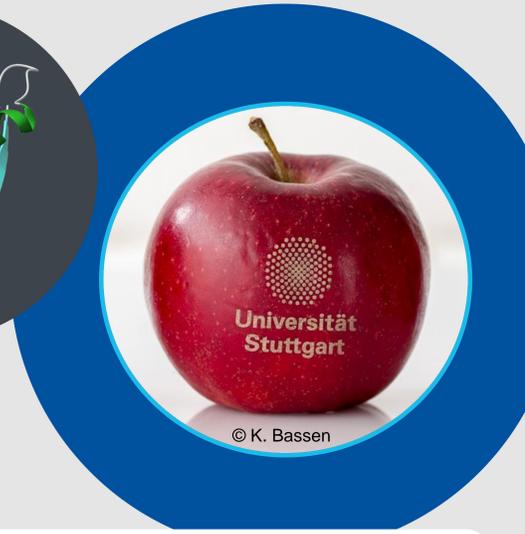
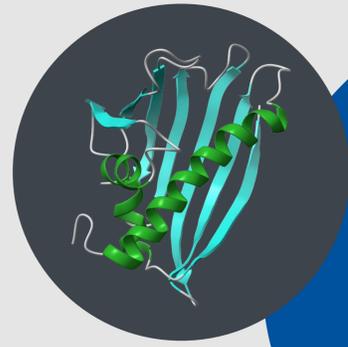


Universität Stuttgart

Institute of Biochemistry and Technical Biochemistry
Department of Food Chemistry

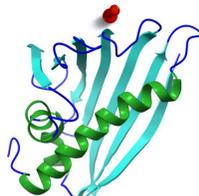


J. Kaeswurm, L. Straub, M. Buchweitz

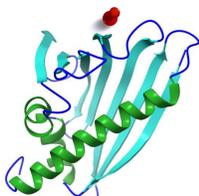
Entwicklung einer isoallergenspezifischen Quantifizierungsmethode für das Apfelallergen Mal d 1 mittels bottom-up Proteomics

Äpfel...

- ... sind das beliebteste Obst in Deutschland ¹
- ... sind eine wichtige Quelle für Vitamine, sekundäre Pflanzen- und Ballaststoffe ²
- ... sind aufgrund der Homologie der Allergene Mal d 1 und Bet v 1 in Apfel und Birke für 70% aller Birkenpollenallergiker allergen ³
- ... besitzen ein sortenspezifisches allergenes Potential ^{4,5}
- Bislang wurde kein Zusammenhang zwischen dem Mal d 1 Gehalt und der Allergenität entdeckt ⁴
- **Hypothese:** Isoallergenverteilung im Apfel beeinflusst das allergene Potential, da Isoallergene sich möglicherweise aufgrund der Differenzen in ihrer Aminosäuresequenz in der Allergenität unterscheiden ⁵
- Bisherige Quantifizierungsmethode (ELISA) erlaubt keine isoallergenspezifische Quantifizierung, weshalb eine MS-basierte Methode entwickelt wurde

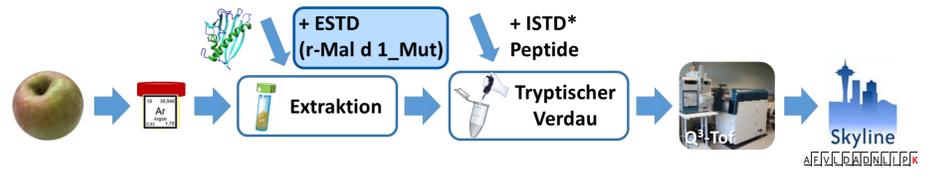


Mal d 1



Bet v 1

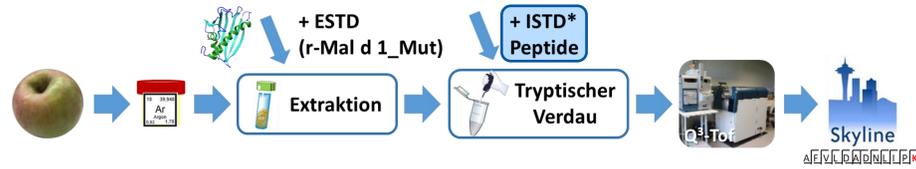
Bedeutung des Extraktionsstandards (ESTD)



- Mal d 1.0101 wurde rekombinant exprimiert ⁶ und während der Extraktion zugesetzt, um mögliche Unterschiede in der Extrahierbarkeit des Proteins aus den unterschiedlichen Äpfeln zu kompensieren
- Extrahierbarkeit ist abhängig vom Erntejahr und der Sorte, allerdings ist kein Zusammenhang zwischen den Sorten in den verschiedenen Jahren zu erkennen
- Extrahierbarkeit aus der Schale höher als aus dem Fruchtfleisch

Erntejahr	Wiederfindung ESTD Fruchtfleisch	Wiederfindung ESTD Schale
2019	Ø 42% (36-69%)	Ø 80% (62-120%)
2020	Ø 63% (40-100%)	Ø 83% (65-96%)

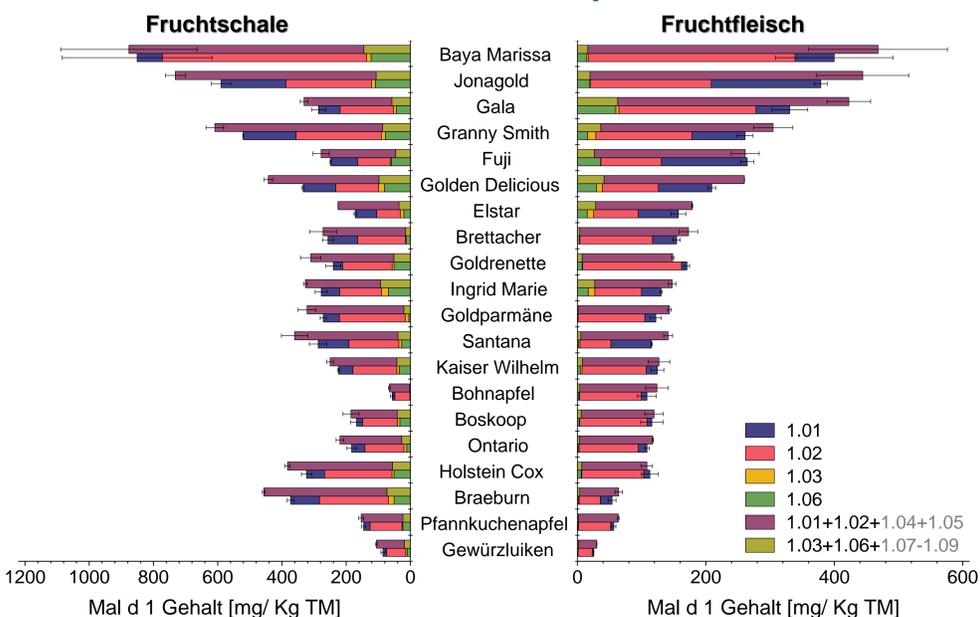
Auswahl der Marker für die Quantifizierung mittels Isotopenverdünnungsanalyse (ISTD*)



Isoallergenspezifische Marker	Summenmarker	Globalmarker	Marker für ESTD
1.01	1.01+1.02	1.01+1.02+1.04+1.05	1.03
1.02	1.01+1.02+1.05	1.03+1.06+1.07+1.08+1.09	1.06
1.03	1.02+1.06		
1.06	1.04+1.05		

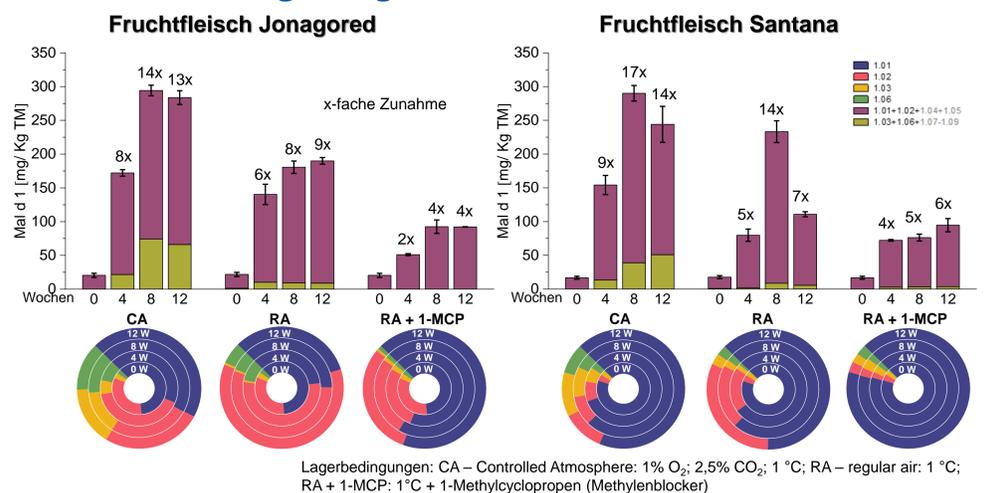
ESTD	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	160																																																					
1.01	MGVYTFENEFTSEI	PPSR	L	F	K	AFVLDADNLI	IPK	I	APQAV	I	K	QVEILEGNG	GGPGTI	K	I	TFEGESQYGY	AK	H	R	I	D	S	I	D	E	A	S	Y	S	Y	T	L	I	E	G	D	A	L	T	D	T	I	E	K	I	S	Y	E	T	K	L	V	A	S	-	G	S	G	S	T	I	K	S	I	S	H	N
1.02	MGVYTFENEFTSEI	PPSR	L	F	K	AFVLDADNLI	IPK	I	APQAV	I	K	QVEILEGNG	GGPGTI	K	I	TFEGESQYGY	AK	H	R	I	D	S	I	D	E	A	S	Y	S	Y	T	L	I	E	G	D	A	L	T	D	T	I	E	K	I	S	Y	E	T	K	L	V	A	S	-	G	S	G	S	T	I	K	S	I	S	H	N
1.03	MGVYTFENEFTSEI	PPSR	L	F	K	AFVLDADNLI	IPK	I	APQAV	I	K	QVEILEGNG	GGPGTI	K	I	TFEGESQYGY	AK	H	R	I	D	S	I	D	E	A	S	Y	S	Y	T	L	I	E	G	D	A	L	T	D	T	I	E	K	I	S	Y	E	T	K	L	V	A	S	-	G	S	G	S	T	I	K	S	I	S	H	N
1.04	MGVYTFENEFTSEI	PPSR	L	F	K	AFVLDADNLI	IPK	I	APQAV	I	K	QVEILEGNG	GGPGTI	K	I	TFEGESQYGY	AK	H	R	I	D	S	I	D	E	A	S	Y	S	Y	T	L	I	E	G	D	A	L	T	D	T	I	E	K	I	S	Y	E	T	K	L	V	A	S	-	G	S	G	S	T	I	K	S	I	S	H	N
1.05	MGVYTFENEFTSEI	PPSR	L	F	K	AFVLDADNLI	IPK	I	APQAV	I	K	QVEILEGNG	GGPGTI	K	I	TFEGESQYGY	AK	H	R	I	D	S	I	D	E	A	S	Y	S	Y	T	L	I	E	G	D	A	L	T	D	T	I	E	K	I	S	Y	E	T	K	L	V	A	S	-	G	S	G	S	T	I	K	S	I	S	H	N
1.06	MGVYTFENEFTSEI	PPSR	L	F	K	AFVLDADNLI	IPK	I	APQAV	I	K	QVEILEGNG	GGPGTI	K	I	TFEGESQYGY	AK	H	R	I	D	S	I	D	E	A	S	Y	S	Y	T	L	I	E	G	D	A	L	T	D	T	I	E	K	I	S	Y	E	T	K	L	V	A	S	-	G	S	G	S	T	I	K	S	I	S	H	N
1.07	MGVYTFENEFTSEI	PPSR	L	F	K	AFVLDADNLI	IPK	I	APQAV	I	K	QVEILEGNG	GGPGTI	K	I	TFEGESQYGY	AK	H	R	I	D	S	I	D	E	A	S	Y	S	Y	T	L	I	E	G	D	A	L	T	D	T	I	E	K	I	S	Y	E	T	K	L	V	A	S	-	G	S	G	S	T	I	K	S	I	S	H	N
1.08	MGVYTFENEFTSEI	PPSR	L	F	K	AFVLDADNLI	IPK	I	APQAV	I	K	QVEILEGNG	GGPGTI	K	I	TFEGESQYGY	AK	H	R	I	D	S	I	D	E	A	S	Y	S	Y	T	L	I	E	G	D	A	L	T	D	T	I	E	K	I	S	Y	E	T	K	L	V	A	S	-	G	S	G	S	T	I	K	S	I	S	H	N
1.09	MGVYTFENEFTSEI	PPSR	L	F	K	AFVLDADNLI	IPK	I	APQAV	I	K	QVEILEGNG	GGPGTI	K	I	TFEGESQYGY	AK	H	R	I	D	S	I	D	E	A	S	Y	S	Y	T	L	I	E	G	D	A	L	T	D	T	I	E	K	I	S	Y	E	T	K	L	V	A	S	-	G	S	G	S	T	I	K	S	I	S	H	N

Mal d 1 Gehalt in verschiedenen Apfelsorten



- Mal d 1 Gehalte von 30-468 mg/ Kg Trockenmasse (TM) im Fruchtfleisch und 66-876 mg/ Kg TM in der Fruchtschale wurden quantifiziert
- Gehalt in der Schale ist 2-10 mal höher als im Fleisch (Ausnahme: Bohnapfel)
- Isoallergene 1.04 und 1.05 wurde in keiner der Proben detektiert
- Verhältnisse der mittels aufsummierten Einzel- und Globalmarkern quantifizierten Gesamtgehalte verdeutlichen die gute Übereinstimmung der Ergebnisse:
 - Schale: Ø 85% (76%-97%)
 - Fruchtfleisch: Ø 90% (79%-115%)

Einfluss der Lagerung auf den Mal d 1 Gehalt



- Zunahme des Allergengehalts und Änderung des Isoallergenprofils während der Lagerung
- Unterschiedliche Anreicherung der Isoallergene bei den verschiedenen Lagerbedingungen
- Bei beiden Sorten ist Lagerung unter kühlen Bedingungen und Anwesenheit von 1-MCP die am besten geeignete Methode für niedrige Mal d 1 Gehalte

Resümee

- Ausgewählte Marker sind zur Quantifizierung des Mal d 1 in Äpfeln geeignet
- Verwendung des ESTDs zur Korrektur der unterschiedlichen und teilweise schlechten Extrahierbarkeit des Allergens essenziell
- Unterschiede im Mal d 1 Gehalt zwischen den Sorten und Zunahme während Lagerung beobachtet

Quellen

¹ BLE Referat 414: Landwirtschaftliche Statistik: Pro-Kopf-Verbrauch von Obst nach Arten 2019/2020. ² Wolfe et al. J Agric Food Chem (2003) 29;51(3):609-14. ³ Gao et al. BMC Plant Biol 2008;8:116. ⁴ Romer et al. Sci Rep (2020) 4;10(1):9144. ⁵ Siekierzynska et al. (2021) Int J Mol Sci. 29;22(7):3527. ⁶ Kaeswurm et al. (2020) Methods Protoc 27;4(1):3.

Kontakt: Julia Kaeswurm (julia.kaeswurm@lc.uni-stuttgart.de)

Nachwuchsgruppe Polyphenol-Matrix-Interaktionen – Dr. M. Buchweitz

Gefördert durch das Ministerium für Wissenschaft, Forschung und Kunst Baden-Württemberg, die Dr. Leni Schöninger Stiftung, Fonds der Chemischen Industrie und der DFG.