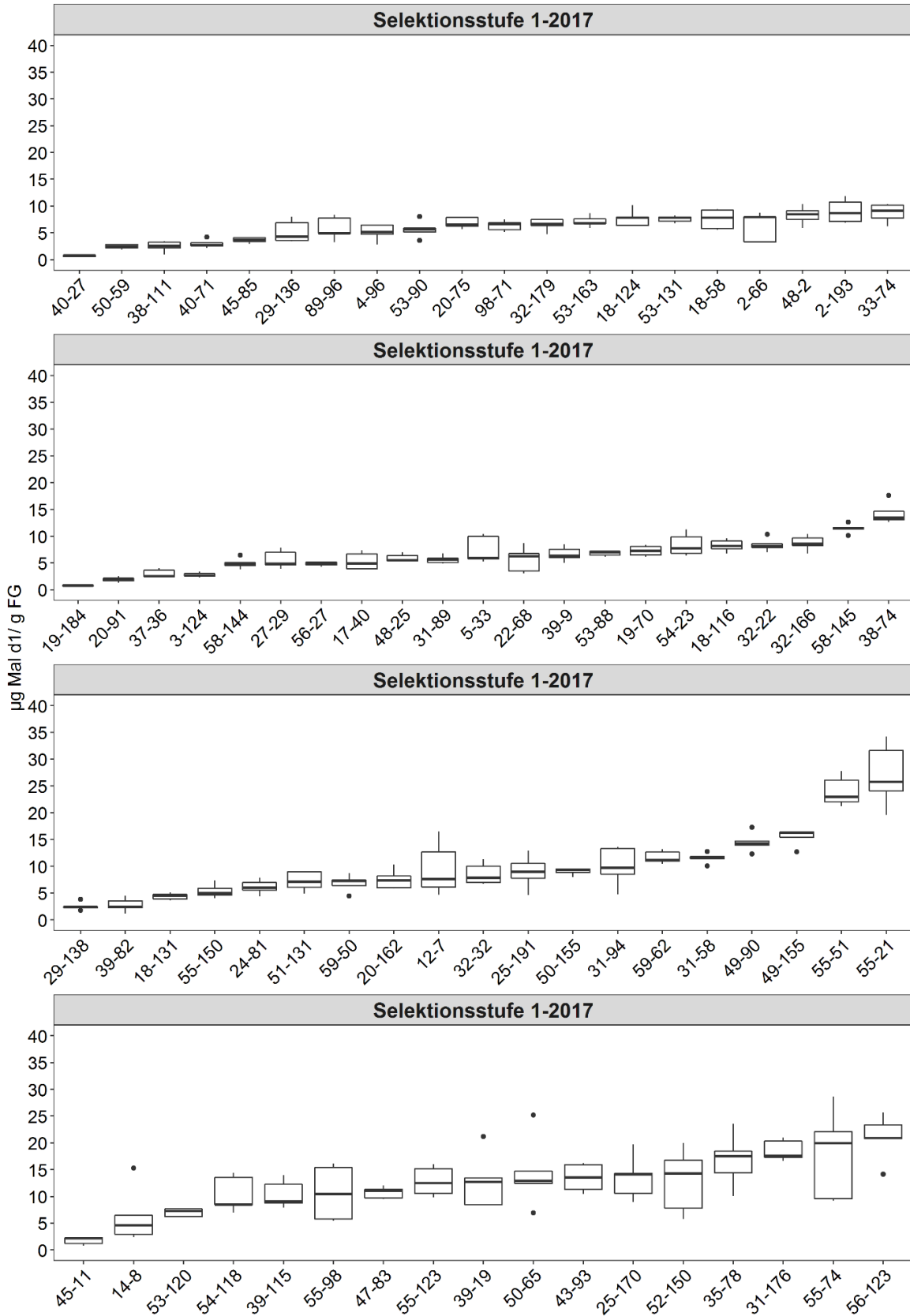
Anhang Abbildung 1 Western Blot Analyse von rMal d 1.02 (1), rBet v 1 (2), rPru d 1 (3) und rFra a 1 (4) unter Verwendung eines gegen Mal d 1 gerichteten Antikörpers mit einer eingesetzten Konzentration von 2,5 µg/mL (Romer et al. 2020) (a) und 5 µg/mL (b). M = Proteinmarker

Anhang Tabelle 1 ELISA Analyse unter Verwendung einer Beschichtungskonzentration von jeweils 0,5 µg/mL rekombinanten rMal d 1.02, rPru d 1, rFra a 1 und rBet v 1. Es wurden zwei verschiedene Konzentrationen des polyklonalen Antikörpers eingesetzt mit $c= 2,5 \mu\text{g/mL}$ und $5 \mu\text{g/mL}$. Die Blindwert-korrigierte Absorption wurde als Mittelwert aus einer Dreifachbestimmung angegeben.

Protein	Absorption* mit	CPolyklonaler	Absorption* mit	CPolyklonaler
	Anikörper= 2,5 µg/mL		Anikörper= 5 µg/mL	
rMal d 1	2,52		2,95	
rPru d 1	2,47		2,92	
rFra a 1	1,58		2,06	
rBet v 1	0,33		0,51	

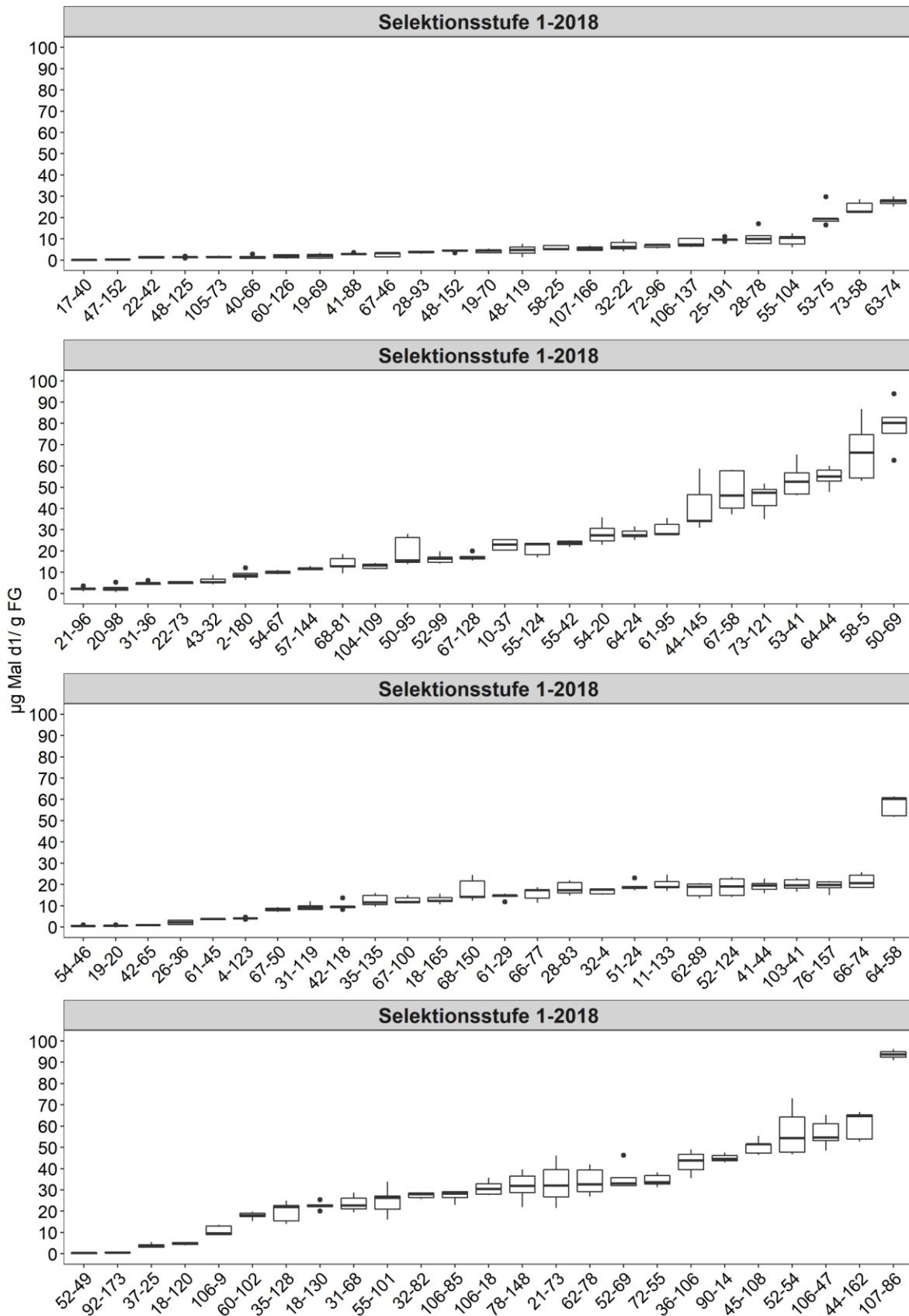
*Blindwert korrigiert 450 nm-620 nm

5.3. Allergengehalte von Genotypen der Selektionsstufe 1

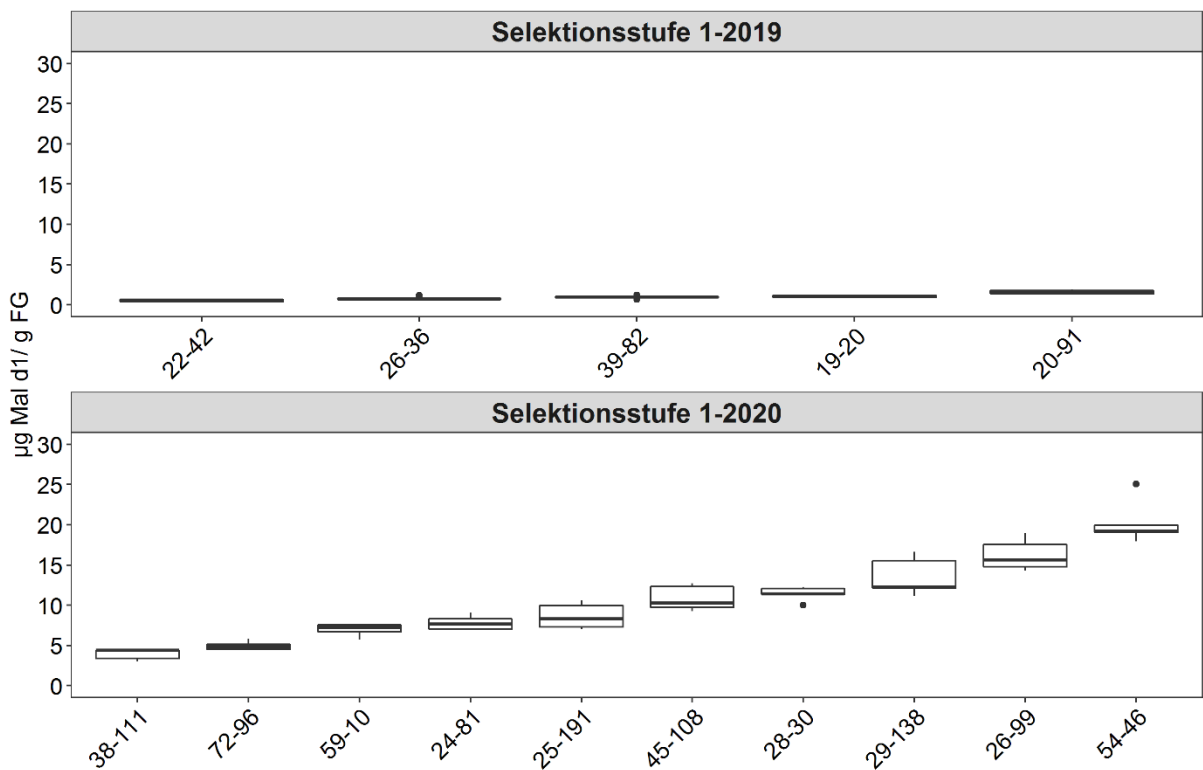


Anhang Abbildung 2 Mal d 1 Gehalte in µg/g FG der Genotypen aus Selektionsstufe 1 aus 2017.

Anhang

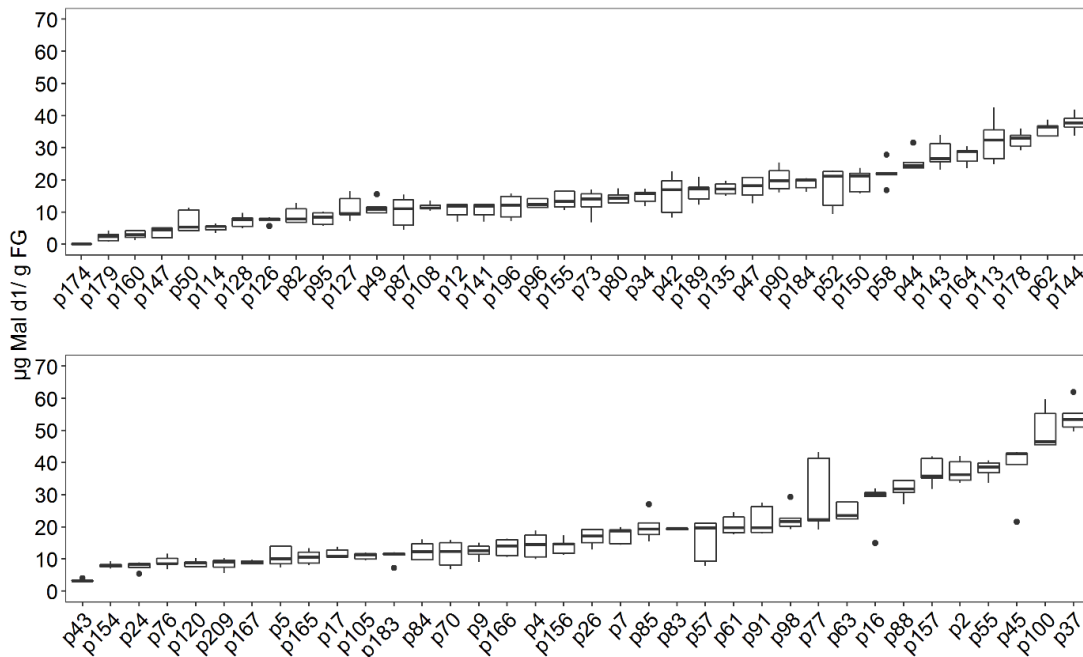


Anhang Abbildung 3 Mal d 1 Gehalte in µg/g FG der Genotypen aus Selektionsstufe 1 aus 2018.



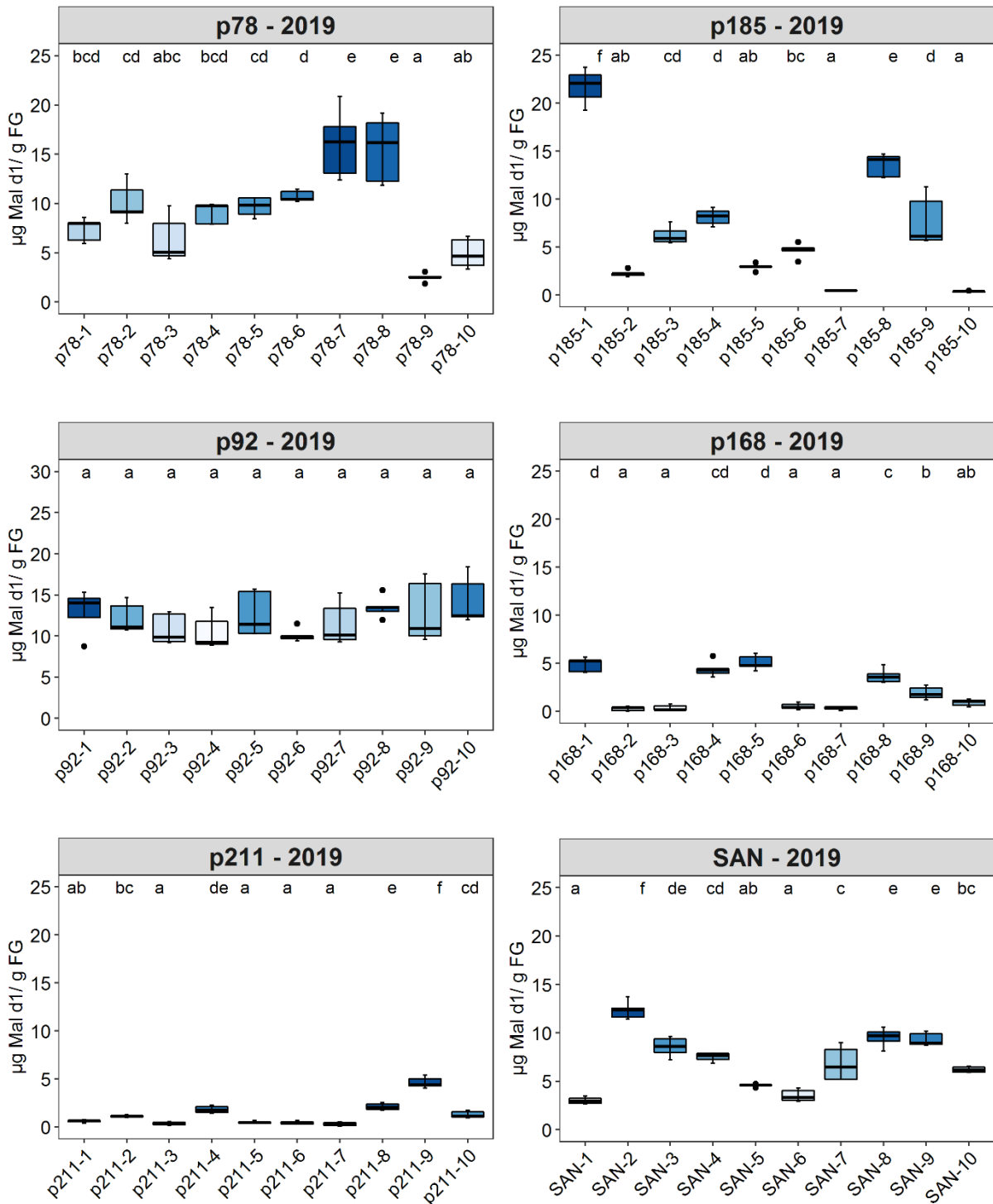
Anhang Abbildung 4 Mal d 1 Gehalte in µg/g FG der Genotypen aus Selektionsstufe 1 aus 2019 und 2020.

5.4. Allergengehalte von Genotypen der Selektionsstufe 2

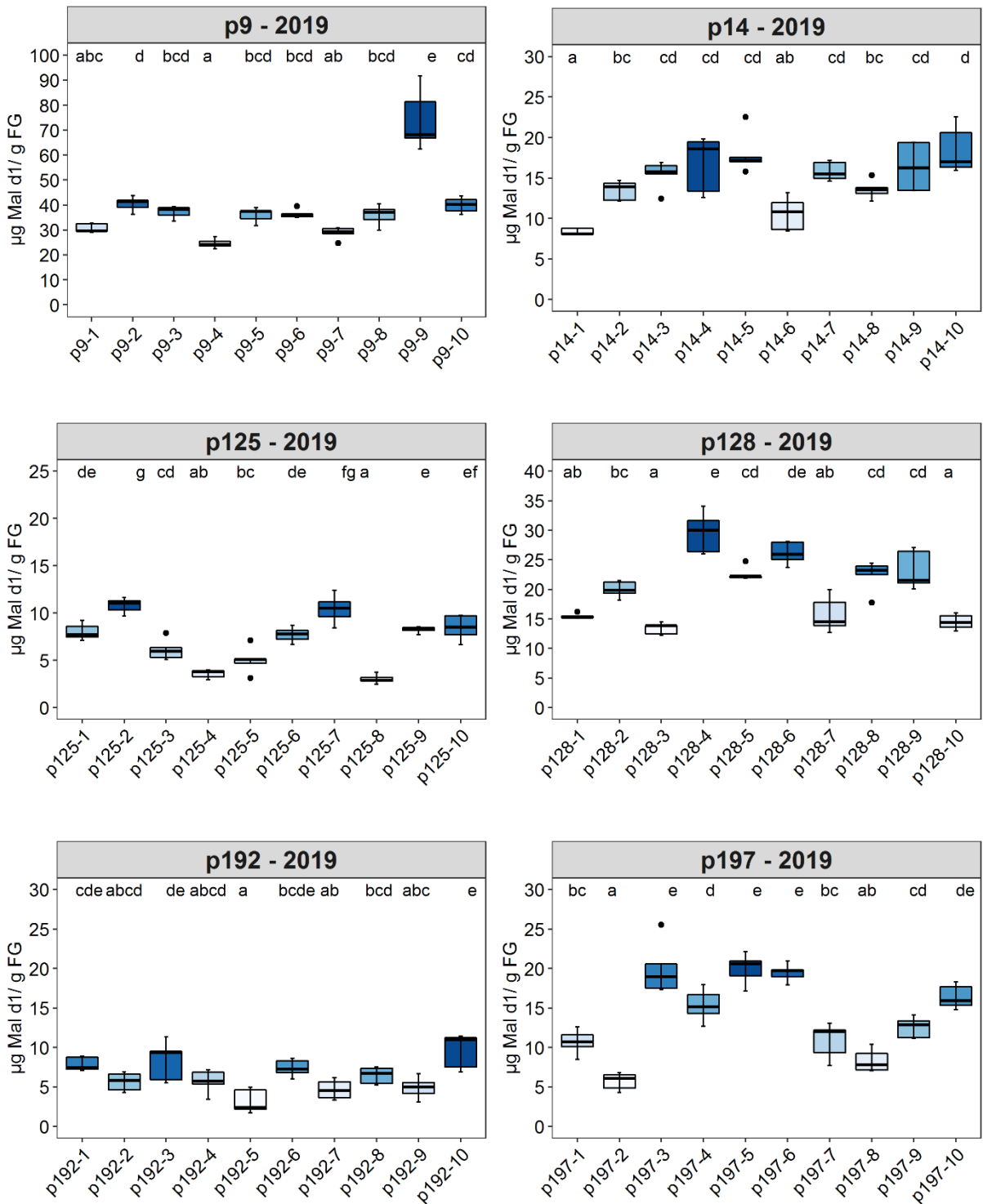


Anhang Abbildung 5 Mal d 1 Gehalte verschiedener Genotypen der Selektionsstufe 2 aus dem Erntejahr 2018. Jede Box setzt sich aus den Bestimmungen von mindestens fünf technischen Replikaten zusammen.

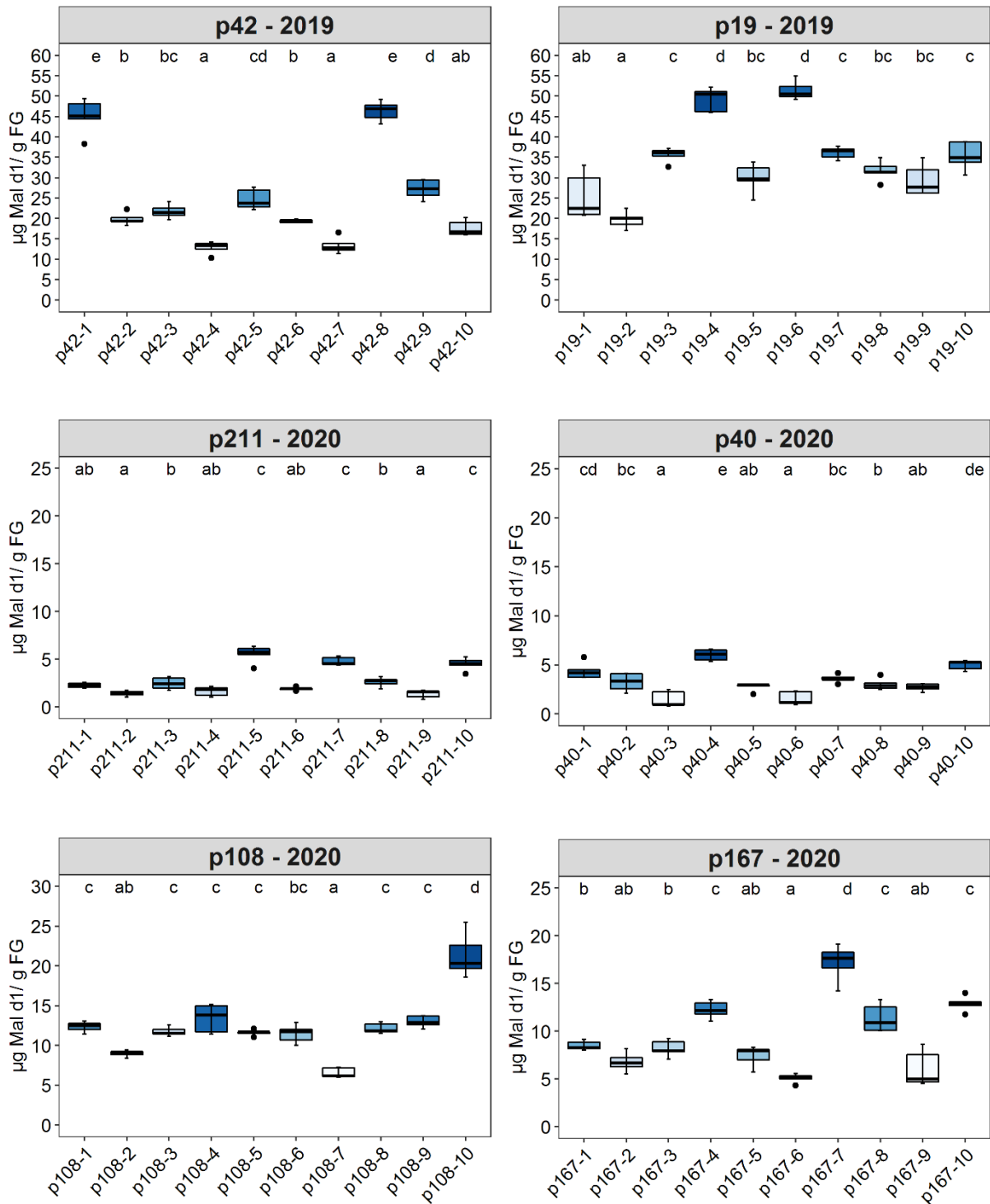
5.5. Intra-Variabilität der Allergengehalte verschiedener Genotypen



Anhang Abbildung 6 Mal d 1 Gehalte von zehn biologischen Replikaten der Genotypen p78, p185, p92, p168, p211 und SAN aus dem Erntejahr 2019. Jede Box setzt sich aus den Bestimmungen von mindestens fünf technischen Replikaten zusammen. Die Boxen sind nach aufsteigendem Median von weiß über hellblau bis dunkelblau gefärbt. Paarweise Vergleiche wurden mit dem Post Hoc Test Tukey-Kramer HSD durchgeführt. Unterschiedliche Buchstaben zeigen einen signifikanten Unterschied mit $p < 0,05$.

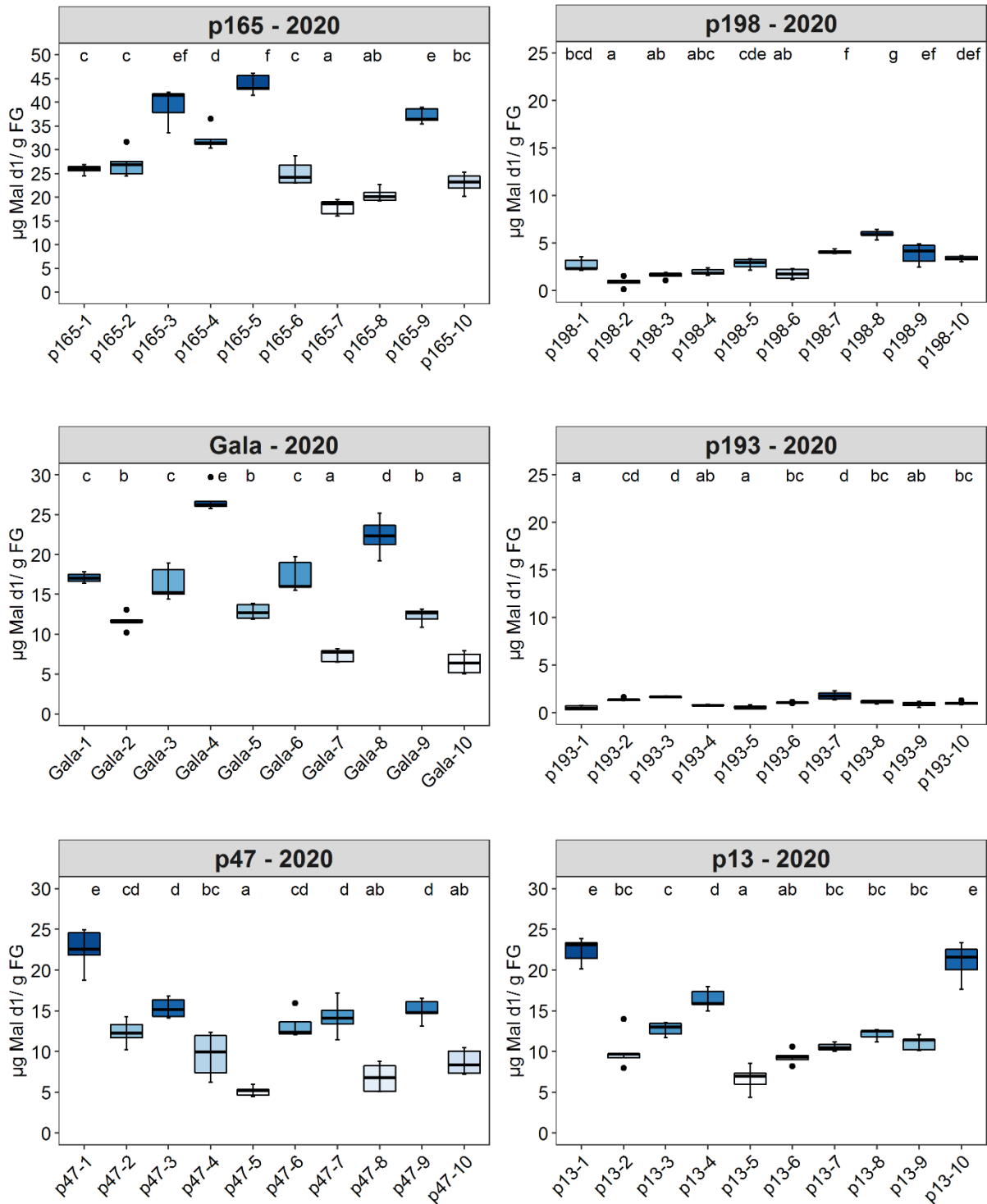


Anhang Abbildung 7 Mal d 1 Gehalte von zehn biologischen Replikaten der Genotypen p9, p14, p125, p128, p192 und p197 aus dem Erntejahr 2019. Jede Box setzt sich aus den Bestimmungen von mindestens fünf technischen Replikaten zusammen. Die Boxen sind nach aufsteigendem Median von weiß über hellblau bis dunkelblau gefärbt. Paarweise Vergleiche wurden mit dem Post Hoc Test Tukey-Kramer HSD durchgeführt. Unterschiedliche Buchstaben zeigen einen signifikanten Unterschied mit $p < 0,05$.



Anhang Abbildung 8 Mal d 1 Gehalte von zehn biologischen Replikaten der Genotypen p42, p19, p211, p40, p108 und p167 aus den Erntejahren 2019 und 2020. Jede Box setzt sich aus den Bestimmungen von mindestens fünf technischen Replikaten zusammen. Die Boxen sind nach aufsteigendem Median von weiß über hellblau bis dunkelblau gefärbt. Paarweise Vergleiche wurden mit dem Post Hoc Test Tukey-Kramer HSD durchgeführt. Unterschiedliche Buchstaben zeigen einen signifikanten Unterschied mit $p < 0,05$.

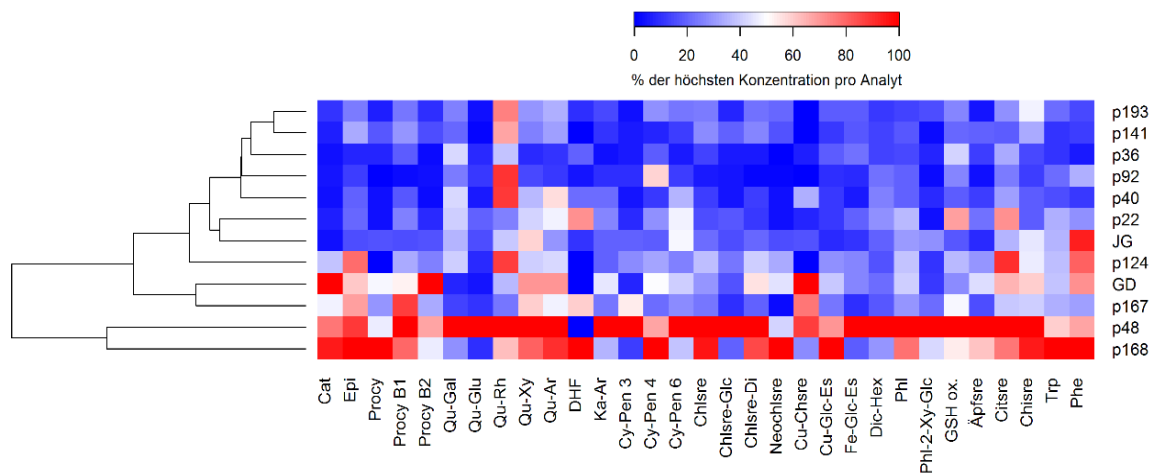
Anhang



Anhang Abbildung 9 Mal d 1 Gehalte von zehn biologischen Replikaten der Genotypen p165, p198, Gala, p193, p47 und p13 aus dem Erntejahr 2020. Jede Box setzt sich aus den Bestimmungen von mindestens fünf technischen Replikaten zusammen. Die Boxen sind nach aufsteigendem Median von weiß über hellblau bis dunkelblau gefärbt. Paarweise Vergleiche wurden mit dem Post Hoc Test Tukey-Kramer HSD durchgeführt. Unterschiedliche Buchstaben zeigen einen signifikanten Unterschied mit $p < 0,05$.

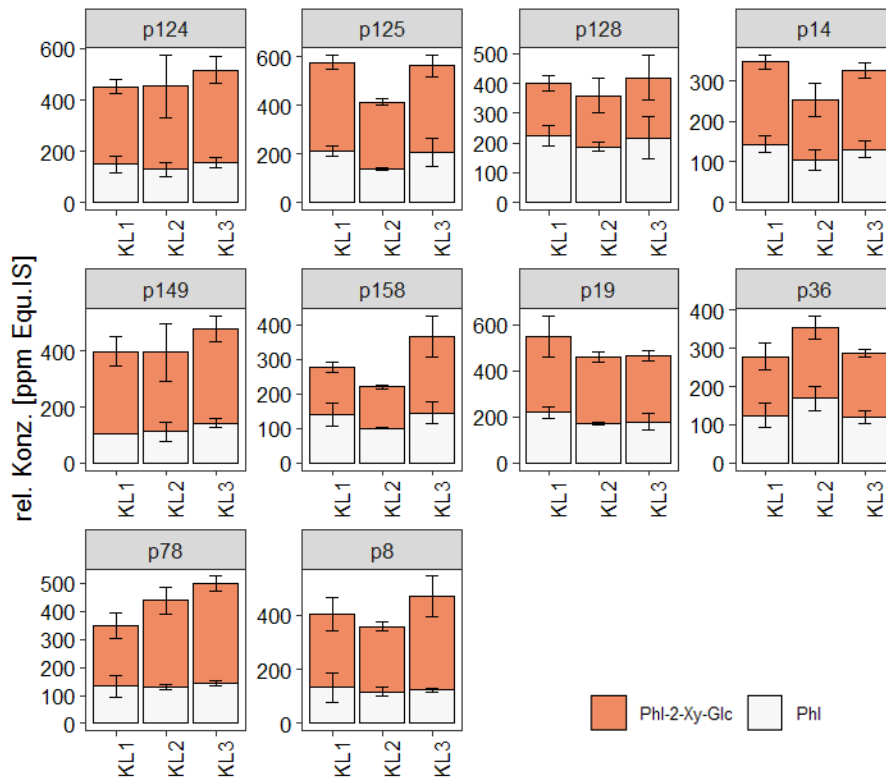
5.6. Metabolit-Profil von Apfelpollen

Zwölf Pollen-Proben verschiedener Genotypen wurden mittels LC-MS auf ihre Polyphenol-Zusammensetzung untersucht. Aufgrund dessen, dass für jede Probe nur geringe Probe-Mengen zur Verfügung standen, wurden je Probe nur etwa 50 mg für die Analyse herangezogen. Dies führte zu hohen Schwankungen zwischen den Replikaten. Alle Proben zeigten ein weites Spektrum an Polyphenolen. Dabei ist besonders auffallend, dass p48 die höchsten Metabolitkonzentrationen, nahezu über alle Substanz-Klassen hinweg, besitzt. Die am stärksten akkumulierte Gruppe ist die der Flavonole. Dabei sticht Qu-Rh mit seinen hohen Gehalten und geringen Konzentrationsschwankungen zwischen den Genotypen, besonders hervor. In der Gruppe der Anthocyane konnten lediglich die Analyten Cy-Pen 3, 4 und 6 nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den Flavonolen fallen hier die Gehalte erwartungsgemäß bis zu 50 % im Durchschnitt geringer aus.

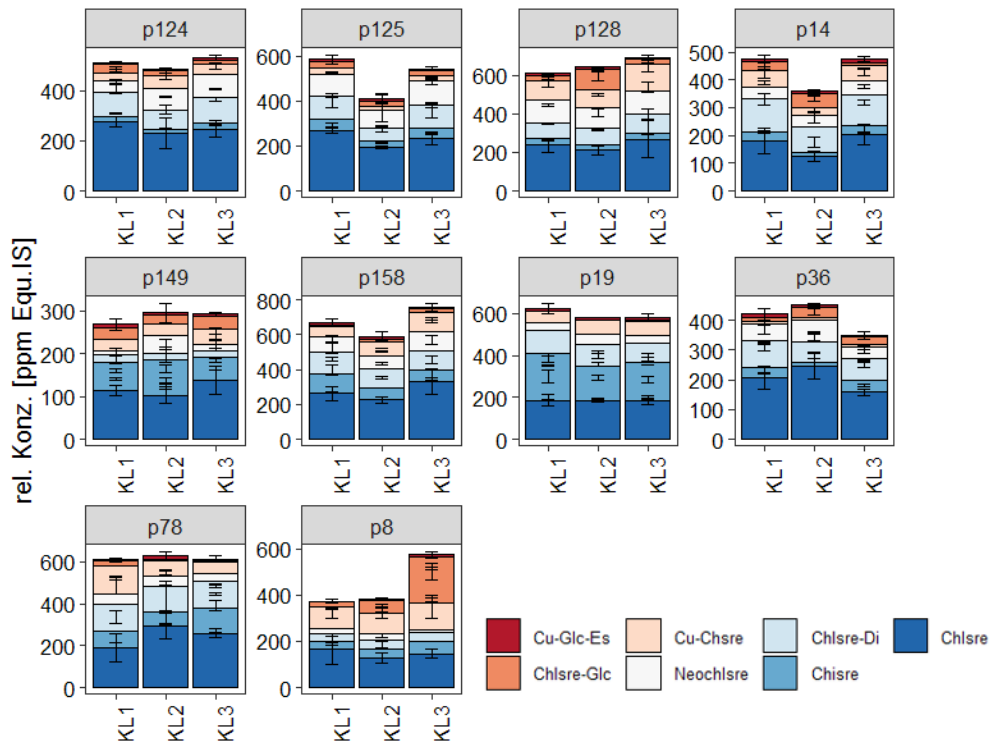


Anhang Abbildung 10 Polyphenol-Zusammensetzung von Pollen. Die Farbskala der Metabolitgehalte umfasst die Werte 0 % (blau) bis 100 % (rot), wobei 100 % der höchsten relativen Konzentration innerhalb eines Metaboliten entspricht. JG= Jonagold

5.7. Stabilität von Polyphenolen während der Lagerung

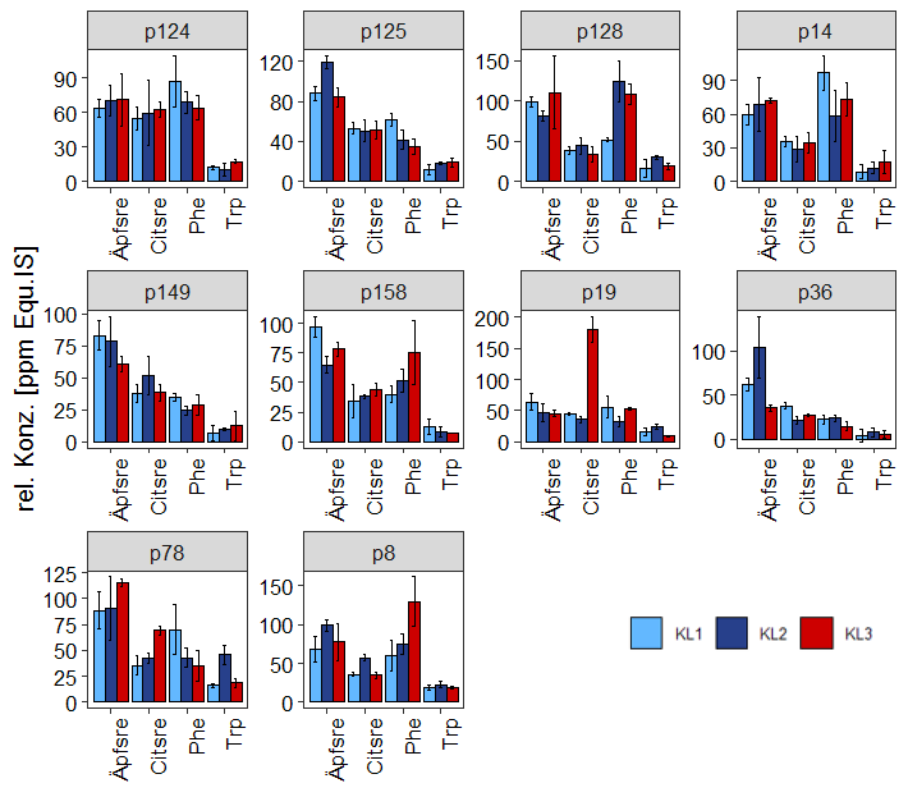


Anhang Abbildung 11 Relative Konzentrationen der DHC über drei Auslagerungszeitpunkte unter Kühllagerungsbedingungen (KL1-3) in 10 verschiedenen Genotypen.



Anhang Abbildung 12 Relative Konzentrationen der ZSD über drei Auslagerungszeitpunkte unter Kühllagerungsbedingungen (KL1-3) in 10 verschiedenen Genotypen.

Anhang



Anhang Abbildung 13 Relative Konzentrationen von Äpfersre, Citsre, Phe und Trp über drei Auslagerungszeitpunkte unter Kühlagerungsbedingungen (KL1-3) in 10 verschiedenen Genotypen.

5.8. Proteomik

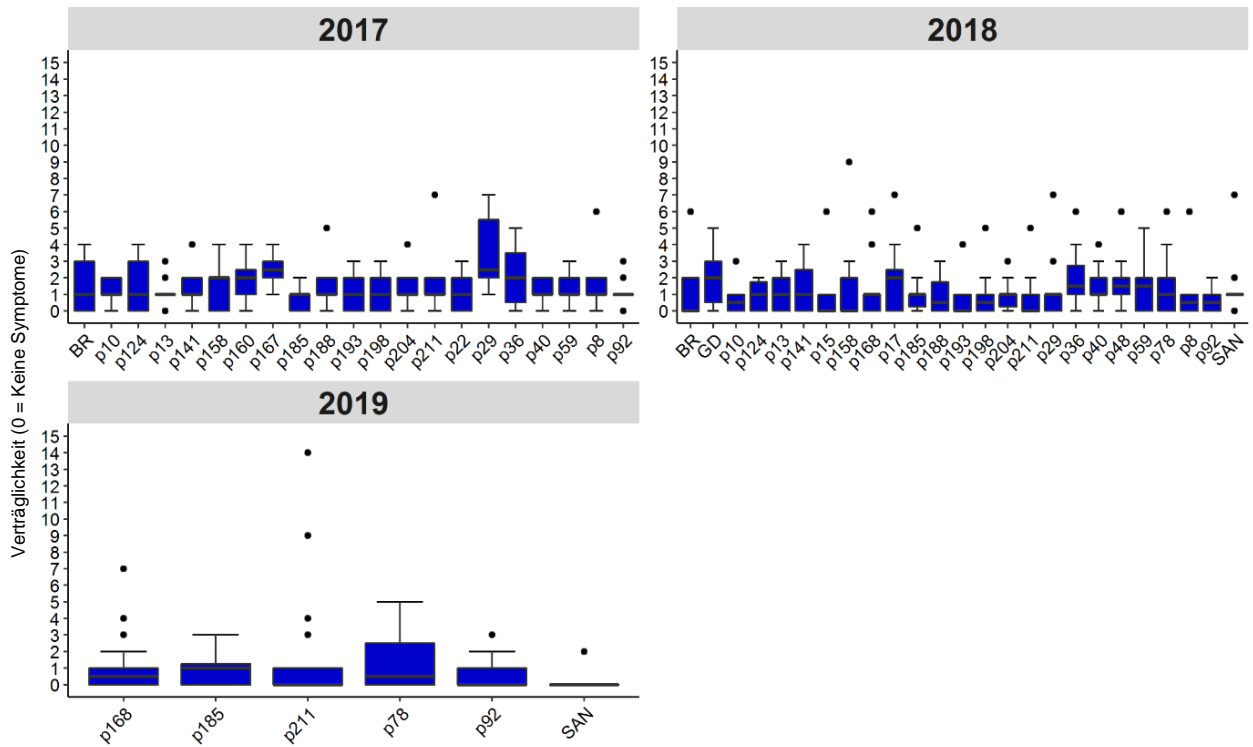
Anhang Tabelle 2 Hoch angereicherte Peptide in Gruppe II-Genotypen aus drei Erntejahren. Es sind hoch angereicherte Peptide mit einem statistisch signifikanten p-Wert (<0,05) gezeigt, die aus einer t-test Analyse zwischen den Peptidintensitäten der einzelnen Genotypen aus Gruppe II und der gesamten Gruppe I resultierten. Spezifische Peptide sind fettgedruckt.

Peptidsequenz (Position innerhalb der Aminosäuresequenz)	Protein/ NCBI Eintrag	Erntejahr	2017		2018			2019				
			Genotyp	p204	p8	p188	p40	p59	p158	SAN	p78	
			Mal d 1 [µg/g FW]	-	-	-	-	-	-	-	6,95±0,57	
YSVIEGDAITETIEK (84-98)	XP_008377311.1	Mal d 1.03	21,38	4,68								
EDVEIKEEHVK (124-134)	XP_008390601.1	Mal d 1.06			1,91			2,82				
STSHYHTKEDVEIKEEHVK (116-134)			3,80	6,17	1,26			6,17				
HKVDGIDKDNFVYK (70-83)	XP_008351173.1	Mal d 1.06							2,69			
LVAASSGSVIK (105-115)	AAX21002.1	Mal d 1.03			12,88			4,68				
LVASDNGSIIK (105-115)	AAX21008.1	Mal d 1.03			50,12							
STSHYTTKGDVEIKEEHVK (116-134)					4,37							45,71
LYYALVLDADNLLPK (19-33)	AAS00045.1	Mal d 1.03										22,39
HRIDGVDKDNLVYK (70-83)	AAX21000.1	Mal d 1.03										4,68
LMASGSGCVIK (105-115)												5,50
LVAAGSGSVIK (105-115)	AAX21003.1	Mal d 1.03			14,45			3,80				
SIEILEGDDGGVGTQK (41-58)	CBL94177.1	Mal d 1.08							2,88			
LFNATALDGDDELIK (19-33)									4,27			
HRIDGVDKDNFVYQYSVIEGDAISETIEK (70-98)	CBL94174.1	Mal d 1.07			11,48							
HKIDGVDKDNFVYQYSVIEGDAISETIEK (70-98)	AAX20992.1	Mal d 1.07										11,48
LVASDSGSIK (105-115)	CBL94173.1	Mal d 1.03			8,32							
LVAYGSGSVIK (105-115)	XP_008377426.1	Mal d 1.03										0,70
NITFGEQSQYGYVK (56-69)	AEF38460.1	Mal d 1.02					776					
GDFEIKEK (124-131)	AEF38445.1	Mal d 1.06										37,15
	AFC65129.1	Mal d 1.06										
STEILGGNGGVGTIK (41-55)	AAX21001.1	Mal d 1.03										
	AAX21000.1											
TVEILEGDGSGVTIK (41-55)	AAS00045.1	Mal d 1.03			9,77	3,39						
TVEILEGDGSGVTIKK (41-56)	AAX20977.1	Mal d 1.03			30,20	13,18						30,90
FVTQVTPQR (10-18)	CBL94148.1	Mal d 1.11						3,47		3,72		
LMFSSIK (34-40)	XP_008346874.1	Mal d 1.11						6,03	0,46			
SIEFLSGSGEVGTIK (41-55)					2,88			2,75		2,51		
QINFTEASPMK (56-66)					3,98			3,24				
DDIQIKEEDIELGKDR (128-143)								3,31				
EEDIELGKDR (134-143)												
AIGMYEVLEAYLMAHPR (144-160)								2,75				
AFILDADNLIPK (22-33)	CBL94138.1	Mal d 1.10				6,76				6,76		
GIEILEGNGGVGTIK (41-55)	XP_008340764.1	Mal d 1.10				6,03				5,01		
GIEILEGNGGVGTIKK (41-56)										3,72		
KVTFGEQSGLGFVK (56-69)										3,63		

Anhang

Peptidsequenz (Position innerhalb der Aminosäuresequenz)	Protein/ NCBI Eintrag	Erntejahr	2017				2018			2019		
			Genotyp		p204	p8	p188	p40	p59	p158	SAN	p78
			Mal d 1 [µg/g FW]		-	-	-	-	-	-	-	6,95±0,57
			Proteingruppe									
LVASPDGGSIVK (106-117)					8,91				3,98			
AGKEQASGLFK (137-147)												
EQASGLFK (140-147)					2,63							
LVESYLLANPDAYN (150-161)									2,57			
LIENYLLEHKDAYN (146-159)	XP_008360261.1	Mal d 1.03	2,82	6,76	7,59							
	AAX20997.1	Mal d 1.03										
IDGVDKDNFVYQYSVIEGDAISETIEK (72-98)	AAX20992.1	Mal d 1.07		3,89								
	CBL94174.1	Mal d 1.07										
YCCTPPNNTPETCPPEYSEIFEK (191-214)	AAC36740.1	Mal d 2				5,50						
	NP_001315714.1											
NGGAVPPACCNGIR (43-56)	ABB96482.1	Mal d 3							104			
SLAGSVSGVNPNGNAESLPGK (77-96)	AAT80662.1	Mal d 3	15,49									
	AAT80659.1	Mal d 3										
	AAT80664.1	Mal d 3										
LGDYLV EQGL (122-131)	XP_008337609.1	Mal d 4							11,48			
KSTMALLIGIYDEPMTPGQCNMVVER (96-121)	AAX19860.1	Mal d 4							4,47			
	XP_008337609.1											
KTGQALVFGIYEPLTPGQCNMIVER (96-121)	XP_008365251.1	Mal d 4							4,47			
	AAD29412.1	Mal d 4										

5.9. Humanstudien



Anhang Abbildung 14 Boxplots zu den Symptomwerten von Patienten im Rahmen der Humanstudien 2017 (Romer et al. 2020), 2018 (Romer et al. 2020) und 2019 (Chebib et al. 2022).

6. Literatur

- Abós-Gracia, B., Del Moral, M.G., López-Relaño, J., Viana-Huete, V., Castro, L., Villalba, M., Martínez-Naves, E.** (2013). Olea europaea pollen lipids activate invariant natural killer T cells by upregulating CD1d expression on dendritic cells. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131(5), 1393-9.e5.
- Adam, I.K., Adam, A.A., Bello, B.A.** (2016). Effect of Polyphenol Oxidase on Browning of Apple and Garden Egg. *Dutse Journal of Pure and Applied Sciences*(2), 177–184.
- Agarwal, P., Agarwal, P.K.** (2014). Pathogenesis related-10 proteins are small, structurally similar but with diverse role in stress signaling. *Molecular Biology Reports*, 41(2), 599–611.
- Agati, G., Brunetti, C., Di Ferdinando, M., Ferrini, F., Pollastri, S., Tattini, M.** (2013). Functional roles of flavonoids in photoprotection: new evidence, lessons from the past. *Plant Physiology and Biochemistry*, 72, 35–45.
- Ahammer, L., Grutsch, S., Kamenik, A.S., Liedl, K.R., Tollinger, M.** (2017a). Structure of the major apple allergen Mal d 1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(8), 1606–1612.
- Ahammer, L., Grutsch, S., Wallner, M., Ferreira, F., Tollinger, M.** (2017b). NMR resonance assignments of a hypoallergenic isoform of the major birch pollen allergen Bet v 1. *Biomolecular NMR Assignments*, 11(2), 231–234.
- Ahmed, I., Lv, L., Lin, H., Li, Z., Ma, J., Guanzhi, C., Sun, L., Xu, L.** (2018). Effect of tyrosinase-aided crosslinking on the IgE binding potential and conformational structure of shrimp (*Metapenaeus ensis*) tropomyosin. *Food Chemistry*, 248, 287–295.
- Alonso-Salces, R.M., Barranco, A., Abad, B., Berrueta, L.A., Gallo, B., Vicente, F.** (2004a). Polyphenolic profiles of Basque cider apple cultivars and their technological properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(10), 2938–2952.
- Alonso-Salces, R.M., Ndjoko, K., Queiroz, E.F., Ioset, J.R., Hostettmann, K., Berrueta, L.A., Gallo, B., Vicente, F.** (2004b). On-line characterisation of apple polyphenols by liquid chromatography coupled with mass spectrometry and ultraviolet absorbance detection. *Journal of Chromatography A*, 1046(1-2), 89–100.
- Anagnostou, A.** (2020). CON: Skin testing with fresh foods. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 124(5), 443–444.
- Aprèa, E., Charles, M., Endrizzi, I., Laura Corollaro, M., Betta, E., Biasioli, F., Gasperi, F.** (2017). Sweet taste in apple: the role of sorbitol, individual sugars, organic acids and volatile compounds. *Scientific Reports*, 7, 44950.
- Arakawa, O.** (1991). Effect of temperature on anthocyanin accumulation in apple fruit as affected by cultivar, stage of fruit ripening and bagging. *Journal of Horticultural Science*, 66(6), 763–768.
- Arumuganathan, K., Earle, E.D.** (1991). Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9(3), 208–218.
- Asam, C., Batista, A.L., Moraes, A.H., Paula, V.S. de, Almeida, F.C.L., Aglas, L., Kitzmüller, C., Bohle, B., et al.** (2014). Bet v 1--a Trojan horse for small ligands boosting allergic sensitization? *Clinical Experimental Allergy*, 44(8), 1083–1093.
- Asero, R., Marzban, G., Martinelli, A., Zaccarini, M., Laimer Da Camara Machado, M.** (2006). Search for low-allergenic apple cultivars for birch-pollen-allergic patients: is there a correlation between in vitro assays and patient response. *European Annals of Allergy and Clinical Immunology*, 38(3).

- Ashina, K., Tsubosaka, Y., Nakamura, T., Omori, K., Kobayashi, K., Hori, M., Ozaki, H., Murata, T. (2015). Histamine induces vascular hyperpermeability by increasing blood flow and endothelial barrier disruption in vivo. *PLoS One*, 10(7), e0132367.
- Asturias, J.A., Gómez-Bayón, N., Arilla, M.C., Sánchez-Pulido, L., Valencia, A., Martínez, A. (2002). Molecular and structural analysis of the panallergen profilin B cell epitopes defined by monoclonal antibodies. *International Immunology*, 14(9), 993–1001.
- Atkinson, R.G., Perry, J., Matsui, T., Ross, G.S., Macrae, E.A. (1996). A stress-, pathogenesis-, and allergen-related cDNA in apple fruit is also ripening-related. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 24(1), 103–107.
- Attard, E. (2013). A rapid microtitre plate Folin-Ciocalteu method for the assessment of polyphenols. *Open Life Sciences*, 8(1), 48–53.
- Ausukua, M., Dublin, I., Echebarria, M.-A., Aguirre, J.-M. (2009). Oral Allergy Syndrome (OAS). General and stomatological aspects. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*, e568-e572.
- Awad, M.A., Jager, A. de (2000). Flavonoid and chlorogenic acid concentrations in skin of ‘Jonagold’ and ‘Elstar’ apples during and after regular and ultra low oxygen storage. *Postharvest Biology and Technology*, 20(1), 15–24.
- Awad, M.A., Jager, A. de (2002). Relationships between fruit nutrients and concentrations of flavonoids and chlorogenic acid in ‘Elstar’ apple skin. *Scientia Horticulturae*, 92(3-4), 265–276.
- Awad, M.A., Jager, A. de (2003). Influences of air and controlled atmosphere storage on the concentration of potentially healthful phenolics in apples and other fruits. *Postharvest Biology and Technology*, 27(1), 53–58.
- Awad, M.A., Jager, A. de, van Westing, L.M. (2000). Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: characterisation of variation. *Scientia Horticulturae*, 83(3-4), 249–263.
- Babenko, L.M., Smirnov, O.E., Romanenko, K.O., Trunova, O.K., Kosakivska, I.V. (2019). Phenolic compounds in plants: biogenesis and functions. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 91(3), 5–18.
- Balázs, A., Tóth, M., Blazics, B., Héthelyi, É., Szarka, S., Ficsor, E., Ficzek, G., Lemberkovics, É., et al. (2012). Investigation of dietary important components in selected red fleshed apples by GC-MS and LC-MS. *Fitoterapia*, 83(8), 1356–1363.
- 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.
- Baneyx, F., Mujacic, M. (2004). Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*, 22(11), 1399–1408.
- Baritelle, A.L., Hyde, G.M., Fellman, J.K., Varith, J. (2001). Using 1-MCP to inhibit the influence of ripening on impact properties of pear and apple tissue. *Postharvest Biology and Technology*, 23(2), 153–160.
- Barlow, D.J., Edwards, M.S., Thornton, J.M. (1986). Continuous and discontinuous protein antigenic determinants. *Nature*, 322(6081), 747–748.
- Bars-Cortina, D., Macià, A., Iglesias, I., Romero, M.P., Motilva, M.J. (2017). Phytochemical profiles of new red-fleshed apple varieties compared with traditional and new white-fleshed varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(8), 1684–1696.
- Bartra, J., García-Moral, A., Enrique, E. (2016). Geographische Unterschiede bei Nahrungsmittelallergien. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*, 59(6), 755–763.

- Becker, S., Becker, S., Chebib, S., Schwab, W., Dierend, W., Zuberbier, T., Bergmann, K.-C.** (2021). Die Testung von Äpfeln auf ihre Allergenität. *Erwerbs-Obstbau*.
- Behrens, C.E., Smith, K.E., Iancu, C.V., Choe, J., Dean, J.V.** (2019). Transport of anthocyanins and other flavonoids by the Arabidopsis ATP-binding cassette transporter AtABCC2. *Scientific Reports*, 9(1), 437.
- Bernardi, M.L., Giangrieco, I., Camardella, L., Ferrara, R., Palazzo, P., Panico, M.R., Crescenzo, R., Carratore, V., et al.** (2011). Allergenic lipid transfer proteins from plant-derived foods do not immunologically and clinically behave homogeneously: the kiwifruit LTP as a model. *PloS One*, 6(11), e27856.
- Besbes, F., Franz-Oberdorf, K., Schwab, W.** (2019). Phosphorylation-dependent ribonuclease activity of Fra a 1 proteins. *Journal of Plant Physiology*, 233, 1–11.
- Beuning, L., Bowen, J., Persson, H., Barraclough, D., Bulley, S., Macrae, E.** (2004). Characterisation of Mal d 1-related genes in Malus. *Plant Molecular Biology*, 55(3), 369–388.
- Björkstén, F., Halmepuro, L., Hannuksela, M., Lahti, A.** (1980). Extraction and properties of apple allergens. *Allergy*, 35(8), 671–677.
- Bohle, B., Zwölfer, B., Heratizadeh, A., Jahn-Schmid, B., Antonia, Y.D., Alter, M., Keller, W., Zuidmeer, L., et al.** (2006). Cooking birch pollen-related food: divergent consequences for IgE- and T cell-mediated reactivity in vitro and in vivo. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 118(1), 242–249.
- Bolhaar, S.T.H.P., van de Weg, W.E., van Ree, R., Gonzalez-Mancebo, E., Zuidmeer, L., Bruijnzeel-Koomen, C.A.F.M., Fernandez-Rivas, M., Jansen, J., et al.** (2005a). In vivo assessment with prick-to-prick testing and double-blind, placebo-controlled food challenge of allergenicity of apple cultivars. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 116(5), 1080–1086.
- Bolhaar, S.T.H.P., Zuidmeer, L., Ma, Y., Ferreira, F., Bruijnzeel-Koomen, C.A.F.M., Hoffmann-Sommergruber, K., van Ree, R., Knulst, A.C.** (2005b). A mutant of the major apple allergen, Mal d 1, demonstrating hypo-allergenicity in the target organ by double-blind placebo-controlled food challenge. *Clinical Experimental Allergy*, 35(12), 1638–1644.
- Bondonno, C.P., Bondonno, N.P., Shinde, S., Shafaei, A., Boyce, M.C., Swinny, E., Jacob, S.R., Lacey, K., et al.** (2020). Phenolic composition of 91 Australian apple varieties: towards understanding their health attributes. *Food & Function*, 11(8), 7115–7125.
- Bondonno, N.P., Bondonno, C.P., Blekkenhorst, L.C., Considine, M.J., Maghzal, G., Stocker, R., Woodman, R.J., Ward, N.C., et al.** (2018). Flavonoid-rich apple improves endothelial function in individuals at risk for cardiovascular disease: A randomized controlled clinical trial. *Molecular Nutrition & Food Research*, 62(3).
- Botton, A., Lezzer, P., Dorigoni, A., Barcaccia, G., Ruperti, B., Ramina, A.** (2008). Genetic and environmental factors affecting allergen-related gene expression in apple fruit (*Malus domestica* L. Borkh). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), 6707–6716.
- Boyer, J., Liu, R.H.** (2004). Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition Journal*, 3(1), 5.
- Brady, C.J., O'Connell, P.B.** (1976). On the significance of increased protein synthesis in ripening banana fruits. *Functional Plant Biology*, 3(3), 301.
- Breiteneder, H.** (2004). Thaumatin-like proteins -- a new family of pollen and fruit allergens. *Allergy*, 59(5), 479–481.
- Breiteneder, H., Ebner, C.** (2000). Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 106(1 Pt 1), 27–36.
- Breiteneder, H., Mills, C.** (2006). Structural bioinformatic approaches to understand cross-reactivity. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50(7), 628–632.

- Breiteneder, H., Radauer, C.** (2004). A classification of plant food allergens. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113(5), 821–30; quiz 831.
- Bublin, M., Eiwegger, T., Breiteneder, H.** (2014). Do lipids influence the allergic sensitization process? *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 134(3), 521–529.
- Buendía, B., Gil, M.I., Tudela, J.A., Gady, A.L., Medina, J.J., Soria, C., López, J.M., Tomás-Barberán, F.A.** (2010). HPLC-MS analysis of proanthocyanidin oligomers and other phenolics in 15 strawberry cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7), 3916–3926.
- Bufe, A.** (1998). The biological function of allergens: relevant for the induction of allergic diseases? *International Archives of Allergy and Immunology*, 117(4), 215–219.
- Bufe, A.** (2003). Neue Therapeutische Ansätze der Immunmodulation bei allergischen Erkrankungen/Novel Therapeutic Concepts for Immunomodulation of Allergic Diseases. *LaboratoriumsMedizin*, 27(5/6), 201–203.
- 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.
- Burda, S., Oleszek, W., Lee, C.Y.** (1990). Phenolic compounds and their changes in apples during maturation and cold storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(4), 945–948.
- Carbone, K., Giannini, B., Picchi, V., Lo Scalzo, R., Cecchini, F.** (2011). Phenolic composition and free radical scavenging activity of different apple varieties in relation to the cultivar, tissue type and storage. *Food Chemistry*, 127(2), 493–500.
- Carlsson, L., Nyström, L.-E., Sundkvist, I., Markey, F., Lindberg, U.** (1977). Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells. *Journal of Molecular Biology*, 115(3), 465–483.
- Casañal, A., Zander, U., Muñoz, C., Dupeux, F., Luque, I., Botella, M.A., Schwab, W., Valpuesta, V., et al.** (2013). The strawberry pathogenesis-related 10 (PR-10) Fra proteins control flavonoid biosynthesis by binding to metabolic intermediates. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(49), 35322–35332.
- Chapman, M.D., Pomés, A., Breiteneder, H., Ferreira, F.** (2007). Nomenclature and structural biology of allergens. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 119(2), 414–420.
- Chebib, S., Meng, C., Ludwig, C., Bergmann, K.-C., Becker, S., Dierend, W., Schwab, W.** (2022). Identification of allergenomic signatures in allergic and well-tolerated apple genotypes using LC-MS/MS. *Food chemistry. Molecular sciences*, 4, 100111.
- Chebib, S., Schwab, W.** (2021). Microscale Thermophoresis reveals oxidized glutathione as high-affinity ligand of Mal d 1. *Foods*, 10(11), 2771.
- Cehade, M., Mayer, L.** (2005). Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115(1), 3–12; quiz 13.
- Cheng, M.-C., Ko, K., Chang, W.-L., Kuo, W.-C., Chen, G.-H., Lin, T.-P.** (2015). Increased glutathione contributes to stress tolerance and global translational changes in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 83(5), 926–939.
- Chevreau, E., Lespinasse, Y., Gallet, M.** (1985). Inheritance of pollen enzymes and polyploid origin of apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Theoretical and Applied Genetics*, 71(2), 268–277.
- Choi, J.H., Keum, K.C., Lee, S.Y.** (2006). Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chemical Engineering Science*, 61(3), 876–885.
- Chung, S.-Y., Champagne, E.T.** (2009). Reducing the allergenic capacity of peanut extracts and liquid peanut butter by phenolic compounds. *Food Chemistry*, 115(4), 1345–1349.

- Chung, S.-Y., Kato, Y., Champagne, E.T.** (2005). Polyphenol oxidase/caffeic acid may reduce the allergenic properties of peanut allergens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(15), 2631–2637.
- Clark, A.T., Ewan, P.W.** (2003). Interpretation of tests for nut allergy in one thousand patients, in relation to allergy or tolerance. *Clinical Experimental Allergy*, 33(8), 1041–1045.
- Cohen, J.** (1977). *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. Elsevier.
- Cools, M., van Bever, H.P., Weyler, J.J., Stevens, W.J.** (2000). Long-term effects of specific immunotherapy, administered during childhood, in asthmatic patients allergic to either house-dust mite or to both house-dust mite and grass pollen. *Allergy*, 55(1), 69–73.
- Coseteng, M.Y., Lee, C.Y.** (1987). Changes in apple polyphenoloxidase and polyphenol concentrations in relation to degree of browning. *Journal of Food Science*, 52(4), 985–989.
- Costa, S., Almeida, A., Castro, A., Domingues, L.** (2014). Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system. *Frontiers in Microbiology*, 5, 63.
- Cox, J., Mann, M.** (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature Biotechnology*, 26(12), 1367–1372.
- Cucu, T., Meulenaer, B. de, Bridts, C., Devreese, B., Ebo, D.** (2012). Impact of thermal processing and the Maillard reaction on the basophil activation of hazelnut allergic patients. *Food and Chemical Toxicology*, 50(5), 1722–1728.
- Cucu, T., Platteau, C., Taverniers, I., Devreese, B., Loose, M. de, Meulenaer, B. de** (2011). ELISA detection of hazelnut proteins: effect of protein glycation in the presence or absence of wheat proteins. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 28(1), 1–10.
- Davies, K.M., Schwinn, K.E., Deroles, S.C., Manson, D.G., Lewis, D.H., Bloor, S.J., Bradley, J.M.** (2003). Enhancing anthocyanin production by altering competition for substrate between flavonol synthase and dihydroflavonol 4-reductase. *Euphytica*, 131(3), 259–268.
- Deutscher Wetterdienst 2017.** Deutschlandwetter im Sommer 2017. https://www.dwd.de/DE/presse/pressemitteilungen/DE/2017/20170830_deutschlandwetter_sommer.pdf?__blob=publicationFile&v=3. Zugegriffen: 8. November 2021.
- Deutscher Wetterdienst 2018.** Deutschlandwetter im Sommer 2018. https://www.dwd.de/DE/presse/pressemitteilungen/DE/2018/20180830_deutschlandwetter_sommer.pdf?__blob=publicationFile&v=3. Zugegriffen: 8. November 2021.
- Deutscher Wetterdienst 2019.** Deutschlandwetter im Sommer 2019. https://www.dwd.de/DE/presse/pressemitteilungen/DE/2019/20190830_deutschlandwetter_sommer2019.pdf?__blob=publicationFile&v=2. Zugegriffen: 8. November 2021.
- Deutscher Wetterdienst 2020.** Deutschlandwetter im Sommer 2020. https://www.dwd.de/DE/presse/pressemitteilungen/DE/2020/20200831_deutschlandwetter_sommer2020.pdf?__blob=publicationFile&v=4. Zugegriffen: 8. November 2021.
- Dirlewanger, E., Cosson, P., Tavaud, M., Aranzana, J., Poizat, C., Zanetto, A., Arús, P., Laigret, F.** (2002). Development of microsatellite markers in peach *Prunus persica* (L.) Batsch and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 105(1), 127–138.
- Dixon, D.P., Skipsey, M., Edwards, R.** (2010). Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 71(4), 338–350.
- Dixon, R.A., Xie, D.-Y., Sharma, S.B.** (2005). Proanthocyanidins--a final frontier in flavonoid research? *The New Phytologist*, 165(1), 9–28.
- Downs, M.L., Baumert, J.L., Taylor, S.L., Mills, E.N.C.** (2016). Mass spectrometric analysis of allergens in roasted walnuts. *Journal of Proteomics*, 142, 62–69.

- Dupree, E.J., Jayathirtha, M., Yorkey, H., Mihasan, M., Petre, B.A., Darie, C.C.** (2020). A critical review of bottom-up proteomics: The good, the bad, and the future of this field. *Proteomes*, 8(3).
- Eberhardt, M.V., Lee, C.Y., Liu, R.H.** (2000). Antioxidant activity of fresh apples. *Nature*, 405(6789), 903–904.
- Egger, M., Hauser, M., Mari, A., Ferreira, F., Gadermaier, G.** (2010). The role of lipid transfer proteins in allergic diseases. *Current Allergy and Asthma Reports*, 10(5), 326–335.
- Ehgartner, D., Sagmeister, P., Langemann, T., Meitz, A., Lubitz, W., Herwig, C.** (2017). A novel method to recover inclusion body protein from recombinant E. coli fed-batch processes based on phage ΦX174-derived lysis protein E. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(14), 5603–5614.
- Eidelpes, R., Hofer, F., Röck, M., Führer, S., Kamenik, A.S., Liedl, K.R., Tollinger, M.** (2021). Structure and Zeatin binding of the peach allergen Pru p 1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(29), 8120–8129.
- Eigenmann, P.A.** (2001). Food allergy: a long way to safe processed foods. *Allergy*, 56(12), 1112–1113.
- El-Manzalawy, Y., Honavar, V.** (2010). Recent advances in B-cell epitope prediction methods. *Immunome Research*, 6 Suppl 2, S2.
- El-Sharkawy, I., Liang, D., Xu, K.** (2015). Transcriptome analysis of an apple (*Malus × domestica*) yellow fruit somatic mutation identifies a gene network module highly associated with anthocyanin and epigenetic regulation. *Journal of Experimental Botany*, 66(22), 7359–7376.
- 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 profilin. *Structure*, 5(1), 33–45.
- Felton, G.W.** (2005). Indigestion is a plant's best defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(52), 18771–18772.
- Fernandes, H., Michalska, K., Sikorski, M., Jaskolski, M.** (2013). Structural and functional aspects of PR-10 proteins. *The FEBS Journal*, 280(5), 1169–1199.
- Fernández-Rivas, M., Bolhaar, S., González-Mancebo, E., Asero, R., van Leeuwen, A., Bohle, B., Ma, Y., Ebner, C., et al.** (2006). Apple allergy across Europe: how allergen sensitization profiles determine the clinical expression of allergies to plant foods. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 118(2), 481–488.
- Ferreira, F., Hirtenlehner, K., Jilek, A., Godnik-Cvar, J., Breiteneder, H., Grimm, R., Hoffmann-Sommergruber, K., Scheiner, O., et al.** (1996). Dissection of immunoglobulin E and T lymphocyte reactivity of isoforms of the major birch pollen allergen Bet v 1: potential use of hypoallergenic isoforms for immunotherapy. *The Journal of Experimental Medicine*, 183(2), 599–609.
- Focke-Tejkl, M., Weber, M., Niespodziana, K., Neubauer, A., Huber, H., Henning, R., Stegfellner, G., Maderegger, B., et al.** (2015). Development and characterization of a recombinant, hypoallergenic, peptide-based vaccine for grass pollen allergy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 135(5), 1207-7.e1-11.
- Francetic, O., Belin, D., Badaut, C., Pugsley, A.P.** (2000). Expression of the endogenous type II secretion pathway in *Escherichia coli* leads to chitinase secretion. *The EMBO Journal*, 19(24), 6697–6703.
- Francini, A., Sebastiani, L.** (2013). Phenolic compounds in apple (*Malus x domestica* Borkh.): Compounds characterization and stability during postharvest and after processing. *Antioxidants*, 2(3), 181–193.

- Francisco, R.M., Regalado, A., Ageorges, A., Burla, B.J., Bassin, B., Eisenach, C., Zarrouk, O., Vialet, S., et al. (2013). ABCC1, an ATP binding cassette protein from grape berry, transports anthocyanidin 3-O-Glucosides. *The Plant Cell*, 25(5), 1840–1854.
- Franz-Oberdorf, K., Eberlein, B., Edelmann, K., Bleicher, P., Kurze, E., Helm, D., Olbricht, K., Darsow, U., et al. (2017). White-fruited strawberry genotypes are not per se hypoallergenic. *Food Research International*, 100(Pt 1), 748–756.
- Führer, S., Kamenik, A.S., Zeindl, R., Nothegger, B., Hofer, F., Reider, N., Liedl, K.R., Tollinger, M. (2021). Inverse relation between structural flexibility and IgE reactivity of Cor a 1 hazelnut allergens. *Scientific Reports*, 11(1), 4173.
- Gajhede, M., Osmark, P., Poulsen, F.M., Ipsen, H., Larsen, J.N., van Joost Neerven, R.J., Schou, C., Löwenstein, H., et al. (1996). X-ray and NMR structure of Bet v 1, the origin of birch pollen allergy. *Nature Structural Biology*, 3(12), 1040–1045.
- Galli, S.J., Tsai, M., Piliponsky, A.M. (2008). The development of allergic inflammation. *Nature*, 454(7203), 445–454.
- Gallus, S., Talamini, R., Giacosa, A., Montella, M., Ramazzotti, V., Franceschi, S., Negri, E., La Vecchia, C. (2005). Does an apple a day keep the oncologist away? *Annals of Oncology*, 16(11), 1841–1844.
- Ganglberger, E., Grunberger, K., Sponer, B., Radauer, C., Breiteneder, H., Boltz-Nitulescu, G., Scheiner, O., Jensen-Jarolim, E. (2000). Allergen mimotopes for 3-dimensional epitope search and induction of antibodies inhibiting human IgE. *FASEB Journal*, 14(14), 2177–2184.
- Gao, Z., van de Weg, E.W., Matos, C.I., Arens, P., Bolhaar, S.T.H.P., Knulst, A.C., Li, Y., Hoffmann-Sommergruber, K., et al. (2008). Assessment of allelic diversity in intron-containing Mal d 1 genes and their association to apple allergenicity. *BMC Plant Biology*, 8, 116.
- Gao, Z.S., van de Weg, W.E., Schaart, J.G., Schouten, H.J., Tran, D.H., Kodde, L.P., van der Meer, I.M., van der Geest, A.H.M., et al. (2005). Genomic cloning and linkage mapping of the Mal d 1 (PR-10) gene family in apple (*Malus domestica*). *Theoretical and Applied Genetics*, 111(1), 171–183.
- Garcia, A., Wichers, J.H., Wichers, H.J. (2007). Decrease of the IgE-binding by Mal d 1, the major apple allergen, by means of polyphenol oxidase and peroxidase treatments. *Food Chemistry*, 103(1), 94–100.
- Gerhauser, C. (2008). Cancer chemopreventive potential of apples, apple juice, and apple components. *Planta Medica*, 74(13), 1608–1624.
- Geroldinger-Simic, M., Kinaciyan, T., Nagl, B., Baumgartner-Durchschlag, U., Huber, H., Ebner, C., Lidholm, J., Bartel, D., et al. (2013). Oral exposure to Mal d 1 affects the immune response in patients with birch pollen allergy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131(1), 94–102.
- Giomaro, G., Karioti, A., Bilia, A.R., Bucchini, A., Giamperi, L., Ricci, D., Fraternali, D. (2014). Polyphenols profile and antioxidant activity of skin and pulp of a rare apple from Marche region (Italy). *Chemistry Central Journal*, 8(1), 45.
- Golding, J.B., McGlasson, W.B., Wyllie, S.G., Leach, D.N. (2001). Fate of apple peel phenolics during cool storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(5), 2283–2289.
- Gong, J., Chen, S.-S. (2003). Polyphenolic antioxidants inhibit peptide presentation by antigen-presenting cells. *International Immunopharmacology*, 3(13-14), 1841–1852.
- Goodman, C.D., Casati, P., Walbot, V. (2004). A multidrug resistance-associated protein involved in anthocyanin transport in *Zea mays*. *The Plant Cell*, 16(7), 1812–1826.
- Groth, S., Budke, C., Weber, T., Neugart, S., Brockmann, S., Holz, M., Sawadski, B.C., Daum, D., et al. (2021a). Relationship between phenolic compounds, antioxidant

- properties, and the allergenic protein Mal d 1 in different selenium-biofortified apple cultivars (*Malus domestica*). *Molecules*, 26(9).
- Groth, S., Budke, C., Weber, T., Oest, M., Brockmann, S., Holz, M., Daum, D., Rohn, S.** (2021b). Selenium biofortification of different varieties of apples (*Malus domestica*) - Influence on protein content and the allergenic proteins Mal d 1 and Mal d 3. *Food Chemistry*, 362, 130134.
- 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*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12), 4002–4007.
- Grutsch, S., Fuchs, J.E., Ahammer, L., Kamenik, A.S., Liedl, K.R., Tollinger, M.** (2017). Conformational flexibility differentiates naturally occurring Bet v 1 isoforms. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1192.
- Grutsch, S., Fuchs, J.E., Freier, R., Kofler, S., Bibi, M., Asam, C., Wallner, M., Ferreira, F., et al.** (2014). Ligand binding modulates the structural dynamics and compactness of the major birch pollen allergen. *Biophysical Journal*, 107(12), 2972–2981.
- Guarino, C., Arena, S., Simone, L. de, D'Ambrosio, C., Santoro, S., Rocco, M., Scaloni, A., Marra, M.** (2007). Proteomic analysis of the major soluble components in Annurca apple flesh. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(2), 255–262.
- Guidi, L., Degl'Innocenti, E., Remorini, D., Massai, R., Tattini, M.** (2008). Interactions of water stress and solar irradiance on the physiology and biochemistry of *Ligustrum vulgare*. *Tree Physiology*, 28(6), 873–883.
- Guyot, S., Le Bourvellec, C., Marnet, N., Drilleau, J.F.** (2002). Procyanidins are the most abundant polyphenols in dessert apples at maturity. *LWT - Food Science and Technology*, 35(3), 289–291.
- Guyot, S., Marnet, N., Laraba, D., Sanoner, P., Drilleau, J.-F.** (1998). Reversed-Phase HPLC following Thiolysis for Quantitative Estimation and Characterization of the Four Main Classes of Phenolic Compounds in Different Tissue Zones of a French Cider Apple Variety (*Malus domestica* Var. Kermerrien). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(5), 1698–1705.
- Guyot, S., Marnet, N., Sanoner, P., Drilleau, J.-F.** (2003). Variability of the polyphenolic composition of cider apple (*Malus domestica*) fruits and juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(21), 6240–6247.
- Gwanpua, S.G., Verlinden, B.E., Hertog, M., Bulens, I., van de Poel, B., van Impe, J., Nicolai, B.M., Geeraerd, A.H.** (2012). Kinetic modeling of firmness breakdown in 'Braeburn' apples stored under different controlled atmosphere conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 67, 68–74.
- Haftenberger, M., Laußmann, D., Ellert, U., Kalcklösch, M., Langen, U., Schlaud, M., Schmitz, R., Thamm, M.** (2013). Prävalenz von Sensibilisierungen gegen Inhalations- und Nahrungsmittelallergene: Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1). *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*, 56(5-6), 687–697.
- Halász, J., Hegedűs, A., Pedryc, A.** (2006). Review of the molecular background of self-incompatibility in rosaceous fruit trees. *International Journal of Horticultural Science*, 12(2).
- Han, C.U., Lee, C.H., Jang, K.S., Choi, G.J., Lim, H.K., Kim, J.-C., Ahn, S.-N., Choi, J.E., et al.** (2004). Identification of rice genes induced in a rice blast-resistant mutant. *Molecules and Cells*, 17(3), 462–468.
- Han, M., Li, G., Liu, X., Li, A., Mao, P., Liu, P., Li, H.** (2019). Phenolic profile, antioxidant activity and anti-proliferative activity of crabapple fruits. *Horticultural Plant Journal*, 5(4), 155–163.

- Hantusch, B., Krieger, S., Untersmayr, E., Schöll, I., Knittelfelder, R., Flicker, S., Spitzauer, S., Valenta, R., et al.** (2004). Mapping of conformational IgE epitopes on Phl p 5a by using mimotopes from a phage display library. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114(6), 1294–1300.
- Harborne, J.B.** (1994). Do natural plant phenols play a role in ecology? *Acta Horticulturae*(381), 36–45.
- Harel, K., Mayer, A.M., Shain, Y.** (1964). Catechol oxidases from apples, their properties, subcellular location and inhibition. *Physiologia Plantarum*, 17(4), 921–930.
- Harris, S.A., Robinson, J.P., Juniper, B.E.** (2002). Genetic clues to the origin of the apple. *Trends in Genetics*, 18(8), 426–430.
- Härtl, K., Denton, A., Franz-Oberdorf, K., Hoffmann, T., Spornraft, M., Usadel, B., Schwab, W.** (2017). Early metabolic and transcriptional variations in fruit of natural white-fruited *Fragaria vesca* genotypes. *Scientific Reports*, 7, 45113.
- Hegedús, A.** (2006). Review of the self-incompatibility in apple (*Malus x domestica* Borkh., syn.: *Malus pumila* Mill.). *International Journal of Horticultural Science*, 12(2).
- Heimler, D., Romani, A., Ieri, F.** (2017). Plant polyphenol content, soil fertilization and agricultural management: a review. *European Food Research and Technology*, 243(7), 1107–1115.
- Heinzerling, L., Mari, A., Bergmann, K.-C., Bresciani, M., Burbach, G., Darsow, U., Durham, S., Fokkens, W., et al.** (2013). The skin prick test - European standards. *Clinical and Translational Allergy*, 3(1), 3.
- Hellström, J.K., Törrönen, A.R., Mattila, P.H.** (2009). Proanthocyanidins in common food products of plant origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(17), 7899–7906.
- Helsper, J.P.F.G., Gilissen, L.J.W.J., van Ree, R., America, A.H.P., Cordewener, J.H.G., Bosch, D.** (2002). Quadrupole time-of-flight mass spectrometry: a method to study the actual expression of allergen isoforms identified by PCR cloning. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 110(1), 131–138.
- Hemmat, M., Weeden, N.F., Manganaris, A., Lawson, D.M.** (1994). Molecular Marker Linkage Map for Apple. *Journal of Heredity*.
- Henry-Kirk, R.A., McGhie, T.K., Andre, C.M., Hellens, R.P., Allan, A.C.** (2012). Transcriptional analysis of apple fruit proanthocyanidin biosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 63(15), 5437–5450.
- Henry-Kirk, R.A., Plunkett, B., Hall, M., McGhie, T., Allan, A.C., Wargent, J.J., Espley, R.V.** (2018). Solar UV light regulates flavonoid metabolism in apple (*Malus x domestica*). *Plant, Cell & Environment*, 41(3), 675–688.
- Hessel, E.M., Chu, M., Lizcano, J.O., Chang, B., Herman, N., Kell, S.A., Wills-Karp, M., Coffman, R.L.** (2005). Immunostimulatory oligonucleotides block allergic airway inflammation by inhibiting Th2 cell activation and IgE-mediated cytokine induction. *The Journal of Experimental Medicine*, 202(11), 1563–1573.
- Hjernø, K., Alm, R., Canbäck, B., Matthiesen, R., Trajtkovski, 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? *International Archives of Allergy and Immunology*, 122, 155–166.
- Holderbaum, D.F., Kon, T., Kudo, T., Guerra, M.P.** (2010). Enzymatic browning, polyphenol oxidase activity, and polyphenols in four apple cultivars: Dynamics during fruit development. *Hortscience: A Publication of the American Society for Horticultural Science*, 45(8), 1150–1154.

- Holm, J., Bærentzen, G., Gajhede, M., Ipsen, H., Larsen, J.N., Løwenstein, H., Wissenbach, M., Spangfort, M.D.** (2001). Molecular basis of allergic cross-reactivity between group 1 major allergens from birch and apple. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 756(1-2), 307–313.
- Honda, C., Bessho, H., Murai, M., Iwanami, H., Moriya, S., Abe, K., Wada, M., Moriya-Tanaka, Y., et al.** (2014). Effect of Temperature on Anthocyanin Synthesis and Ethylene Production in the Fruit of Early- and Medium-maturing Apple Cultivars during Ripening Stages. *Hortscience: A Publication of the American Society for Horticultural Science*, 49(12), 1510–1517.
- Honda, C., Moriya, S.** (2018). Anthocyanin biosynthesis in apple fruit. *The Horticulture Journal*, 87(3), 305–314.
- 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. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 96(6), 960–970.
- Hu, B., Zhao, J., Lai, B., Qin, Y., Wang, H., Hu, G.** (2016). LcGST4 is an anthocyanin-related glutathione S-transferase gene in Litchi chinensis Sonn. *Plant Cell Reports*, 35(4), 831–843.
- Hummel, M., Wigger, T., Brockmeyer, J.** (2015). Characterization of mustard 2S albumin allergens by bottom-up, middle-down, and top-down proteomics: a consensus set of isoforms of Sin a 1. *Journal of Proteome Research*, 14(3), 1547–1556.
- Ibeas, J.I., Lee, H., Damsz, B., Prasad, D.T., Pardo, J.M., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Narasimhan, M.L.** (2000). Fungal cell wall phosphomannans facilitate the toxic activity of a plant PR-5 protein. *The Plant Journal*, 23(3), 375–383.
- Iyer, L.M., Koonin, E.V., Aravind, L.** (2001). Adaptations of the helix-grip fold for ligand binding and catalysis in the START domain superfamily. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 43(2), 134–144.
- Jacob, T., Loetzen, C.S. von, Reuter, A., Lacher, U., Schiller, D., Schobert, R., Mahler, V., Vieths, S., et al.** (2019). Identification of a natural ligand of the hazel allergen Cor a 1. *Scientific Reports*, 9(1), 8714.
- Jäger, L., Wüthrich, B.** (2002). Nahrungsmittelallergien und -intoleranzen: *Immunologie, Diagnostik, Therapie, Prophylaxe*. München, Jena: Urban & Fischer.
- Jahn-Schmid, B., Radakovics, A., Lüttkopf, D., Scheurer, S., Vieths, S., Ebner, C., Bohle, B.** (2005). Bet v 1142-156 is the dominant T-cell epitope of the major birch pollen allergen and important for cross-reactivity with Bet v 1-related food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 116(1), 213–219.
- James, A.M., Ma, D., Mellway, R., Gesell, A., Yoshida, K., Walker, V., Tran, L., Stewart, D., et al.** (2017). Poplar MYB115 and MYB134 transcription factors regulate proanthocyanidin synthesis and structure. *Plant Physiology*, 174(1), 154–171.
- Janick, J. (Hrsg.)** (1996). Fruit breeding. New York: Wiley.
- Jankiewicz, A., Baltés, W., Bögl, K.W., Dehne, L.I., Jamin, A., Hoffmann, A., Haustein, D., Vieths, S.** (1997). Influence of food processing on the immunochemical stability of celery allergens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 75(3), 359–370.
- Jedrychowski, W., Maugeri, U., Pac, A., Sochacka-Tatara, E., Galas, A.** (2009). Reduced risk of colorectal cancer and regular consumption of apples: Hospital based case-control study in Poland. *Open Medicine*, 4(3), 320–326.
- Jespersen, M.C., Peters, B., Nielsen, M., Marcatili, P.** (2017). BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W24–W29.

- Jiang, S., Chen, M., He, N., Chen, X., Wang, N., Sun, Q., Zhang, T., Xu, H., et al.** (2019). MdGSTF6, activated by MdMYB1, plays an essential role in anthocyanin accumulation in apple. *Horticulture Research*, 6, 40.
- Johansson, S.G.O., Bieber, T., Dahl, R., Friedmann, P.S., Lanier, B.Q., Lockey, R.F., Motala, C., Ortega Martell, J.A., et al.** (2004). Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113(5), 832–836.
- Johnson, P.E., Sayers, R.L., Gethings, L.A., Balasundaram, A., Marsh, J.T., Langridge, J.I., Mills, E.N.C.** (2016). Quantitative proteomic profiling of peanut allergens in food ingredients used for oral food challenges. *Analytical Chemistry*, 88(11), 5689–5695.
- Joseph, B.C., Pichaimuthu, S., Srimeenakshi, S.** (2015). An overview of the parameters for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Cell Science & Therapy*, 06(05).
- Jungblut, P.R., Holzhütter, H.G., Apweiler, R., Schlüter, H.** (2008). The speciation of the proteome. *Chemistry Central Journal*, 2, 16.
- Kadam, K., Karbhal, R., Jayaraman, V.K., Sawant, S., Kulkarni-Kale, U.** (2017). AllerBase: a comprehensive allergen knowledgebase. *Database: The Journal of Biological Databases and Curation*, 2017.
- Kader, A.A.** (1995). Regulation of fruit physiology by controlled/modified atmospheres. *Acta Horticulturae*(398), 59–70.
- Kader, A.A.** (2002). Fruits in the global market. In: *Knee, M. (Ed.), Fruit Quality and its Biological Basis*, 1–16.
- Kahle, K., Kraus, M., Richling, E.** (2005). Polyphenol profiles of apple juices. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49(8), 797–806.
- Kalinowska, M., Bielawska, A., Lewandowska-Siwkiewicz, H., Priebe, W., Lewandowski, W.** (2014). Apples: content of phenolic compounds vs. variety, part of apple and cultivation model, extraction of phenolic compounds, biological properties. *Plant Physiology and Biochemistry*, 84, 169–188.
- Kazemi-Shirazi, L., Pauli, G., Purohit, A., Spitzauer, S., Fröschle, R., Hoffmann-Sommergruber, K., Breiteneder, H., Scheiner, O., et al.** (2000). Quantitative IgE inhibition experiments with purified recombinant allergens indicate pollen-derived allergens as the sensitizing agents responsible for many forms of plant food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 105(1), 116–125.
- Kelleher, N.L.** (2004). Peer Reviewed: Top-Down Proteomics. *Analytical Chemistry*, 76(11), 196 A-203 A.
- Kellerhals, M.** (2009). Introduction to Apple (*Malus × domestica*). In K.M. Folta & S.E. Gardiner (Hrsg.), *Genetics and Genomics of Rosaceae* (S. 73–84). New York, NY: Springer New York.
- Ketterer, B., Coles, B., Meyer, D.J.** (1983). The role of glutathione in detoxication. *Environmental Health Perspectives*, 49, 59–69.
- Kiewning, D., Baab, G., Schmitz-Eiberger, M.** (2012). Impact of storage conditions on the apple allergen Mal d 1. *Erwerbs-Obstbau*, 54(4), 177–183.
- 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 Science and Technology*, 53(1), 198–203.
- 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 Chemistry*, 140(1-2), 99–104.

- Kiser, J.Z., Post, M., Wang, B., Miyagi, M.** (2009). Streptomyces erythraeus trypsin for proteomics applications. *Journal of Proteome Research*, 8(4), 1810–1817.
- Kitamura, S., Shikazono, N., Tanaka, A.** (2004). TRANSPARENT TESTA 19 is involved in the accumulation of both anthocyanins and proanthocyanidins in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 37(1), 104–114.
- Kitzmüller, C., Zulehner, N., Roulias, A., Briza, P., Ferreira, F., Faé, I., Fischer, G.F., Bohle, B.** (2015). Correlation of sensitizing capacity and T-cell recognition within the Bet v 1 family. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 136(1), 151–158.
- Klimek, L., Vogelberg, C., & Werfel, T. (Hrsg.)** (2019). Weißbuch Allergie in Deutschland. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin.
- Knekt, P., Kumpulainen, J., Järvinen, R., Rissanen, H., Heliövaara, M., Reunanen, A., Hakulinen, T., Aromaa, A.** (2002). Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76(3), 560–568.
- 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. *Journal of Molecular Biology*, 422(1), 109–123.
- Koistinen, K.M., Kokko, H.I., Hassinen, V.H., Tervahauta, A.I., Auriola, S., Kärenlampi, S.O.** (2002). Stress-related RNase PR-10c is post-translationally modified by glutathione in birch. *Plant, Cell & Environment*, 25(6), 707–715.
- Koistinen, K.M., Soininen, P., Venäläinen, T.A., Häyrinen, J., Laatikainen, R., Peräkylä, M., Tervahauta, A.I., Kärenlampi, S.O.** (2005). Birch PR-10c interacts with several biologically important ligands. *Phytochemistry*, 66(21), 2524–2533.
- Kondo, Y., Urisu, A.** (2009). Oral allergy syndrome. *Allergology International*, 58(4), 485–491.
- Kootstra, H.S., Vlieg-Boerstra, B.J., Dubois, A.E.** (2007). Assessment of the reduced allergenic properties of the Santana apple. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 99(6), 522–525.
- Korte, R., Brockmeyer, J.** (2017). Novel mass spectrometry approaches in food proteomics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 96, 99–106.
- Korte, R., Happe, J., Brümmer, I., Brockmeyer, J.** (2017). Structural Characterization of the Allergenic 2S Albumin Cor a 14: Comparing Proteoform Patterns across Hazelnut Cultivars. *Journal of Proteome Research*, 16(2), 988–998.
- Kozlovskii, I., Popov, P.** (2021). Protein-peptide binding site detection using 3D convolutional neural networks. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 61(8), 3814–3823.
- Krebitz, M., Wagner, B., Ferreira, F., Peterbauer, C., Campillo, N., Witty, M., Kolarich, D., Steinkellner, H., et al.** (2003). Plant-based heterologous expression of Mal d 2, a thaumatin-like protein and allergen of apple (*Malus domestica*), and its characterization as an antifungal protein. *Journal of Molecular Biology*, 329(4), 721–730.
- Kschonsek, J., Dietz, A., Wiegand, C., Hipler, U.-C., Böhm, V.** (2019a). Allergenicity of apple allergen Mal d 1 as effected by polyphenols and polyphenol oxidase due to enzymatic browning. *LWT - Food Science and Technology*, 113, 108289.
- Kschonsek, J., Wiegand, C., Hipler, U.-C., Böhm, V.** (2019b). Influence of polyphenolic content on the in vitro allergenicity of old and new apple cultivars: A pilot study. *Nutrition*, 58, 30–35.
- Kschonsek, J., Wolfram, T., Stöckl, A., Böhm, V.** (2018). Polyphenolic compounds analysis of old and new apple cultivars and contribution of polyphenolic profile to the in vitro antioxidant capacity. *Antioxidants*, 7(1).
- Kurze, E., Kock, V., Lo Scalzo, R., Olbricht, K., Schwab, W.** (2018a). Effect of the strawberry genotype, cultivation and processing on the Fra a 1 allergen content. *Nutrients*, 10(7).

- Kurze, E., Lo Scalzo, R., Campanelli, G., Schwab, W.** (2018b). Effect of tomato variety, cultivation, climate and processing on Sola 1 4, an allergen from *Solanum lycopersicum*. *PLoS One*, *13*(6), e0197971.
- Kviklys, D., Viškelis, J., Liaudanskas, M., Janulis, V., Laužikė, K., Samuolienė, G., Uselis, N., Lanauskas, J.** (2022). Apple Fruit Growth and Quality Depend on the Position in Tree Canopy. *Plants*, *11*(2).
- Lachman, J., Šulc, M., Sus, J., Pavlíková, O.** (2006). Polyphenol content and antiradical activity in different apple varieties. *Horticultural Science*, *33*(No. 3), 95–102.
- Lattanzio, V., Di Venere, D., Linsalata, V., Bertolini, P., Ippolito, A., Salerno, M.** (2001). Low temperature metabolism of apple phenolics and quiescence of *Phlyctaena vagabunda*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(12), 5817–5821.
- Lay-Yee, M., Dellapenna, D., Ross, G.S.** (1990). Changes in mRNA and protein during ripening in apple fruit (*Malus domestica* Borkh. cv Golden Delicious). *Plant Physiology*, *94*(2), 850–853.
- Le Bourvellec, C., Picot, M., Renard, C.** (2006). Size-exclusion chromatography of procyanidins: Comparison between apple and grape procyanidins and application to the characterization of fractions of high degrees of polymerization. *Analytica Chimica Acta*, *563*(1-2), 33–43.
- Leja, M., Mareczek, A., Ben, J.** (2003). Antioxidant properties of two apple cultivars during long-term storage. *Food Chemistry*, *80*(3), 303–307.
- Lester, G.E., Lewers, K.S., Medina, M.B., Saftner, R.A.** (2012). Comparative analysis of strawberry total phenolics via Fast Blue BB vs. Folin–Ciocalteu: Assay interference by ascorbic acid. *Journal of Food Composition and Analysis*, *27*(1), 102–107.
- Letunic, I., Bork, P.** (2021). Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research*.
- Li, H., Subbiah, V., Barrow, C.J., Dunshea, F.R., Suleria, H.A.R.** (2021). Phenolic Profiling of Five Different Australian Grown Apples. *Applied Sciences*, *11*(5), 2421.
- Lingwood, D., Simons, K.** (2010). Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, *327*(5961), 46–50.
- López-Pedrouso, M., Bernal, J., Franco, D., Zapata, C.** (2014). Evaluating two-dimensional electrophoresis profiles of the protein phaseolin as markers of genetic differentiation and seed protein quality in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(29), 7200–7208.
- López-Pedrouso, M., Lorenzo, J.M., Gagaoua, M., Franco, D.** (2020). Current trends in proteomic advances for food allergen analysis. *Biology*, *9*(9).
- Luby, J.J.** (2003). Taxonomic classification and brief history. In D.C. Ferree & I.J. Warrington (Hrsg.), *Apples: Botany, production, and uses* (S. 1–14). New York, NY: CABI Pub.
- Luo, H., Dai, C., Li, Y., Feng, J., Liu, Z., Kang, C.** (2018). Reduced Anthocyanins in Petioles codes for a GST anthocyanin transporter that is essential for the foliage and fruit coloration in strawberry. *Journal of Experimental Botany*, *69*(10), 2595–2608.
- Lüttkopf, D., Ballmer-Weber, B.K., Wüthrich, B., Vieths, S.** (2000). Celery allergens in patients with positive double-blind placebo-controlled food challenge. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *106*(2), 390–399.
- Luzar, J., Štrukelj, B., Lunder, M.** (2016). Phage display peptide libraries in molecular allergology: from epitope mapping to mimotope-based immunotherapy. *Allergy*, *71*(11), 1526–1532.
- Ma, Y., Zuidmeer, L., Bohle, B., Bolhaar, S.T.H., Gadermaier, G., Gonzalez-Mancebo, E., Fernandez-Rivas, M., Knulst, A.C., et al.** (2006). Characterization of recombinant Mal d 4 and its application for component-resolved diagnosis of apple allergy. *Clinical and Experimental Allergy*, *36*(8), 1087–1096.

- Macheix, J.-J., Fleuriet, A., Billot, J.** (2018). *Fruit Phenolics*. CRC Press.
- Malec, M., Le Quéré, J.-M., Sotin, H., Kolodziejczyk, K., Bauduin, R., Guyot, S.** (2014). Polyphenol profiling of a red-fleshed apple cultivar and evaluation of the color extractability and stability in the juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(29), 6944–6954.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L.** (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727–747.
- Marković-Housley, Z., Degano, M., Lamba, D., Roepenack-Lahaye, E. von, Clemens, S., Susani, M., Ferreira, F., Scheiner, O., et al.** (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. *Journal of Molecular Biology*, 325(1), 123–133.
- Marrs, K.A., Alfenito, M.R., Lloyd, A.M., Walbot, V.** (1995). A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene *Bronze-2*. *Nature*, 375(6530), 397–400.
- Marsh, D.G., Goodfriend, L., King, T.P., Lowenstein, H., Platts-Mills, T.A.** (1986). Allergen nomenclature. *Bulletin of the World Health Organization*, 64(5), 767–774.
- Martínez-Téllez, M.A., Lafuente, M.T.** (1997). Effect of high temperature conditioning on ethylene, phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase and polyphenol oxidase activities in flavedo of chilled «Fortune» mandarin fruit. *Journal of Plant Physiology*, 150(6), 674–678.
- Marzano, V., Tilocca, B., Fiocchi, A.G., Vernocchi, P., Levi Mortera, S., Urbani, A., Roncada, P., Putignani, L.** (2020). Perusal of food allergens analysis by mass spectrometry-based proteomics. *Journal of Proteomics*, 215, 103636.
- Marzban, G., Herndl, A., Pietrozotto, S., Banerjee, S., Obinger, C., Maghuly, F., Hahn, R., Boscia, D., et al.** (2009). Conformational changes of Mal d 2, a thaumatin-like apple allergen, induced by food processing. *Food Chemistry*, 112(4), 803–811.
- Mastrorilli, C., Cardinale, F., Giannetti, A., Caffarelli, C.** (2019). Pollen-food allergy syndrome: A not so rare disease in childhood. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 55(10).
- Matthes, A., Schmitz-Eiberger, M.** (2009). Apple (*Malus domestica* L. Borkh.) allergen Mal d 1: effect of cultivar, cultivation system, and storage conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(22), 10548–10553.
- Mauro, M., Russello, M., Incorvaia, C., Gazzola, G., Frati, F., Moingeon, P., Passalacqua, G.** (2011). Birch-apple syndrome treated with birch pollen immunotherapy. *International Archives of Allergy and Immunology*, 156(4), 416–422.
- McGhie, T.K., Hunt, M., Barnett, L.E.** (2005). Cultivar and growing region determine the antioxidant polyphenolic concentration and composition of apples grown in New Zealand. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8), 3065–3070.
- Medina, M.B.** (2011a). Determination of the total phenolics in juices and superfruits by a novel chemical method. *Journal of Functional Foods*, 3(2), 79–87.
- Medina, M.B.** (2011b). Simple and rapid method for the analysis of phenolic compounds in beverages and grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(5), 1565–1571.
- Meister, A.** (1988). Glutathione metabolism and its selective modification. *Journal of Biological Chemistry*, 263(33), 17205–17208.
- Metzger, M.J., Rounsevell, M., Acosta-Michlik, L., Leemans, R., Schröter, D.** (2006). The vulnerability of ecosystem services to land use change. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 114(1), 69–85.
- Miller, W.L.** (2007). StAR search--what we know about how the steroidogenic acute regulatory protein mediates mitochondrial cholesterol import. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 21(3), 589–601.

- Mills, E., Madsen, C., Shewry, P., Wichers, H.** (2003). Food allergens of plant origin—their molecular and evolutionary relationships. *Trends in Food Science & Technology*, 14(4), 145–156.
- Minton, A.P.** (2001). The influence of macromolecular crowding and macromolecular confinement on biochemical reactions in physiological media. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(14), 10577–10580.
- Mirza, O., Henriksen, A., Ipsen, H., Larsen, J.N., Wissenbach, M., Spangfort, M.D., Gajhede, M.** (2000). Dominant epitopes and allergic cross-reactivity: complex formation between a Fab fragment of a monoclonal murine IgG antibody and the major allergen from birch pollen Bet v 1. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 165(1), 331–338.
- Mishra, A., Kumar, A.** (2021). Mapping B-cell epitopes for nonspecific lipid transfer proteins of legumes consumed in India and identification of critical residues responsible for IgE binding. *Foods*, 10(6).
- Mittag, D., Batori, V., Neudecker, P., Wiche, R., Friis, E.P., Ballmer-Weber, B.K., Vieths, S., Roggen, E.L.** (2006). A novel approach for investigation of specific and cross-reactive IgE epitopes on Bet v 1 and homologous food allergens in individual patients. *Molecular Immunology*, 43(3), 268–278.
- Mogensen, J.E., Ferreras, M., Wimmer, R., Petersen, S.V., Enghild, J.J., Otzen, D.E.** (2007). The major allergen from birch tree pollen, Bet v 1, binds and permeabilizes membranes. *Biochemistry*, 46(11), 3356–3365.
- 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(26), 23684–23692.
- Moiseyev, G.P., Fedoreyeva, L.I., Zhuravlev, Y.N., Yasnetskaya, E., Jekel, P.A., Beintema, J.J.** (1997). Primary structures of two ribonucleases from ginseng calluses. *FEBS Letters*, 407(2), 207–210.
- Mothes, N., Horak, F., Valenta, R.** (2004). Transition from a botanical to a molecular classification in tree pollen allergy: implications for diagnosis and therapy. *International Archives of Allergy and Immunology*, 135(4), 357–373.
- Mueller, L.A., Goodman, C.D., Silady, R.A., Walbot, V.** (2000). AN9, a petunia glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein. *Plant Physiology*, 123(4), 1561–1570.
- 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. *Molecular Plant*, 3(1), 113–124.
- Muraro, A., Roberts, G., Halken, S., Agache, I., Angier, E., Fernandez-Rivas, M., van Gerth Wijk, R., Jutel, M., et al.** (2018). EAACI guidelines on allergen immunotherapy: Executive statement. *Allergy*, 73(4), 739–743.
- Murphy, K., Weaver, C.** (2018a). *Janeway Immunologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Murphy, K., Weaver, C.** (2018b). Wie Antigene den T-Lymphocyten präsentiert werden. In K. Murphy & C. Weaver (Hrsg.), *Janeway Immunologie* (S. 273–326). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Mygind, N., Dahl, R., Bisgaard, H.** (2000). Leukotrienes, leukotriene receptor antagonists, and rhinitis. *Allergy*, 55(5), 421–424.
- Nakamura, R., Teshima, R.** (2013). Proteomics-based allergen analysis in plants. *Journal of Proteomics*, 93, 40–49.
- Napolitano, A., Cascone, A., Graziani, G., Ferracane, R., Scalfi, L., Di Vaio, C., Ritieni, A., Fogliano, V.** (2004). Influence of variety and storage on the polyphenol composition of apple flesh. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(21), 6526–6531.

- Neudecker, P., Lehmann, K., Nerkamp, J., Haase, T., Wangorsch, A., Fötisch, K., Hoffmann, S., Rösch, P., et al. (2003). Mutational epitope analysis of Pru av 1 and Api g 1, the major allergens of cherry (*Prunus avium*) and celery (*Apium graveolens*): correlating IgE reactivity with three-dimensional structure. *The Biochemical Journal*, 376(Pt 1), 97–107.
- 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(25), 22756–22763.
- Niggemann, B., Erdmann, S., Fuchs, T., Henzgen, M., Jäger, L., Kleine-Tebbe, J., Lepp, U., Raithel, M., et al. (2006). Standardisierung von oralen Provokationstests bei Nahrungsmittelallergien. *Allergo Journal*, 15(4), 262–270.
- Nilsson, T., Mann, M., Aebersold, R., Yates, J.R., Bairoch, A., Bergeron, J.J.M. (2010). Mass spectrometry in high-throughput proteomics: Ready for the big time. *Nature Methods*, 7(9), 681–685.
- Nothegger, B., Reider, N., Covaciu, C.E., Cova, V., Ahammer, L., Eidelpes, R., Unterhauser, J., Platzgummer, S., et al. (2020). Allergen-specific immunotherapy with apples: selected cultivars could be a promising tool for birch pollen allergy. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 34(6), 1286–1292.
- 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(13), 5188–5196.
- Orozco-Navarrete, B., Song, J., Casañal, A., Sozzani, R., Flors, V., Sánchez-Sevilla, J.F., Trinkl, J., Hoffmann, T., et al. (2021). Down-regulation of Fra a 1.02 in strawberry fruits causes transcriptomic and metabolic changes compatible with an altered defense response. *Horticulture Research*, 8(1), 58.
- Pacios, L.F., Tordesillas, L., Cuesta-Herranz, J., Compes, E., Sánchez-Monge, R., Palacín, A., Salcedo, G., Díaz-Perales, A. (2008). Mimotope mapping as a complementary strategy to define allergen IgE-epitopes: peach Pru p 3 allergen as a model. *Molecular Immunology*, 45(8), 2269–2276.
- Pagliarani, G., Paris, R., Iorio, A.R., Tartarini, S., Del Duca, S., Arens, P., Peters, S., van de Weg, E. (2012). Genomic organisation of the Mal d 1 gene cluster on linkage group 16 in apple. *Molecular Breeding : New Strategies in Plant Improvement*, 29(3), 759–778.
- Pajno, G.B., Fernandez-Rivas, M., Arasi, S., Roberts, G., Akdis, C.A., Alvaro-Lozano, M., Beyer, K., Bindslev-Jensen, C., et al. (2018). EAACI Guidelines on allergen immunotherapy: IgE-mediated food allergy. *Allergy*, 73(4), 799–815.
- Paris, R., Pagliarani, G., Savazzini, F., Aloisi, I., Iorio, R.A., Tartarini, S., Ricci, G., Del Duca, S. (2017). Comparative analysis of allergen genes and pro-inflammatory factors in pollen and fruit of apple varieties. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, 264, 57–68.
- Pastorello, E.A., Pravettoni, V., Farioli, L., Ispano, M., Fortunato, D., Monza, M., Giuffrida, M.G., Rivolta, F., et al. (1999). Clinical role of a lipid transfer protein that acts as a new apple-specific allergen. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 104(5), 1099–1106.
- Pearson, K. (1895). Notes on regression and inheritance in the case of two parents. *Proceedings of the Royal Society of London*, 58(347-352), 240–242.
- Pereira-Lorenzo, S., Ramos-Cabrer, A.M., Fischer, M. (2009). Breeding Apple (*Malus x Domestica* Borkh). In T.M. Gradziel (Hrsg.), *Breeding Plantation Tree Crops: Temperate Species* (S. 33–81). New York, NY: Springer New York.
- Pérez-Díaz, R., Madrid-Espinoza, J., Salinas-Cornejo, J., González-Villanueva, E., Ruiz-Lara, S. (2016). Differential Roles for VviGST1, VviGST3, and VviGST4 in

- Proanthocyanidin and Anthocyanin Transport in *Vitis vinifera*. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1166.
- Pfaar, O., Bonini, S., Cardona, V., Demoly, P., Jakob, T., Jutel, M., Kleine-Tebbe, J., Klimek, L., et al.** (2018). Perspectives in allergen immunotherapy: 2017 and beyond. *Allergy*, 73 Suppl 104, 5–23.
- Picchi, V., Lo Scalzo, R., Kurze, E., Fibiani, M., Vangdal, E., Schwab, W.** (2019). Impact of year of harvest, genotype and cultivation method on bioactives and Pru d 1 allergen content in plums. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 1–13.
- Piretti, M.V., Gallerani, G., Brodnik, U.** (1996). Polyphenol polymerisation involvement in apple superficial scald. *Postharvest Biology and Technology*, 8(1), 11–18.
- Pirquet, C. v.** (2006). Allergie. *Allergo Journal*, 15(5), 332–333.
- Pomés, A.** (2010). Relevant B cell epitopes in allergic disease. *International Archives of Allergy and Immunology*, 152(1), 1–11.
- Poulsen, L.K., Hummelshoj, L.** (2007). Triggers of IgE class switching and allergy development. *Annals of Medicine*, 39(6), 440–456.
- Poupard, P., Brunel, N., Leduc, N., Viémont, J.-D., Strullu, D.-G., Simoneau, P.** (2001). Expression of a Bet v 1 homologue gene encoding a PR 10 protein in birch roots: induction by auxin and localization of the transcripts by in situ hybridization. *Functional Plant Biology*, 28(1), 57.
- Pree, I., Reisinger, J., Focke, M., Vrtala, S., Pauli, G., van Hage, M., Cromwell, O., Gadermaier, E., et al.** (2007). Analysis of epitope-specific immune responses induced by vaccination with structurally folded and unfolded recombinant Bet v 1 allergen derivatives in man. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 179(8), 5309–5316.
- Prigent, S.V.E., Voragen, A.G.J., van Koningsveld, G.A., Baron, A., Renard, C.M.G.C., Gruppen, H.** (2009). Interactions between globular proteins and procyanidins of different degrees of polymerization. *Journal of Dairy Science*, 92(12), 5843–5853.
- Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K.** (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302.
- Prussin, C., Metcalfe, D.D.** (2006). 5. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117(2 Suppl Mini-Primer), S450–456.
- Puc, M.** (2003). Characterisation of pollen allergens. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 10(2), 143–149.
- Puehringer, H.** (2003). MdAP, a novel protein in apple, is associated with the major allergen Mal d 1. *Gene*, 321, 173–183.
- Pühringer, H., Moll, D., Hoffmann-Sommergruber, K., Watillon, B., Katinger, H., da Câmara Machado, M.L.** (2000). The promoter of an apple Ypr10 gene, encoding the major allergen Mal d 1, is stress- and pathogen-inducible. *Plant Science*, 152(1), 35–50.
- Radauer, C., Breiteneder, H.** (2007). Evolutionary biology of plant food allergens. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120(3), 518–525.
- Ramachandran, S., Christensen, H.E., Ishimaru, Y., Dong, C.H., Chao-Ming, W., Cleary, A.L., Chua, N.H.** (2000). Profilin plays a role in cell elongation, cell shape maintenance, and flowering in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 124(4), 1637–1647.
- 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. Bundesinstitut für Risikobewertung.
- Ring, J.** (2014). History of allergy in antiquity. *Chemical Immunology and Allergy*, 100, 2–14.

- Ring, L., Yeh, S.-Y., Hücherig, S., Hoffmann, T., Blanco-Portales, R., Fouche, M., Villatoro, C., Denoyes, B., et al.** (2013). Metabolic interaction between anthocyanin and lignin biosynthesis is associated with peroxidase FaPRX27 in strawberry fruit. *Plant Physiology*, 163(1), 43–60.
- Rocha, A., Morais, A.** (2001). Characterization of polyphenoloxidase (PPO) extracted from ‘Jonagored’ apple. *Food Control*, 12(2), 85–90.
- Romer, E., Chebib, S., Bergmann, K.-C., Plate, K., Becker, S., Ludwig, C., Meng, C., Fischer, T., et al.** (2020). Tiered approach for the identification of Mal d 1 reduced, well tolerated apple genotypes. *Scientific Reports*, 10(1), 9144.
- Romer, E.J.** (2021). Untersuchungen zur Abhängigkeit der Allergenität von Apfelgenotypen vom Mal d 1-Gesamtgehalt, den Mal d 1-Proteinvarianten und dem Polyphenolgehalt. Dissertation. Technische Universität München, Freising.
- RStudio Team** (2020). RStudio: Integrated Development for R. Boston, MA: RStudio, PBC.
- Rudeschko, O., Fahlbusch, B., Henzgen, M., Schlenvoigt, G., Herrmann, D., Jäger, L.** (1995a). Optimization of apple allergen preparation for in vivo and in vitro diagnostics. *Allergy*, 50(3), 262–268.
- Rudeschko, O., Fahlbusch, B., Henzgen, M., Schlenvoigt, G., Herrmann, D., Vieths, S., Jäger, L.** (1995b). Investigation of the stability of apple allergen extracts. *Allergy*, 50(7), 575–580.
- Rupasinghe, H.P.V., Murr, D.P., Paliyath, G., Skog, L.** (2000). Inhibitory effect of 1-MCP on ripening and superficial scald development in ‘McIntosh’ and ‘Delicious’ apples. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 75(3), 271–276.
- Saitou, N., Nei, M.** (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425.
- Salcedo, G., Sanchez-Monge, R., Diaz-Perales, A., Garcia-Casado, G., Barber, D.** (2004). Plant non-specific lipid transfer proteins as food and pollen allergens. *Clinical Experimental Allergy*, 34(9), 1336–1341.
- Sánchez-Monge, R., Lombardero, M., García-Sellés, F.J., Barber, D., Salcedo, G.** (1999). Lipid-transfer proteins are relevant allergens in fruit allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 103(3), 514–519.
- Sancho, A.I., Foxall, R., Browne, T., Dey, R., Zuidmeer, L., Marzban, G., Waldron, K.W., van Ree, R., et al.** (2006a). Effect of postharvest storage on the expression of the apple allergen Mal d 1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(16), 5917–5923.
- Sancho, A.I., Foxall, R., Rigby, N.M., Browne, T., Zuidmeer, L., van Ree, R., Waldron, K.W., Mills, E.N.C.** (2006b). Maturity and storage influence on the apple (*Malus domestica*) allergen Mal d 3, a nonspecific lipid transfer protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(14), 5098–5104.
- Sancho, A.I., Wangorsch, A., Jensen, B.M., Watson, A., Alexeev, Y., Johnson, P.E., Mackie, A.R., Neubauer, A., et al.** (2011). Responsiveness of the major birch allergen Bet v 1 scaffold to the gastric environment: impact on structure and allergenic activity. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55(11), 1690–1699.
- Sannomaru, Y., Katayama, O., Kashimura, Y., Kaneko, K.** (1998). Changes in polyphenol content and polyphenoloxidase activity of apple fruits during ripening process. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, 45(1), 37–43.
- Sanoner, P., Guyot, S., Marnet, N., Molle, D., Drilleau, J.P.** (1999). Polyphenol profiles of French cider apple varieties (*Malus domestica* sp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(12), 4847–4853.
- Santos-Buelga, C., Scalbert, A.** (2000). Proanthocyanidins and tannin-like compounds - nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1094–1117.

- Saraste, M., Sibbald, P.R., Wittinghofer, A.** (1990). The P-loop — a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 15(11), 430–434.
- Saure, M.C.** (1990). External control of anthocyanin formation in apple. *Scientia Horticulturae*, 42(3), 181–218.
- Sawa, T., Nakao, M., Akaike, T., Ono, K., Maeda, H.** (1999). Alkylperoxyl radical-scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: implications for the anti-tumor-promoter effect of vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(2), 397–402.
- Scalzo, J., Politi, A., Pellegrini, N., Mezzetti, B., Battino, M.** (2005). Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. *Nutrition*, 21(2), 207–213.
- 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 Biology*, 9, 24.
- Schenk, M.F., Fischer, A.R., Frewer, L.J., Gilissen, L.J., Jacobsen, E., Smulders, M.J.** (2008). The influence of perceived benefits on acceptance of GM applications for allergy prevention. *Health, Risk & Society*, 10(3), 263–282.
- Schenk, M.F., Gilissen, L.J., Esselink, G.D., Smulders, M.J.** (2006). Seven different genes encode a diverse mixture of isoforms of Bet v 1, the major birch pollen allergen. *BMC Genomics*, 7, 168.
- Scheurer, S., van Ree, R., Vieths, S.** (2021). The role of lipid transfer proteins as food and pollen allergens outside the mediterranean area. *Current Allergy and Asthma Reports*, 21(2), 7.
- Schimek, E.M., Zwölfer, B., Briza, P., Jahn-Schmid, B., Vogel, L., Vieths, S., Ebner, C., Bohle, B.** (2005). Gastrointestinal digestion of Bet v 1-homologous food allergens destroys their mediator-releasing, but not T cell-activating, capacity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 116(6), 1327–1333.
- 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 Chemistry*, 127(4), 1459–1464.
- Schouten, H.J., Krens, F.A., Jacobsen, E.** (2006). Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants: international regulations for genetically modified organisms should be altered to exempt cisgenesis. *EMBO Reports*, 7(8), 750–753.
- Schumann, W., Ferreira, L.C.S.** (2004). Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Genetics and Molecular Biology*, 27(3), 442–453.
- 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. *Biological Chemistry*, 389(7), 919–923.
- Senti, G., Prinz Vavricka, B.M., Erdmann, I., Diaz, M.I., Markus, R., McCormack, S.J., Simard, J.J., Wüthrich, B., et al.** (2008). Intralymphatic allergen administration renders specific immunotherapy faster and safer: a randomized controlled trial. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(46), 17908–17912.
- 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. *The Biochemical Journal*, 457(3), 379–390.
- Seutter von Loetzen, C., Jacob, T., Hartl-Spiegelhauer, O., Vogel, L., Schiller, D., Spörlein-Güttler, C., Schobert, R., Vieths, S., et al.** (2015). Ligand recognition of the major birch pollen allergen Bet v 1 is isoform dependent. *PLoS One*, 10(6), e0128677.
- Sevastyanovich, Y.R., Alfasi, S.N., Cole, J.A.** (2010). Sense and nonsense from a systems biology approach to microbial recombinant protein production. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 55(1), 9–28.

- Shaheen, N., Halima, O., Akhter, K.T., Nuzhat, N., Rao, R.S.P., Wilson, R.S., Ahsan, N.** (2019). Proteomic characterization of low molecular weight allergens and putative allergen proteins in lentil (*Lens culinaris*) cultivars of Bangladesh. *Food Chemistry*, 297, 124936.
- Shi, Y., Jiang, L., Zhang, L., Kang, R., Yu, Z.** (2014). Dynamic changes in proteins during apple (*Malus x domestica*) fruit ripening and storage. *Horticulture Research*, 1, 6.
- Shoji, T., Mutsuga, M., Nakamura, T., Kanda, T., Akiyama, H., Goda, Y.** (2003). Isolation and structural elucidation of some procyanidins from apple by low-temperature nuclear magnetic resonance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(13), 3806–3813.
- Shulman, S.T.** (2017). Clemens von Pirquet: A Remarkable Life and Career. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, 6(4), 376–379.
- Sicherer, S.H., Teuber, S.** (2004). Current approach to the diagnosis and management of adverse reactions to foods. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114(5), 1146–1150.
- Siekierzynska, A., Piasecka-Kwiatkowska, D., Litwinczuk, W., Burzynska, M., Mysza, A., Karpinski, P., Zygal, E., Piorecki, N., et al.** (2021). Molecular and immunological identification of low allergenic fruits among old and new apple varieties. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7).
- Sigumoto, E.S., Gut, J.A.W.** (2017). Validation of spectrophotometric microplate methods for polyphenol oxidase and peroxidase activities analysis in fruits and vegetables. *Food Science and Technology*, 37(suppl 1), 148–153.
- Simons, F.E.R.** (2004). Advances in H1-antihistamines. *The New England Journal of Medicine*, 351(21), 2203–2217.
- Singh, M.B., Bhalla, P.L.** (2008). Genetic engineering for removing food allergens from plants. *Trends in Plant Science*, 13(6), 257–260.
- Singh, S.M., Panda, A.K.** (2005). Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99(4), 303–310.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M.** (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Oxidants and Antioxidants Part A* (S. 152–178). Elsevier.
- Smole, U., Balazs, N., Hoffmann-Sommergruber, K., Radauer, C., Hafner, C., Wallner, M., Ferreira, F., Grössinger, R., et al.** (2010). Differential T-cell responses and allergen uptake after exposure of dendritic cells to the birch pollen allergens Bet v 1.0101, Bet v 1.0401 and Bet v 1.1001. *Immunobiology*, 215(11), 903–909.
- Soh, W.T., Aglas, L., Mueller, G.A., Gilles, S., Weiss, R., Scheiblhofer, S., Huber, S., Scheidt, T., et al.** (2019). Multiple roles of Bet v 1 ligands in allergen stabilization and modulation of endosomal protease activity. *Allergy*, 74(12), 2382–2393.
- Somssich, I.E., Schmelzer, E., Bollmann, J., Hahlbrock, K.** (1986). Rapid activation by fungal elicitor of genes encoding "pathogenesis-related" proteins in cultured parsley cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(8), 2427–2430.
- 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. *European Journal of Nutrition*, 38(4), 201–215.
- Sørensen, H.P., Mortensen, K.K.** (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 115(2), 113–128.
- Spangfort, M.D., Mirza, O., Ipsen, H., van Neerven, R.J.J., Gajhede, M., Larsen, J.N.** (2003). Dominating IgE-binding epitope of Bet v 1, the major allergen of birch pollen, characterized by X-ray crystallography and site-directed mutagenesis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 171(6), 3084–3090.

- Speer, C., Gahr, M.** (2009). Pädiatrie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Stastna, M., van Eyk, J.E.** (2012). Analysis of protein isoforms: can we do it better? *Proteomics*, 12(19-20), 2937–2948.
- Stills, H.F.** (2012). Polyclonal Antibody Production. In *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents* (S. 259–274). Elsevier.
- Sun, W., Meng, X., Liang, L., Jiang, W., Huang, Y., He, J., Hu, H., Almqvist, J., et al.** (2015). Molecular and biochemical analysis of chalcone synthase from Freesia hybrid in flavonoid biosynthetic pathway. *PLoS One*, 10(3), e0119054.
- Swoboda, I., Jilek, A., Ferreira, F., Engel, E., Hoffmann-Sommergruber, K., Scheiner, O., Kraft, D., Breiteneder, H., et al.** (1995a). Isoforms of Bet v 1, the major birch pollen allergen, analyzed by liquid chromatography, mass spectrometry, and cDNA cloning. *The Journal of Biological Chemistry* (Vol. 270, No.6), 2617–2613.
- Swoboda, I., Jilek, A., Ferreira, F., Engel, E., Hoffmann-Sommergruber, K., Scheiner, O., Kraft, D., Breiteneder, H., et al.** (1995b). Isoforms of Bet v 1, the major birch pollen allergen, analyzed by liquid chromatography, mass spectrometry, and cDNA cloning. *Journal of Biological Chemistry*, 270(6), 2607–2613.
- Swoboda, I., Scheiner, O., Kraft, D., Breitenbach, M., Heberle-Bors, E., Vicente, O.** (1994). A birch gene family encoding pollen allergens and pathogenesis-related proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1219(2), 457–464.
- Syed, A., Kohli, A., Nadeau, K.C.** (2013). Food allergy diagnosis and therapy: where are we now? *Immunotherapy*, 5(9), 931–944.
- Szabó, E.E., Takács, K.** (2018). Distinction of apple cultivars according to their mal D 1 allergen coding genes using PCR technique. *Acta Alimentaria*, 47(4), 395–401.
- Tarozzi, A., Marchesi, A., Cantelli-Forti, G., Hrelia, P.** (2004). Cold-storage affects antioxidant properties of apples in Caco-2 cells. *The Journal of Nutrition*, 134(5), 1105–1109.
- Toda, M., Heilmann, M., Ilchmann, A., Vieths, S.** (2014). The Maillard reaction and food allergies: is there a link? *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 52(1), 61–67.
- Tomás-Barberán, F.A., Espín, J.C.** (2001). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(9), 853–876.
- Tordesillas, L., Pacios, L.F., Palacín, A., Cuesta-Herranz, J., Madero, M., Díaz-Perales, A.** (2010). Characterization of IgE epitopes of Cuc m 2, the major melon allergen, and their role in cross-reactivity with pollen profilins. *Clinical Experimental Allergy*, 40(1), 174–181.
- Tosca, M.A., Olcese, R., Licari, A., Ciprandi, G.** (2020). Allergen immunotherapy and asthma. *Pediatric Allergy and Immunology: Official Publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*, 31 Suppl 24, 46–48.
- Treutter, D.** (2001). Biosynthesis of phenolic compounds and its regulation in apple. *Plant Growth Regulation*, 34(1), 71–89.
- Treutter, D.** (2010). Managing phenol contents in crop plants by phytochemical farming and breeding-vision and constraints. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(3), 807–857.
- Trott, O., Olson, A.J.** (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), 455–461.
- Tsao, R., Yang, R., Young, J.C., Zhu, H.** (2003). Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(21), 6347–6353.

- Tsiatsiani, L., Heck, A.J.R.** (2015). Proteomics beyond trypsin. *The FEBS Journal*, 282(14), 2612–2626.
- Tsujishita, Y., Hurley, J.H.** (2000). Structure and lipid transport mechanism of a StAR-related domain. *Nature Structural Biology*, 7(5), 408–414.
- Tsurutani, M., Yanagida, Y., Hagiwara, S., Murata, M., Homma, S.** (2002). Comparison of soluble and plastidal polyphenol oxidase in mature apples. *Food Science and Technology Research*, 8(1), 42–44.
- Uehara, M., Sato, K., Abe, Y., Katagiri, M.** (2001). Sequential IgE epitope analysis of a birch pollen allergen (Bet v1) and an apple allergen (Mal d1). *Allergology International*(Vol.50 No.1).
- Umemura, H., Otagaki, S., Wada, M., Kondo, S., Matsumoto, S.** (2013). Expression and functional analysis of a novel MYB gene, MdMYB110a_JP, responsible for red flesh, not skin color in apple fruit. *Planta*, 238(1), 65–76.
- United States Department of Agriculture** (2019). Food Composition Database—Apples, Raw, with Skin. <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/171688/nutrients>. Zugegriffen: 7. Oktober 2021.
- Urbanek, R., Nemat, K.** (2019). Allergologie. *Pädiatrie*, 253–263.
- Utriainen, M., Kokko, H., Auriola, S., Sarrazin, O., Kärenlampi, S.** (1998). PR-10 protein is induced by copper stress in roots and leaves of a Cu/Zn tolerant clone of birch, *Betula pendula*. *Plant, Cell & Environment*, 21(8), 821–828.
- Valenta, R., Duchene, M., Vrtala, S., Birkner, T., Ebner, C., Hirschwehr, R., Breitenbach, M., Rumpold, H., et al.** (1991). Recombinant allergens for immunoblot diagnosis of tree-pollen allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 88(6), 889–894.
- van Breda, S.G.J., Kok, T.M.C.M. de** (2018). Smart combinations of bioactive compounds in fruits and vegetables may guide new strategies for personalized prevention of chronic diseases. *Molecular Nutrition & Food Research*, 62(1).
- van der Maas, M.P., Schenk, M.F.** (2009). Development of a protocol that allows safe consumption of the hypoallergenic apple cultivar santana. *Acta Horticulturae*(841), 549–552.
- van der Sluis, A.A., Dekker, M., Jager, A. de, Jongen, W.M.** (2001). Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 3606–3613.
- van der Sluis, A.A., Dekker, M., Jongen, W., Jager, A. de** (2003). Polyphenolic antioxidants in apples; Effect of storage conditions on four cultivars. *Acta Horticulturae*(600), 533–540.
- van Ree, R.** (2002). Clinical importance of non-specific lipid transfer proteins as food allergens. *Biochemical Society Transactions*, 30(Pt 6), 910–913.
- van Regenmortel, M.H.** (1989). The concept and operational definition of protein epitopes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 323(1217), 451–466.
- Vanek-Krebitz, M., Hoffmann-Sommergruber, K., Laimer Da Camara Machado, M., Susani, M., Ebner, C., Kraft, D., Scheiner, O., Breiteneder, H.** (1995). Cloning and sequencing of Mal d 1, the major allergen from apple (*Malus domestica*), and its immunological relationship to Bet v 1, the major birch pollen allergen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 214(2), 538–551.
- Vázquez-Ortiz, M., Alvaro-Lozano, M., Alsina, L., Garcia-Paba, M.B., Piquer-Gibert, M., Giner-Muñoz, M.T., Lozano, J., Domínguez-Sánchez, O., et al.** (2013). Safety and predictors of adverse events during oral immunotherapy for milk allergy: severity of reaction at oral challenge, specific IgE and prick test. *Clinical and Experimental Allergy*, 43(1), 92–102.

- Veberic, R., Schmitzer, V., Petkovsek, M.M., Stampar, F.** (2010). Impact of shelf life on content of primary and secondary metabolites in apple (*Malus domestica* Borkh.). *Journal of Food Science*, 75(9), S461-8.
- Vegro, M., Eccher, G., Populin, F., Sorgato, C., Savazzini, F., Pagliarani, G., Tartarini, S., Pasini, G., et al.** (2016). Old apple (*Malus domestica* L. Borkh) varieties with hypoallergenic properties: An integrated approach for studying apple allergenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(48), 9224–9236.
- Velasco, R., Zharkikh, A., Affourtit, J., Dhingra, A., Cestaro, A., Kalyanaraman, A., Fontana, P., Bhatnagar, S.K., et al.** (2010). The genome of the domesticated apple (*Malus* × *domestica* Borkh.). *Nature Genetics*, 42(10), 833–839.
- Velazhahan, R., Muthukrishnan, S.** (2003). Transgenic tobacco plants constitutively overexpressing a rice thaumatin-like protein (PR-5) show enhanced resistance to *Alternaria alternata*. *Biologia Plantarum*, 46(3), 347–354.
- Venisse, J.-S., Malnoy, M., Faize, M., Paulin, J.-P., Brisset, M.-N.** (2002). Modulation of defense responses of *Malus* spp. during compatible and incompatible interactions with *Erwinia amylovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(12), 1204–1212.
- Vieths, S., Jankiewicz, A., Schöning, B., Aulepp, H.** (1994). Apple allergy: the IgE-binding potency of apple strains is related to the occurrence of the 18-kDa allergen. *Allergy*, 49(4), 262–271.
- Vieths, S., Scheurer, S., Ballmer-Weber, B.K.** (2002). Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. *Annals New York Academy of Sciences*(964), 47–68.
- Vieths, S., Schöning, B., Jankiewicz, A.** (1993). Occurrence of IgE binding allergens during ripening of apple fruits. *Food and Agricultural Immunology*, 5(2), 93–105.
- Vinson, J.A., Su, X., Zubik, L., Bose, P.** (2001). Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5315–5321.
- Vlieg-Boerstra, B.J., van de Weg, W.E., van der Heide, S., Kerkhof, M., Arens, P., Heijerman-Peppelman, G., Dubois, A.E.J.** (2011). Identification of low allergenic apple cultivars using skin prick tests and oral food challenges. *Allergy*, 66(4), 491–498.
- Vrhovsek, U., Rigo, A., Tonon, D., Mattivi, F.** (2004). Quantitation of polyphenols in different apple varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(21), 6532–6538.
- Wagner, S., Radauer, C., Bublin, M., Hoffmann-Sommergruber, K., Kopp, T., Greisenegger, E.K., Vogel, L., Vieths, S., et al.** (2008). Naturally occurring hypoallergenic Bet v 1 isoforms fail to induce IgE responses in individuals with birch pollen allergy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(1), 246–252.
- Wang, C., Wang, Y., Liu, G., Fu, L.** (2020). Food allergomics based on high-throughput and bioinformatics technologies. *Food Research International*, 130, 108942.
- Wang, C.S., Huang, J.C., Hu, J.H.** (1999). Characterization of two subclasses of PR-10 transcripts in lily anthers and induction of their genes through separate signal transduction pathways. *Plant Molecular Biology*, 40(5), 807–814.
- Wang, J., Vanga, S.K., Raghavan, V.** (2019). Effect of pre-harvest and post-harvest conditions on the fruit allergenicity: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(7), 1027–1043.
- Wang, X., Li, C., Liang, D., Zou, Y., Li, P., Ma, F.** (2015). Phenolic compounds and antioxidant activity in red-fleshed apples. *Journal of Functional Foods*, 18, 1086–1094.
- Ward, J.H.** (1963). Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association*, 58(301), 236–244.
- Wiche, R., Gubesch, M., König, H., Fötisch, K., Hoffmann, A., Wangorsch, A., Scheurer, S., Vieths, S.** (2005). Molecular basis of pollen-related food allergy: identification of a

- second cross-reactive IgE epitope on Pru av 1, the major cherry (*Prunus avium*) allergen. *The Biochemical Journal*, 385(Pt 1), 319–327.
- Wigotzki, M.** (2001). Einfluss der technologischen Verarbeitung auf das allergene Potential der birkenpollenassoziierten Lebensmittel Haselnuß, Apfel und Karotte. Dissertation. Universität Hamburg.
- Wilkins, M.R., Pasquali, C., Appel, R.D., Ou, K., Golaz, O., Sanchez, J.C., Yan, J.X., Gooley, A.A., et al.** (1996). From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Nature Biotechnology*, 14(1), 61–65.
- Wingate, V.P., Lawton, M.A., Lamb, C.J.** (1988). Glutathione causes a massive and selective induction of plant defense genes. *Plant Physiology*, 87(1), 206–210.
- Winkel-Shirley, B.** (2001). Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology*, 126(2), 485–493.
- Witke, W.** (2004). The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes. *Trends in cell biology*, 14(8), 461–469.
- Wojdyło, A., Oszmiański, J., Laskowski, P.** (2008). Polyphenolic compounds and antioxidant activity of new and old apple varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), 6520–6530.
- Wu, Z., Lian, J., Han, Y., Zhou, N., Li, X., Yang, A., Tong, P., Chen, H.** (2016). Crosslinking of peanut allergen Ara h 2 by polyphenol oxidase: digestibility and potential allergenicity assessment. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(10), 3567–3574.
- Wüthrich, B.** (2014). History of food allergy. *Chemical Immunology and Allergy*, 100, 109–119.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K.** (2006). Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 781–803.
- Yang, X., Song, J., Campbell-Palmer, L., Walker, B., Zhang, Z.** (2012). Allergen related gene expression in apple fruit is differentially controlled by ethylene during ripening. *Postharvest Biology and Technology*, 63(1), 40–49.
- Yano, S., Tachibana, H., Yamada, K.** (2005). Flavones suppress the expression of the high-affinity IgE receptor FcεRI in human basophilic KU812 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1812–1817.
- Yoruk, R., Marshall, M.R.** (2003). Physicochemical properties and function of plant polyphenols oxidase: A review. *Journal of Food Biochemistry*, 27(5), 361–422.
- Zaborsky, N., Brunner, M., Wallner, M., Himly, M., Karl, T., Schwarzenbacher, R., Ferreira, F., Achatz, G.** (2010). Antigen aggregation decides the fate of the allergic immune response. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 184(2), 725–735.
- Zhang, J., Chen, S., Li, Y., Di, B., Zhang, J., Liu, Y.** (2008). Effect of high temperature and excessive light on glutathione content in apple peel. *Frontiers of Agriculture in China*, 2(1), 97–102.
- Zhang, Q., Yang, J., Bautista, J., Badithe, A., Olson, W., Liu, Y.** (2018). Epitope mapping by HDX-MS elucidates the surface coverage of antigens associated with high blocking efficiency of antibodies to birch pollen allergen. *Analytical chemistry*, 90(19), 11315–11323.
- Zhang, Y., Fonslow, B.R., Shan, B., Baek, M.-C., Yates, J.R.** (2013). Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. *Chemical reviews*, 113(4), 2343–2394.
- Zhao, J.** (2015). Flavonoid transport mechanisms: how to go, and with whom. *Trends in Plant Science*, 20(9), 576–585.

- Zhao, J., Dixon, R.A.** (2009). MATE transporters facilitate vacuolar uptake of epicatechin 3'-O-glucoside for proanthocyanidin biosynthesis in *Medicago truncatula* and *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 21(8), 2323–2340.
- Zhao, Y., Dong, W., Zhu, Y., Allan, A.C., Lin-Wang, K., Xu, C.** (2020). PpGST1, an anthocyanin-related glutathione S-transferase gene, is essential for fruit coloration in peach. *Plant biotechnology journal*, 18(5), 1284–1295.
- Zheng, Q., Song, J., Campbell-Palmer, L., Thompson, K., Li, L., Walker, B., Cui, Y., Li, X.** (2013). A proteomic investigation of apple fruit during ripening and in response to ethylene treatment. *Journal of Proteomics*, 93, 276–294.
- Zubini, P., Zambelli, B., Musiani, F., Ciurli, S., Bertolini, P., Baraldi, E.** (2009). The RNA hydrolysis and the cytokinin binding activities of PR-10 proteins are differently performed by two isoforms of the Pru p 1 peach major allergen and are possibly functionally related. *Plant Physiology*, 150(3), 1235–1247.
- Zuidmeer, L., Goldhahn, K., Rona, R.J., Gislason, D., Madsen, C., Summers, C., Sodergren, E., Dahlstrom, J., et al.** (2008). The prevalence of plant food allergies: a systematic review. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(5), 1210-1218.e4.
- Zuidmeer, L., van Leeuwen, W.A., Kleine Budde, I., Breiteneder, H., Ma, Y., Mills, C., Sancho, A.I., Meulenbroek, E.J., et al.** (2006). Allergenicity assessment of apple cultivars: hurdles in quantifying labile fruit allergens. *International Archives of Allergy and Immunology*, 141(3), 230–240.