



Allergene bei Apfel – Ursachen, Auswirkung und Einflussfaktoren

PD Dr. M. Schmitz
Vortrag Erfurt, 26.01.2016



Qualität

Wertgebende Inhaltsstoffe:

Sekundäre
Pflanzeninhaltsstoffe
Phenole
Vitamine
Mineralstoffe

Wertmindernde Inhaltsstoffe:

Allergene
Pestizidrückstände
Mykotoxine



DPC, 2006

Konsumentenpräferenz

Qualität

Wertgebende
Inhaltsstoffe:

Sekundäre
Pflanzeninhaltsstoffe

Phenole

Vitamine

Mineralstoffe



Wertmindernde
Inhaltsstoffe:

Allergene

Pestizidrückstände

Mykotoxine

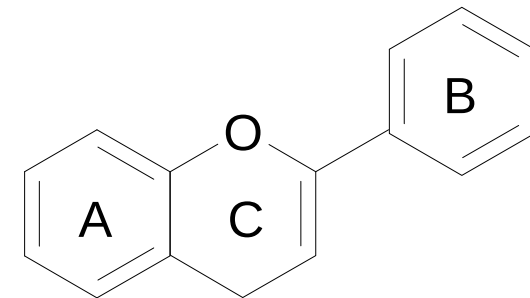


DPC, 2006

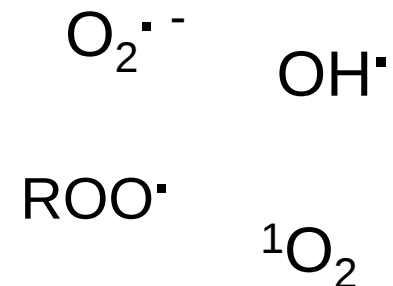
Konsumentenpräferenz

Polyphenole

- Fraßschutz, Farb- und Lockstoffe, Antioxidantien
- Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe
- Gliederung in:
Phenolsäuren und Flavonoide
- Aromatischer Ring mit Hydroxylgruppen
- Antioxidatives Potenzial:
Abfangen von Radikalen, Reduktans,
Wasserstoffdonor, Metallchelator



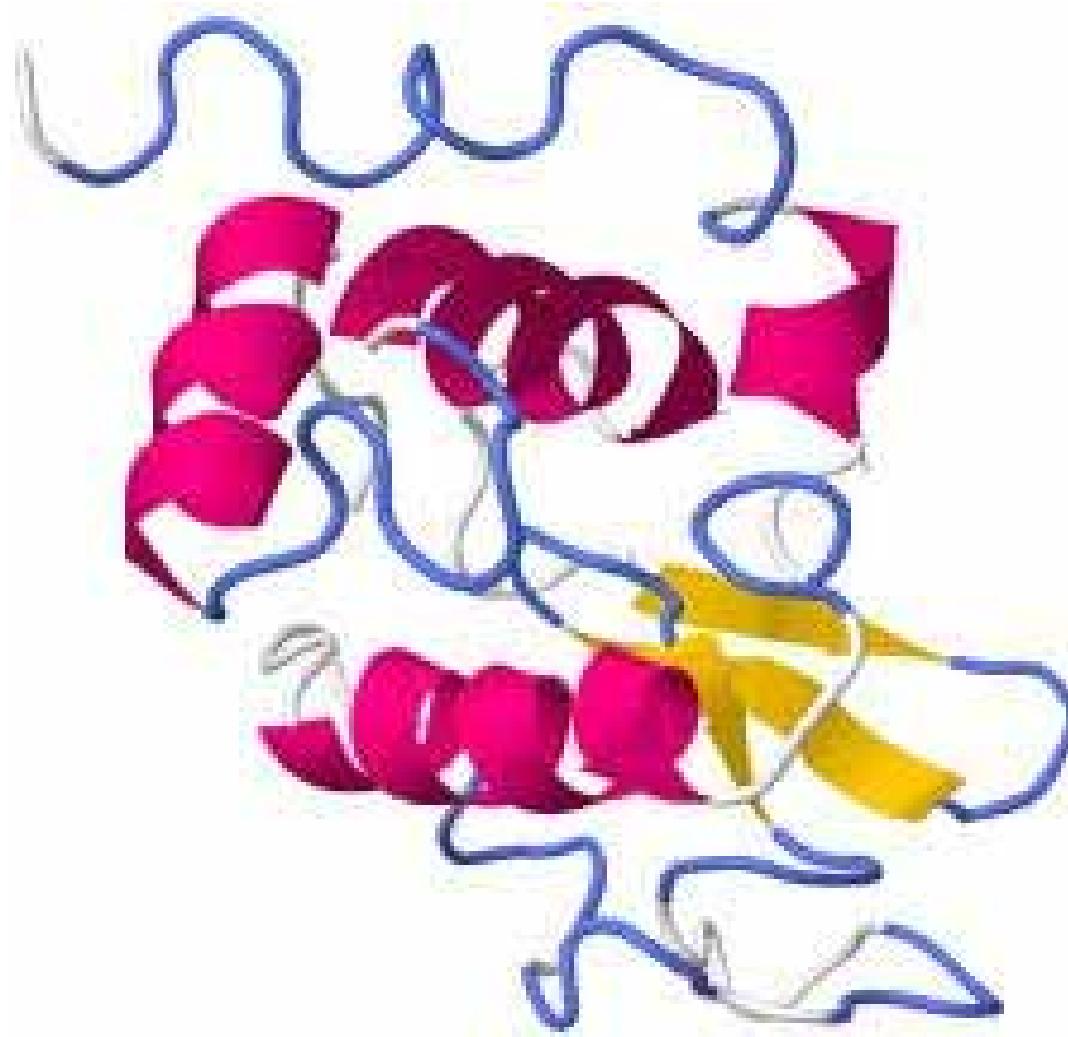
Flavonoid Grundstruktur



Allergene sind in den meisten Fällen
Proteine



Tertiär-/Quartärstruktur eines Proteins



c.) PR-Proteine als sekundäre Inhaltstoffe

PR-Proteine

Als **PR-Proteine (pathogenesis related proteins)** bezeichnet man Proteine mit relativ niedrigem Molekulargewicht, niedrigem isoelektrischen Punkt und hoher Resistenz gegenüber Proteasen, deren de novo Synthese in Pflanzengeweben nach Einwirkung biotischer oder abiotischer Stressfaktoren und während bestimmter Entwicklungsstadien (z. B. Blüte, Seneszenz) erfolgt.



Reaktionen auf Nahrungsmittel

Immunologische Reaktionen (Überempfindlichkeiten)

- ❖ IgE vermittelt:
NM-Allergien
- ❖ Nicht IgE vermittelt:
Zöliaki

Nicht-immunologische Reaktionen (Intoleranzen)

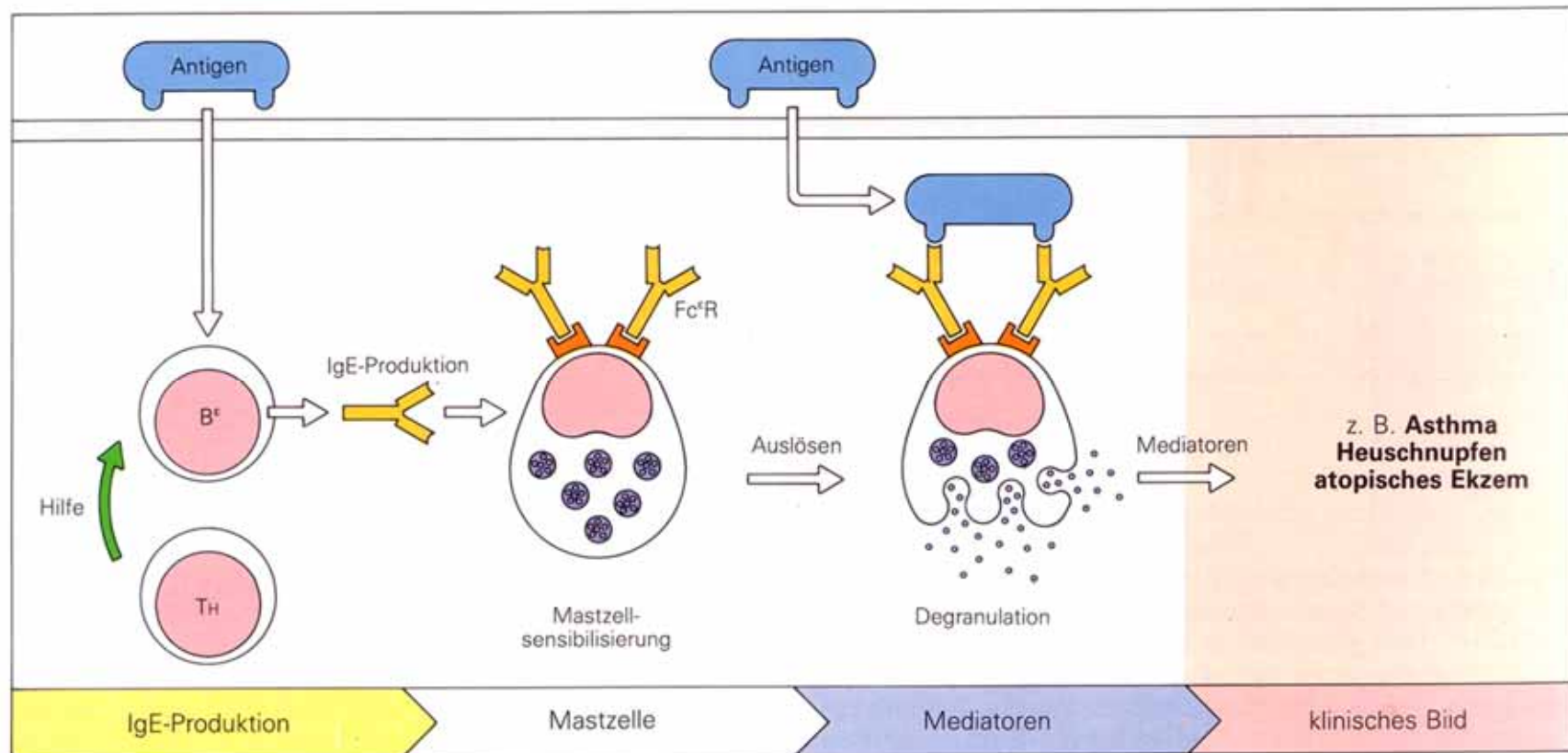
- ❖ Toxikologisch:
Vergiftung
- ❖ Metabolisch:
Laktose-
intoleranz

Mikrobiell

- ❖ Infektionen:
Salmonellen
- ❖ Toxine

Allergische Reaktion Typ I

„Unerwünscht heftige Abwehrreaktion des Immunsystems auf bestimmte harmlose Umweltstoffe“



(Roitt et al. 1987)

Symptome allergischer Reaktionen

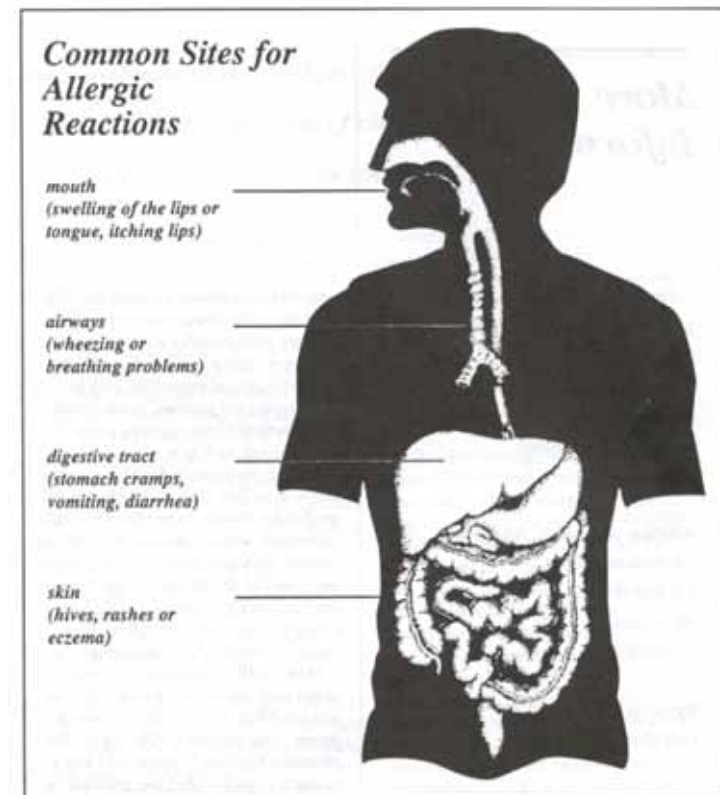
Respirationstrakt: juckende, tränende Augen, Husten, Schnupfen, Keuchhusten

Gastrointestinaltrakt: Krämpfe, Erbrechen, Diarrhoe

Haut: Ekzeme, Nesselausschlag, Schwellungen, Ausschläge

Respirationstrakt: Kurzatmung, Engegefühl in der Brust, Asthma, Anschwellen und Jucken des Mundes und Halses

Kardiovaskuläre Probleme: Abfallens des Blutdrucks, Bewusstlosigkeit, Schock



Apfelallergene

kDa

31 Mal d 2: Thaumatococcus-spezifisches Protein

18 Mal d 1: Bet v 1-Homolog

14 Mal d 4: Profilin

09 Mal d 3: Lipidtransfer-Protein



Mal d 1

- Wichtigstes Apfelallergen in Nord-Mitteleuropa, Kreuzreaktivität zu Bet v 1
- Protein mit MG = 18 kDa, 158 AA
- In Schale und Fruchtfleisch vorhanden
- Pathogenesis-related protein (PRP)
- Hitzelabil und Verdauung durch Pepsin
 - Orales Allergie Syndrom
- Funktion: Bindung und Transport von Pflanzensteroiden?



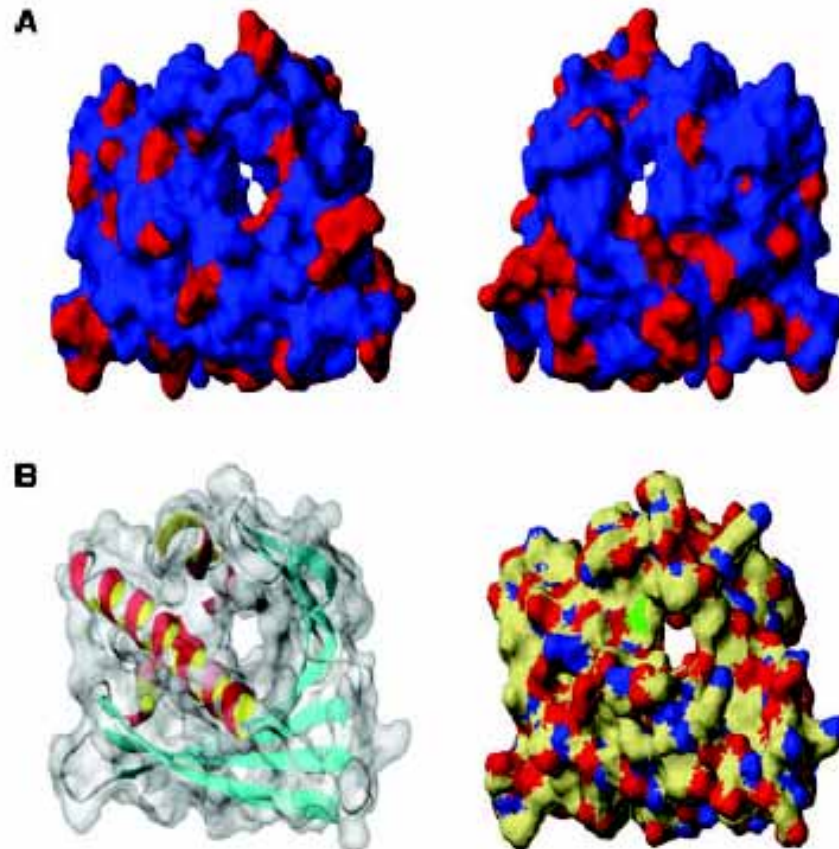


Figure 1. Molecular model of Mal d 1 and Bet v 1. (A) Front and back surfaces of the Mal d 1 model, coloured blue where the nearest atom to the surface is conserved and red where it varies within the Mal d 1 sequences. (B) Bet v 1 structure with helices and sheets shown with a transparent surface to the left and the surface coloured using the nearest atom on the right. Oxygens, red; nitrogens blue; carbons, khaki; sulphur, green to indicate hydrophobic or hydrophilic surfaces.



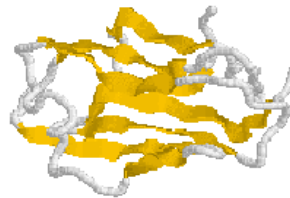
Allergene - Strukturen



Bet v1



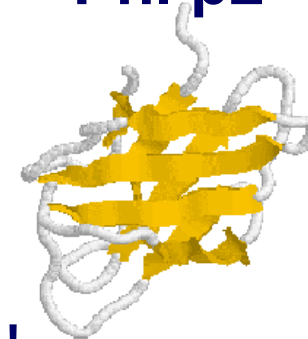
Der f2



Amb a5



Phl p2



Keine gemeinsamen Strukturen!



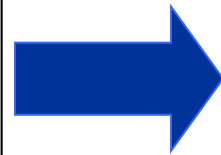
Biotische Faktoren:
Viren, Bakterien, Pilze

Fungizide,
Herbizide

Mechanische
Verletzung

Seneszenz,
Lagerung

Abiotische Faktoren:
UV-B, Dürre, Nässe, Kälte



Aktivierung des
Abwehrsystems
der Pflanze



Resistenzinduktion



Kreuzallergien

8-12% der Bevölkerung haben eine
Birkenpollenpollinose



Davon haben 50-70% eine Nahrungsmittelallergie



Kern- und Steinobstallergie (61%)



Apfel
(97%)



Pfirsich
(67%)



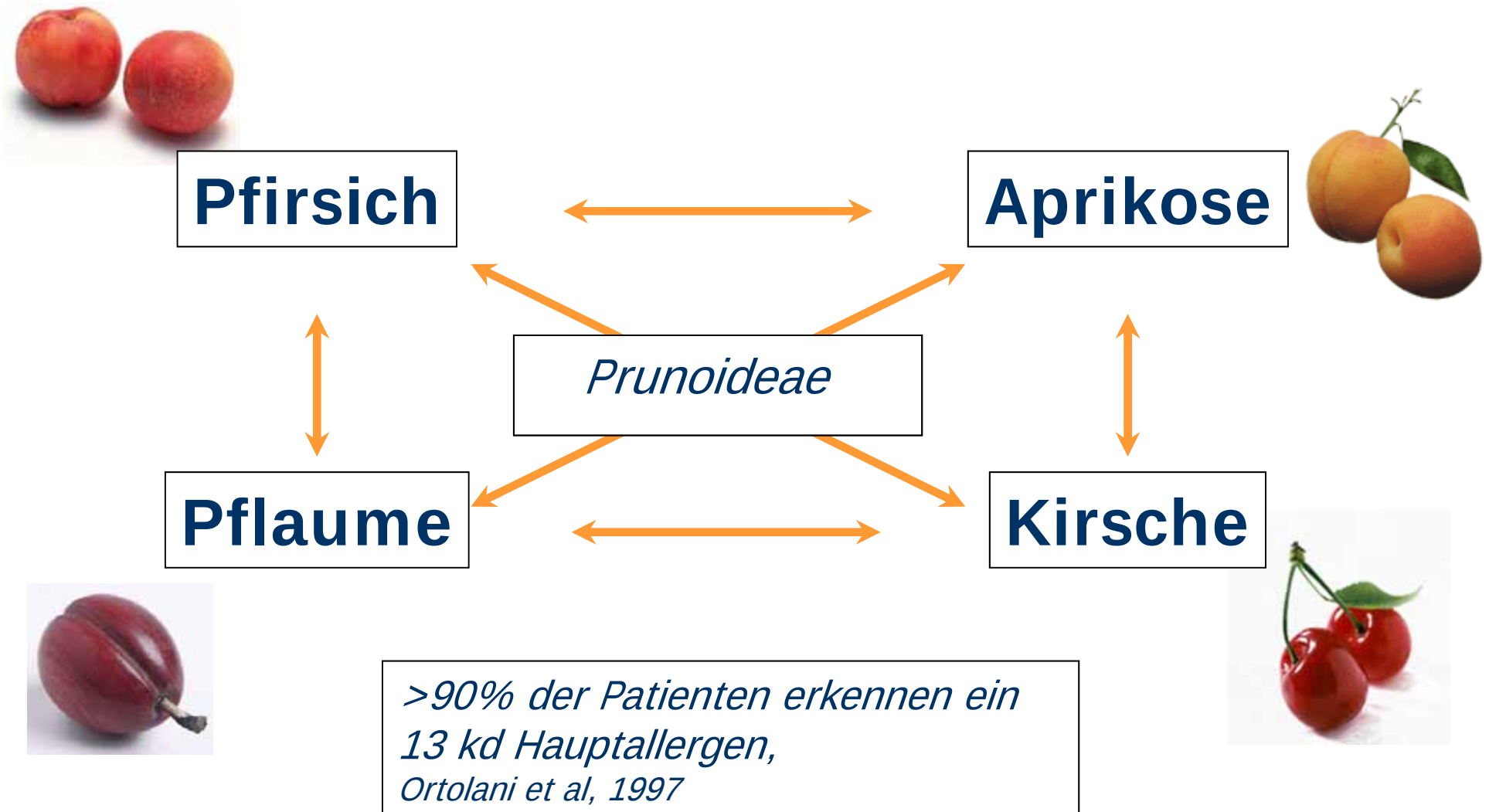
Kirsche
(58%)



Birne
(40%)



Kreuzreaktionen: gleiche Familie



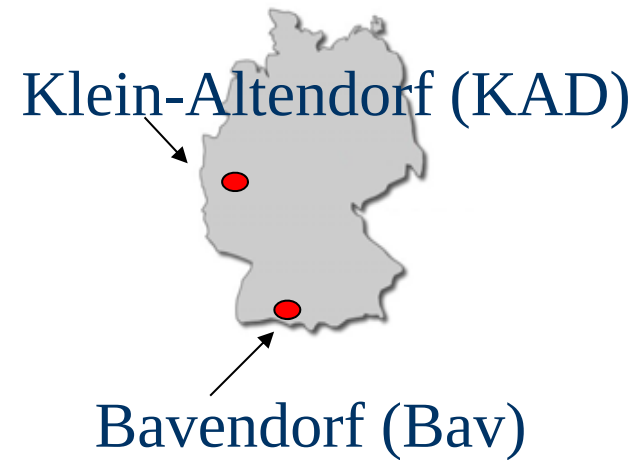
Hypothesen

- Der Mal d 1-Gehalt wird durch die Auswahl der Sorte und der Lagerungs- und Kultivierungsbedingungen beeinflusst
- Es besteht ein Zusammenhang zwischen dem Mal d 1- und Polyphenolgehalt sowie der Polyphenoloxidaseaktivität
- 1-MCP beeinflusst, als Ethyleninhibitor, die Mal d 1-Synthese während der Lagerung



Früchte/ Ernte:

- 13 verschiedene Apfelsorten:
 - Alte Tafelsorten
 - Neue Züchtungen
- 2 Standorte
- Integrierte Produktion (IP)
- EU-2092/91, Bioland
- Optimaler Erntezeitpunkt
nach Streif-Index, standardisierte Ernte

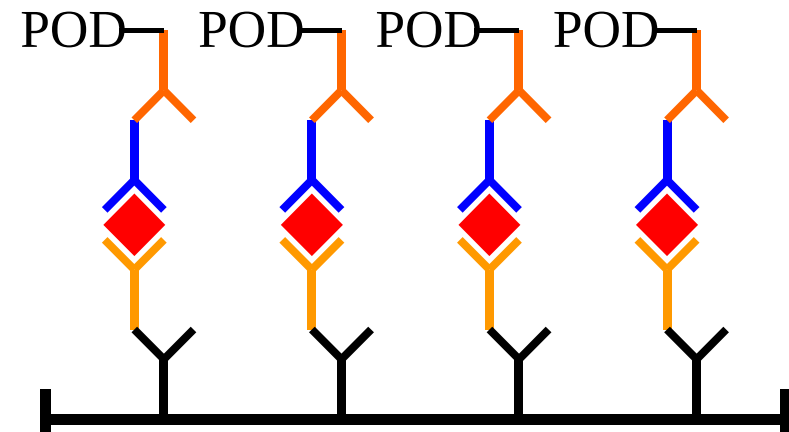


Lagerung:

4, 8 und 12 Wochen im Kühllager

Analytik:

Gesamtproteingehalt nach Bradford
Sandwich-ELISA: Mal d 1-Gehalt





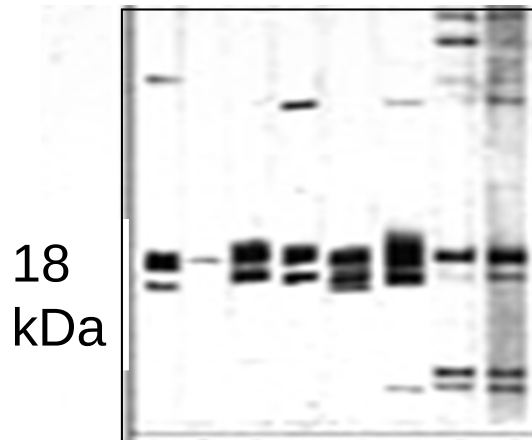
**Hochschule
Bonn-Rhein-Sieg**
University of Applied Sciences

Ergebnisse Sortenvergleich

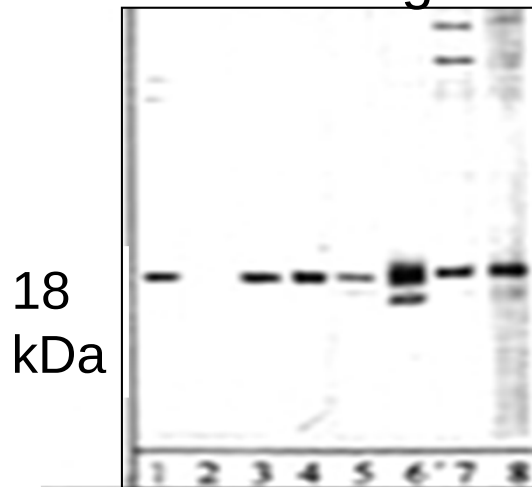


Immundetektion zum Nachweis von Mal d 1 in verschiedenen Apfelsorten

Golden Delicious



Jonagold



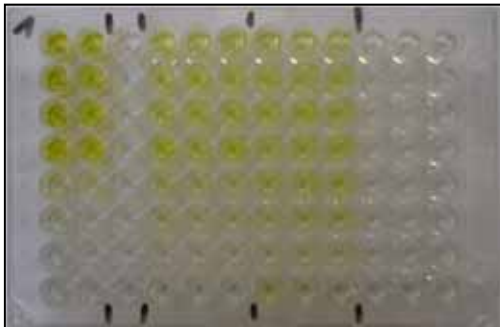
Gehalt an Mal d 1:

Golden Delicious > Jonagold



Material und Methoden

- Extraktion der Proteine/
Mal d 1 nach Björksten
(1980)



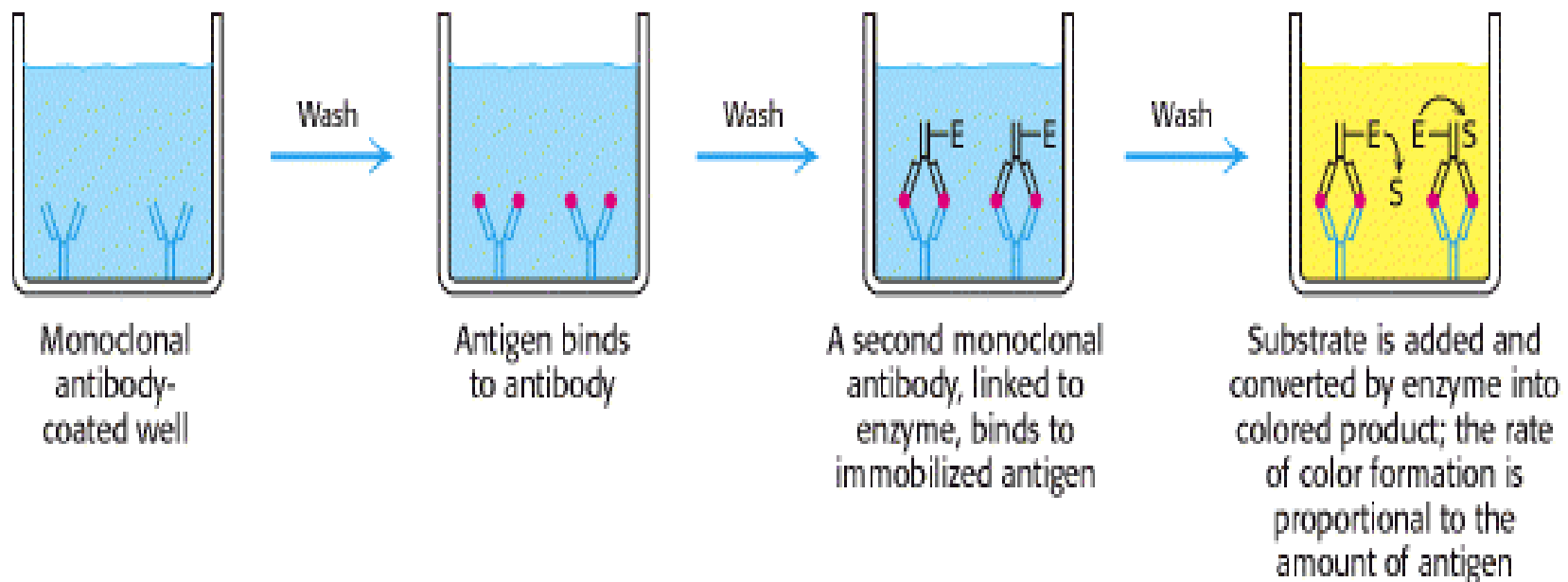
- Messung des Mal d 1-Gehaltes
durch Sandwich-ELISA

- Proteinbestimmung modifiziert nach Bradford (1976)



Enzyme-linked-immunosorbent-Assay

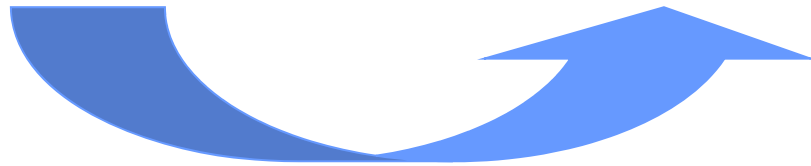
(B) Sandwich ELISA



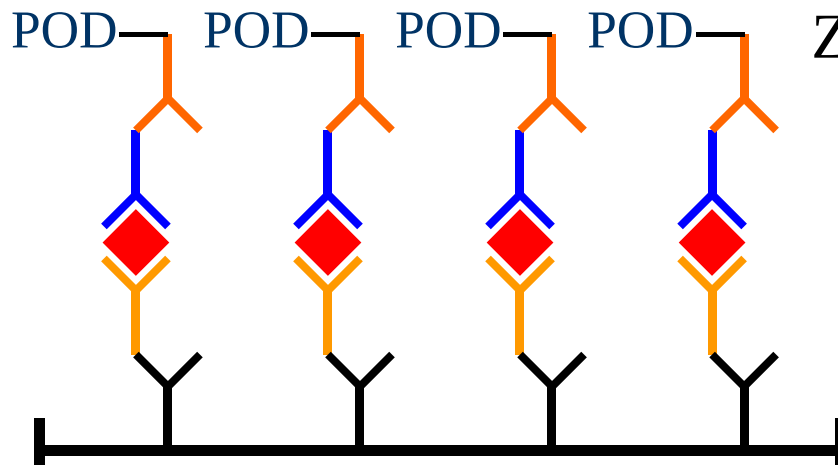
Sandwich-ELISA

Substrat

Farbreaktion



Optische Dichte
ist der Proben-
konzentration
proportional



Ziege-anti Kaninchen-IgG-POD

Kaninchen-anti-Bet v 1

Mal d 1: Standard, Apfelextrakt

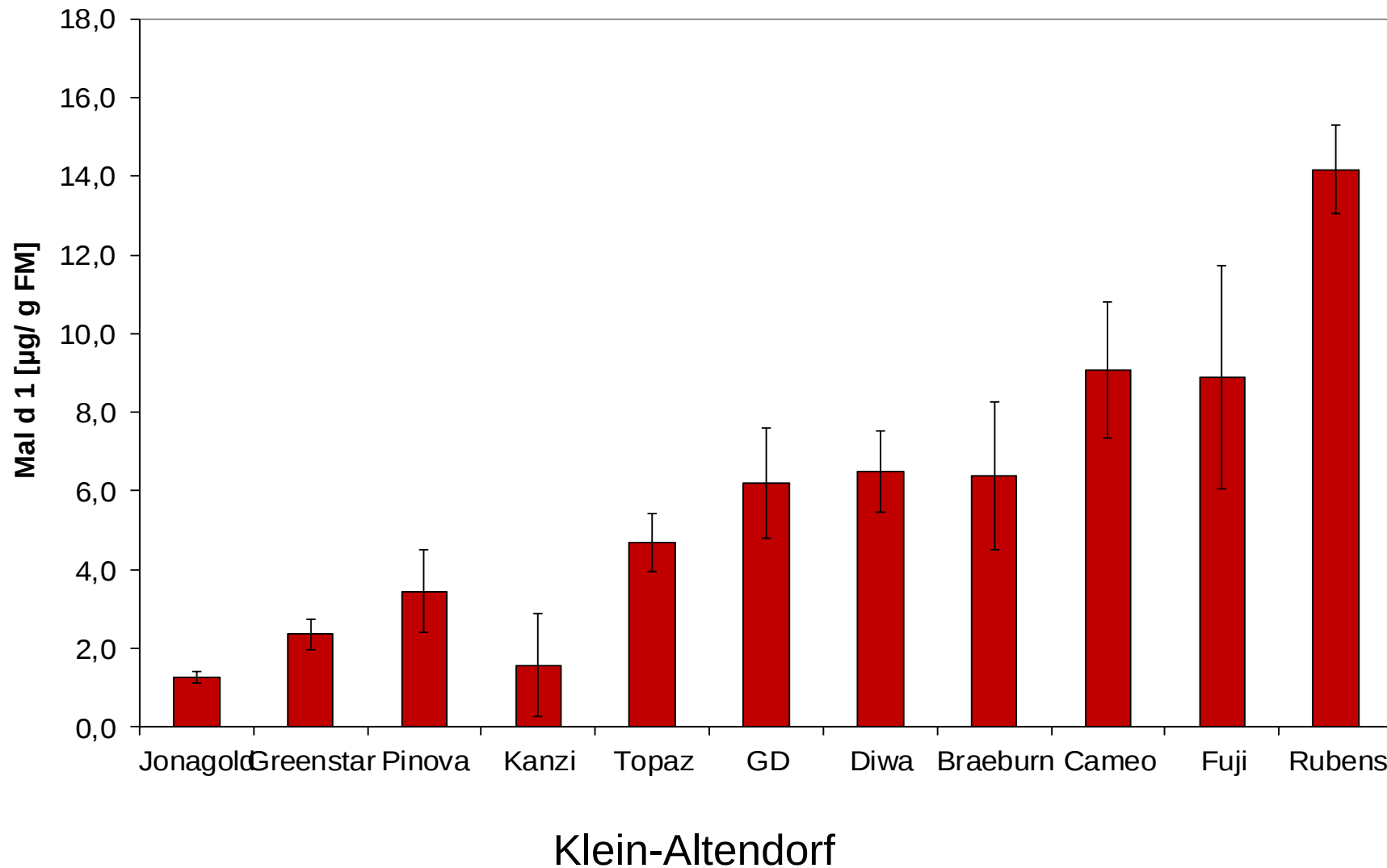
Maus-anti Mal d 1

Schaf-anti-Maus Ig

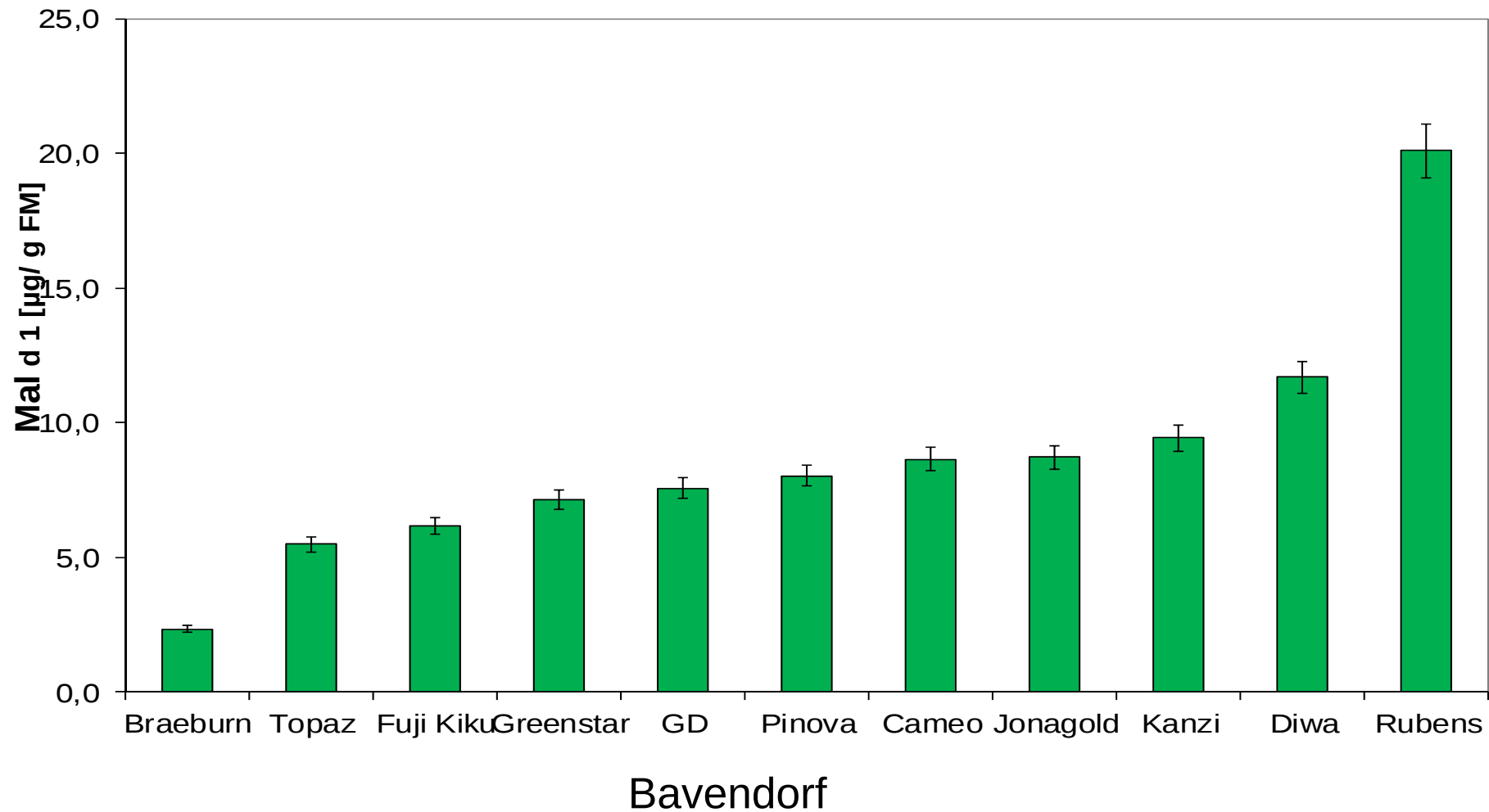


Hochschule
Bonn-Rhein-Sieg
University of Applied Sciences

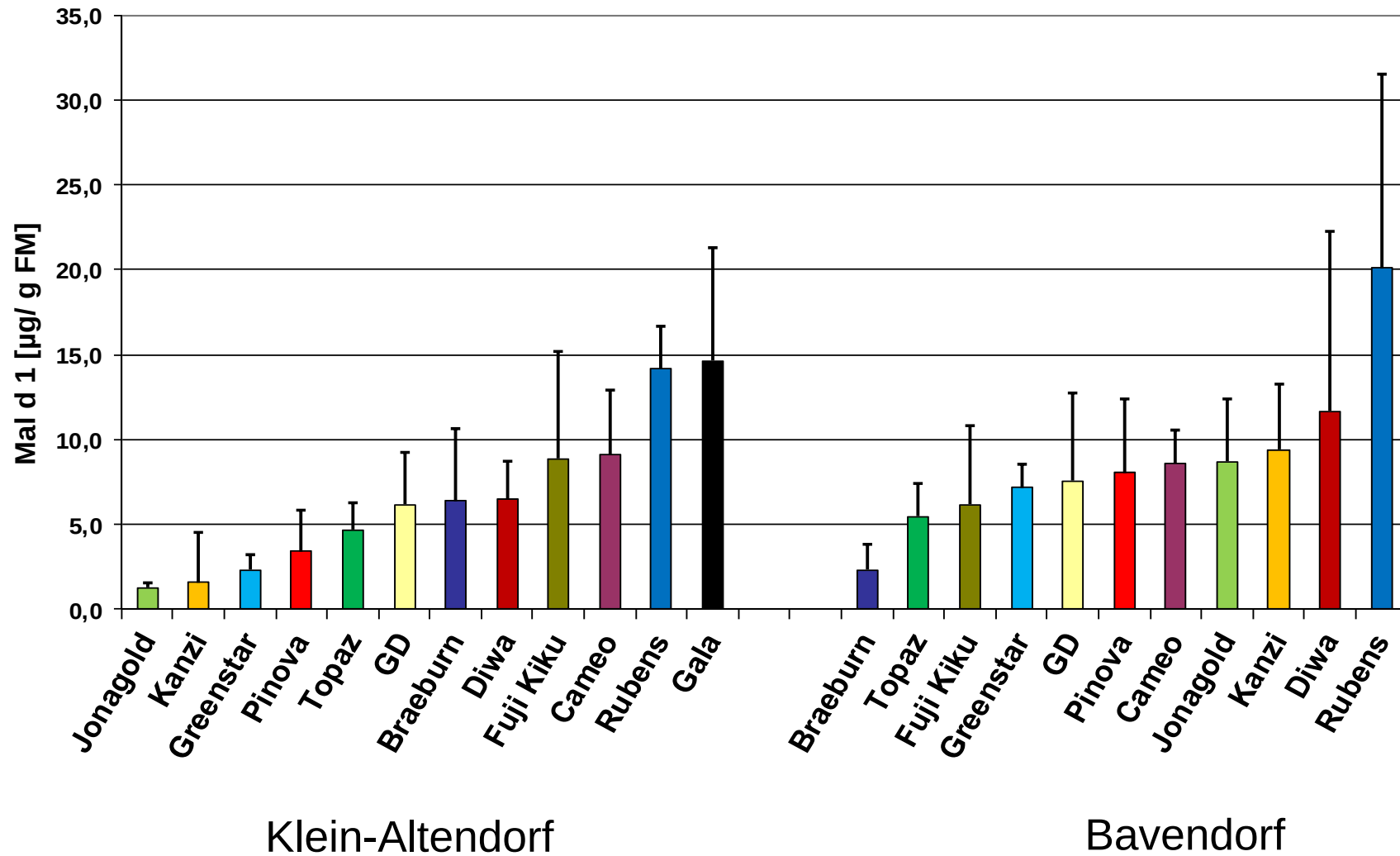
Einfluss der Sorte auf den Mal d 1-Gehalt



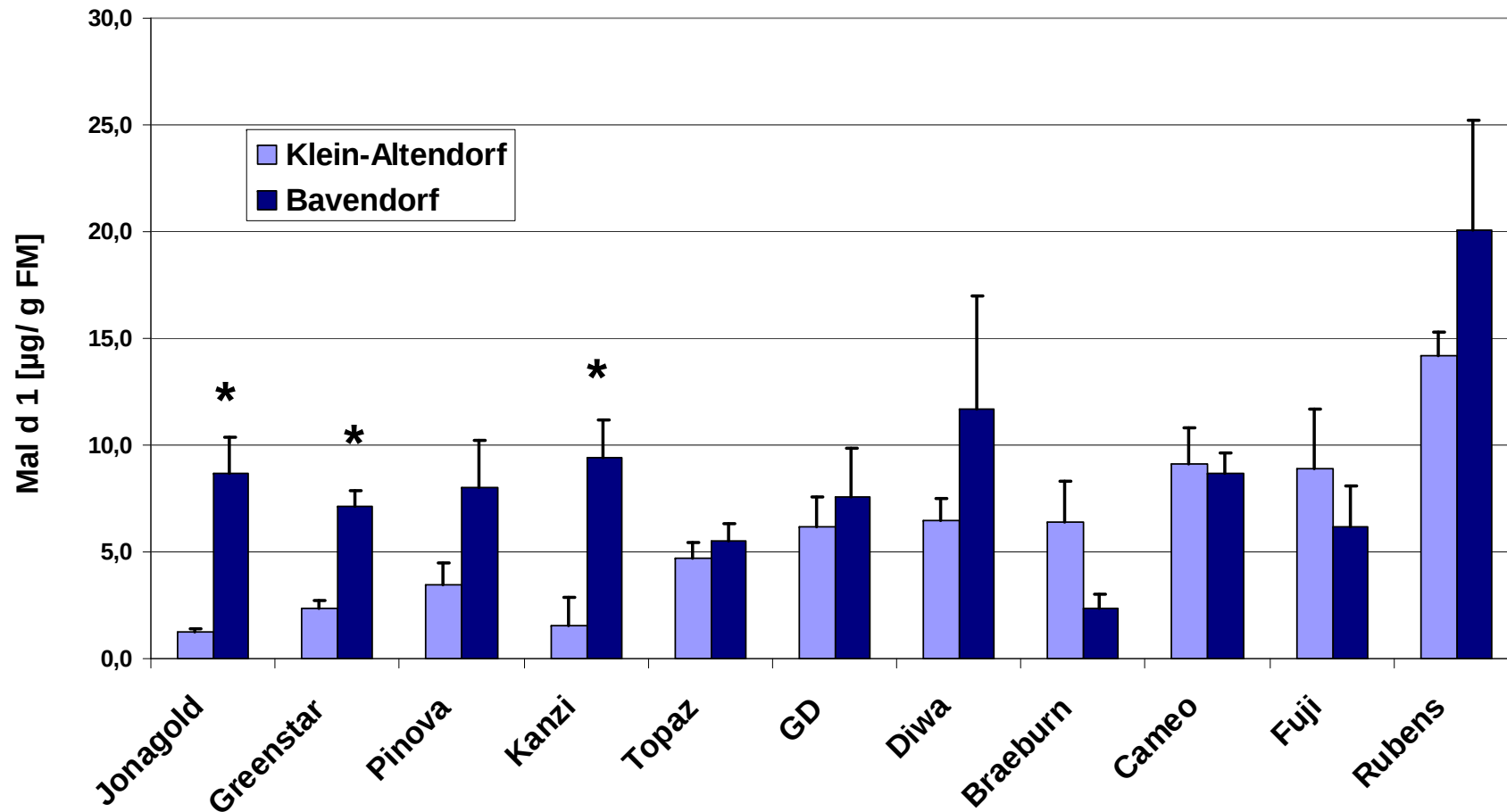
Einfluss der Sorte auf den Mal d 1-Gehalt



Einfluss der Sorte auf den Mal d 1-Gehalt



Einfluss des Standortes auf den Mal d 1-Gehalt



* Signifikant $p < 0,05$

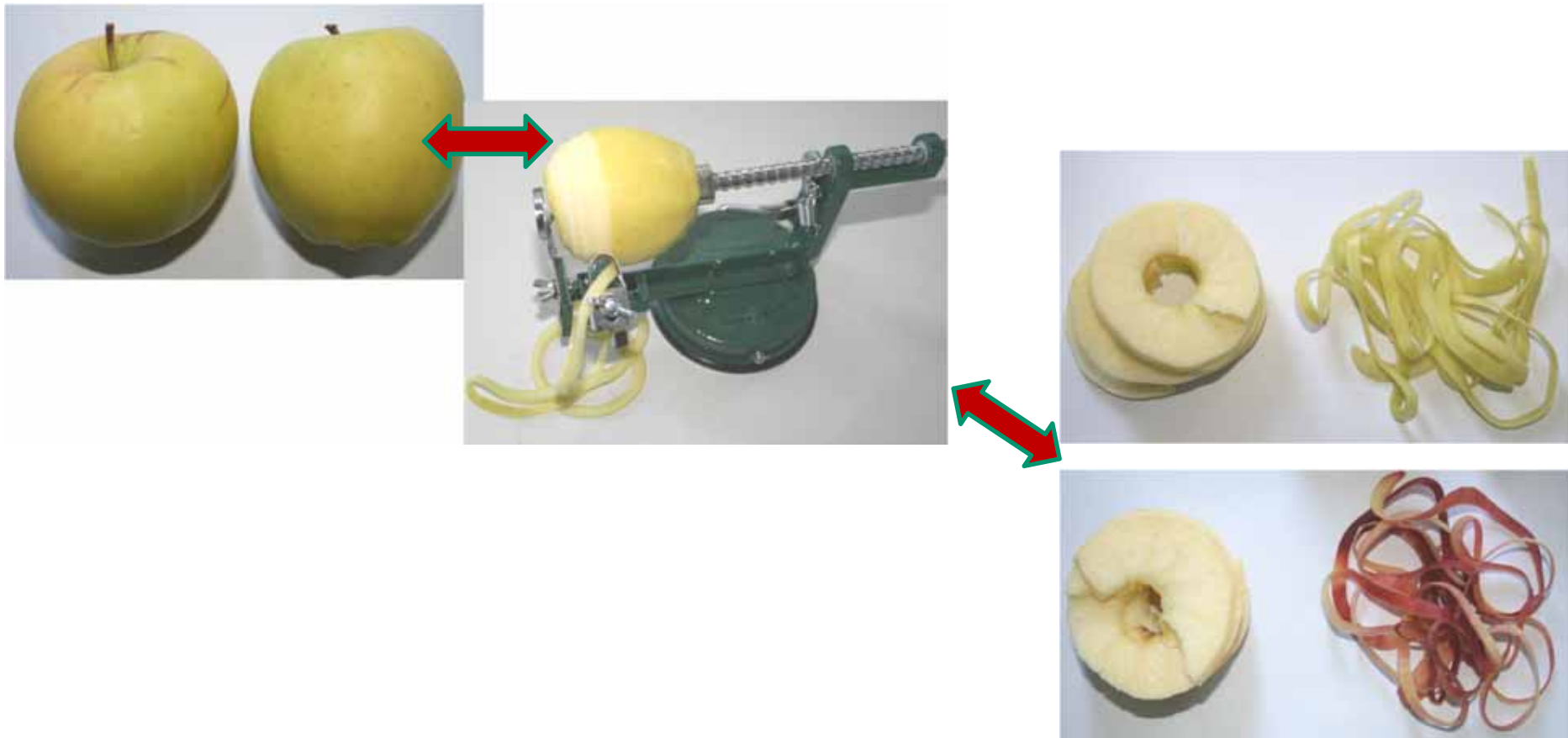
MW $\pm$ SF, n = 5

Hypothesen

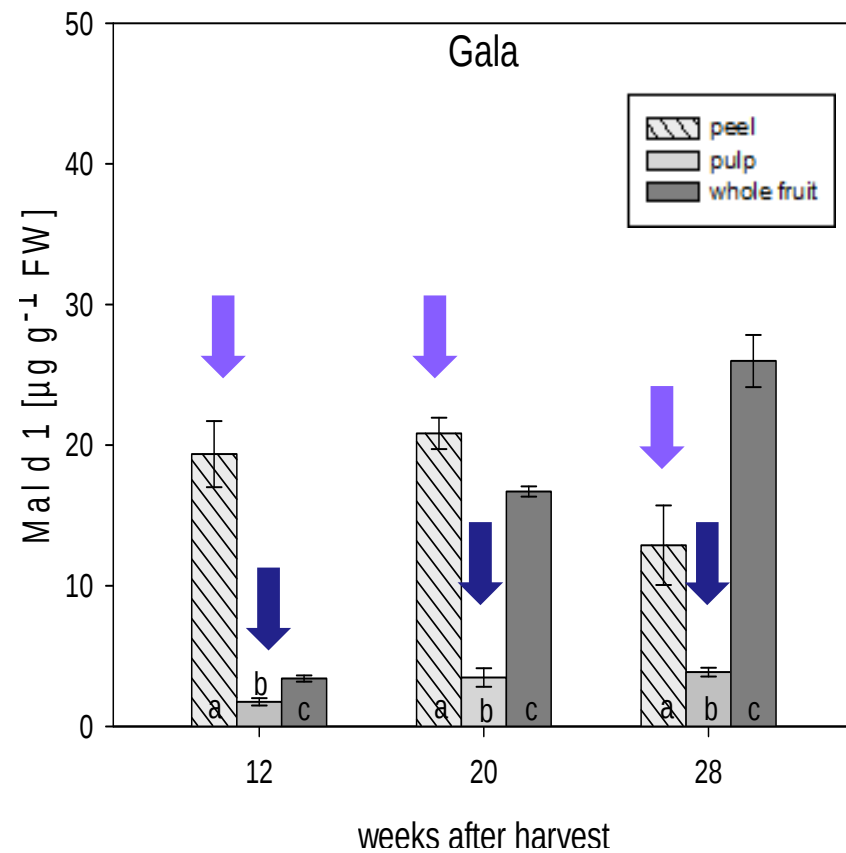
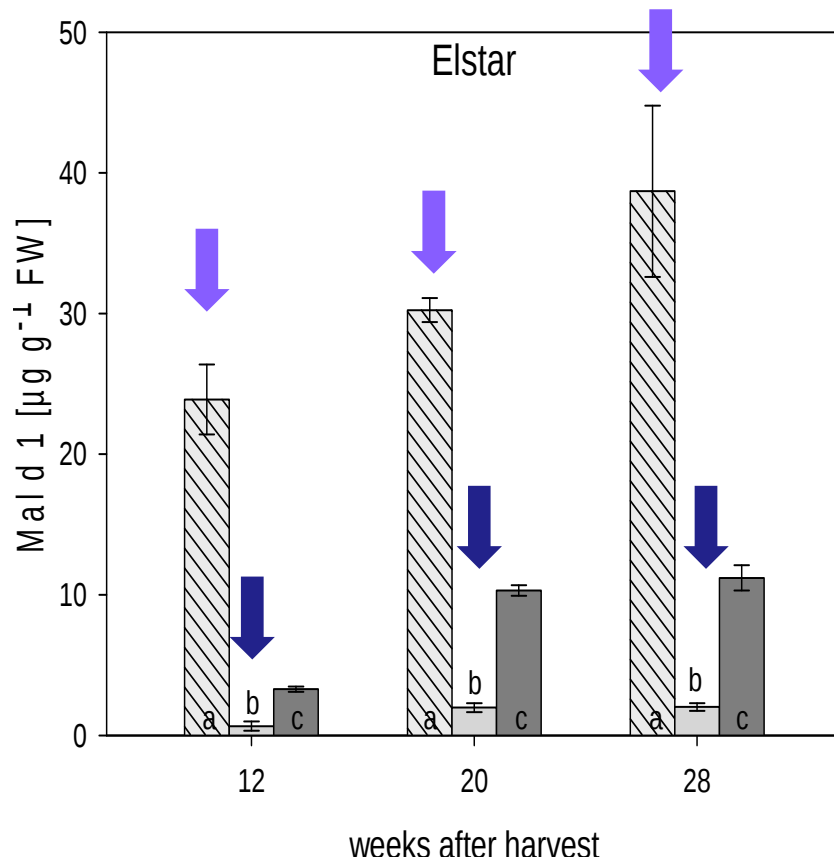
- Der Mal d 1-Gehalt wird durch die Auswahl der Sorte und der Lagerungs- und Kultivierungsbedingungen beeinflusst.
- Der Mal d 1-Gehalt ist in der Schale höher als im Fruchtfleisch.
- Es besteht ein Zusammenhang zwischen dem Mal d 1- und Polyphenolgehalt sowie der Polyphenoloxidaseaktivität
- 1-MCP beeinflusst, als Ethyleninhibitor, die Mal d 1-Synthese während der Lagerung



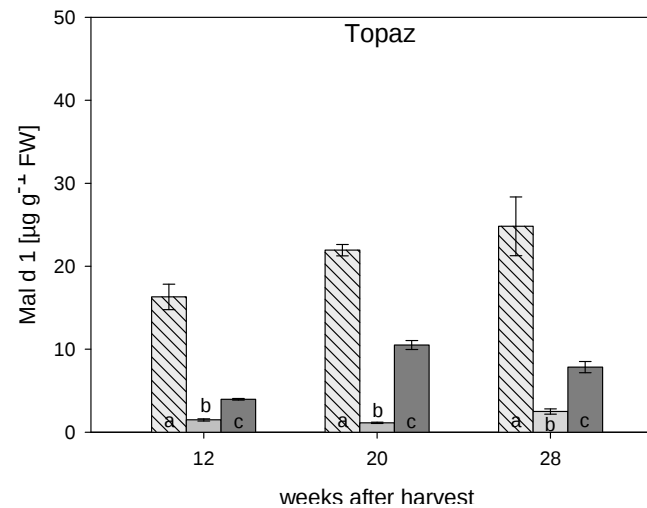
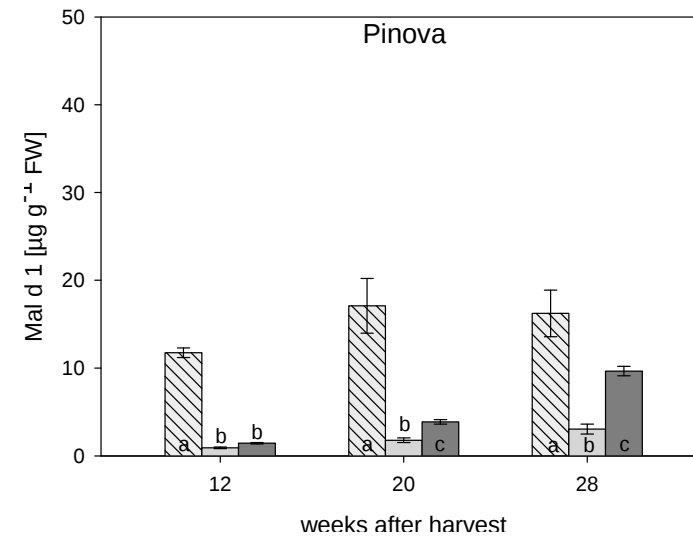
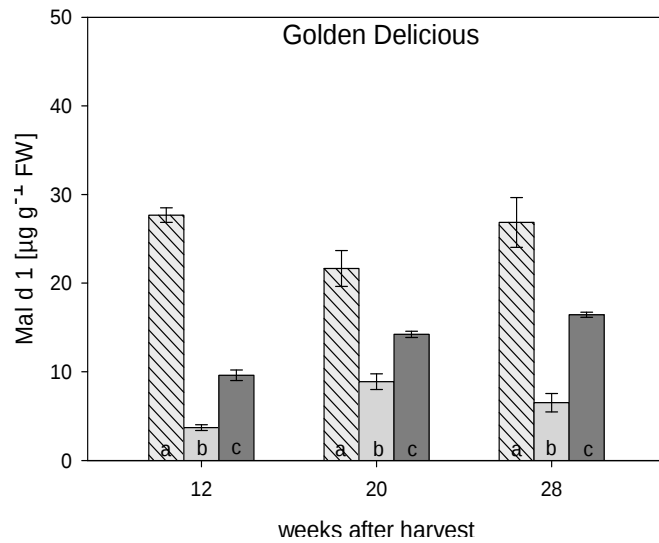
Mal d 1-Gehalt in der Schale oder im Fruchtfleisch: Versuchsvorbereitung



Mal d 1 – Gehalt in Apfelschalen und im Fruchtfleisch bei verschiedenen Apfelsorten



Mal d 1 – Gehalt in Apfelschalen und im Fruchtfleisch bei verschiedenen Apfelsorten

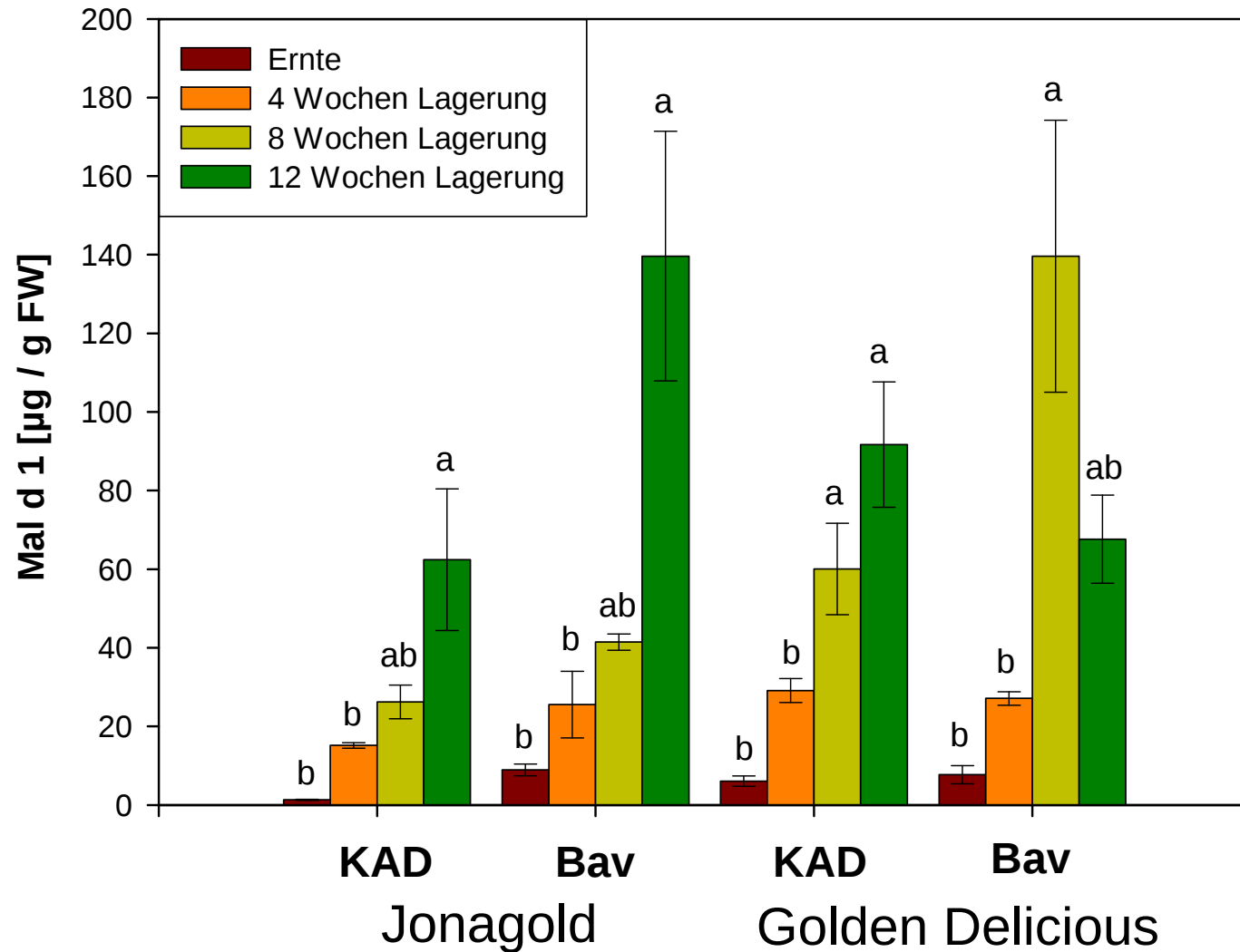


Hypothesen

- Der Mal d 1-Gehalt wird durch die Auswahl der Sorte und der Lagerungs- und Kultivierungsbedingungen beeinflusst.
- Der Mal d 1-Gehalt ist in der Schale höher als im Fruchtfleisch.
- Lagerung führt zu einer Steigerung des Mal d1-Gehaltes.
- Es besteht ein Zusammenhang zwischen dem Mal d 1- und Polyphenolgehalt sowie der Polyphenoloxidaseaktivität
- 1-MCP beeinflusst, als Ethyleninhibitor, die Mal d 1-Synthese während der Lagerung

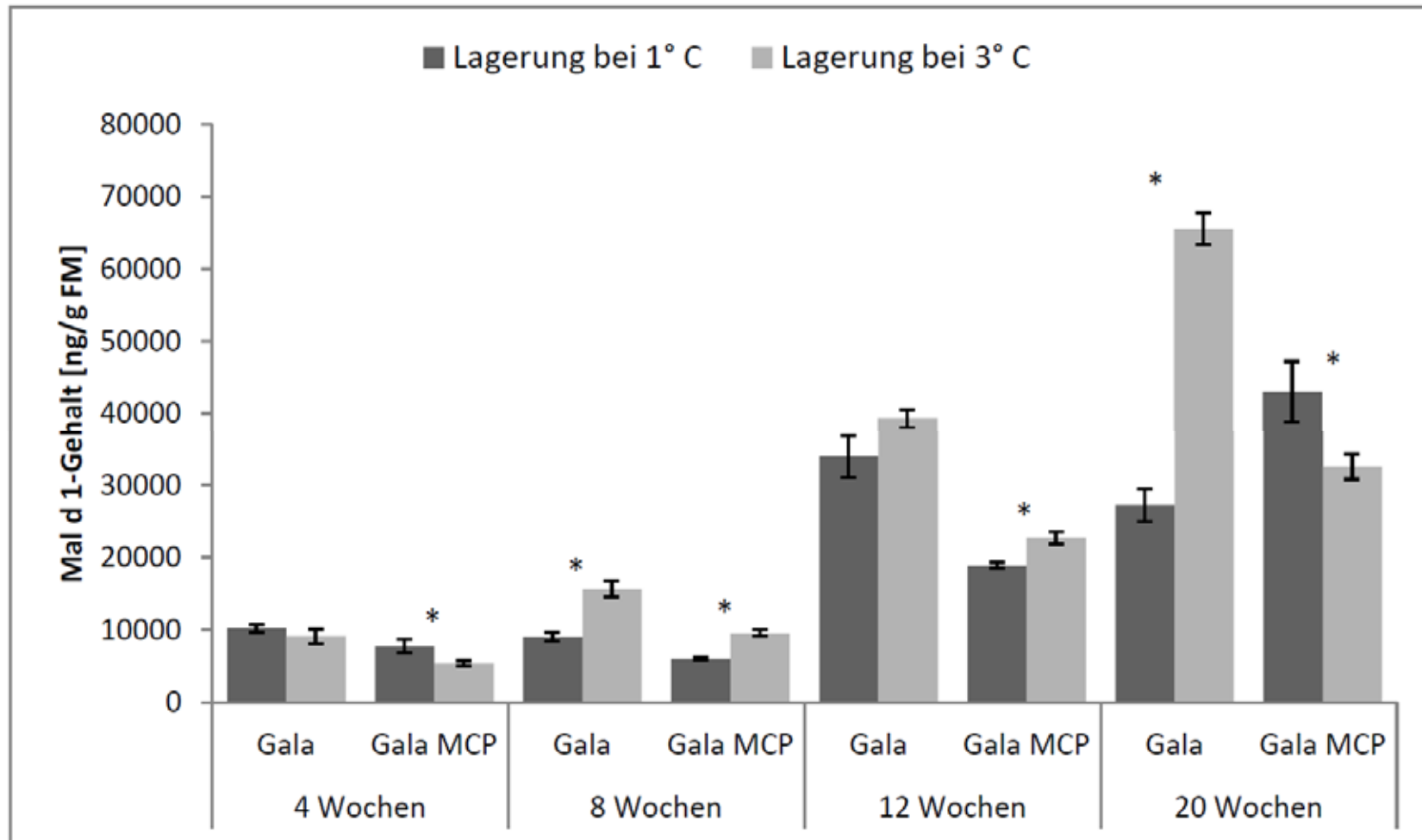


Einfluss der Lagerung auf den Mal d 1-Gehalt

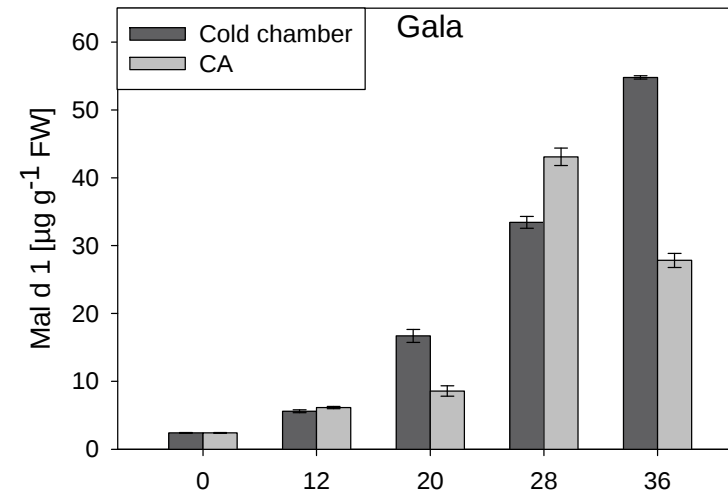
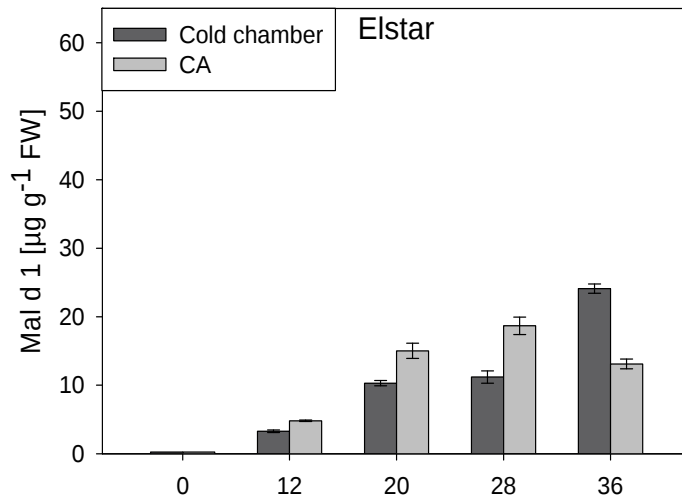
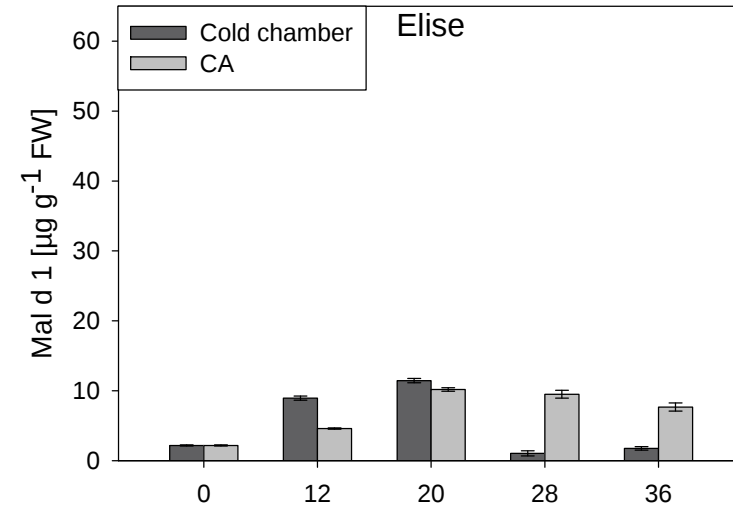
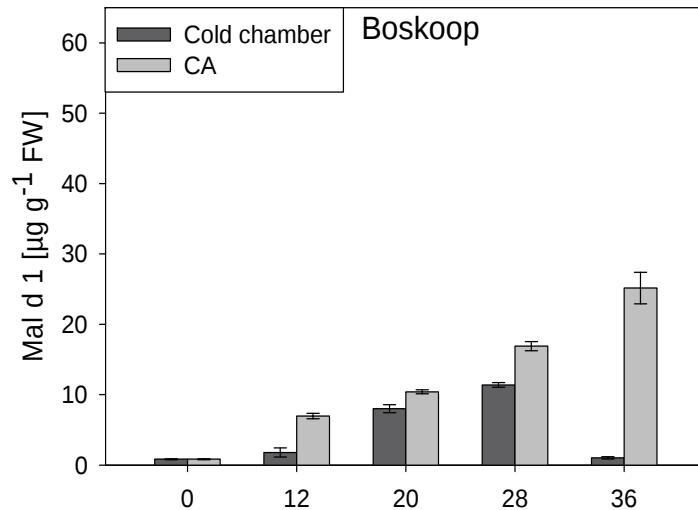


MW ± SF, n = 5, $p < 0,05$

Einfluss der Kühllagerbedingungen auf den Mal d 1-Gehalt bei Gala-Früchten, $MW \pm SE$.

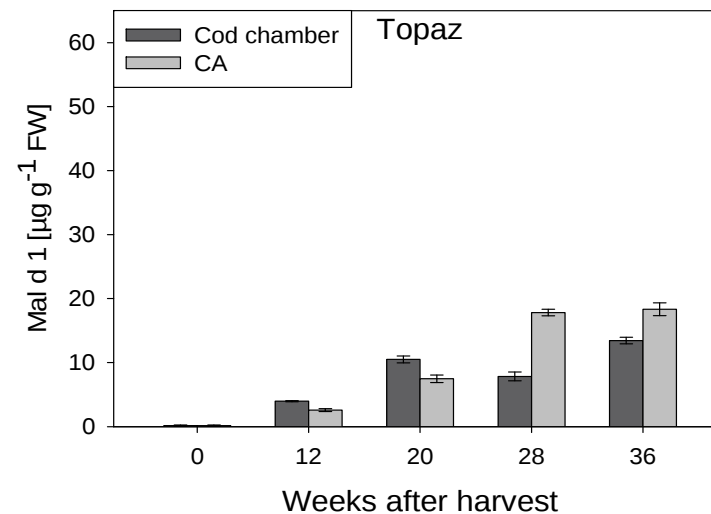
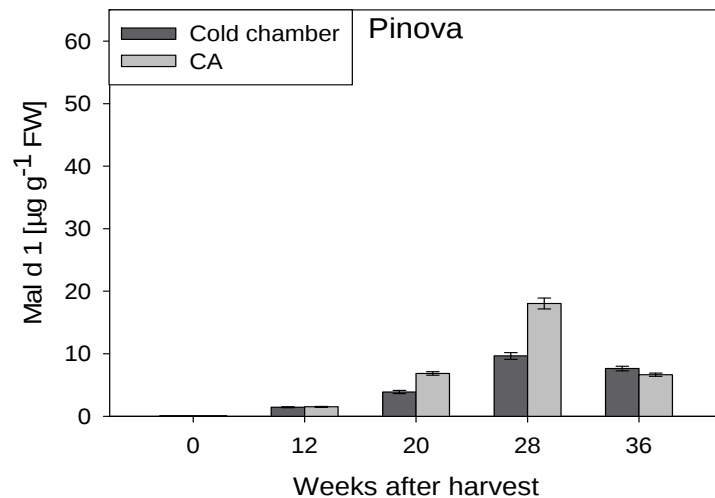
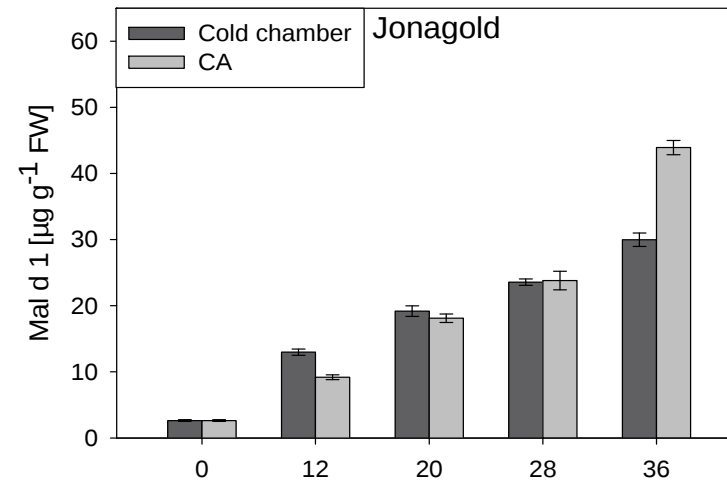
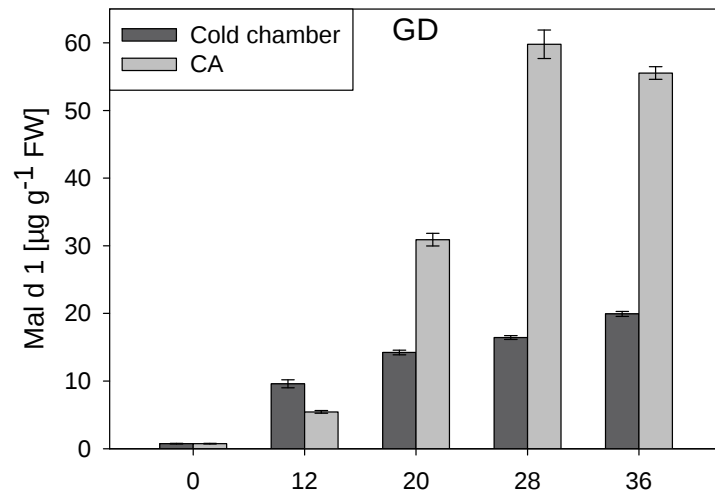


Mal d 1-Gehalt bei verschiedenen Apfelsorten unter versch. Lagerbedingungen, MW_±SE.



Woche nach der Ernte

Mal d 1-Gehalt bei verschiedenen Apfelsorten unter versch. Lagerbedingungen, MW_±SE.



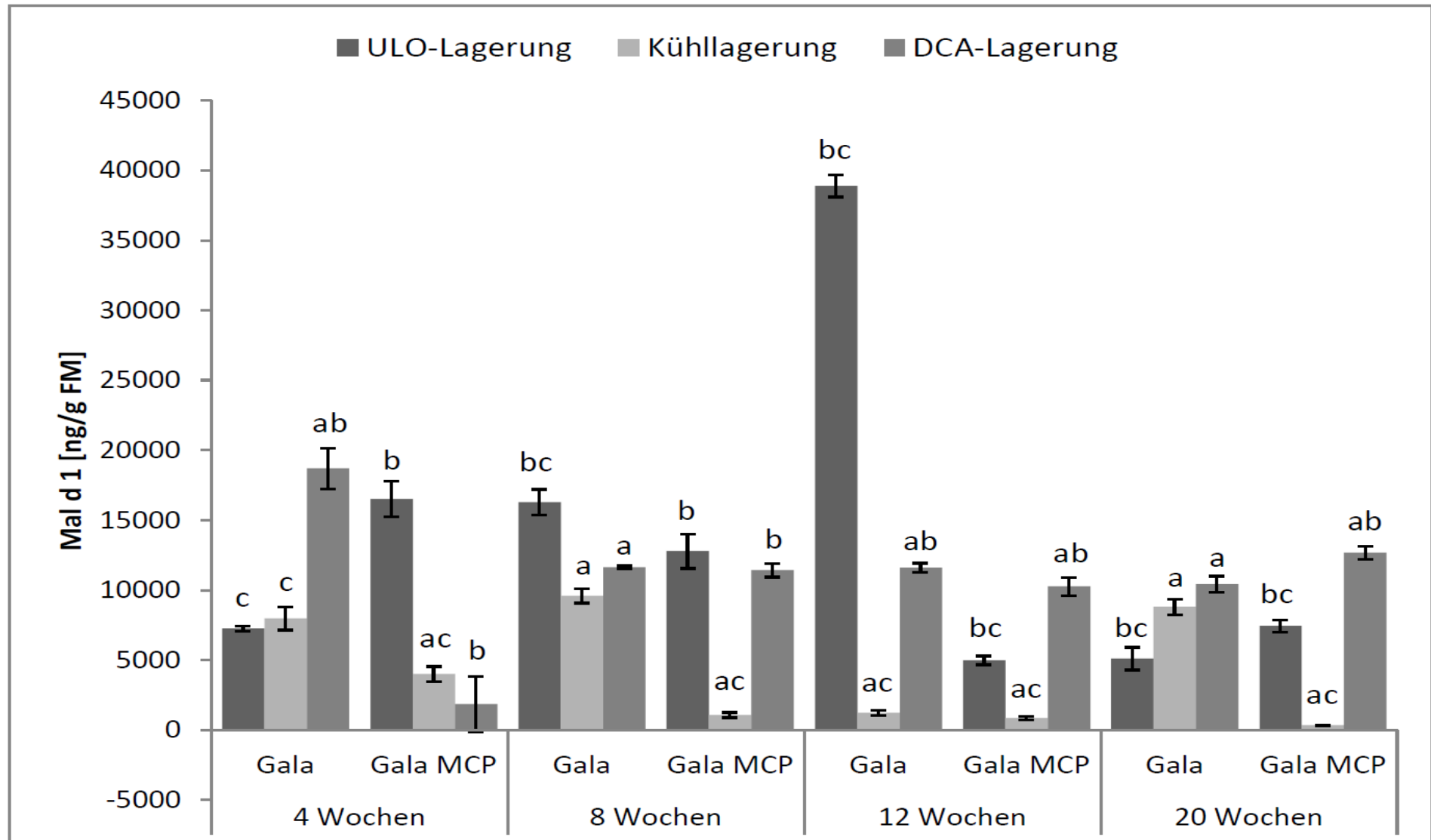


**Hochschule
Bonn-Rhein-Sieg**
University of Applied Sciences

Kühl-, CA- und DCA-Lagerung



Einfluss verschiedener Lagerungsarten auf den Mal d1-Gehalt



- Der Mal d 1-Gehalt war sorten- und standortabhängig
- Während der Lagerung kam es zu einem signifikanten Anstieg des Mal d 1-Gehaltes
- Die Lagerungstemperatur hatte einen Effekt auf die Synthese des Proteins.





**Hochschule
Bonn-Rhein-Sieg**
University of Applied Sciences

Ergebnisse BIO / IP

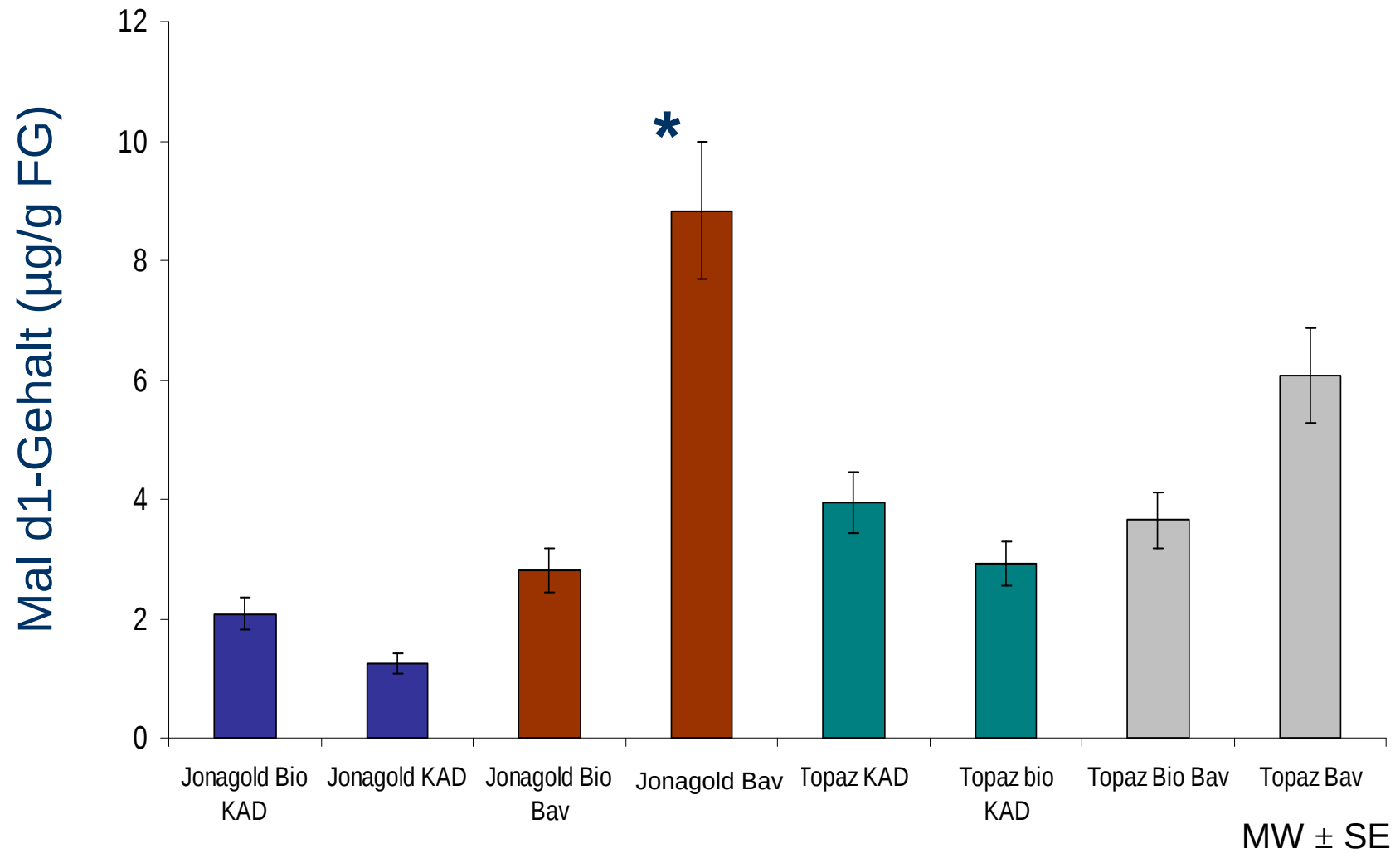


Hypothesen

- ↪ Der Mal d 1-Gehalt wird durch die Auswahl der Sorte und der Lagerungs- und Kultivierungsbedingungen beeinflusst
- ↪ Nach IP-Richtlinien produzierte Früchte zeigten höhere Mal d 1-Gehalte im Vergleich zu Früchten aus biologischem Anbau.
- ↪ Es besteht ein Zusammenhang zwischen dem Mal d 1- und Polyphenolgehalt sowie der Polyphenoloxidaseaktivität
- ↪ 1-MCP beeinflusst, als Ethyleninhibitor, die Mal d 1-Synthese während der Lagerung



Mal d 1-Gehalt BIO/ IP



Einfluss der Kultivierungsmaßnahmen auf den
Mal d 1-Gehalt [$\mu\text{g/ g FM}$]

Sorte	Standort	Bio	IP	ANOVA
Jonagold	KAD	2.0 a	1.3 b	$p = 0.004$
	Bav	1.3 b	8.7 a	$p = 0.003$
Topaz	KAD	2.7 b	4.7 a	$p = 0.035$
	Bav	2.0 b	5.5 a	$p = 0.018$

Hypothesen

- ↳ Der Mal d 1-Gehalt wird durch die Auswahl der Sorte und der Lagerungs- und Kultivierungsbedingungen beeinflusst
- ↳ Nach IP-Richtlinien produzierte Früchte zeigten höhere Mal d 1-Gehalte im Vergleich zu Früchten aus biologischem Anbau.
- ↳ Es besteht ein Zusammenhang zwischen dem Mal d 1- und Polyphenolgehalt sowie der Polyphenoloxidaseaktivität
- ↳ 1-MCP beeinflusst, als Ethyleninhibitor, die Mal d 1-Synthese während der Lagerung



Zusammenhang zwischen Polyphenolen und Mal d 1

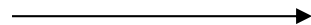
Monophenole



o-Diphenole



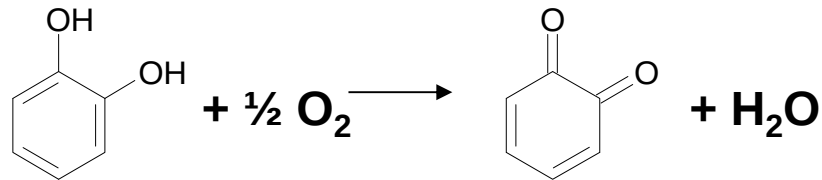
o-Chinone



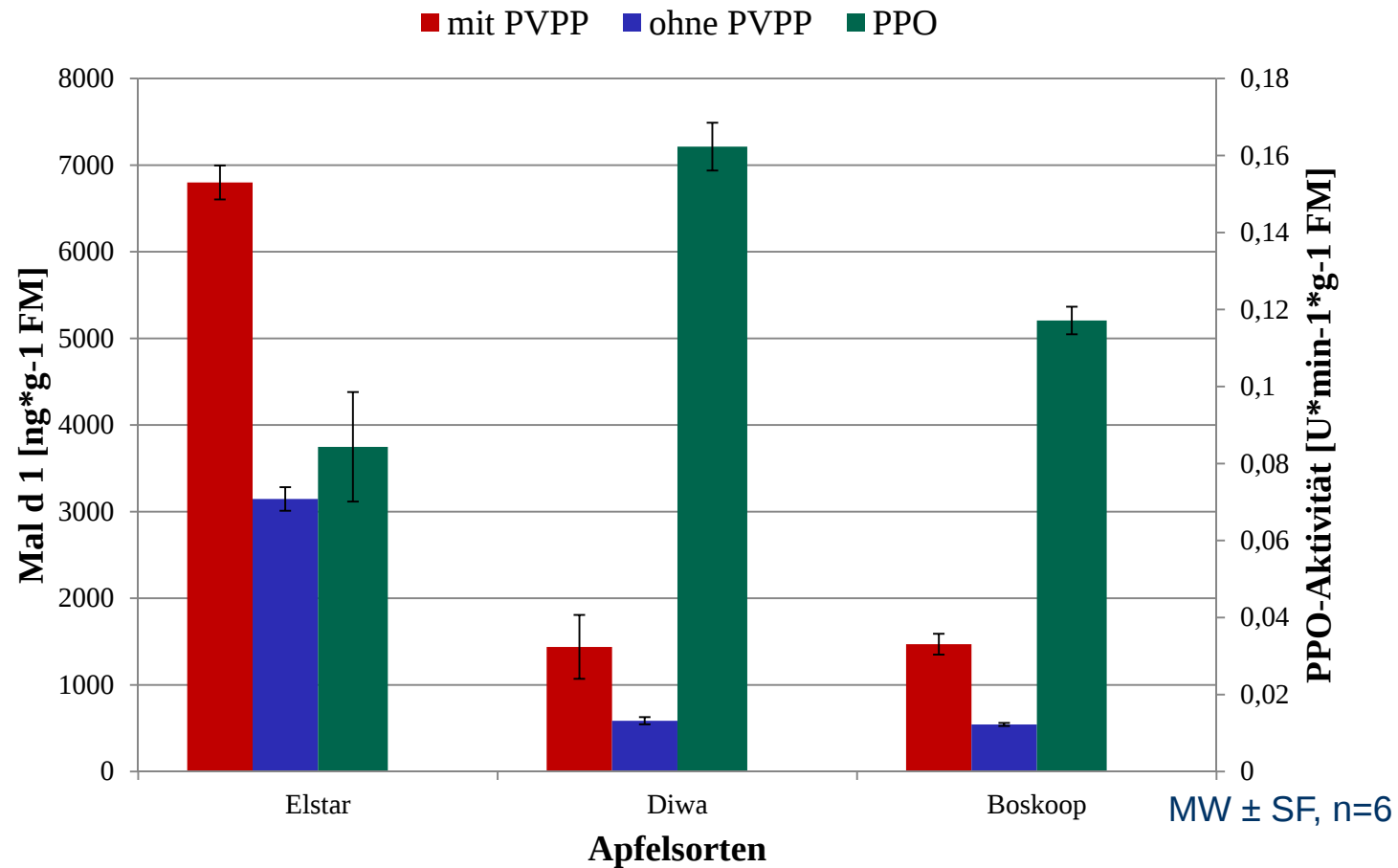
Kondensation mit Proteinen zu
polymeren Strukturen



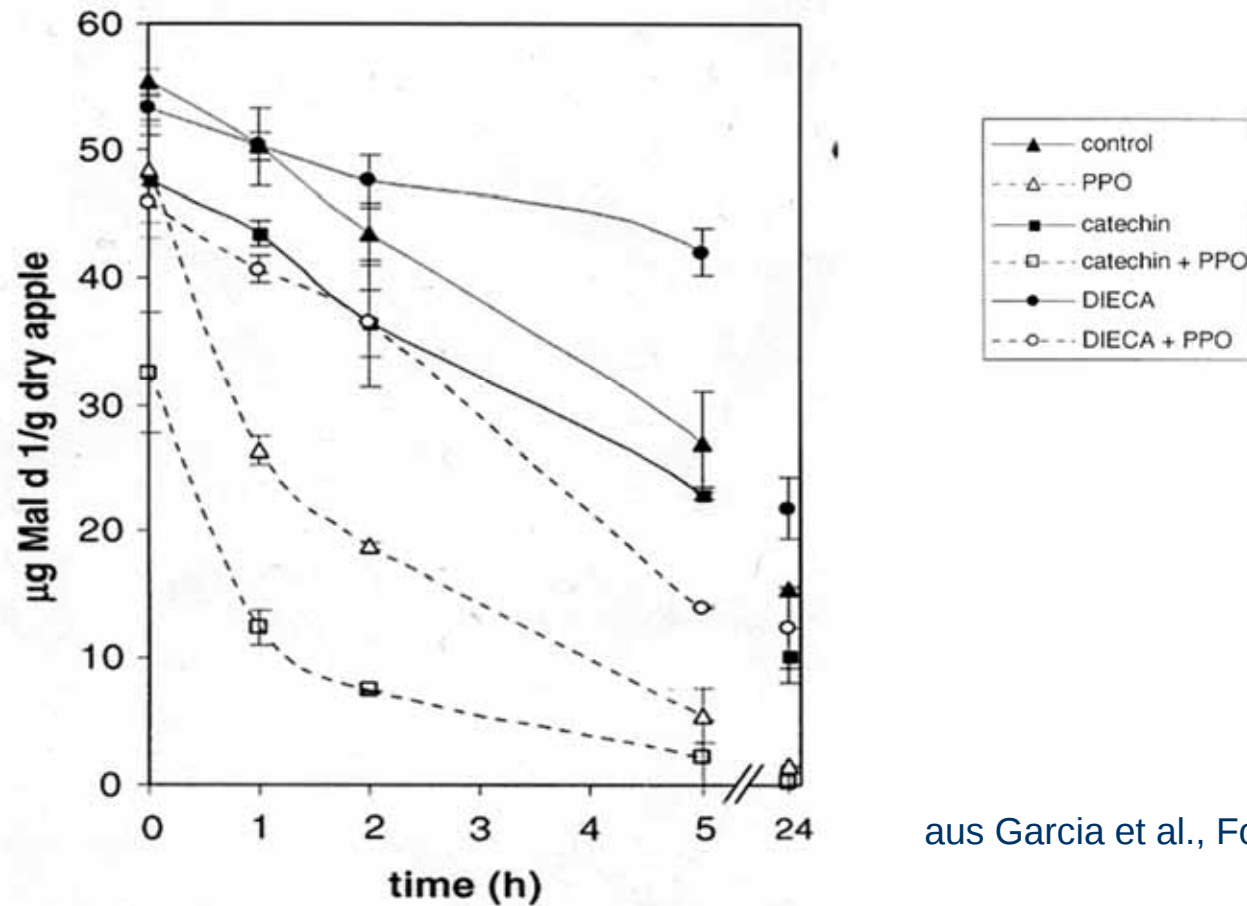
Herabsetzung der
IgE-Bindungsfähigkeit



Mal d 1 und PPO-Aktivität



Korrelationen zwischen Mal d 1, Polyphenolen und PPO



aus Garcia et al., Food Chemistry, 2007



Korrelation zwischen Mal d 1, PPO und Phenolen

		PPO	Catechin	Epicatechin	Gesamt phenole
Elstar	Mal d 1	0,826*	0,823*	0,876*	0,912*
Diwa		0,955**	0,393	0,485	0,113
Boskoop		0,793	0,361	0,023	0,178

n=6

* p<0,05; ** p<0,01



- In dieser Untersuchung konnte bei den Apfelsorten ‚Elstar‘ und ‚Diwa‘ ein Zusammenhang zwischen dem Mal d1-Gehalt, dem Polyphenolgehalt und der Polyphenoloxidase-aktivität alleine aufgezeigt werden.





**Hochschule
Bonn-Rhein-Sieg**
University of Applied Sciences

MCP

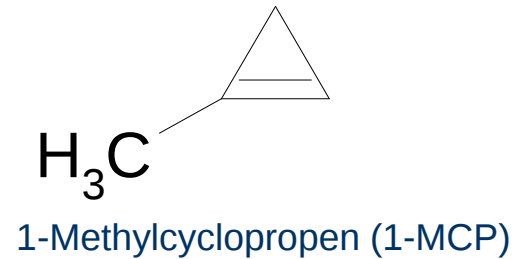


Hypothesen

- ↪ Der Mal d 1-Gehalt wird durch die Auswahl der Sorte und der Lagerungs- und Kultivierungsbedingungen beeinflusst
- ↪ Es besteht ein Zusammenhang zwischen dem Mal d 1- und Polyphenolgehalt sowie der Polyphenoloxidaseaktivität
- ↪ 1-MCP beeinflusst, als Ethyleninhibitor, die Mal d 1-Synthese während der Lagerung



Material und Methoden IV



„Golden Delicious“



1-MCP
Behandlung:
24 h, bei 2°C

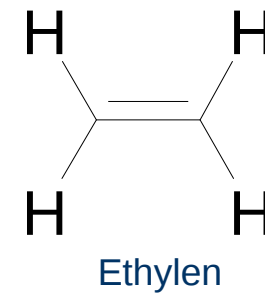


Lagerung:

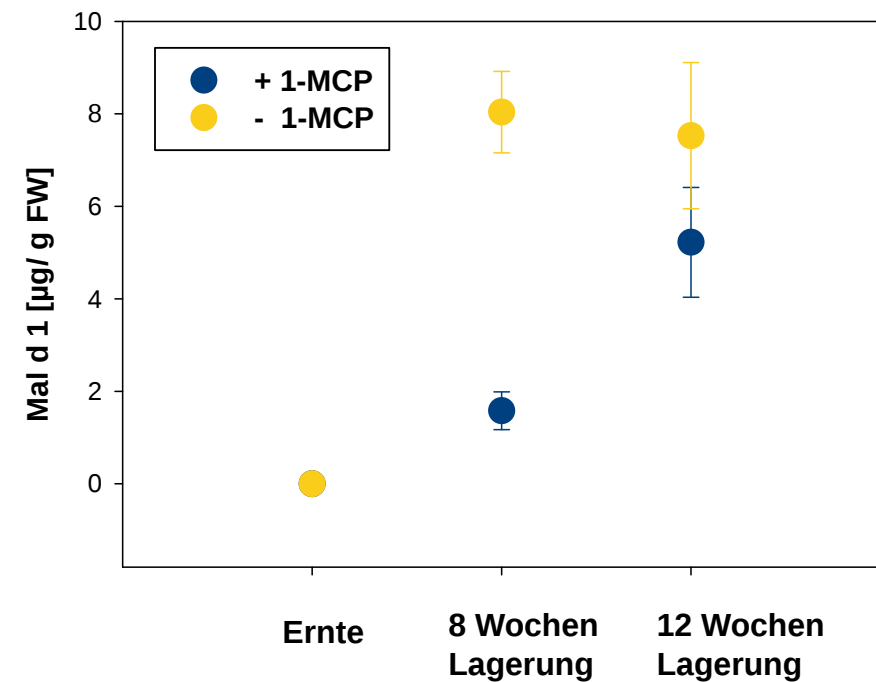
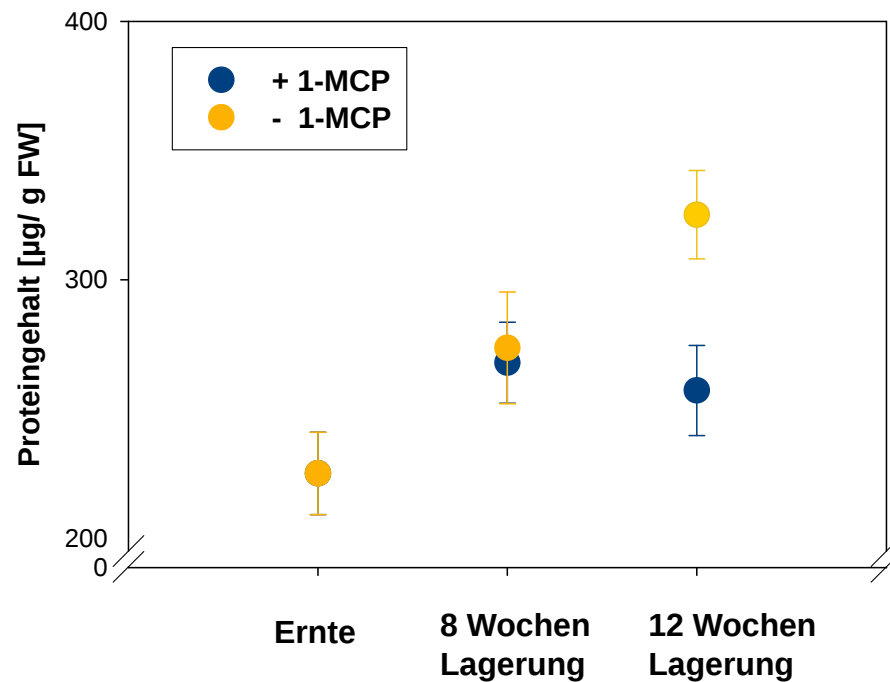
8 und 12 Wochen
im Kühllager bei 2°C



Keine 1-MCP
Behandlung,
Lagerung bei 2°C

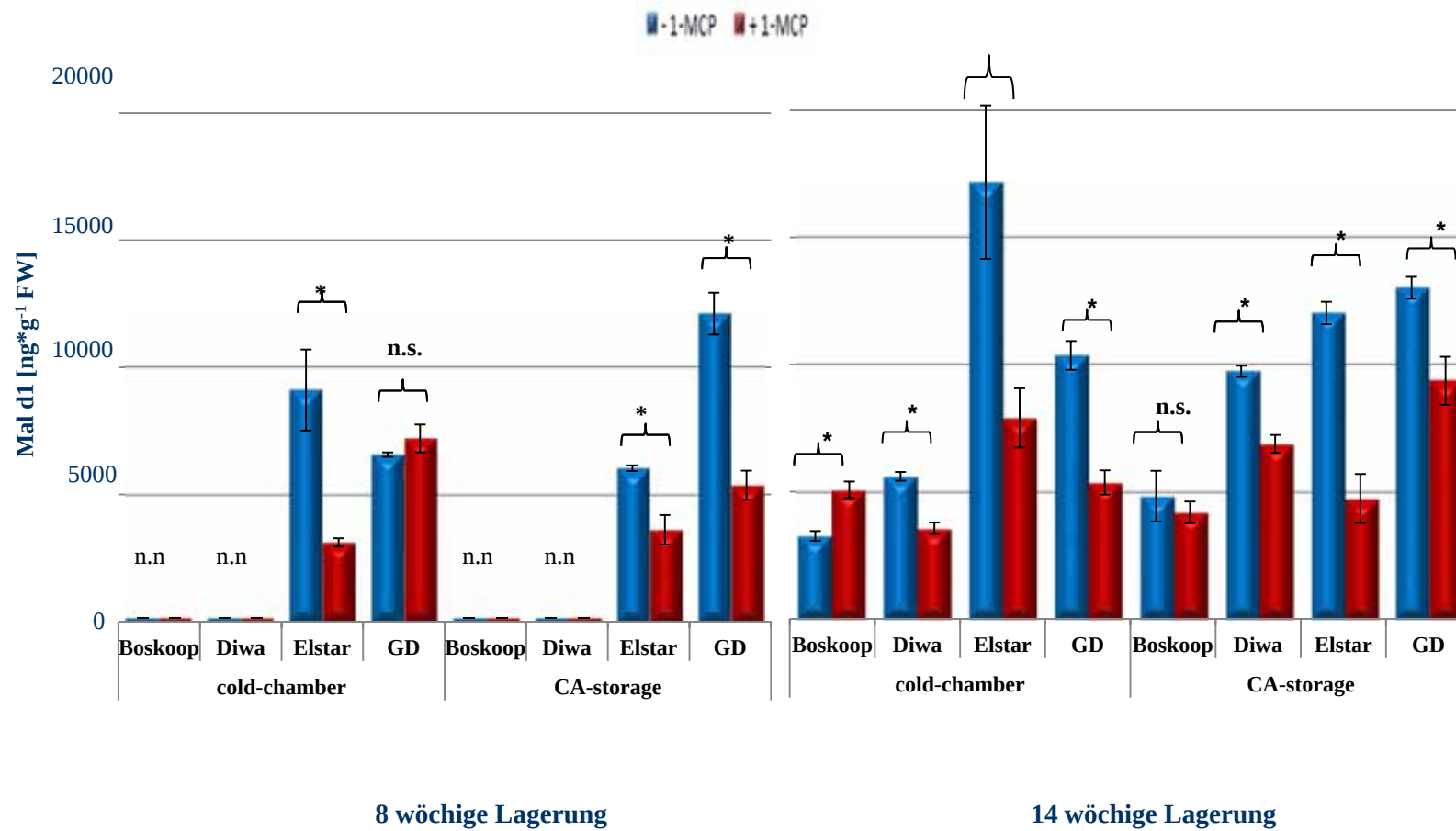


Einfluss einer 1-MCP-Behandlung auf den Protein- und Mal d 1-Gehalt während der Lagerung



MW $\pm$ SF, n = 5

Einfluss einer 1-MCP-Behandlung auf Mal d 1-Gehalt während der Lagerung



- Eine 1-MCP-Behandlung der Früchte nach der Ernte führte zu geringeren Mal d 1-Gehalten nach 8 Wochen Kühlung.

Dies lässt auf einen Einfluss von Ethylen auf die Mal d 1-Synthese schließen.

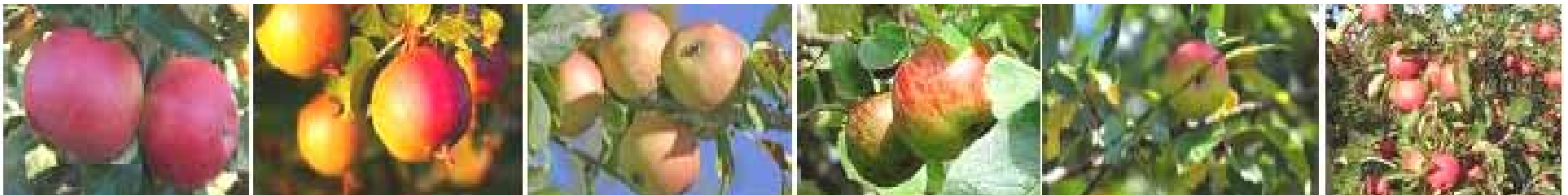
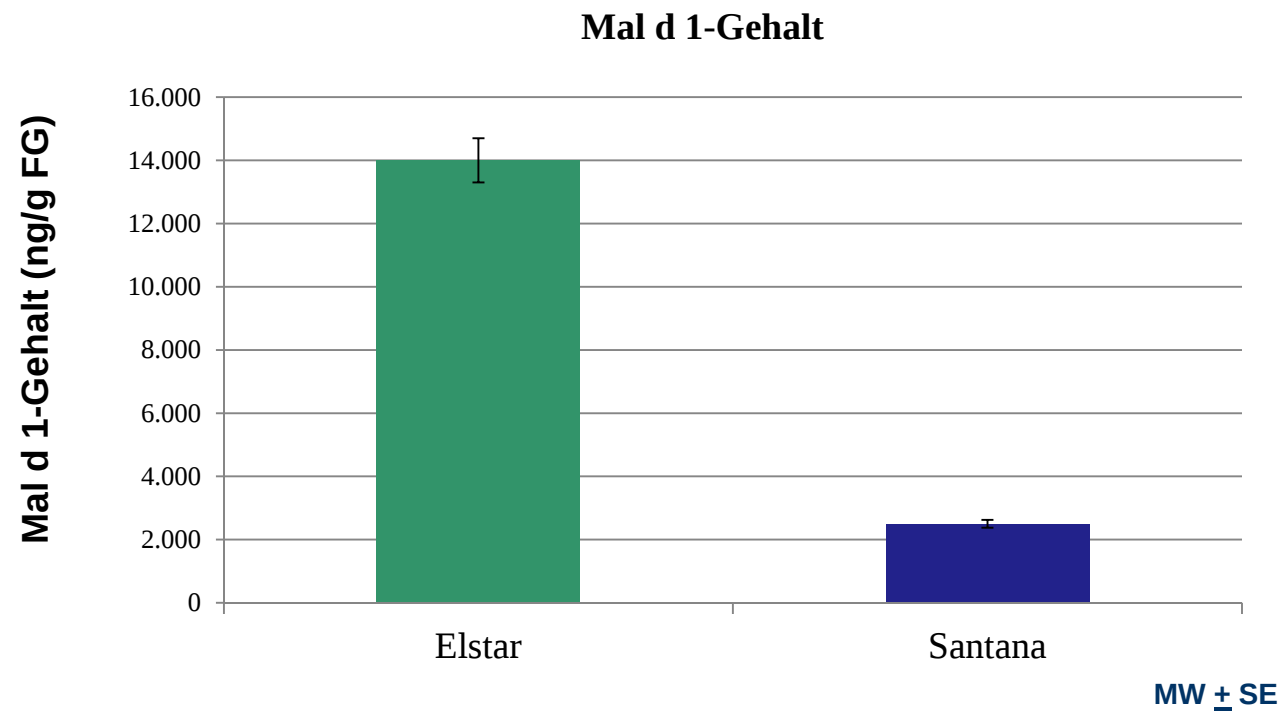


Hypothesen

- Der Mal d 1-Gehalt wird durch die Auswahl der Sorte und der Lagerungs- und Kultivierungsbedingungen beeinflusst
- Es besteht ein Zusammenhang zwischen dem Mal d 1- und Polyphenolgehalt sowie der Polyphenoloxidaseaktivität
- 1-MCP beeinflusst, als Ethyleninhibitor, die Mal d 1-Synthese während der Lagerung
- Durch Züchtung kann der Mal d1 –Gehalt bei Apfel reduziert werden.



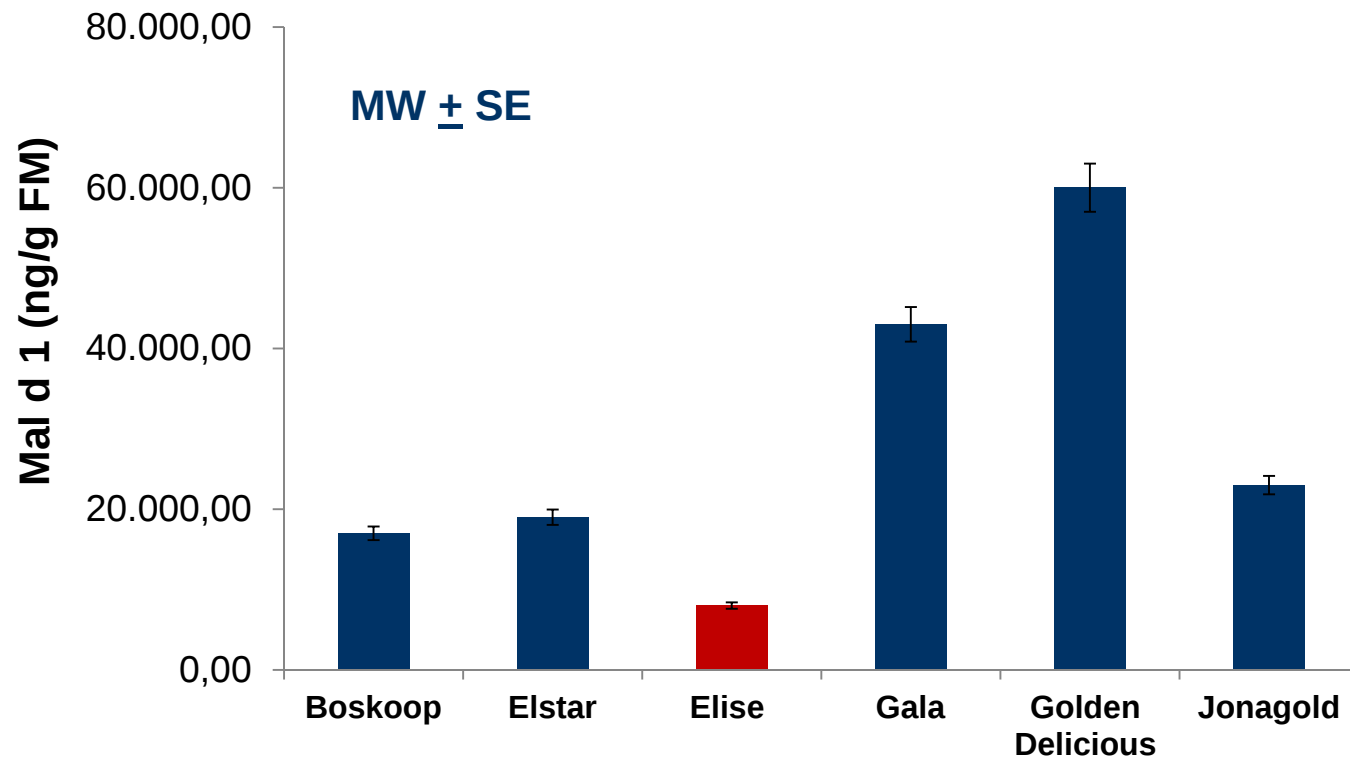
Mal d 1- Gehalt bei ‚Elstar‘ und ‚Santana‘ zum Erntetermin (2010).



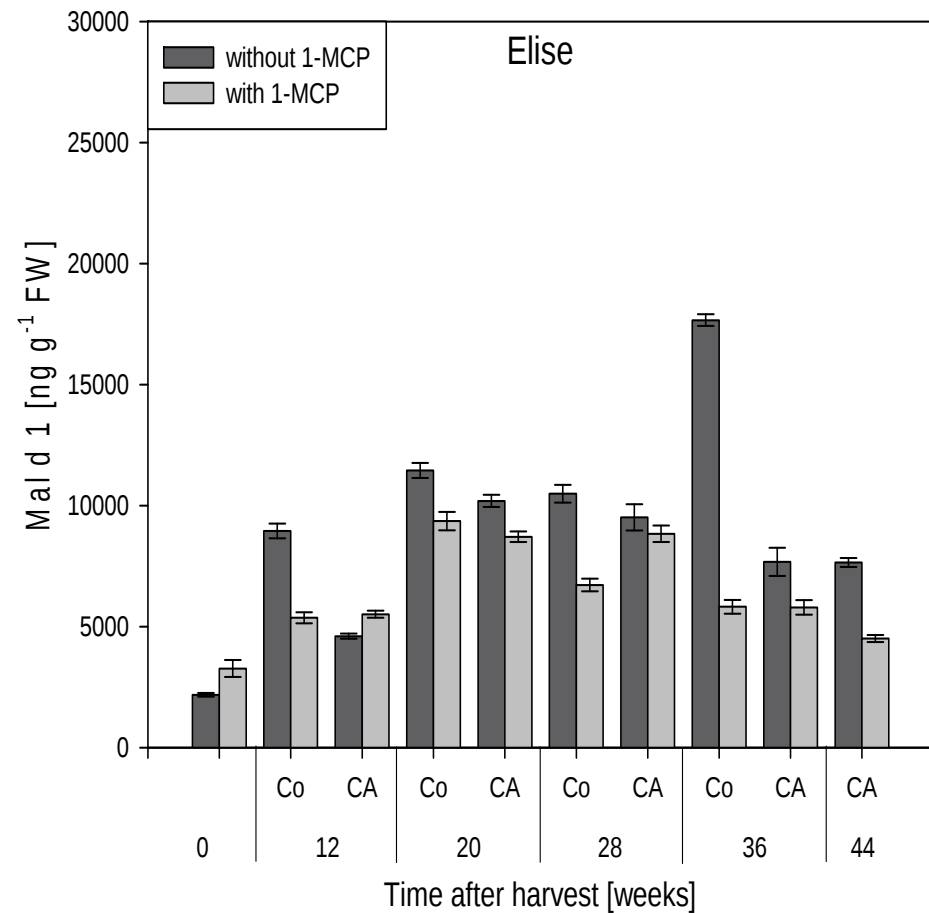
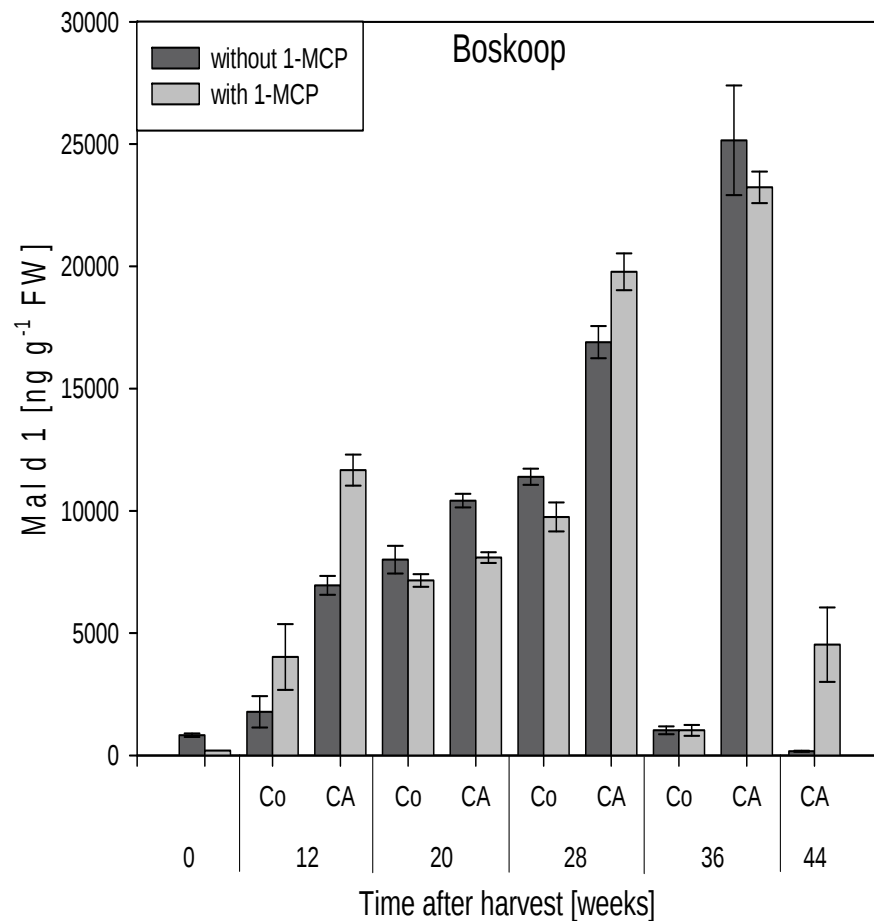
Labelling



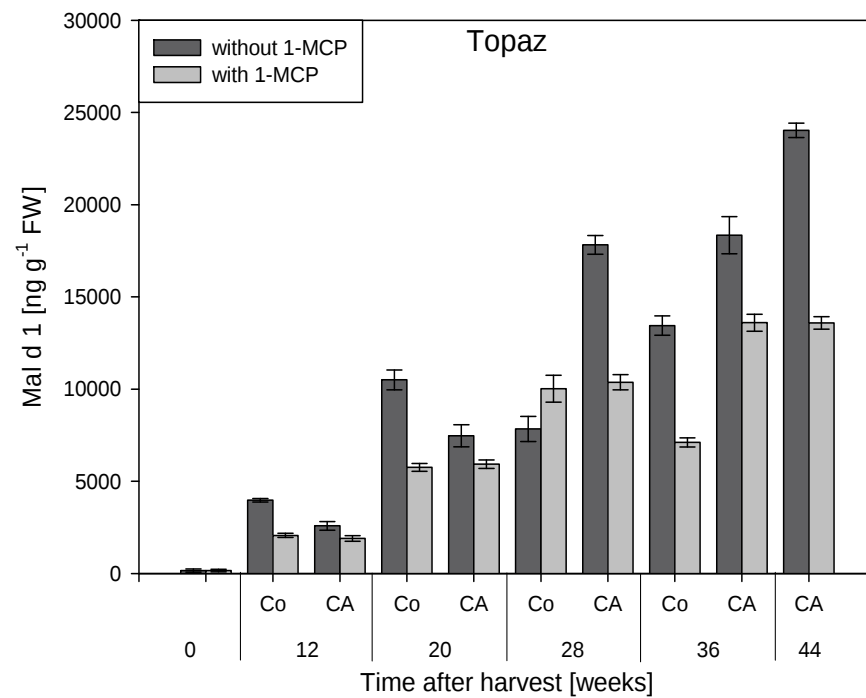
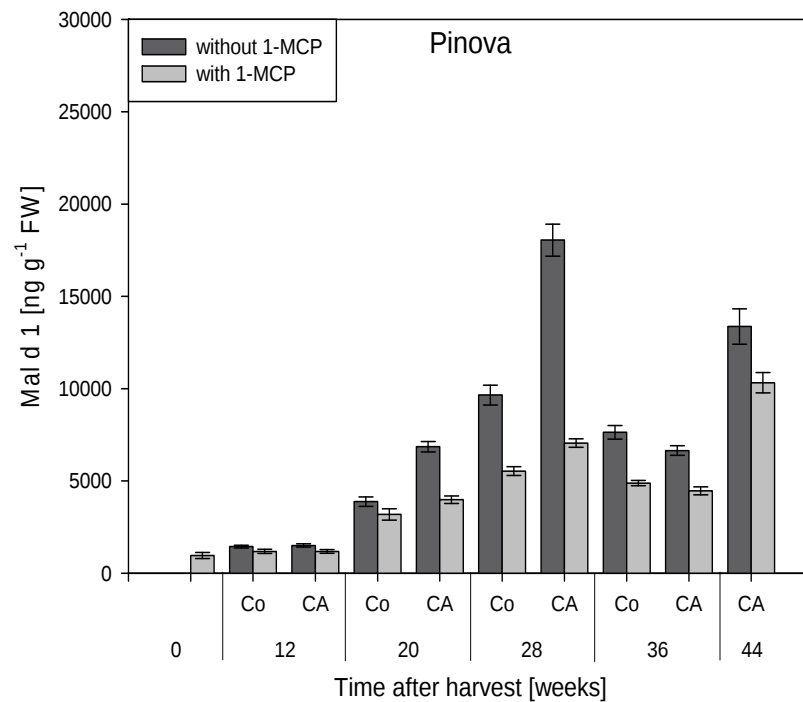
Sorten mit geringem Mal d 1-Gehalt



Mal d 1- Gehalte bei Boskoop und Elise nach Lagerung bis zu 44 Wochen



Mal d 1- Gehalte bei Pinova und Topaz nach Kurz- bzw. Langzeitlagerung und MCP-Behandlung



Vererbung Mal d 1 Gehalte

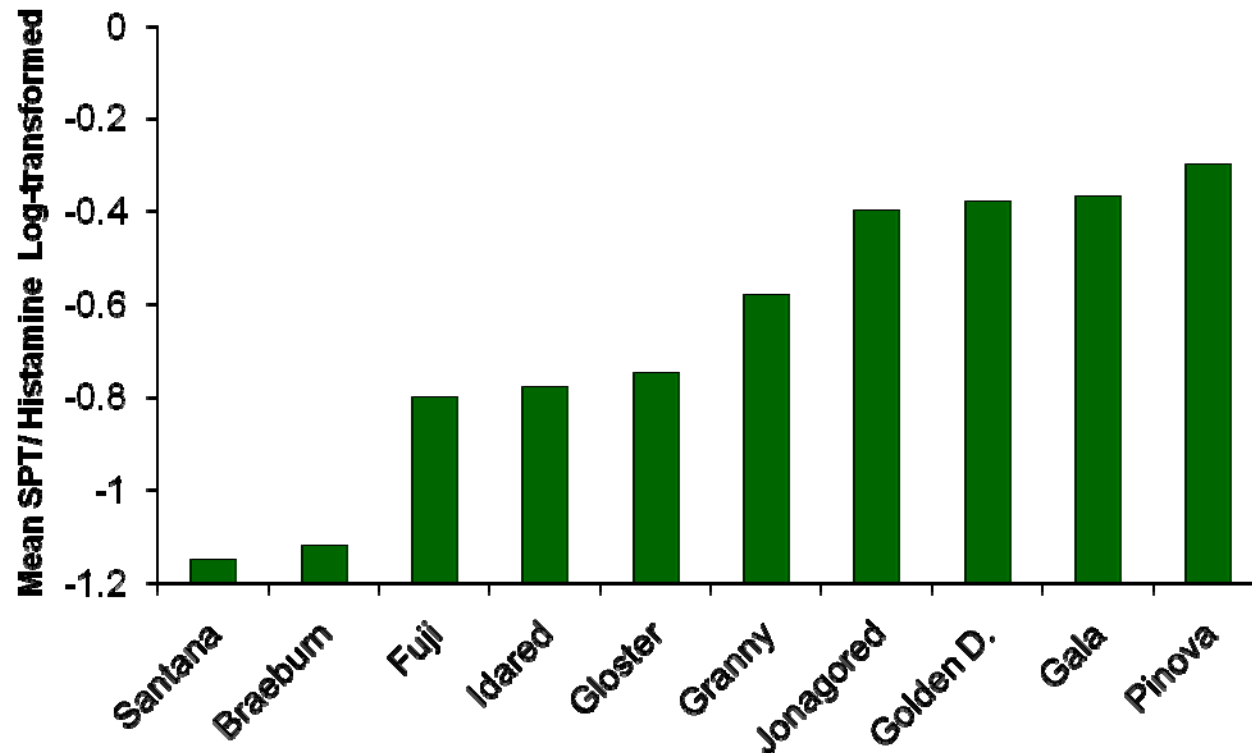
	Mutter	Vater	Allergenität
	Golden Delicious	Sämling	hoch
➡	Boskoop	Sämling	niedrig
➡	Pinova	Clivia Golden Delicious	niedrig
	Jonagold	Golden Delicious Jonathan	hoch
	Gala	Kidds Orange Golden Delicious	hoch
	Elstar	Golden Delicious Ingrid Marie	hoch
➡	Topaz	Rubin Vanda	niedrig
➡	Elise	Septer CoxOrange	sehr niedrig
➡	Santana	Elstar Priscilla	sehr niedrig

Prick-Tests

hochsignifikanter Unterschied in
der allergenen Potenz der Sorten



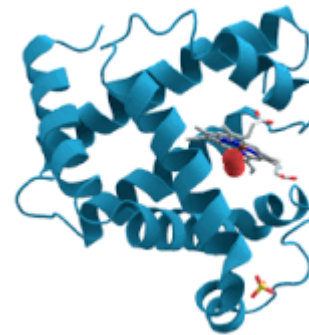
In vivo Bestimmung der Allergenität; Prick-to-prick Test¹ verschiedener Apfelsorten (Bolhaar et al., 2005)



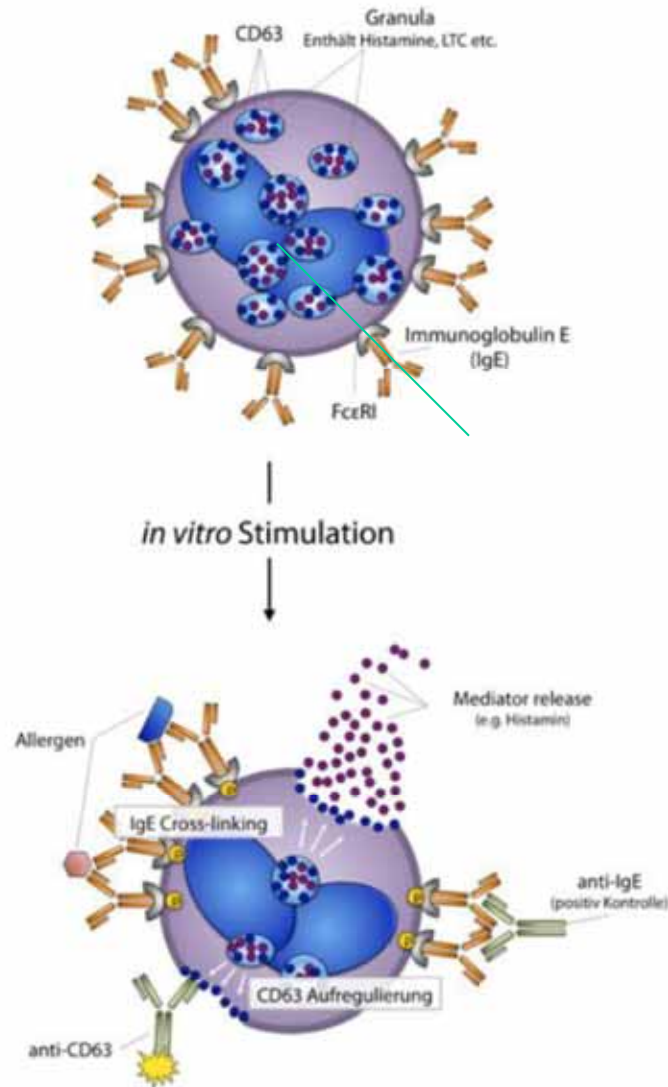
Die analytischen Untersuchungen des Mal d1-Gehaltes konnten mit Hilfe eines basophilen Aktivierungstest bestätigt werden

For diesen Test benötigt man:

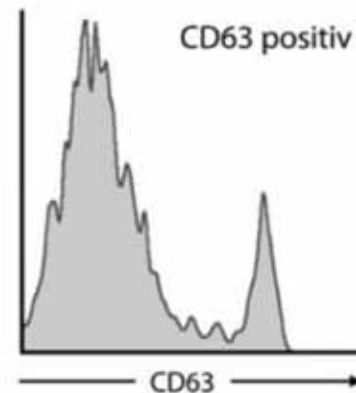
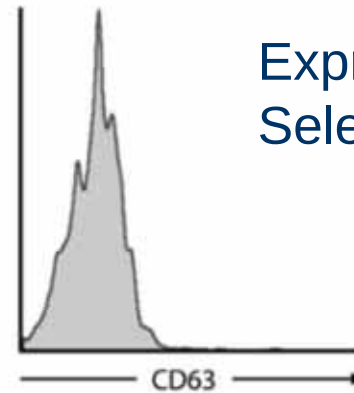
- Blut von Allergikern
- Extrakte von Früchten mit nativem Protein

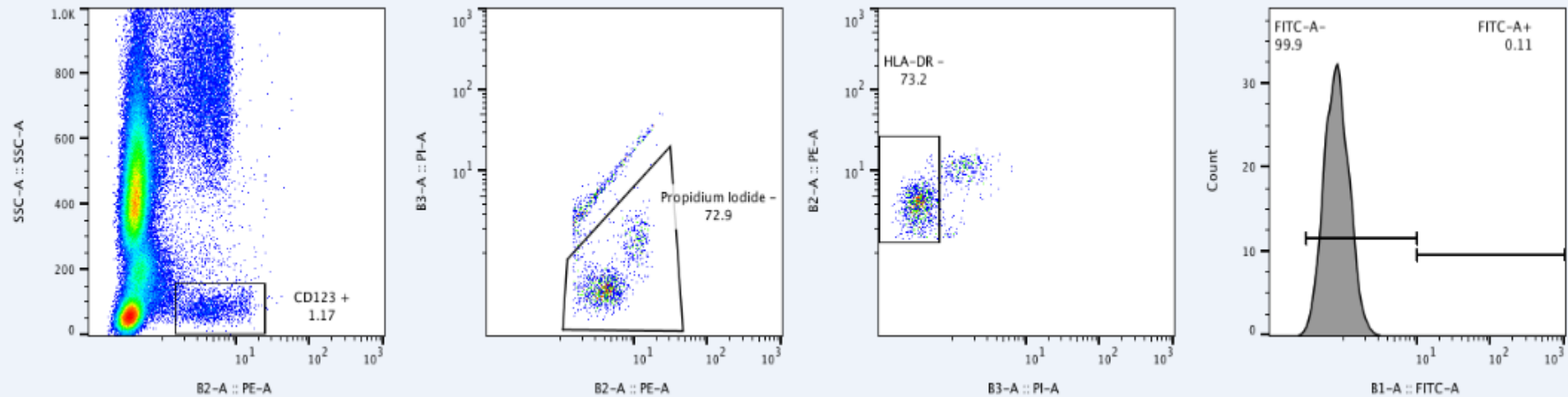


Basophil activation test - principle

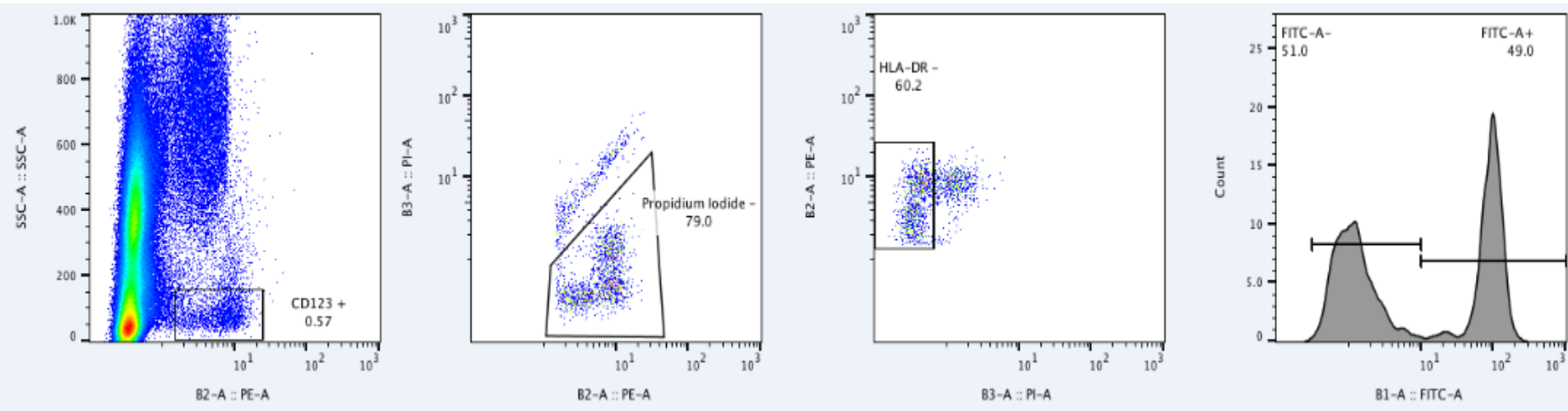


Exprimierung eines basophilen Selektionsmarker CD 123





Beispielhafte Auswertung mit dem Programm Flowjo (Version 10.08.08) Probennummer 18; SSC-A = low side scatter; B = blauer Kanal; PE = Farbstoff; PI = Propidium Iodide



Beispielhafte Auswertung mit dem Programm Flowjo (Version 10.08.08) Probennummer 36; SSC-A = low side scatter; B = blauer Kanal; PE = Farbstoff; PI = Propidium Iodide

Gala



GB 120



Wellant



Braeburn



Natyra



Pinova



GC 210



Abstammung und **Vor**-einstufung der Sorten

Gala: Kidds Orange*Golden Delicious - hoch allergen

Braeburn: Lady Hamilton*Granny Smith – moderat bis gering

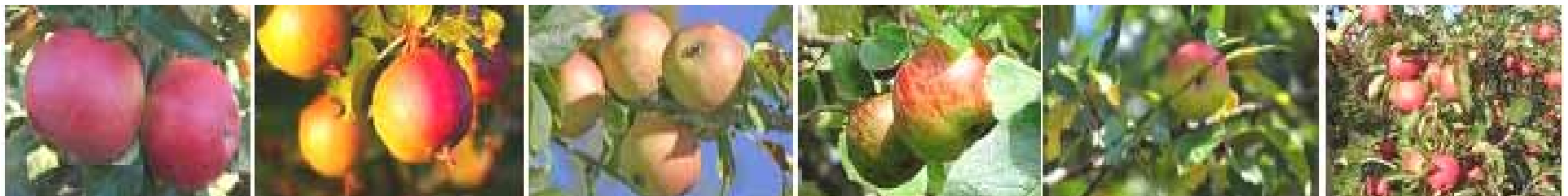
Pinova: Clivia*Golden Delicious- unterschiedliche Einstufung

Gräfin Goldbach (Bay 4069): Rubinette*Pomona – gering

Natyra: Elise*schorfresistente Sorte – keine Voreinstufung

Bay 4210: ??*???- allergikerfreundlich

Wellant: Elise*Zuchtklone – niedrig-moderat



Mal d 1-Gehalte bei verschiedenen Apfelsorten mittels Sandwich ELISA (Januar 2015)

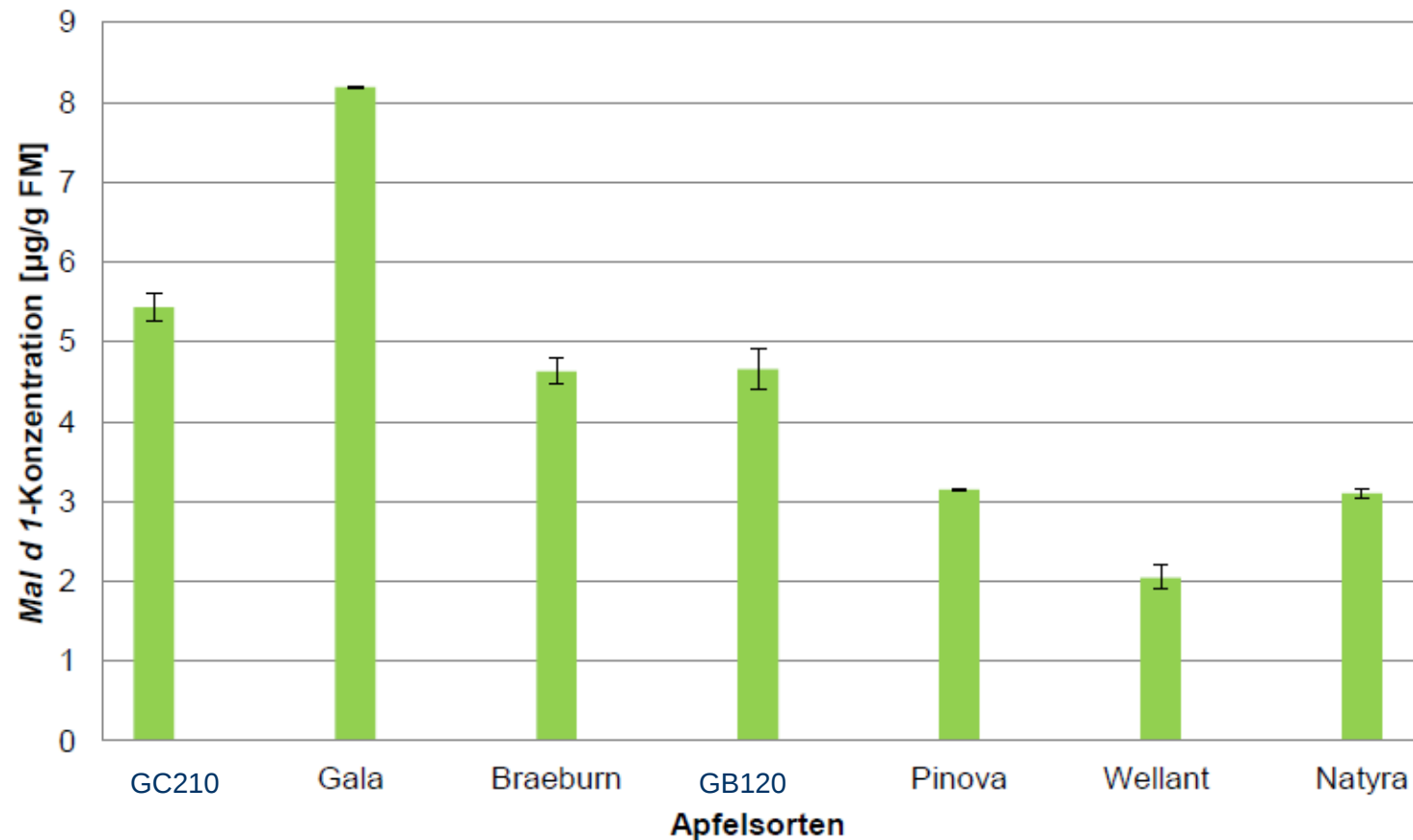


Abbildung 23 Mittelwerte $\pm$ Standardfehler der Mal d 1-Konzentrationen [$\mu\text{g/g FM}$] der untersuchten Apfelsorten (ELISA 1) zum Zeitpunkt der Reife



Mal d1-Gehalte – Sandwich ELISA

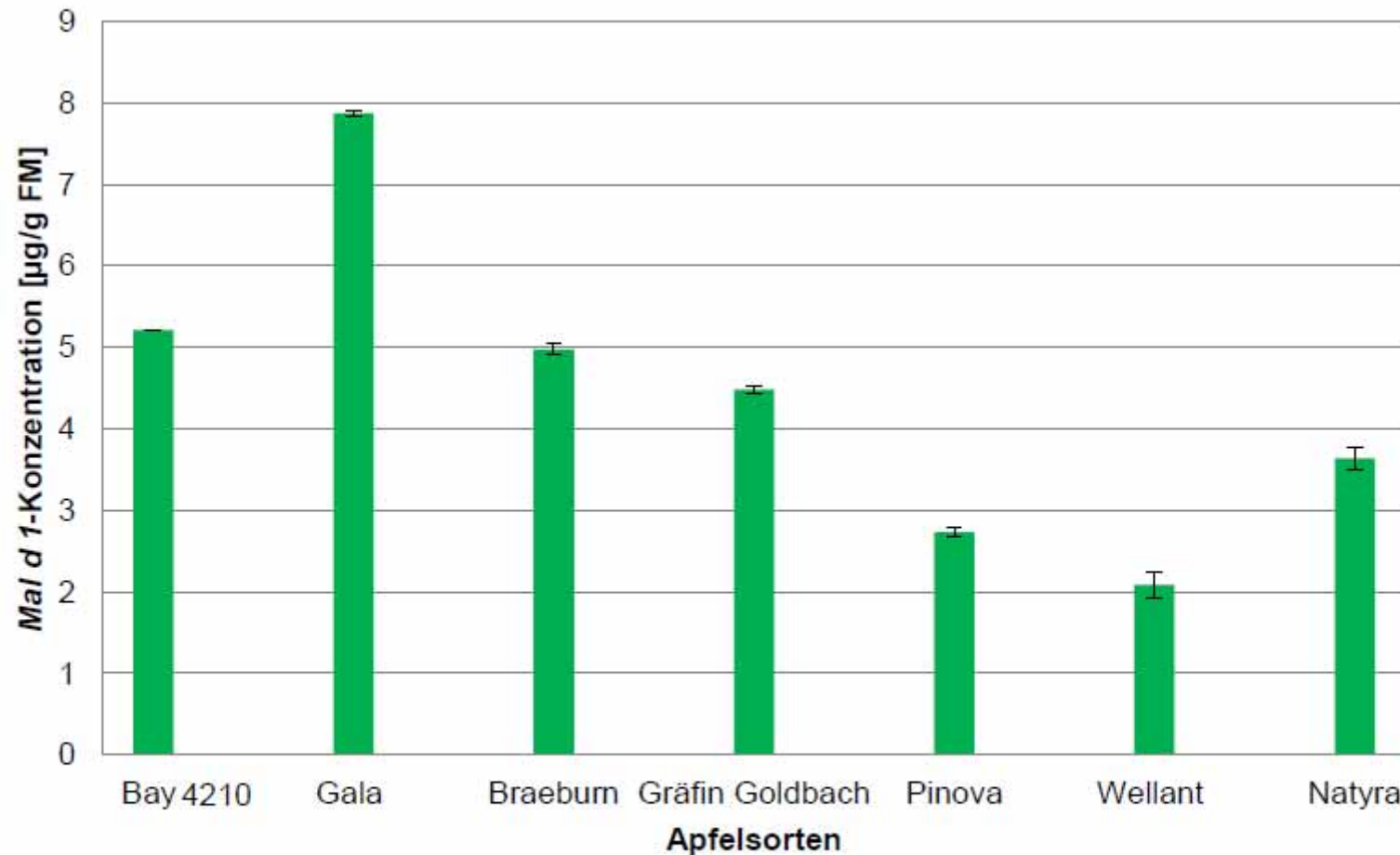


Abbildung 24 Mittelwerte +/- Standardfehler der Mal d 1-Konzentrationen [µg/g FM] der untersuchten Apfelsorten (ELISA 2) zum Zeitpunkt der Reife

Mal d1-Gehalte – Sandwich ELISA

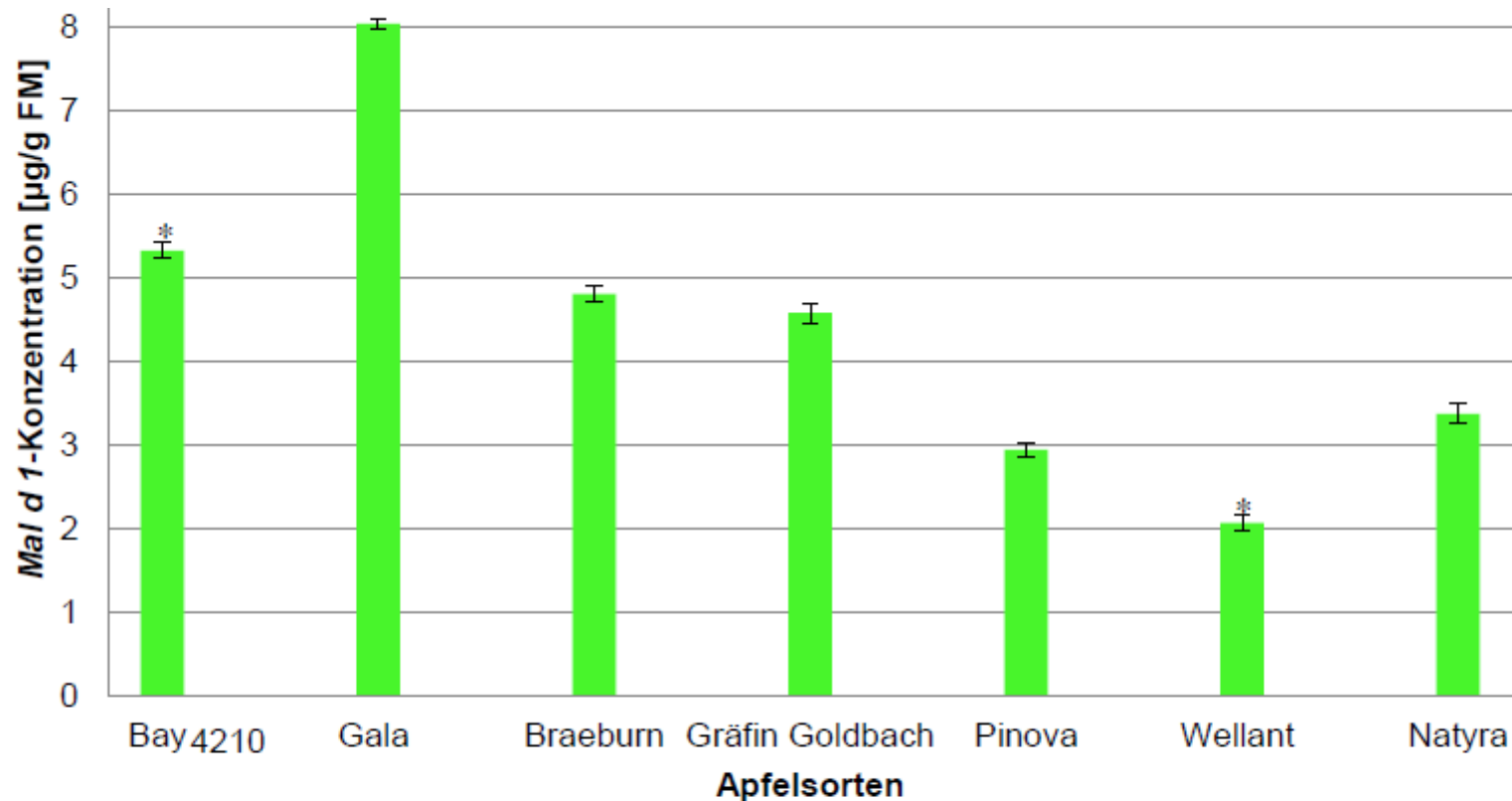


Abbildung 26 Vergleich Mittelwert $\pm$ Standardfehler der Mal d 1-Konzentrationen [µg/g FM] verschiedener Apfelsorten zum Zeitpunkt der Reife; t-Test für gepaarte Stichproben zum Signifikanzniveau 0,05; * kennzeichnet Apfelsorten deren mittlere Mal d 1-Konzentration [µg/g FM] signifikant (Signifikanzniveau 0,05) unterschiedlich zu allen anderen ermittelte mittleren Mal d 1-Konzentration [µg/g FM] ist

Basophilen-Reaktion verschiedener Sorten

Apfelsorte	CD123 +/PI -/HLA-DR -/FITC-A+ Freq. of Parent
Blindwert	0
Mal d 1 (100 ng/ml)	5,8
Wellant	0
Pinova	2,6
Gala	18,3
Natyra	0,1
Braeburn	0,2
GB 120	0,1
GC 210	0,2





**Hochschule
Bonn-Rhein-Sieg**
University of Applied Sciences

Fallbeispiel.....



Fallbeispiel:

Junge Frau (22 Jahre), Apfelallergikerin, bekommt einen Korb frische Bio-Äpfel geschenkt.

Nach Verzehr keine Allergie.....



Fallbeispiel:

Junge Frau (22 Jahre), Apfelallergikerin, bekommt einen Korb frische Äpfel geschenkt.

Verzehr am Tag danach

- Atemnot
- Heuschnupfen
- Hautjucken
- Arzt



????

Fallbeispiel:

Es wurden Untersuchungen zur verzehrten Nahrung an beiden Tagen gemacht

Ernährung weitgehend gleich

Sie hatte jedoch am 2. Tag wegen Kopfschmerzen eine Tablette genommen.....



Und ist Fahrrad gefahren.....

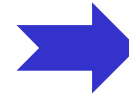


Eine Weiterverfolgung dieser Einflussfaktoren bestätigte.....

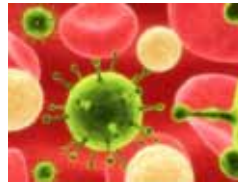
Sport



Medikamente



Infektionen



Verstärkung der
Symptome

Fallbeispiel: Person 22 Jahre



Zusammenfassung

Der Mal d 1-Gehalt:

- ist sorten- und standortabhängig
- wird durch die Kultivierungsmethode beeinflusst
- steigt während der Lagerung an
- wird durch eine 1-MCP-Behandlung verringert
- wird durch hohe Polyphenolgehalte in Verbindung mit hohen PPO Aktivitäten beeinflusst (gemindert)
- Ausprägung der Allergenität ist abhängig vom Gesundheits- und Belastungszustand der Personen





© Nouvellesimages

**Vielen Dank für
Ihre
Aufmerksamkeit!**



**Hochschule
Bonn-Rhein-Sieg**
University of Applied Sciences