

Univ.-Doz. Dr. Mag. Karin HOFFMANN-
SOMMERGRUBER
Institut für Pathophysiologie
Zentrum für Physiologie und
Pathophysiologie
Medizinische Universität Wien
AKH-EBO 3Q
Währinger Gürtel 18-20, 1090 Wien
Email: Karin.Hoffmann-
Sommergruber@meduniwien.ac.at

Endbericht für

Forschungsprojekt Nr. 1383
BMLFUW, GZ 21.210/76-II/1/03

"Nachweis von stress-induzierbaren Allergenen in Äpfeln von Bäumen mit Feuerbrand im Vergleich zu gesunden Früchten"

Zeitraum: 1.12. 2003 – 31. 12. 2005

Einleitung

Der Apfel ist europaweit die am häufigsten konsumierte Obstsorte und ist vom ernährungsphysiologischen Standpunkt aus eine ideale Frucht hinsichtlich seiner Vitamine und Inhaltsstoffe und ist das ganze Jahr hindurch erhältlich. Jedoch groben Schätzungen nach sind rund 1 Million Europäer Apfelallergiker. Die Symptome reichen von unangenehmem Jucken im Mund, Rachenraum und Ohren, Schwellungen und Rötungen bis hin zu schwereren Symptomen des Gastrointestinaltraktes (Durchfall, Magenkrämpfe) aber auch generalisiertes Ekzem und Schockzustände sind in vereinzelt Fällen beschrieben worden.

Zur Zeit sind vom Apfel (*Malus domestica*) 4 verschiedene relevante Allergene bereits identifiziert worden. Die bereits bekannten Allergene sind Mal d 1 [1, 2], Mal d 2 [3], Mal d 3 [4] und Mal d 4 [2]. Davon sind Mal d 1, Mal d 2 und Mal d 3 Mitglieder verschiedener Familien der „pathogenesis-related proteins“ (PR-Proteine), Proteine [5], die durch Stress oder Pathogenbefall vermehrt in der Pflanze produziert werden [6]. Mal d 4 hingegen ist ein Vertreter der Profilinfamilie und scheint durch Pathogenbefall nicht vermehrt exprimiert zu werden.

Mal d 1

Mal d 1 (17 kDa) ist das Hauptallergen der Apfelallergiker in Mittel- und Nordeuropa. Dieses Protein findet sich vermehrt in der Frucht. Es gehört zur Familie der pathogenesis-related proteins, wird also bei Stress hochreguliert [6]. Es existiert jedoch nicht nur ein Mal d 1-Protein mit einer Sequenz in der Frucht, sondern viele Isoformen. Momentan sind 18 verschiedene im Apfel bekannt, die sich nur in einigen wenigen Aminosäuren unterscheiden und die von Gao und Mitarbeiter auch auf DNA Ebene nachgewiesen worden sind. Diese 18 verschiedenen Gene für Mal d 1 konnten im Apfelgenom identifiziert und deren Lokalisation mittels „Linkage Gruppen“ näher bestimmt werden [7]. Es befindet sich vermehrt in alten Blättern und in Früchten [8, 9] aber nicht im Apfelpollen. Mal d 1 ist weder stabil gegenüber

Wärmebehandlung noch gegenüber enzymatischer Verdauung [10]. Daher verursacht Mal d 1, vor allem orale Allergiesymptome, die sich auf den Mund- und Rachenraum beschränken, und nur sehr selten kommt es zu gastrointestinalen Beschwerden oder zu einer Schocksymptomatik.

Die Struktur von Mal d 1 ähnelt sehr der des Birkenpollenallergens Bet v 1 [11-13]. Die DNA-Sequenz zwischen beiden Allergenen ist ähnlich, und das drückt sich auch in der räumlichen Struktur aus. Die IgE-Epitope - das sind Sequenzen im Molekül, die von IgE-Antikörpern erkannt werden - sind von der Struktur abhängig. Durch Austausch von nur 5 Aminosäuren konnte kürzlich gezeigt werden, dass die IgE-Bindungsfähigkeit der dadurch entstandenen Mal d 1 Mutante im Vergleich zum Wildtyp Protein deutlich vermindert war [14]. Wir gehen davon aus, dass in Nord- und Mitteleuropa die primäre Sensibilisierungsquelle der Birkenpollen ist und später - das kann kurz danach oder Jahre später sein - die Reaktionen auf frische Früchte, wie z. B. Apfel und Gemüse kommen.

Mal d 2

Mal d 2 (23 kDa) gehört wie Mal d 1 zu einer pathogenesis-related protein-Familie (PR-Familie 5;) und heißt thaumatin-ähnliches Protein [15]. Es konnte ein Gen im Apfelgenom lokalisiert werden [16]. Die Aminosäuresequenz enthält 16 Cysteinreste und besitzt dadurch die Fähigkeit, 8 Disulfidbrücken zu bilden, die dem Protein eine starre und strikte Struktur verleihen, die nicht so leicht aufzubrechen ist. Die Vertreter innerhalb dieser Familie ähneln sich nicht so sehr in ihrer Sequenz, wohl aber in ihrer dreidimensionalen Struktur: Die Positionen der Cysteinreste innerhalb der Sequenz sind stark konserviert. Mal d 2 wirkt gegen pathogene Pilze, die eine Pflanze befallen [3]. Es integriert sich wahrscheinlich in die Membranen, reißt sie auf, hindert die Pilze auf diese Weise in ihrem Wachstum und bringt sie damit zum Absterben. Mal d 2 ist ein mittelhäufig erkanntes Allergen im Apfel, und kommt außerdem in Kirschen, Paprika und den Pollen einer Zedernart vor [17-19].

Mal d 3

Mal d 3 (unspezifisches Lipid transfer Protein; 9 kDa) gehört ebenfalls zu den „pathogenesis-related proteins“ [5]. Es wurden für Mal d 3 2 Genorte im Apfelgenom bis dato nachgewiesen [20]. Auch diese Proteine sind sehr stabil und resistent sowohl gegenüber enzymatischem Verdau als auch gegenüber Wärmebehandlung. Im Apfel ist Mal d 3 vor allem in der Schale zu finden [21]. Patienten, die mit diesem Allergen reagieren, haben weniger Beschwerden beim Verzehren des geschälten Apfels. Durch seine stabile Struktur ist dieses Allergen auch in pasteurisierten Fruchtsäften zu finden und erhält bei mittlerer Temperaturbehandlung seine IgE Reaktivität [22].

Mal d 4

Mal d 4 (14 kDa), Profilin, steht für eine kleinere Genfamilie im Apfel, die aus mehreren Isoformen besteht. Von Mal d 4 konnten 3 verschiedene Genloci im Apfelgenom identifiziert werden [16]. Das Protein ist instabil und lässt sich im gastrischen simulierten enzymatischen Verdau sehr schnell degradieren (K. Hoffmann-Sommergruber, persönliche Labordaten, Publikation in Vorbereitung). Es ist ubiquitär zu finden und wird daher auch Panallergen genannt [2, 23]. Es findet sich als allergen wirksames Protein in den Früchten der Familie der Rosaceae, wie: Kirschen und Pfirsichen, weiters in Bananen, Litschis, Hawaii-Ananas, Tomaten, Sellerie, Sojabohnen und Nüssen. Auch im Pollenflug ist es zu finden, etwa von Birke, Gräsern und Parietaria, Sonnenblume und Beifuß.

Generell gilt: IgE-Aktivität ist nicht gleich bedeutend mit klinischen Symptomen. Nicht immer bedeuten IgE-Reaktionen gegen Profiline, dass die Patienten tatsächlich allergische Symptome erfahren.

In einem EU-Projekt, welches von der Projektleiterin koordiniert worden ist (SAFE, 2000-2003) wurden die 4 Apfelallergene bereits genauer charakterisiert, die Proteine rekombinant

hergestellt und die entsprechenden Antikörper und Screeningmethoden etabliert [24] (<http://www.akh-wien.ac.at/safe/>).

Für den Allergengehalt in Früchten ist es von große Bedeutung den Einfluß von Kultur- und Lagerungsbedingungen zu untersuchen. Weiters ist eine Risikoabschätzung von möglichem erhöhten Allergengehalt im Zusammenhang mit Infektionskrankheiten der Bäume und geeigneten Pflanzenschutzmaßnahmen für den allergischen Konsumenten von großer Bedeutung.

Feuerbrand ist eine durch das Bakterium *Erwinia amylovora* hervorgerufenen Krankheit an Pomoideae [25]. Die Infektion erfolgt hauptsächlich über Blüten und Triebspitzen. In weiterer Folge werden Äste und in seltenen Fällen die Früchte selbst befallen. Es sind von einigen Cultivaren unterschiedliche Resistenzen gegenüber Feuerbrand bekannt: *Golden Delicious* ist für diese Krankheit eher wenig anfällig, Topaz hingegen ist eine sehr anfällige Sorte. In dem vorliegenden Projekt soll der mögliche Einfluß einer Feuerbrandinfektion einerseits und geeigneter Bekämpfungsmaßnahmen andererseits auf den Allergengehalt von verschiedenen Apfeln kultivaren untersucht werden.

Methoden und Probenmaterial

Probenmaterial

Das vorliegende Projekt ist thematisch eng mit dem Projekt von Dr. M. Keck (derzeitiger Leiter: Dr. R. Moosbeckhofer) verknüpft. Die Apfelproben wurden aus zwei Obstanlagen (Intensivanbau, 10ha) gewonnen, wobei die Proben von markierten Bäumen in einer Reihe gezogen werden, um den Einfluß der Umweltbedingungen gleich zu halten. Die Pflanzenschutzversuche werden an ausgewählten Bäumen unter Einhaltung eines genauen Zeitschemas durchgeführt. Es wurden Äpfel von infizierten Bäumen (genau beschriebener Infektionsstatus) verwendet. Nach der Ernte wurden die Äpfel unter kontrollierten Bedingungen gelagert und transportiert. Die Äpfel der Cultivare Golden Delicious (mittelresistent gegenüber Feuerbrand) und Topaz (anfällig gegenüber Feuerbrand) wurden im ersten Jahr (Ernte 2003) primär als Untersuchungsmaterial verwendet. Für Ernte 2004 und 2005 wurden vor allem Elstar und Topaz (+/- Feuerbrand) für die Untersuchungen verwendet und der Einfluß des Hefepräparates *A. pullulans*. Für Äpfel der Ernte 2004 liegen Boniturangaben vor, für die Äpfel der Ernte 2005 gibt es einen Infektionsnachweis mittels PCR und nested PCR.

Da aus technischen Gründen (Rodung der Anlage) in den beiden Jahren die Äpfel nicht von demselben Standort bezogen werden konnten, sollten der Einfluß des Mikroklimas und der Bodenbeschaffenheit bei der Interpretation der Resultate miteinbezogen werden.

Da Golden Delicious in den Jahren 2004 und 2005 nicht mehr zur Verfügung, stand wurden Glashausversuche mit Apfelsämlingen durchgeführt.

Ernte 2003:

- Golden Delicious +/- Feuerbrand *
- Idared +/-Feuerbrand*
- Topaz +/- Feuerbrand;°
- Topaz – Feuerbrand + Prohexadione-Ca°

*Betrieb Kofler, Prutz, T

°Betrieb Blum, Höchst, V

Die obengenannten Sorten wurden im Oktober 2003 am Institut f. Pathophysiologie bei 4°C (3 Monate) gelagert. Anschließend wurde das Fruchtfleisch zerkleinert, in flüssigem

Stickstoff schockgefroren und bei -70°C bis zur Aufarbeitung der Proteine bzw. der RNA gelagert.

Ernte 2004:

Anlage Kofler wurde gerodet – keine Proben für 2004, und 2005 erhältlich;

- Topaz + /- Feuerbrand[°]
- Topaz +Hefepräparat (*Aureobasidium pullulans*)[°]
- Topaz + Feuerbrand + Hefepräparat (*Aureobasidium pullulans*)[°]
- Elstar + Feuerbrand[°]
- Elstar – Feuerbrand[°]
- Idared#
- Rubella#

[°]Betrieb Blum, Höchst, V

von Fr. Univ. Doz. Dr. Eva Wilhelm, Seibersdorf

Anlage Blum:

In der Anlage Blum ist seit 1998 Feuerbrand aufgetreten, was auch mittels Laboruntersuchungen belegt immer wieder belegt worden ist. Die Proben der Ernte 2004 wurden von Bäumen entnommen, die eindeutige Symptome zeigten und von Hrn. Ing. Bechter, der eine 10 Jahre lange Erfahrung mit dieser Erkrankung hat, visuell bonitiert (Topaz).

Die Bäume der Sorte Topaz und Sorte Elstar waren zu diesem Zeitpunkt 3-4 Jahre alt. Der Befall war: 5-6 Blütenbüschel pro Baum (entspricht für junge Bäume einem starken Befall).

Die befallenen Blütenbüschel wurden entfernt (nicht visuell feststellbare Restinfektion im Holz möglich) - die Mehrzahl der befallenen Bäume ist nun gerodet.

- Hefeapplikationstermine:
1. Spritzung 28.4.2004, (10% offene Blüten)
 2. Spritzung 29.4.04, (40% offene Blüten)
 3. Spritzung 2. 5. 04, (70% offene Blüten)
 4. Spritzung 11.5.04 (90% offene Blüten)

Hefepräparat in der vorgeschriebenen Aufwandmenge: Komponente A $10,5\text{kg/ha/ m}^2$ (Puffersubstanzen zur pH Reduktion der Lösung auf pH 3.5 -4.0) + Komponente B $1,5\text{kg/ha/m}^2$: Kronenhöhe (2.10 hoch 10 Blastosporen/g). Das Hefepräparat wurde 4 x in die Blüte appliziert.

Die Äpfel wurden ans Inst. f. Pathophysiologie geliefert und dort bei 4°C 3 Monate lang gelagert, dann aufgearbeitet, bzw. Material schockgefroren und bei -70°C aufbewahrt.

Ernte 2005:

- Topaz + /- Feuerbrand[°]
- Topaz +Hefepräparat (*A. pullulans*)[°]
- Topaz + Feuerbrand + Hefepräparat (*A. pullulans*)[°]
- Elstar + / - Feuerbrand[°]
- Elstar +Hefepräparat (*A. pullulans*)[°]
- Elstar + Feuerbrand + Hefepräparat (*A. pullulans*)[°]
-

[°]Betrieb Amann, Koblach, V (Kontakt DI Höfert)

Pflanzenmaterial der infizierten Bäume (n=7), von denen Proben entnommen werden sollen wurden von Hrn. DI Höfert entnommen und an AGES für Untersuchung auf *E. amylovora* Infektion geschickt. Es wurden nach Anwachsen der Kolonien (mehrere Ausstriche) nested PCR und PCR für *E. amylovora* Nachweis durchgeführt. Alle 7 Proben (Probe 1-4 = Elstar; Proben 5-7 = Topaz) waren *E. amylovora* positiv (Probendurchführung 8.6.2005).

Äpfel wurden nach Transport bei 4°C gelagert, anschließend RNA Extraktion und Proteinextraktion bzw. weiteres Material bei -70°C aufbewahrt.

Apfelsämlinge 2005:

Wie eingangs erwähnt wurden zusätzlich Apfelsämlinge (cv. Golden Delicious) 6 Monate nach Aussaat mit *E. amylovora* infiziert. Diese Versuche wurden in Kooperation dankenwerterweise in den Glashäusern der AGES durchgeführt. Für die Infektion wurde der Stamm 295/93 nach einer Übernacht-Kultur (ca. 20 Stunden), in der Konzentration von ca. 108 cfu/ml verwendet.

•**1. Durchgang:** Sieben Tage vor der Infektion wurde bei einigen Sämlingen Prohexadione-Ca-behandlung durchgeführt. Die Probennahme der Blätter erfolgte 1 Woche nach Infektion. Es wurde eine visuelle Bonitur durchgeführt, die bei 2 war. Für diesen Ansatz wurden insgesamt 119 Sämlinge verwendet. Als Kontrollen wurden 20 Sämlinge mitgeführt und 20 angeschnitten und mit Wasser behandelt. Weitere 20 Sämlinge wurden mit Prohexadione-Ca alleine behandelt, die nächste Gruppe mit Prohexadione-Ca behandelt und angeschnitten im Vergleich zu den nächsten 20, die mit Prohexadione-Ca behandelt worden waren, und mittels Anschnitt mit *E. amylovora* infiziert waren. Schließlich war die letzte Gruppe mit *E. amylovora* alleine infiziert worden.

•**2: Durchgang:** Die Vorbehandlung erfolgte wie bei der ersten Versuchsreihe. Diesmal wurde die Blattprobenentnahme 18 Tage nach der Infektion durchgeführt. Es wurde eine visuelle Bonitur durchgeführt, die Blattproben in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C eingefroren, um in weiterer Folge Real Time PCR durchzuführen. Diesmal wurden pro Ansatz je 10 Sämlinge verwendet, die Anordnung der Gruppe erfolgte wie beim ersten Durchgang.

Methoden:

Proteinextraktion

Apfelstücke (150 g) wurden in kleine Stücke geschnitten und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Anschließend wurden sie in einem Mixer zu Pulver zerrieben und in Extraktionspuffer (100ml) 2 Stunden lang gerührt bei 4°C. Danach wurde das Gemisch zentrifugiert (10.000g; 45 Minuten). Der Überstand wurde filtriert und mit Zugabe von Biocryl (1:1000) noch weiter geklärt. Dann wurden die Proteine durch Ammoniumsulfatfällung (gesättigte Lösung) konzentriert. Der Apfelproteinextrakt wurde nach Dialyse (Dialyseschlauch: Spectra/Por® 6 Dialysis membrane, Firma Spectrum; MWCO: 10 000 Da) im SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und im Westernblot und ELISA analysiert.

Gele und Westernblots

Die SDS-Gelelektrophorese (12%) wurde nach Standardprotokollen durchgeführt [26, 27]. Die Proben wurden nach Zugabe von Probenpuffer und Aufkochen bei 95°C auf das Gel aufgetragen und unter Anschließen von elektrischem Strom (25 mA/Gel) auf dem Gel aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel entweder gefärbt (Coomassie) oder die Proteine

auf Nitrozellulose (PROTRAN BA45; *Schleicher und Schüll*) transferiert (4°C, 1 Stunde, 250 mA unter ständigem Rühren des Puffers durchgeführt).

Anschließend wird die Membran unspezifisch abgebunden (Goldpuffer 3% Milchpulver) und mit den entsprechenden Antikörpern (polyklonales anti-Bet v 1 Antiserum (aus Kaninchen (1: 1 000 in GP) oder monoklonaler anti Bet v 1 Mausantikörper BIP1) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Waschschritten wird die Membran mit sekundärem rabbit α mouse IgG + M Antikörper oder swine anti-rabbit IgG (beide Antikörper sind mit alkalischer Phosphatase gekoppelt) eine Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wird gewaschen und mit Färbelösung (Alkalischer Phosphatase Puffer; 60 μ l BCIP, 60 μ l NBTC) die Antikörperbindung sichtbar gemacht und die Reaktion mit ddH₂O gestoppt.

IgE Immunoblot

Beim Immunoblot werden an eine Membran adsorbierten Proteine mit humanem Serum inkubiert, um gebundene IgE Antikörper nachzuweisen [28]. Die Detektion erfolgt mit Hilfe eines zweiten, radioaktiv markierten Antikörpers. Anti-human IgE – ¹²⁵I hat die Fähigkeit an IgE zu binden, und ermöglicht es so, mögliche Allergene zu identifizieren. Die Inkubation erfolgt wie oben beschrieben, es werden in diesem Fall Patentenseren (oder normales Humanserum zur Kontrolle; 1:4 in Goldpuffer verdünnt) eingesetzt. Als Zweitantikörper wird - I¹²⁵ markiertes anti-human IgE (1: 20- 1: 40 in Goldpuffer verdünnt) verwendet. Anschließend wird der Blot gewaschen und mit einem Röntgenfilm exponiert und nach 24 Stunden Expositionszeit entwickelt.

ELISA

Die ELISA-Platten werden mit Proteinlösung beschichtet (10 μ g/ml) und über bei Nacht 4°C inkubiert. Anschließend werden unspezifische Bindungsstellen mit TBST-Milchpulver (3% Milchpulver) abgesättigt und nach Waschrissen werden Allergikerseren (1:5 verdünnt) überschichtet. Die Bindung von IgE wird mit AP-konjugierten Antikörpern (Kaninchen anti-IgE IgG) nachgewiesen. Die Farbreaktion wird Puffersubstrat –detektiert und im ELISA Reader bei 550 nm analysiert.

RNA Extraktion

Das abgewogene Pflanzenmaterial (Fruchtfleisch oder Blätter) wird in flüssigem Stickstoff nochmals tiefgefroren und sofort im Mörser fein zu Pulver zerrieben. Das Pulver wird in einem Falconröhrchen mit Extraktionspuffer (4M Guanidiniumisothiocyanat/0.5% Na-Laurylsarkosin/25mM Na-citrat/ 0.1M β -Mc-Äthanol) versetzt, gut gemischt und bei RT 15Minuten lang bei ca. 8.000 g zentrifugiert. Der Überstand wird durch RNase-freie Filter geschickt und mit einer gesättigten Cäsium-chlorid Lösung 24h bei 20°C bei ca. 25.000g zentrifugiert. Anschließend wird das durchsichtige RNA Pellet in RNase-freiem Wasser resuspendiert mit 1/10 Volumen 3M NA-Azetat und 2.5 Volumen Äthanol präzipitiert und nach einem Zentrifugationsschritt nochmals in Wasser resuspendiert und bei –70°C aufbewahrt.

c-DNA Synthese

Für die anschließende PCR wird zuerst die m-RNA in die stabilere c-DNA umgeschrieben. Als Template dient 2 μ g der Gesamt-RNA. Zu einem Ansatz werden 25 mM MgCl₂, PCR Puffer, die einzelnen Nucleotide, RNase-Inhibitor, ein Primer (meist oligo dT, für die Real Time PCR random Hexamere) und die reverse Transkriptase zugegeben und die Reaktion 1 h bei 42°C durchgeführt, nach einem Hitzeschritt (99°C, 5 min) wird die cDNA gekühlt und ist für die PCR Reaktion bereit.

PCR und Real Time PCR

Die Mal d 1 „Polymerase Chain Reaction“ wurde nach Standardprotokollen durchgeführt. Als Template diente die c-DNA, die aus den verschiedenen Apfelproben hergestellt worden war. Wie eingangs erwähnt gibt es eine Anzahl von Mal d 1 Sequenzen, die nach ihrer Homologie zu Untergruppen von 1-4 zusammengefasst werden. Isoformenspezifische Primer für diese Subgruppe sind von Pühringer et al. publiziert worden und wurden in unseren Ansätzen ebenfalls verwendet [8].

Real Time PCR

In einem weiteren Schritt wurden für die Subgruppen Mal d 1.01 und Mal d 1.02 auch Real Time Experimente durchgeführt, um eine quantitative Aussage über die vorliegenden m-RNAs zu bekommen. Diese Versuche wurden an einem Taq-Man Gerät der Fa. Applied Biosystems (ABI PRISM 7700) durchgeführt. Als interne Kontrolle wurden Primer spezifisch für 18S rRNA mitgeführt. Es werden von jeder c-DNA Verdünnungsreihen (100 – 0.01 ng) hergestellt. Für den Ansatz werden Master Mix (inklusive Sonde und Primern, und Polymerase) verwendet. Die Reaktion wird in speziellen, für den Laserstrahl geeigneten ELISA Platten durchgeführt.

Zusätzlich zu den Kontrollen wurde bei allen Versuchen ein „calibrator“ mitgetestet. In diesem Fall war das der Wert eines Apfels von einem nicht infizierten Baum, der mitgeführt wurde, um die Ergebnisse der verschiedenen Ansätze und der verschiedenen Platten miteinander zu vergleichen.

Resultate

Im ersten Jahr des Projektes wurden die Nachweismethoden für Apfelallergene mit Mal d 1, dem Hauptallergen des Apfels etabliert. Mal d 1 ist das Apfelallergen, das von den meisten Apfelallergikern in Nord- und Mitteleuropa erkannt wird, und eine hohe Homologie zu Bet v 1, dem Birkenpollenallergen aufweist.

Jahr 1:

Ernte 2003

Zu Beginn des Projektes standen Apfelproben der Sorte Golden Delicious, Topaz und Idared zur Verfügung, jeweils von Bäumen mit *Erwinia amylovora* Befall und von gesunden Bäumen. Am Beispiel von Topaz waren noch zusätzliche Proben von einem erkrankten Baum vorhanden, der mit Prohexadione-Ca behandelt worden ist.

Es wurde zuerst das Proteinextraktionsprotokoll für Proteine aus der Frucht optimiert, da die Proteine während des Aufarbeitens hoch potenten Proteasen ausgesetzt sind, und die Qualität des Extraktes sehr von den Extraktionsbedingungen abhängen. In Abbildung 1 eine Coomassiefärbung eines Gels mit den Extrakten der verschiedenen Apfelproben zu sehen. Das Proteinmuster der verschiedenen Sorten ist vergleichbar hinsichtlich der Qualität und Quantität. Eine Proteinbande < 21 kDa ist in allen Extrakten zu erkennen und entspricht Mal d 1. Diese und ähnliche Extrakte wurden in den weiteren Versuchen für Western Blots und IgE-Immunblots verwendet.

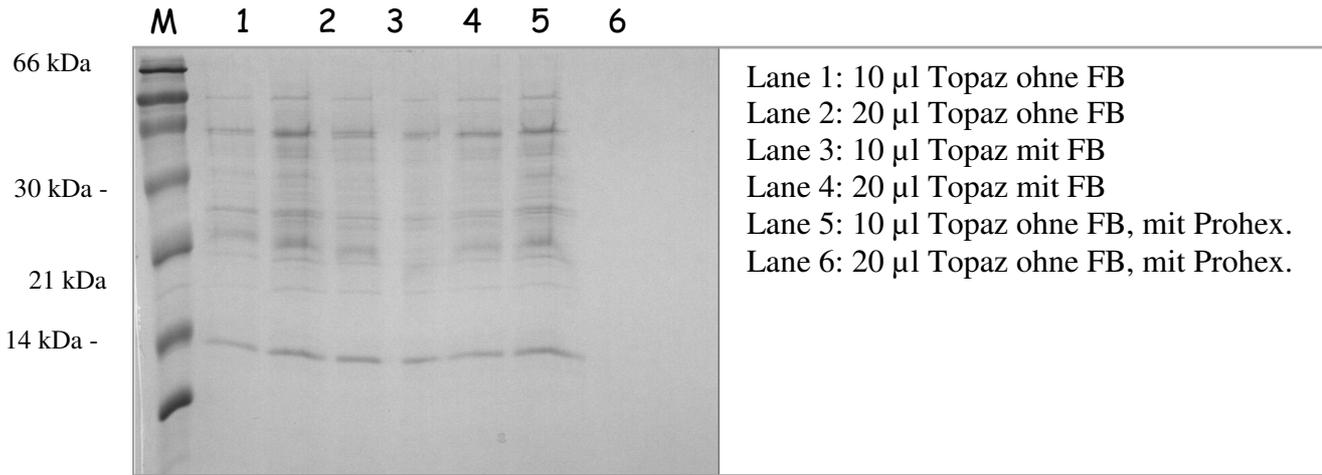


Abbildung 1: Ernte 2003: Coomassie-Färbung eines 12% SDS-Gels mit Apfelproteinextrakten;

Western Blot

In den Extrakten von Golden Delicious und Idared wurden im Western Blot Mal d 1 mit polyklonalem Antiserum und monoklonalem anti-Mal d 1 Antikörper nachgewiesen (siehe Abbildung 2). In Golden Delicious erkennt das polyklonale Antiserum eine Doppelbande bei 18-20 kDa – wobei zwischen den Äpfeln von infizierten Bäumen und Äpfeln von gesunden Bäumen kein signifikanter Unterschied zu erkennen ist (Abbildung 2, Lane 1,2). In Idared wird nur eine Bande in der Höhe von 18 kDa erkannt, wobei die Antikörpererkennung in den von Feuerbrand infizierten Äpfeln deutlich schwächer ist im Vergleich zu den Äpfeln von gesunden Bäumen (Lane 5,6). Der monoklonale Mausantikörper erkennt in allen Extrakten nur eine Mal d 1-relevante Bande in gleichmäßiger Intensität (Lane 3,4,7,8). Zur Kontrolle wurde gereinigtes rekombinantes Mal d 1 Isoform e (Embl Genbank Database: Access. no: AY186248) getestet. Das polyklonale Antiserum erkennt Mal d 1 e (18 kDa) und ein Oligomeres von Mal d 1 e in der Höhe von 54 kDa, Lane 9). Der monoklonale Antikörper hingegen erkennt nur eine Bande bei 18 kDa (Lane 10). Die Pufferkontrollen waren negativ.

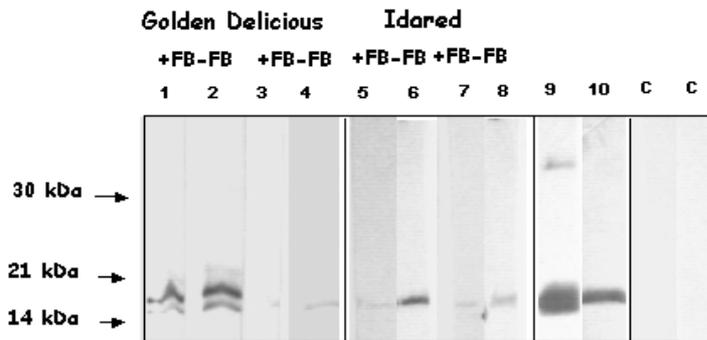


Abbildung 2: Ernte 2003: Western Blot von Apfelproteinextrakt mit monoklonalen und polyklonalen Antikörpern: 1,2,5,6,9: polyklonales Antiserum; 3,4,7,8,10: monoklonales Antiserum; 9,10 – rMal d 1e; c- Pufferkontrollen;

IgE-Immunblot

Proteinextrakte von Topaz wurden nach Gelelektrophorese auf Nitrozelluloseträger transferiert und anschließend im Immunblot mit Patientenserum von Apfelallergikern inkubiert. Gebundenes spezifisches IgE wurde mit radioaktiv markierten Antikörpern detektiert und durch Exposition mit Röntgenfilmen sichtbar gemacht. Es wurde im Immunblot eine Bande bei 18 kDa erkannt. Es ist zwischen den Extrakten von Feuerbrand infizierten und gesunden Äpfeln kein Unterschied zu bemerken, bei den infizierten Äpfeln mit Prohexadione-Ca Behandlung ist die Bande mit deutlich größerer Intensität zu erkennen. Als Kontrolle wurde rMal d 1e geführt und als Negativkontrollen normales Humanserum und Pufferkontrolle.

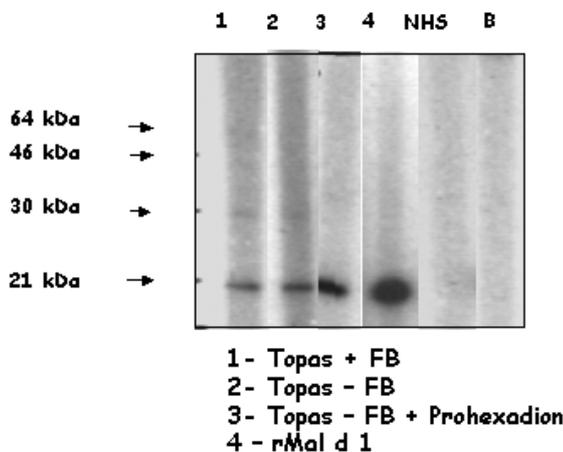


Abbildung 3: IgE- Immunblot von Apfelproteinextrakten mit einem Serumpool von Apfelallergikern;

Ernte 2004

Aus dem Jahr 2004 wurden folgende Proben zur Analyse verwendet: Die Sorten Elstar und Topaz und einzelne Proben von Idared und Rubella (zusätzlich von Seibersdorf geschickt). In diesem Jahr wurde keine Behandlung mit Prohexadione-Ca durchgeführt, aber ein neuer Ansatz mit Hefeinfektion probiert. Mit dem Apfelmateriale des Jahres 2004 wurden ebenfalls Extrakte hergestellt und im SDS-Gel analysiert (siehe Abbildung, Zwischenbericht).

Im Immunblot erkannten spezifische IgE Antikörper deutlich eine Bande bei 18 kDa (Mal d 1; Abbildung 4). In der Probe Topaz mit Feuerbrand wurden noch 3 zusätzliche Banden zwischen 30 kDa und 66 kDa erkannt (Oligomere von Mal d 1). Diese Banden sind auch bei Topaz ohne Feuerbrand aber deutlich geringer zu erkennen. Bei Elstar ist eine Doppelbande von Mal d 1 bei 18 kDa zu sehen.

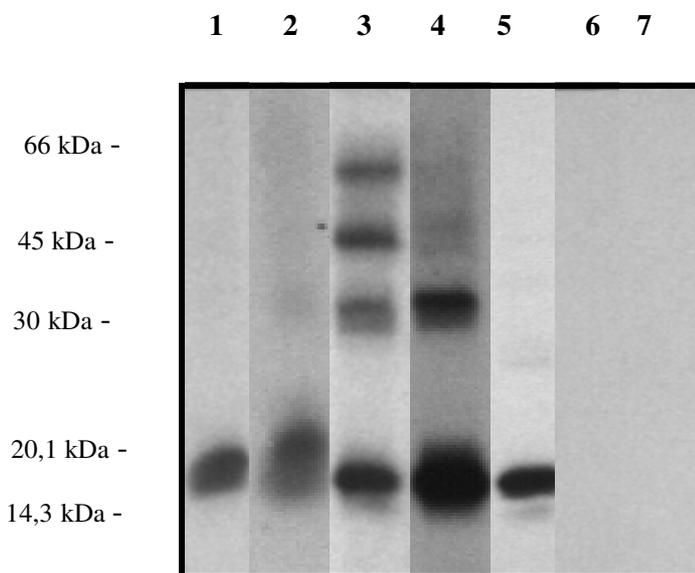


Abb 4.: Coomassie Färbung der Extrakte

Lane 1: 20 µl Topaz mit Hefe und FB
Lane 2: 20 µl Topaz mit Hefe
Lane 3: 20 µl Topaz mit FB
Lane 4: 20 µl Topaz ohne FB
Lane 5: 20 µl Elstar ohne FB
Lane 6: NHS
Lane 7: Puffer

Jahr 2:

Ernte 2004

Die Methoden der Proteinextraktion zeigten, dass der Proteingehalt pro Apfelsorte schwankend war und auch die Mal d 1 Ausbeute stark von der Durchführung der Extraktion abhing. Daher wurden die Proben von Ernte 2004 nochmals extrahiert und im ELISA sofort nach der Extraktion untersucht. Parallel dazu wurden die Proteinwerte pro Probe mittels BCA Standardtest erhoben. Weiters wurde RNA aus den Proben der Ernte 2004 isoliert, und in der PCR die Mal d 1 Isoformen der Subgruppe 1, 2 und 3 nachgewiesen. Real Time Experimente für Mal d 1 Isoform 1 und 2 wurden ebenfalls mit den Proben der Ernte 2004 durchgeführt.

Ernte 2005

Mit den Äpfeln der Ernte dieses Jahres wurden die ersten Proteinextrakte hergestellt und im ELISAs und Immunblot getestet.

Von den Proben der Sämlinge des 2 Durchgangs wurden die ersten RNA Proben hergestellt und PCRs durchgeführt.

ad Ernte 2004:

ELISA:

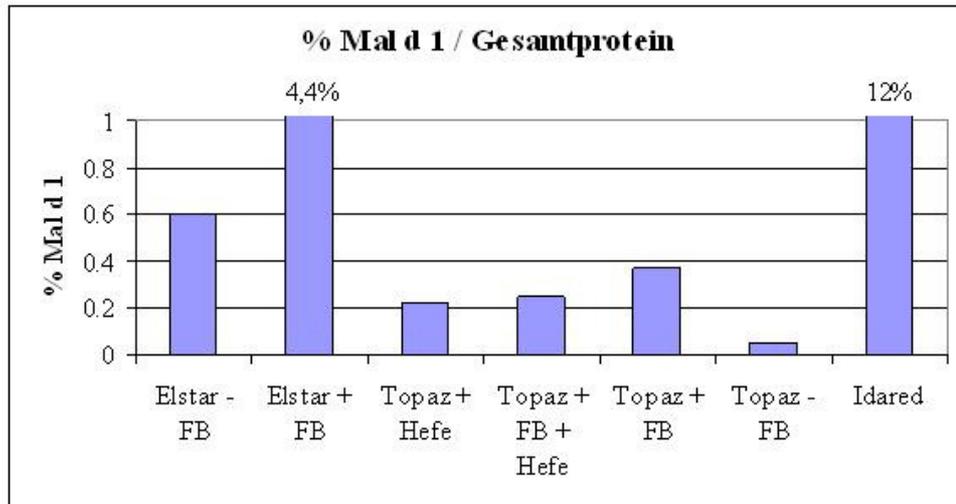


Abb. 5. IgE ELISA; Apfelproben Ernte 2004; Mal d 1- werte in Prozent zu Gesamtprotein präsentiert;

Der Mal d 1 Gehalt der verschiedenen Apfelcultivare Elstar, Topaz und Idared variiert stark und reicht von 0.5% des Gesamtproteingehalts (Topaz) über 0,6% (Elstar) bis zu 12% bei Idared. Bei Feuerbrandinfektion von Elstar steigt der Mal d 1 Gehalt um das 7-fache, ebenso ist der Mal d 1 Gehalt bei Feuerbrandinfektion bei Topas um das 7-fache erhöht. Durch Hefebehandlung alleine steigt der Mal d 1 Gehalt bei Topaz auf das Doppelte. Auch bei Feuerbrandinfektion und Hefebehandlung ist der Mal d 1 Gehalt erhöht (um das 4.4 fache) aber deutlich geringer als bei Feuerbrandinfektion alleine.

PCR

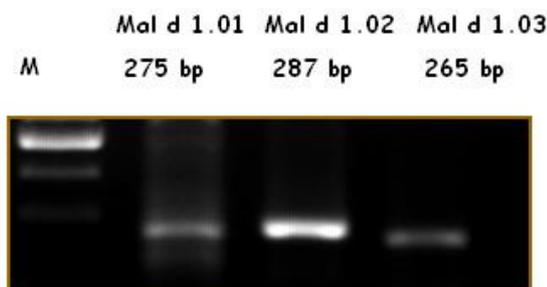


Abb. 6. Mal d 1 Isoformenspezifische PCR aus Apfelfrucht

Mittels PCR konnten mRNA für Mal d 1 Isoformen der Subgruppe 1, 2 und 3 in allen Apfelproben nachgewiesen werden. Die Isoform 4 konnte in keinen der untersuchten Proben nachgewiesen werden.

Folgende Proben wurden analysiert: Elstar +/- FB; Topaz +/- FB; Topaz + Hefe; Topaz + Hefe+ FB; Idared, Rubella;

Real Time PCR:

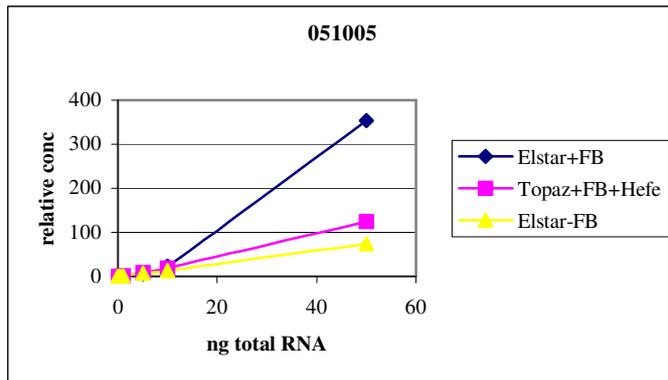


Abb. 7: Mal d 1 spezifische Real Time PCR der Ernte 2004

Mittels Real Time PCR kann eine quantitative Aussage bezüglich der Mal d 1 spezifischen mRNA getroffen werden. Im Vergleich zu Elstar von nicht infizierten Bäumen ist der Mal d 1 Gehalt auf der mRNA Ebene deutlich erhöht bei Proben von infizierten Bäumen. Bei Proben von Topaz von infizierten und Hefe behandelten Bäumen ist der Mal d 1 Gehalte niedriger aber dennoch höher als bei nicht infizierten Bäumen.

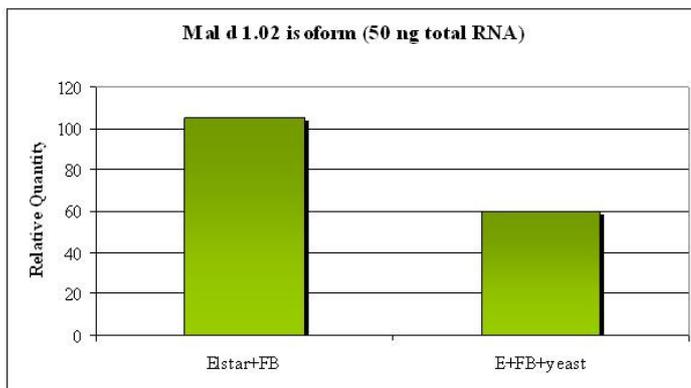
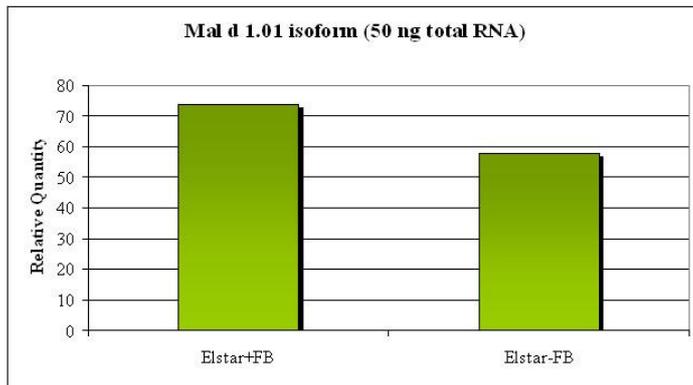


Abb. 8 Mal d 1 Isoformen spezif. Real Time PCR

Die Real Time PCR Experimente wurden auch mit Primern, die spezifisch für die Isoformen der Subgruppen 1 und 2 waren, durchgeführt. In beiden Fällen war die m-RNA erhöht wenn die Proben von infizierten Bäumen stammten. Die Proben von nicht infizierten Bäumen hatten niedrigere Mal d 1 mRNA Mengen und auch die Proben von infizierten Bäumen und mit Hefe behandelt, hatten niedrigere Werte.

ad Ernte 2005

ELISA

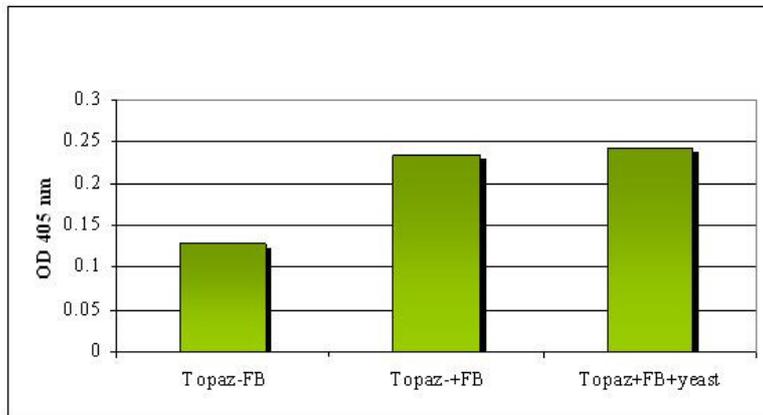


Abb. 9. IgE ELISA der Ernte 2005

Auch die Proben der Ernte 2005 zeigten im ELISA (IgE spezifisch für Mal d 1), dass die Proben von infizierten Bäumen deutlich höher Mal d 1 Werte aufwiesen. Derselbe Effekt war auch bei infizierten Bäumen, die mit Hefe behandelt worden waren zu sehen.

Immunblot

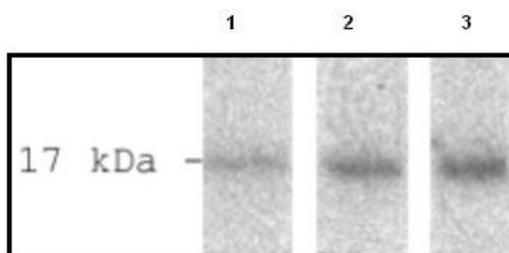


Abb. 10: IgE Immunblot mit Apfelproben von Topaz- FB, (1), Topaz + FB (2), und Topaz +FB + Hefe (3)

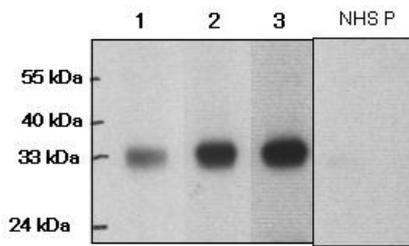


Abb. 11. IgE Immunblot von Apfelproben

von Topaz- FB, (1), Topaz + FB (2), und Topaz +FB + Hefe (3)

Proteinextrakte von den Apfelproben der Ernte 2005 wurden zum Teil durchgeführt und im Immunblot mit spezifischen Seren (Serum spezifisch für Mal d 1; Abb. 10; und Serum spezifisch für Mal d 2, Abb.11) getestet. Die ersten Ergebnisse zeigen, dass Mal d 1 im Proben von infizierten Bäumen stärker erkannt wird. Ebenso ist die Erkennung von Mal d 2 aus Proben von infizierten Bäumen stärker zu beobachten.

Real Time PCR

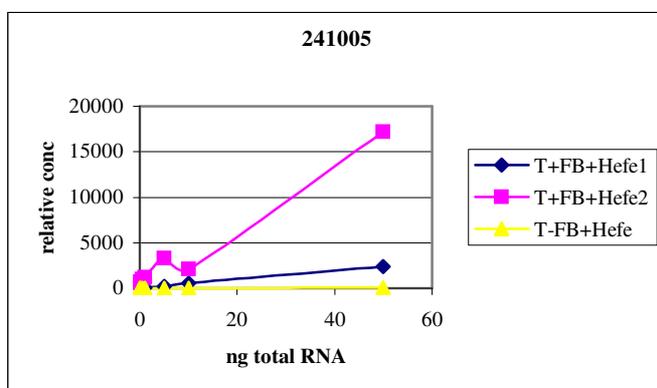
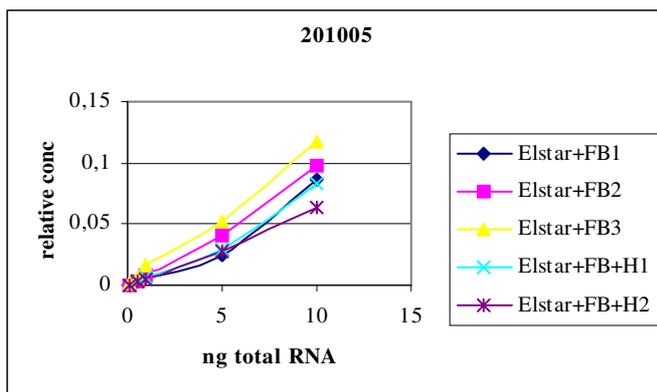


Abb. 12 Real Time PCR spezifisch für Mal d 1 in Proben aus Ernte 2005

Bei Elstar ist die mRNA für Mal d 1 in Proben aus infizierten Bäumen höher im Vergleich zu Proben die von infizierten Bäumen mit Hefebehandlung stammen. Bei Topaz ist die mRNA

für Mal d 1 erhöht bei infizierten und behandelten Bäumen im Vergleich zu Hefe Behandlung alleine.

Sämlinge:

Die Sämlinge des ersten Durchgangs waren in der Infektion zu wenig weit fortgeschritten um sinnvolle Analysen durchzuführen. Daher wurden die Exemplare des zweiten Durchgangs ausgewertet und die Proben bei -70°C aufbewahrt, um anschließend Real Time PCR durchzuführen.

	Bonitur	Pflanzenhöhe (cm; durchschnittlich)
unbehandelt		20,5
angeschnitten + H ₂ O		15,2
+ Prohexa		11,5
angeschnitten+ Prohexa		12,2
angeschnitten+ <i>E. amylovora</i>	2,95	10,3
angeschnitten+ <i>E. amylovora</i> +Prohexa	1,65	10,5

Die Proben zeigen laut Bonitur in den Gruppen deutliche Krankheitsmerkmale. Auch die Prohexadione-Ca Behandlung zeigt Wirkung hinsichtlich des verminderten Wachstums (Siehe auch Bildmaterial im Anhang).

* Boniturschlüssel für visuelle Bonitur	
0	ohne Symptome
1	Verbräunung des Blattgewebes nahe der Schnittstelle und der Blattader
2	Verbräunung von 2 – 3 weiteren Blätter und der Triebspitze
3	Verbräunung und Neuaustrieb
3,5	Verbräunung der halben Pflanze ohne Neuaustrieb
4	Verbräunung des gesamten Triebes, Pflanze tot

Zusammenfassung und weitere geplante Aktivitäten

Im ersten Projektjahr wurden die Methoden etabliert, um das allergene Protein, Mal d 1, im Apfel zu detektieren und mögliche Auswirkungen einer Feuerbrandinfektion und/oder Auswirkungen geeigneter Bekämpfungsmaßnahmen auf den Allergengehalt zu untersuchen. Die Versuche konzentrierten sich auf Mal d 1, das Hauptallergen aus dem Apfel, das von >90% der Apfelallergiker in Mitteleuropa erkannt wird. Mal d 1 wurde aus verschiedenen Apfelsorten, die zum Teil von infizierten Bäumen stammten, mittels Westernblot, IgE-Immunblot und IgE-ELISA bestimmt. Im zweiten Jahr wurden die Extraktionsprotokolle verbessert, um Mal d 1 zu quantifizieren. Es wurden vor allem die Sorten Topaz, Elstar und Golden Delicious untersucht. Da Golden Delicious in den Ernten 2004 und 2005 nicht mehr verfügbar war, wurden zusätzlich Sämlinge im Glashaus angesetzt und mit *E. amylovora* infiziert. Von Topaz und Elstar konnten zwei aufeinanderfolgende Ernten untersucht werden. Weiters wurden PCR-Protokolle und Real Time PCR Protokolle für den quantitativen Nachweis von Mal d 1 mRNA ausgearbeitet.

Mittels ELISA konnte gezeigt werden, dass Mal d 1 in allen Apfelproben zu detektieren war, und dass der Gehalt stark variierend und cultivarabhängig war, wobei die niedrigsten Werte Topaz hatte, höhere Mal d 1 Werte waren bei Elstar zu finden und die höchsten Werte wies die Sorte Idared auf. Diese Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit den Daten von Bolhaar et al., die mittels Hauttests die Mal d 1-bezogene Allergenizität verschiedener Apfelsorten verglichen haben. Bei ihrem Ranking ist Topaz eine nieder allergene Apfelsorte, Elstar und Idared hingegen werden als mittel allergen eingestuft und Golden Delicious ist hoch allergen wirksam [29]. Proben von *E. amylovora* infizierten Bäumen zeigen durchwegs höhere Mal d 1 Werte. Auch die Behandlung mit Hefepräparaten (*Aureobasidium pullulans*) bewirkt höheren Mal d 1 Gehalt in den Apfelproben. In den meisten Fällen ist jedoch der Gehalt niedriger als bei den Proben von Bäumen, die nur eine *E. amylovora* Infektion hatten. Mittels PCR konnten die mRNA für die Isoformen von Mal d 1 der Subgruppen 1-3 in allen Äpfeln nachgewiesen werden, die Subgruppe 4 konnte nicht detektiert werden. Diese Daten decken sich mit den Beobachtungen von Pühringer et al., die ebenfalls Mal d 1.04 nicht in der Frucht nachweisen konnten [8]. Auf der m-RNA Ebene konnte auch Mal d 1 vermehrt bei Proben von *E. amylovora* infizierten Bäumen gemessen werden im Vergleich zu Äpfeln von nicht infizierten Bäumen. Dabei wurden sowohl Isoformen der Gruppe Mal d 1.01 als auch der Gruppe Mal d 1.02 hinaufreguliert, was auf einen ähnlichen Induktionsmechanismus deutet (ähnliche Promoterstrukturen?). Bei zusätzlicher Hefebehandlung war der Mal d 1 Gehalt ebenfalls erhöht, aber niedriger als bei *E. amylovora* Infektion alleine.

Auch Mal d 2, konnte in den Apfelproben mittels Immunblot nachgewiesen werden. Zusammenfassend kann man anhand dieser Untersuchungen schließen dass, sowohl eine Infektion mit *E. amylovora* als auch die Schutzbehandlung mit Hefe (*Aureobasidium pullulans*) einen Pathogenbefall darstellt, der in der Pflanze sowohl die mRNA für Mal d 1 als auch den Proteingehalt von Mal d 1 hinaufreguliert. Dieser Effekt ist bei Doppelinfektion zwar niedriger als bei einer Einzelinfektion von *E. amylovora*, aber noch immer deutlich höher als bei Proben von nicht infizierten Bäumen.

Da Mal d 1 allergen wirksam ist, stellt sich die Frage ob mit einer Infektion von *E. amylovora* und der Bekämpfungsmaßnahme mittels eines Hefepräparates auch das Allergierisiko beim Verzehren solcher Äpfel erhöht. Da der Mal d 1 Gehalt primär stark sortenabhängig ist und die erhobenen Daten für die Sorten Topaz und Elstar noch immer deutlich unter den Werten anderer Cultivare (von nicht infizierten Bäumen) lagen, ist nach heutigem Wissenstand nicht mit einem erhöhten Allergierisiko zu rechnen.

Weiters ist zu beachten, dass aufgrund von technischen Problemen in den 2 aufeinanderfolgenden Jahren die Proben nicht von ein und denselben Standorten bezogen

werden konnten. Daher ist der Effekt verschiedener mikroklimatischer Einflüsse und unterschiedlicher Bodenstrukturen bei diesen Untersuchungen auch in Betracht zu ziehen. Neben diesen Untersuchungen, die sich auf Freilandproben bezogen haben, wurden deshalb auch ein Versuch mit Sämlingen im Glashaus angesetzt, um so gleich behandeltes Pflanzenmaterial untersuchen zu können.

Weiterführende Arbeiten:

Die angeführten Arbeiten wurden im Projektzeitraum durchgeführt. Dennoch sind noch Proben vorhanden, die in der nächsten Zeit aufgearbeitet werden. Vor allem die Proben der Sämlinge werden noch in PCR Experimenten untersucht.

Weiters werden die PCR Daten, die im Rahmen des Projektes von Frau Miriam Mayer durchgeführt worden waren, in ihrer Diplomarbeit zusammengefasst werden.

Auch eine Publikation in einem „peer-reviewed“ Journal ist geplant, wobei folgende Journals in Frage kommen. „Mol Plant Microbe Interaction“, „New Phytology“ oder „Plant Pathology“ (Arbeitstitel des Manuskriptes: „Detection of “stress-induced allergens in apples infected by fireblight (*Erwinia amylovora*).“)

Ebenso wird die Publikation für den “Ländlichen Raum” im Jänner an Herrn Dietrich übermittelt werden.

Referenzen:

- 1 Vanek-Krebitz M, Hoffmann-Sommergruber K, Laimer da Camara Machado M, Susani M, Ebner C, Kraft D, Scheiner O, Breiteneder H: 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. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;214:538-551.
- 2 Ebner C: [Cross-reacting allergens--panallergens]. *Wien Med Wochenschr* 1996;146:404-405.
- 3 Krebitz M, Wagner B, Ferreira F, Peterbauer C, Campillo N, Witty M, Kolarich D, Steinkellner H, Scheiner O, Breiteneder H: 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. *J Mol Biol* 2003;329:721-730.
- 4 Diaz-Perales A, Lombardero M, Sanchez-Monge R, Garcia-Selles FJ, Pernas M, Fernandez-Rivas M, Barber D, Salcedo G: Lipid-transfer proteins as potential plant panallergens: cross-reactivity among proteins of *Artemisia* pollen, *Castanea* nut and Rosaceae fruits, with different IgE-binding capacities. *Clin Exp Allergy* 2000;30:1403-1410.
- 5 Hoffmann-Sommergruber K: Plant allergens and pathogenesis-related proteins. What do they have in common? *Int Arch Allergy Immunol* 2000;122:155-166.
- 6 Pühringer H, Moll D, Hofmann-Sommergruber K, Watillon B, Katinger H, Laimer da Camara Machado M: The promoter of apple Ypr10 gene, encoding the major allergen Mal d 1, is stress- and pathogen-inducible. *Plant Sci* 2000;152:35-50.
- 7 Gao ZS, van de Weg WE, Schaart JG, Schouten HJ, Tran DH, Kodde LP, van der Meer IM, van der Geest AH, Kodde J, Breiteneder H, Hoffmann-Sommergruber K, Bosch D, Gilissen LJ: Genomic cloning and linkage mapping of the Mal d 1 (PR-10) gene family in apple (*Malus domestica*). *Theor Appl Genet* 2005;111:171-183.
- 8 Puehringer HM, Zinoecker I, Marzban G, Katinger H, Laimer M: MdAP, a novel protein in apple, is associated with the major allergen Mal d 1. *Gene* 2003;321:173-183.

- 9 Helsper JP, Gilissen LJ, van Ree R, America AH, Cordewener JH, Bosch D: Quadrupole time-of-flight mass spectrometry: a method to study the actual expression of allergen isoforms identified by PCR cloning. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110:131-138.
- 10 Jensen-Jarolim E, Wiedermann U, Ganglberger E, Zurcher A, Stadler BM, Boltz-Nitulescu G, Scheiner O, Breiteneder H: Allergen mimotopes in food enhance type I allergic reactions in mice. *Faseb J* 1999;13:1586-1592.
- 11 Markovic-Housley Z, Degano M, Lamba D, von Roepenack-Lahaye E, Clemens S, Susani M, Ferreira F, Scheiner O, Breiteneder H: Crystal structure of a hypoallergenic isoforms of the major birch pollen allergen Bet v 1, and its likely function as a plant steroid carrier. *J Mol Biol* 2003;325:123-133.
- 12 Scheurer S, Metzner K, Haustein D, Vieths S: Molecular cloning, expression and characterization of Pru a 1, the major cherry allergen. *Mol Immunol* 1997;34:619-629.
- 13 Neudecker P, Schweimer K, Nerkamp J, Scheurer S, Vieths S, Sticht H, Rosch P: Allergic cross-reactivity made visible: solution structure of the major cherry allergen Pru av 1. *J. Biol. Chem.* 2001;276:22756-22763.
- 14 Ma Y, Gadermaier G, Bohle B, Bolhaar S, Knulst A, Markovic-Housley Z, Breiteneder H, Briza P, Hoffmann-Sommergruber K, Ferreira F: Mutational Analysis of Amino Acid Positions Crucial for IgE-Binding Epitopes of the Major Apple (*Malus domestica*) Allergen, Mal d 1. *Int Arch Allergy Immunol* 2005;139:53-62.
- 15 Hsieh LS, Moos M, Jr., Lin Y: Characterization of apple 18 and 31 kd allergens by microsequencing and evaluation of their content during storage and ripening. *J Allergy Clin Immunol* 1995;96:960-970.
- 16 Gao ZS, Weg WE, Schaart JG, Arkel G, Breiteneder H, Hoffmann-Sommergruber K, Gilissen LJ: Genomic characterization and linkage mapping of the apple allergen genes Mal d 2 (thaumatin-like protein) and Mal d 4 (profilin). *Theor Appl Genet* 2005;111:1087-1097.
- 17 Inschlag C, Hoffmann-Sommergruber K, O'Riordain G, Ahorn H, Ebner C, Scheiner O, Breiteneder H: Biochemical characterization of Pru a 2, a 23-kD thaumatin-like protein representing a potential major allergen in cherry (*Prunus avium*). *Int Arch Allergy Immunol* 1998;116:22-28.
- 18 Jensen-Jarolim E, Santner B, Leitner A, Grimm R, Scheiner O, Ebner C, Breiteneder H: Bell peppers (*Capsicum annuum*) express allergens (profilin, pathogenesis-related protein P23 and Bet v 1) depending on the horticultural strain. *Int Arch Allergy Immunol* 1998;116:103-109.
- 19 Midoro-Horiuti T, Goldblum RM, Kurosky A, Wood TG, Brooks EG: Variable expression of pathogenesis-related protein allergen in mountain cedar (*Juniperus ashei*) pollen. *J Immunol* 2000;164:2188-2192.
- 20 Gao ZS, van de Weg WE, Schaart JG, van der Meer IM, Kodde L, Laimer M, Breiteneder H, Hoffmann-Sommergruber K, Gilissen LJ: Linkage map positions and allelic diversity of two Mal d 3 (non-specific lipid transfer protein) genes in the cultivated apple (*Malus domestica*). *Theor Appl Genet* 2005;110:479-491.
- 21 Fernandez-Rivas M, van Ree R, Cuevas M: Allergy to Rosaceae fruits without related pollinosis. *J Allergy Clin Immunol* 1997;100:728-733.
- 22 Sancho AI, Rigby NM, Zuidmeer L, Asero R, Mistrello G, Amato S, Gonzalez-Mancebo E, Fernandez-Rivas M, van Ree R, Mills EN: The effect of thermal processing on the IgE reactivity of the non-specific lipid transfer protein from apple, Mal d 3. *Allergy* 2005;60:1262-1268.
- 23 Valenta R, Duchene M, Ebner C, Valent P, Sillaber C, Deviller P, Ferreira F, Tejkl M, Edelmann H, Kraft D, et al.: Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens. *J Exp Med* 1992;175:377-385.

- 24 Hoffmann-Sommergruber K: The SAFE project: 'plant food allergies: field to table strategies for reducing their incidence in Europe' an EC-funded study. *Allergy* 2005;60:436-442.
- 25 Van der Zwet T, Keil HL: Fire blight a bacterial disease of Rosaceous plants. *Fire blight a bacterial disease of Rosaceous plants* 1979;
- 26 Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.
- 27 Wallner M, Gruber P, Radauer C, Maderegger B, Susani M, Hoffmann-Sommergruber K, Ferreira F: Lab scale and medium scale production of recombinant allergens in *Escherichia coli*. *Methods* 2004;32:219-226.
- 28 Jarolim E, Rumpold H, Endler AT, Ebner H, Breitenbach M, Scheiner O, Kraft D: IgE and IgG antibodies of patients with allergy to birch pollen as tools to define the allergen profile of *Betula verrucosa*. *Allergy* 1989;44:385-395.
- 29 Bolhaar ST, van de Weg WE, van Ree R, Gonzalez-Mancebo E, Zuidmeer L, Bruijnzeel-Koomen CA, Fernandez-Rivas M, Jansen J, Hoffmann-Sommergruber K, Knulst AC, Gilissen LJ: In vivo assessment with prick-to-prick testing and double-blind, placebo-controlled food challenge of allergenicity of apple cultivars. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:1080-1086.