



Die nächste Ebene der Allergenquantifizierung

Quantifizierungsmethode zur isoallergenspezifischen Bestimmung des Apfelallergens Mal d 1

Dr. Maria Buchweitz | Julia Kaeswurm | Leonie Straub | Prof. Dr. Jens Brockmeyer

Darstellung einer Methode zur Quantifizierung und Untersuchung des Isoallergenprofils verschiedener Apfelsorten, um hierdurch die Entwicklung eines allergikerfreundlichen Apfels zu unterstützen.

Der Apfel (*Malus domestica* Bork.) ist schon seit langem ein ambivalentes Symbol im europäischen Kulturkreis. So steht er einerseits für Gesundheit, ewige Jugend, Fruchtbarkeit und Reichtum aber auch für Zwietracht und Versuchung. Heutzutage sind Äpfel, auch aufgrund ihrer ganzjährigen Verfügbarkeit im Handel, mit Abstand das beliebteste Obst der Deutschen mit einem jährlichen Verzehr von über 24 kg (2020/21, Statistisches Bundesamt). Denn ob säuerlicher und giftgrüner Granny Smith, süßer und saftiger Gala oder eine der vielen traditionellen Apfelsorten, die in deutschen Gärten und Streuobstwiesen zu finden sind, es ist für jeden Geschmack etwas dabei. Die Anbaubedingungen für Äpfel sind in Mitteleuropa ideal, weshalb der Apfel auch wirtschaftlich in Deutschland von großer Bedeutung ist.

Gesundheitlicher Nutzen von Äpfeln

Positive Effekte von Äpfeln auf die Gesundheit sind seit der Antike bekannt. Heute besteht ein breites Wissen über die ernährungsphysiologisch hochwertigen Inhaltsstoffe, so sind die Früchte reich an Vitaminen, sekundären Pflanzenstoffen, wie z.B. Polyphenolen, und Ballaststoffen. Ein regelmäßiger Konsum von Äpfeln soll zur Vorbeugung verschiedener Krankheiten beitragen. So wird beispielsweise postuliert, dass ein regelmäßiger Apfelkonsum das Risiko für kardiovaskulären Erkrankungen und Diabetes senken kann [1]. Allerdings meiden geschätzt 2 % der Bevölkerung in Europa den Verzehr frischer Äpfel, da sie auf diese allergisch reagieren [2]. In Nord- und Mitteleuropa ist dies auf eine pollenassoziierte Lebensmittelallergie zurückzuführen. Hierbei handelt es sich um eine Kreuzallergie, da das Apfelallergen Mal d 1 in seiner Struktur homolog zum Hauptallergen in Birkenpollen, dem Bet v 1, ist (Abb. 1). Es wird deshalb geschätzt, dass 70% aller Birkenpollenallergiker im Laufe ihres Lebens eine Allergie gegen Äpfel entwickeln [3]. Neben Äpfeln sind auch in weiteren Obst- und Gemüsearten dem Bet v 1 homologe Proteine enthalten, die zu allergischen Reaktionen führen kön-

nen. Beispiele hierfür sind Pru av 1 in Kirschen (*Prunus avium*,) und Dau c 1 in Karotten (*Daucus carota*).

Die Symptome der pollenassoziierten Apfelallergie sind in Mittel- und Nord-europa üblicherweise mild und äußern sich meist durch einen Juckreiz, Kratzen und Anschwellen der Schleimhäute im Mund-Rachen-Raum (Orales Allergie-Syndrom, OAS). Durch die Limitation der Reaktion auf die Mundhöhle und den Rachenraum unterscheiden sich pollenassoziierte Lebensmittelallergien von einer „echten“ Typ 1 Lebensmittelallergie. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die allergieauslösende Struktur bei Kontakt mit Magensäure und gastrointestinalen Proteasen zerstört wird. Zudem beschränkt sich diese allergische Reaktion oft auf den Verzehr frischer Früchte, da die Tertiärstruktur des Allergens durch Erhitzen oder Verarbeitung denaturiert wird.

Einflussfaktoren auf die Allergenität von Äpfeln

Bei Mal d 1 handelt es sich um ein etwa 17,7 kDa schweres Protein, je nach Isoallergen bestehend aus bis zu 161 Aminosäuren (Abb. 2), welches der PR-10 Familie (pathogenesis related protein) angehört. In der Literatur sind über 150 Proteoformen bekannt, die sich in ihrer Aminosäuresequenz unterschiedlich stark unterscheiden. Nach heutigem Wissensstand, lassen sich diese 12 Isoallergene (Mal d 1.01-1.12) zuordnen. Isoallergene sind eine Gruppe von Allergenen einer Spezies, mit vergleichbarem Molekulargewicht, einer Sequenzübereinstimmung von über 67% und gleicher biologischer Funktion [4]. Eine weitere Unterteilung der Isoallergene erfolgt in verschiedene Isoformen, hierbei unterscheiden sich die Sequenzen um nicht mehr als 10%. Gekennzeichnet werden verschiedenen Isoformen durch zwei weitere Ziffern in der Benennung des Allergens (z.B. 1.0101). In Verbraucherumfragen [6] und klinischen Studien [2,7] konnten sortenabhängige Differenzen in der Allergenität beobachtet werden. Bislang

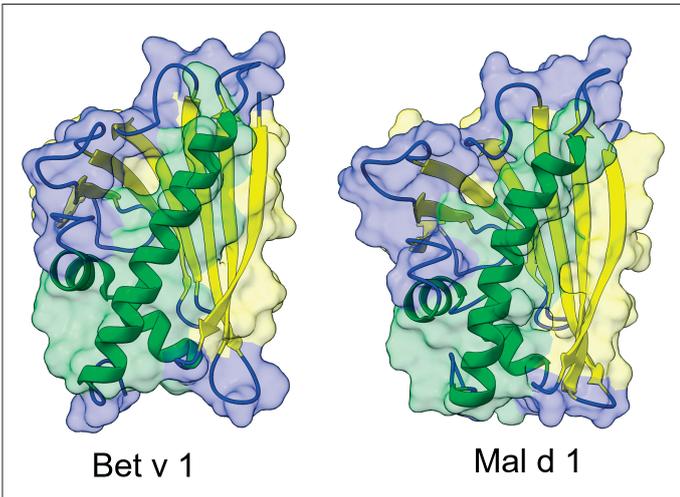


Abb. 1: Räumliche Struktur des Apfelallergens Mal d 1 und des Birkenpollenallergens Bet v 1.

1	10	20	30	40	50
ESTD	MGVYTFENEFTSEIPPSR	LFKAFALDADNLLIPK	IAPQAIKQVEILEGNGB		
1.01	MGVYTFENEFTSEIPPSR	LFKAFVLDADNLLIPK	IAPQAIKQAEIILEGNGB		
1.02	MGVYTFENEFTSEIPPSR	LFKAFVLDADNLLIPK	IAPQAIKQAEIILEGNGB		
1.03	MGVYTFENEFTSEIPPSR	LFNATVLDADNLLIPK	IAPQAVKSAEILEGNGB		
1.04	MGVYTFENEFTSEIPPSR	LFKAFVLDADNLLIPK	IAPQAIKQVEILEGNGB		
1.05	MGVYTFENEFTSEIPPSR	LFKAFVLDADNLLIPK	IAPQAIKQVEILEGNGB		
1.06	MGVYTFENEFTSEIPPSR	LFKAFVLDADNLLIPK	IAPQAVKSAEILEGNGB		
1.07	MGVYTFENEFTSEIPPSR	LFNATVLDADNLLIPK	IAPQAVKSAEILEGNGB		
1.08	MGVYTFENEFTSEIPPSR	LFNATVLDADNLLIPK	IAPQAVKSAEILEGNGB		
1.09	MGVYTFENEFTSEIPPSR	LFNATVLDADNLLIPK	IAPQAVKSAEILEGNGB		
1.10	MGVYTFENEFTSEIPPSR	LFKAFVLDADNLLIPK	IAPQAVKSAEILEGNGB		
60	70	80	90	100	
ESTD	PGTIKKLTFFGEGSQYGVYK	HRIDSIDEASYSYSYTLIEGD	ALTDTIKIKI		
1.01	PGTIKKLTFFGEGSQYGVYK	HRIDSDIEASYSYSYTLIEGD	ALTDTIKIKI		
1.02	PGTIKKLTFFGEGSQYGVYK	HRIDSDIEASYSYSYTLIEGD	ALTDTIKIKI		
1.03	PGTIKKLTFFGEGSQYGVYK	HRIDSDIEASYSYSYTLIEGD	ALTDTIKIKI		
1.04	PGTIKKLTFFGEGSQYGVYK	HRIDSDIEASYSYSYTLIEGD	ALTDTIKIKI		
1.05	PGTIKKLTFFGEGSQYGVYK	HRIDSDIEASYSYSYTLIEGD	ALTDTIKIKI		
1.06	PGTIKKLTFFGEGSQYGVYK	HRIDSDIEASYSYSYTLIEGD	ALTDTIKIKI		
1.07	PGTIKKLTFFGEGSQYGVYK	HRIDSDIEASYSYSYTLIEGD	ALTDTIKIKI		
1.08	PGTIKKLTFFGEGSQYGVYK	HRIDSDIEASYSYSYTLIEGD	ALTDTIKIKI		
1.09	PGTIKKLTFFGEGSQYGVYK	HRIDSDIEASYSYSYTLIEGD	ALTDTIKIKI		
1.10	PGTIKKLTFFGEGSQYGVYK	HRIDSDIEASYSYSYTLIEGD	ALTDTIKIKI		
110	120	130	140	150	
ESTD	SYETKLVAC-GSGSTIKS	ISHYHTKGNIEI...			
1.01	SYETKLVAC-GSGSTIKS	ISHYHTKGNIEI...			
1.02	SYETKLVAS-GSGSTIKS	ISHYHTKGNIEI...			
1.03	SYETKLVAS-GSGSTIKS	ISHYHTKGNIEI...			
1.04	SYETKLVAS-GSGSTIKS	ISHYHTKGNIEI...			
1.05	SYETKLVAS-GSGSTIKS	ISHYHTKGNIEI...			
1.06	SYETKLVAS-GSGSTIKS	ISHYHTKGNIEI...			
1.07	SYETKLVAS-GSGSTIKS	ISHYHTKGNIEI...			
1.08	SYETKLVAS-GSGSTIKS	ISHYHTKGNIEI...			
1.09	SYETKLVAS-GSGSTIKS	ISHYHTKGNIEI...			
1.10	SYETKLVAS-GSGSTIKS	ISHYHTKGNIEI...			

Abb. 2: Zehn Isoallergene des Apfelallergens Mal d 1, mit der Beispielsequenz einer Isoform. Änderungen in der Aminosäuresequenz zu 1.01 sind fett gekennzeichnet, Schnittstellen des tryptischen Verdaus durch einen roten Strich. Ausgewählte Peptidmarker für die Quantifizierung sind farblich hervorgehoben (5). Der Austausch von Aminosäuren im Extraktionsstandard (ESTD) im Vergleich zum Isoallergen 1.01 sind rot markiert.

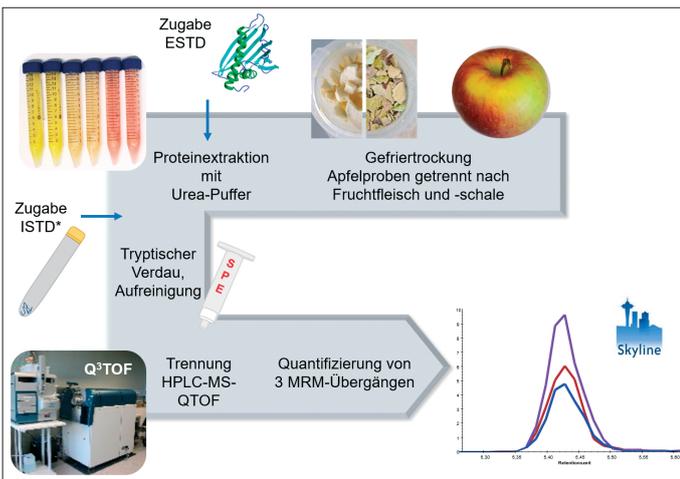


Abb. 3: Probenaufarbeitung zur Quantifizierung des Mal d 1 in Äpfeln.

wurden diese Unterschiede allerdings ausschließlich diagnostisch auf der Effektebene nach oraler Provokation [2,7] oder Hauttests (Skin Prick-Test) und immunochemisch mit Allergikerseren untersucht (2). Bisher konnte die unterschiedliche Allergenität verschiedener Apfelsorten nicht mit dem Gesamtgehalt an Mal d 1 korreliert werden. So werden für Apfelsorten mit vergleichbarem Gehalt an Mal d 1 unterschiedliche allergene Potentiale berichtet [7]. Auffällig ist, dass häufig „neue“ kommerzielle Sorten als

unverträglich und „alte“ nicht kommerzielle Streuobstapfel als besser verträglich beschrieben werden [6]. Derzeit werden verschiedene Hypothesen diskutiert um diese Beobachtung zu erklären.

Einerseits wird postuliert, dass der in vielen traditionellen Sorten hohe Gehalt an polyphenolischen Strukturen zu einer verbesserten Verträglichkeit einer Sorte beiträgt [3]. Hierbei können Polyphenole entweder in ihrer ursprünglichen Struktur, in Form von hochreaktiven Chinonen nach Oxidation durch die Polyphenoloxidase oder nach Weiterreaktion als oligomere Bräunungsprodukte mit dem Allergen interagieren.

Eine weitere Hypothese ist, dass die Isoallergene sich in ihrem allergenen Potential unterscheiden und daher das Isoallergenprofil einer Sorte von Bedeutung ist. Da es sich bei Mal d 1 um ein stressinduziertes Allergen handelt, können sich neben sortenspezifischen Unterschieden auch die Anbaumethode, der Reifestatus bei Ernte, klimatische Effekte und die Lagerung auf den Allergengehalt und das Isoallergenprofil auswirken [2,3].

Neue Methode zur Isoallergenspezifischen Quantifizierung von Mal d 1

Um den möglichen Einfluss des Mal d 1 Gesamtgehalts und der Isoallergenverteilung auf das allergene Potential abschätzen zu können, ist es notwendig, den Mal d 1 Gehalt in den Äpfeln auf Ebene der Isoallergene verlässlich zu quantifizieren. Bisher wurde der Mal d 1 Gehalt überwiegend mittels verschiedenster enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) bestimmt [7,3]. Dieser Ansatz erlaubt jedoch keine Differenzierung der Isoallergene. Außerdem konnten Zuidmeer et al. zeigen, dass verschiedene Immunoassays deutlich abweichende Ergebnisse liefern [8]. Dies beruht zum einen auf der Wahl der eingesetzten Antikörper, aber auch auf Unterschieden in den eingesetzten Proteinextraktionsmethoden. Die Extraktion von vergleichsweise geringen Proteinmengen aus der stark polysaccharidhaltigen Apfelmatrix ist äußerst herausfordernd, insbesondere da bei ELISA primär das native Mal d 1 detektiert wird, welches bei der Extraktion leicht denaturieren kann. Dies kann die Sensitivität der eingesetzten Assays unterschiedlich beeinflussen. Auch mögliche Interaktionen der Polyphenole mit dem nativen Allergen während der Extraktion können zu abweichenden Ergebnissen führen. Der Einsatz eines Extraktionsstandards ist allerdings bei einer Quantifizierung mittels ELISA nicht oder nur durch erheblichen Mehraufwand möglich.

Es wurde daher eine gerichtete massenspektrometrische Methode zu Quantifizierung entwickelt (Abb. 3) [5]. Bei diesem Ansatz werden die extrahierten Proteine zuerst tryptisch verdaut und anschließend an einer HPLC-ESI-Q-TOF in einer zielgerichteten massenspektrometrischen pseudo-MRM-Messung quantifiziert.

Für die Absolutbestimmung des Targetallergens werden absolut quantifizierte ¹³C- und ¹⁵N-isotopenmarkierte Standardpeptide verwendet (Spike Tides). Diese Standards verhalten sich hinsichtlich Retentionszeit und Fragmentierung identisch zu den nativen Markerpeptiden und unterscheiden sich nur in ihrer Masse (Abb. 4) [9]. Zur Quantifizierung werden die Peakflächen dreier Multiple-Reaction-Monitoring (MRM)-Übergänge, also Fragmentierungen des Precursors (Peptidion), des isotopenmarkierten Standards mit denen des nativen Peptids ins Verhältnis gesetzt. Die Auswahl der Standardpeptide erfolgte nach dem *in silico* Verdau der Mal d 1 Isoallergene 1.01-1.10. Die Anwesenheit der Peptide in den Apfelproben wurde in ungerichteten Messungen verifiziert. Nach einer ersten Vorauswahl wurden die massenspektrometrischen Parameter mit kommerziellen Peptiden optimiert. Final konnten für die Isoallergene 1.01, 1.02, 1.03 und 1.06 spezifische Marker (Einzelmarker) und Kombinationsmarker für die Isoallergene 1.04+1.05; 1.01+1.02; 1.02+1.06 und 1.01+1.02+1.05 identifiziert werden (Abb. 2). Mittels der zwei Globalmarker 1.01+1.02+1.04+1.05 und 1.03+1.06-1.10 ist es möglich den Gesamtgehalt aller Isoallergene 1.01-1.10 zu quantifizieren. Die verschiedenen Markertypen ermöglichen die Verifikation der Quantifizierung und zeigen, dass nicht alle mittels *in silico* Verdau identifizierten Einzel- und Kombinationsmarker ohne Weiteres für eine Quantifizierung geeignet sind. Allerdings konnte gezeigt werden, dass durch Auf-

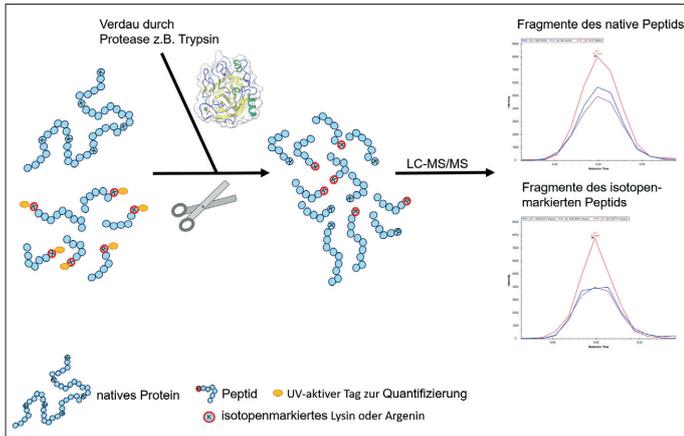


Abb. 4: Prinzip der Isotopen-Verdünnungsanalyse bei Proteinen

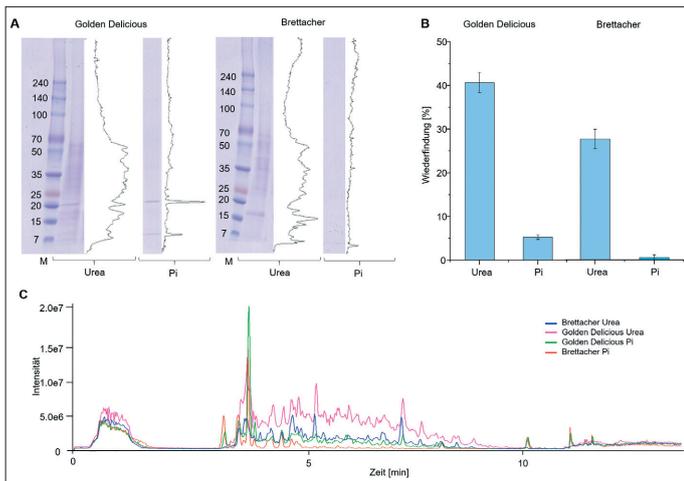


Abb. 5: Unterschiede in der Extrahierbarkeit von Proteinen bei der Verwendung von 6 M Harnstoffpuffer (Urea) und 100 mM Phosphatpuffer (Pi) am Beispiel der Sorten Golden Delicious und Brettacher anhand SDS-PAGE des Proteinextraktes (A), Wiederfindung des Extraktionsstandards (B) und TIC des Massendektors (C).

summieren der Einzelmarker im Schnitt $88 \pm 11\%$ des mittels Globalmarkers quantifizierten Mal d 1 Gesamtgehalts gefunden werden konnte [5]. Der Vorteil dieses massenspektrometrischen Ansatzes ist, dass eine Absolutquantifizierung mehrerer Peptide, d.h. Marker für verschiedene Isoallergene, gleichzeitig durchgeführt werden kann. Da die Tertiärstruktur irrelevant ist und auch denaturierte Proteine quantifiziert werden können, ermöglicht diese Methode den Einsatz von hochmolarem Harnstoffpuffer zur Proteinextraktion aus der Apfelmatrix. Dieser Puffer hat eine besonders hohe Extraktionseffizienz im Vergleich zum üblicherweise verwendeten Phosphatpuffer (Abb. 5) [5], welcher für die Extraktion von nicht-denaturiertem Protein eingesetzt werden muss, und unterbindet darüber hinaus die Oxidation der Polyphenole durch die Polyphenoloxidase und die Interaktion bzw. Reaktion von Polyphenolen mit Proteinen. Zudem wurde die Verwendung eines Extraktionsstandards etabliert (Abb. 3). Dieser erlaubt die Überwachung und Korrektur unterschiedlicher Extraktionseffizienzen in den verschiedenen Proben. Als Standard wurde eine Mutante des Mal d 1.01 in *E. coli* rekombinant exprimiert [10]. Für diese wurden geringfügige Änderungen in der Aminosäuresequenz der Isoform 1.0101 eingeführt, welche die Unterscheidung zum nativen Mal d 1 erlauben (Abb. 2). In ersten Messungen wurde die Bedeutung eines Extraktionsstandards deutlich, denn die Extraktionseffizienz unterschied sich zwischen den untersuchten Proben deutlich. Generell war die Extrahierbarkeit der Schale besser als die des Fruchtfleisches, so wurde aus Fruchtfleischproben der Erntejahre 2020 und 2021 im Schnitt $56 \pm 21\%$ des Extraktionsstandards wiedergefunden, während die Wiederfindung in der Schale bei $72 \pm 19\%$ lag [5]. Aber auch zwischen den Sorten und verschiedenen Erntejahren

gleicher Sorten konnten deutliche Unterschiede beobachtet werden. Dies unterstreicht die Notwendigkeit, die Extraktionseffizienz für jede untersuchte Probe zu bestimmen, um diesen Effekt bei der Beurteilung des Mal d 1 Gehalts in Bezug auf die Allergenität auszuschließen.

Fazit

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die entwickelte Methode die isoallergenspezifische Quantifizierung des Mal d 1 Gehalts ermöglicht und zukünftig eingesetzt wird um den Mal d 1 Gehalt und das Isoallergenprofil verschiedener kommerzieller und traditioneller Apfelsorten zu untersuchen sowie den Effekt von Lagerung, Anbau und klimatischen Bedingungen zu bestimmen. Wir erwarten, dass die von uns entwickelte Methode zukünftig dazu beiträgt den Zusammenhang zwischen der Allergenität, dem Mal d 1 Gehalt, dem Isoallergenprofil, dem Polyphenolgehalt und der Polyphenoloxidaseaktivität, sowie weiterer Einflussfaktoren besser zu verstehen und hierdurch die Entwicklung eines allergikerfreundlichen Apfels zu unterstützen.

Die Methode wurde in der Arbeitsgruppe Polyphenol-Matrix Interaktionen unter Leitung von Dr. Maria Buchweitz in der Abteilung Lebensmittelchemie von Prof. Jens Brockmeyer an der Universität Stuttgart entwickelt. Die Co-Autoren Julia Kaeswurm und Leonie Straub widmeten sich der Thematik im Rahmen ihrer Promotion (J.K.) und Masterthesis (L.S.). Finanziert wurde das Projekt "Interaktion von Polyphenolen mit Proteinen am Beispiel des Apfelallergens Mal d 1" durch die DFG.

Literatur

- [1] Boyer, J.; Liu, R. H. *Nutr J* 2004, DOI: 10.1186/1475-2891-3-5.
- [2] 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.; Hoffmann-Sommergruber, K.; Knulst, A. C.; Gilissen, L. J. W. J. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2005, DOI: 10.1016/j.jaci.2005.07.004.
- [3] Siekierzynska, A.; Piasecka-Kwiatkowska, D.; Myszyka, A.; Burzynska, M.; Sozanska, B.; Sozanski, T. *Clinical and translational allergy* 2021, DOI: 10.1002/ctlt.12032.
- [4] Radauer, C.; Nandy, A.; Ferreira, F.; Goodman, R. E.; Larsen, J. N.; Lidholm, J.; Pomés, A.; Raulf-Heimsoth, M.; Rozynek, P.; Thomas, W. R.; Breiteneder, H. *Allergy* 2014, DOI: 10.1111/all.12348.
- [5] Kaeswurm, J. A. H.; Straub, L. V.; Klußmann, A.; Brockmeyer, J.; Buchweitz, M. *Journal of agricultural and food chemistry* in press, DOI: 10.1021/acs.jafc.2c03745.
- [6] BUND-Ortsgruppe Lemgo. BUND-Lemgo Sortenliste Apfelallergie - Stand Oktober 2021, <https://www.bund-lemgo.de/apfelallergie.html>.
- [7] Romer, E.; Chebib, S.; Bergmann, K.-C.; Plate, K.; Becker, S.; Ludwig, C.; Meng, C.; Fischer, T.; Dierend, W.; Schwab, W. *Sci Rep* 2020, DOI: 10.1038/s41598-020-66051-4.
- [8] Zuidmeer, L.; van Leeuwen, W. A.; Kleine Budde, I.; Breiteneder, H.; Ma, Y.; Mills, C.; Sancho, A. I.; Meulenbroek, E. J.; van de Weg, E.; Gilissen, L.; Ferreira, F.; Hoffmann-Sommergruber, K.; van Ree, R. *International archives of allergy and immunology* 2006, DOI: 10.1159/000095293.
- [9] Lange, V.; Picotti, P.; Doman, B.; Aebersold, R. *Molecular systems biology* 2008, DOI: 10.1038/msb.2008.61.
- [10] Kaeswurm, J. A. H.; Nestl, B.; Richter, S. M.; Emperle, M.; Buchweitz, M. *Methods and protocols* 2020, DOI: 10.3390/mps4010003.



Autoren | Kontakt

**Dr. Maria Buchweitz | Julia Kaeswurm | Leonie Straub
Prof. Dr. Jens Brockmeyer**

Universität Stuttgart | Institut für Biochemie und Technische Biochemie
Abteilung Lebensmittelchemie
Allmandring 5B | 70569 Stuttgart | www.lc.uni-stuttgart.de