



Untersuchungen zum Polyphenolprofil alter und neuer  
Apfelsorten sowie zum Einfluss phenolischer Verbindungen  
auf die *in-vitro*-Allergenität

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

„doctor rerum naturalium“

- *Dr. rer. nat.* -

vorgelegt dem Rat der Fakultät für Biowissenschaften  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena



**FRIEDRICH-SCHILLER-  
UNIVERSITÄT  
JENA**

von M.Sc. Molecular Nutrition

**Josephine Kschonsek**

geboren am 20. Dezember 1989 in Saalfeld (Saale)

## **Gutachter**

**1. apl. Prof. Dr. habil. Volker Böhm**

Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Institut für Ernährungswissenschaften  
Arbeitsgruppe Bioaktive Pflanzenstoffe  
Dornburger Straße 25  
07743 Jena

**2. PD Dr. habil. Uta-Christina Hipler**

Universitätsklinikum Jena  
Klinik für Hautkrankheiten  
Erfurter Straße 35  
07743 Jena

**3. Prof. Dr. habil. Bernhard Watzl**

Max Rubner-Institut, Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel  
Institut für Physiologie und Biochemie der Ernährung  
Haid-und-Neu-Straße 9  
76131 Karlsruhe



„DIE NEUGIER STEHT IMMER AN ERSTER STELLE EINES PROBLEMS,  
DAS GELÖST WERDEN WILL.“

- Galileo Galilei -

## Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	VIII
<b>II</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	IX
<b>III</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	X
<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	1
<b>1.1</b>	<b>Birkenpollen-assoziierte Apfelallergie</b> .....	2
1.1.1	Typ-I-Hypersensitivitätsreaktion .....	2
1.1.2	Apfelallergene .....	4
1.1.3	Kreuzreaktivität zwischen <i>Mal d 1</i> und <i>Bet v 1</i> .....	5
<b>1.2</b>	<b>Polyphenole in Äpfeln</b> .....	7
1.2.1	Klassifizierung .....	7
1.2.2	Biosynthese.....	11
1.2.3	Bioverfügbarkeit, Absorption und Metabolismus .....	12
1.2.4	Antioxidative Wirkung.....	15
1.2.5	Enzymatische Bräunung .....	17
<b>2</b>	<b>Zielstellung</b> .....	20
<b>3</b>	<b>Übersicht der Manuskripte</b> .....	21
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	27
<b>4.1</b>	<b>Polyphenolprofil und antioxidative Kapazität von Äpfeln und ihre Struktur- Wirkungsbeziehungen</b> .....	27
4.1.1	Auswirkungen der Züchtung auf den Polyphenolgehalt und das -profil..	27
4.1.2	Einfluss des Polyphenolprofils auf die antioxidative Kapazität .....	31
4.1.3	Struktur-Wirkungsbeziehungen von Polyphenolen .....	32
<b>4.2</b>	<b>Allergisches Potenzial von Äpfeln und mögliche Einflussfaktoren</b> .....	34
4.2.1	Vergleich des allergischen Potenzials verschiedener Apfelsorten .....	34
4.2.2	Einfluss von Polyphenolen auf das allergische Potenzial von Äpfeln ....	38
4.2.3	Beurteilung von <i>in-vitro</i> - und <i>in-vivo</i> -diagnostischen Methoden .....	43
<b>5</b>	<b>Schlussfolgerungen</b> .....	47
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	50
<b>7</b>	<b>Summary</b> .....	53
	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	56

<b>Wissenschaftliche Publikationen und Konferenzbeiträge .....</b>	<b>LXXVI</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>LXXVIII</b>
<b>Eidesstattliche Erklärungen .....</b>	<b>LXXIX</b>

## I Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b>	Klassifizierung von Apfelallergenen. ....	4
<b>Tab. 2:</b>	Klassifizierung von Flavonoiden anhand ihres strukturellen Grundgerüsts. ....	8
<b>Tab. 3:</b>	Klassifizierung von Phenolsäuren anhand ihres strukturellen Grundgerüsts. .	10
<b>Tab. 4:</b>	Einflussfaktoren auf die Bioverfügbarkeit von Polyphenolen beim Menschen.	13
<b>Tab. 5:</b>	Vergleich der relativen antioxidativen Aktivität identifizierter phenolischer Verbindungen in Äpfeln sowie von Vitamin C in verschiedenen hydrophilen Testsystemen. ....	31
<b>Tab. 6:</b>	Vergleich der Allergenität verschiedener Apfelsorten. ....	36
<b>Tab. 7:</b>	Antiallergische Wirkmechanismen von Polyphenolen. ....	42



## II Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b>	Typ-I-Hypersensitivitätsreaktion durch FcεRI-vermittelte Mastzellaktivierung. .	3
<b>Abb. 2:</b>	Determinanten für die Sensibilisierung, Kreuzreaktion und Symptomentwicklung einer Birkenpollen-assoziierten Kreuzallergie.....	6
<b>Abb. 3:</b>	Struktur des 2-Phenylchromangrundgerüsts (Flavan) der Flavonoide. ....	7
<b>Abb. 4:</b>	Biosynthese der Flavonoide und Phenolsäuren. ....	11
<b>Abb. 5:</b>	Absorption und Metabolismus von Polyphenolen. ....	15
<b>Abb. 6:</b>	Reaktionsmechanismen von Polyphenolen mit Peroxylradikalen. ....	17
<b>Abb. 7:</b>	Enzymatische Bräunungsreaktion des Apfels. ....	19
<b>Abb. 8:</b>	Vergleich des Polyphenolgehaltes und -profils von Fruchtfleisch und Schale alter und neuer Apfelsorten. ....	29
<b>Abb. 9:</b>	Vergleich des Gesamtpolyphenolgehaltes alter und neuer Apfelsorten. ....	30
<b>Abb. 10:</b>	Strukturelle Voraussetzungen für die antioxidative Wirksamkeit von Polyphenolen. ....	33
<b>Abb. 11:</b>	Vergleich der <i>in-vitro</i> -Allergenität alter und neuer Apfelsorten. ....	35

### III Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AOA	antioxidative Aktivität
AOK	antioxidative Kapazität
ATPase	Adenosintriphosphatase
AP-Zelle	antigenpräsentierende Zelle
BAT	Basophilenaktivierungstest, engl. <i>basophil activation test</i>
BCR	B-Zell-Rezeptor, engl. <i>B-cell receptor</i>
BDE	Bindungsdissoziationsenergie
<i>Bet v</i>	Birke, lat. <i>Betula verrucosa</i>
<i>Bet v 1</i>	Hauptallergen der Birke
BMEL	Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft
CA	kontrollierte Atmosphäre, engl. <i>controlled atmosphere</i>
Ca <sup>2+</sup>	zweiwertiges Kalzium
CAST	zellulärer Antigenstimulationstest, engl. <i>cellular antigen stimulation test</i>
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i>
CD40L	CD40-Ligand
CD63	CD63-Basophilenaktivierung
Cu <sup>+</sup>	einwertiges Kupfer
Cu <sup>2+</sup>	zweiwertiges Kupfer
DAD	Diodenarray-Detektor, engl. <i>diode array detector</i>
DHC	Dihydrochalkone
ELISA	engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ET	Elektronentransfer
et al.	und andere, lat. <i>et alii</i>
FcεRI	IgE-Rezeptor
Fe <sup>2+</sup>	zweiwertiges Eisen
FLA	Flavanole
FLO	Flavonole
FW	Frischgewicht
G	Glykosid
H <sub>2</sub> O	Wasser

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HAT	Wasserstoffatomtransfer
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, engl. <i>high performance liquid chromatography</i>
I	Isoleucin
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
<i>in vitro</i>	im Glas
<i>in vivo</i>	im lebenden Organismus
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IP	Ionisierungspotenzial
LPH	Laktase-Phloridzin-Hydrolase
<i>Mal d</i>	Kulturapfel, lat. <i>Malus domestica</i>
<i>Mal d 1</i>	Hauptallergen des Kulturapfels
MCT	Monocarboxylat-Transporter
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex, engl. <i>major histocompatibility complex</i>
N	Asparagin
ns	nicht signifikant
O <sub>2</sub>	molekularer Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxidradikalanion
O <sub>3</sub>	Ozon
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Singulett-sauerstoff
OAS	orales Allergie-Syndrom
OH <sup>•</sup>	Hydroxylradikal
oP	orale Provokation
ORAC	engl. <i>oxygen radical absorbance capacity</i>
p	Signifikanzniveau
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidyl-inositol-3,4,5-trisphosphat
PP	Aglykon
PPG	Polyphenol-Glykosid
PPM	Polyphenol-Metabolit
PPO	Polyphenoloxidase

PR-10	Pathogenese-verwandte Proteine-10
<i>Pru av</i>	Kirsche, lat. <i>Prunus avium</i>
<i>Pru p</i>	Pfirsich, lat. <i>Prunus persica</i>
PS	Phenolsäuren
RAA	relative antioxidative Aktivität
RAST	Radio-Allergo-Sorbent-Test
<i>rMal d</i>	rekombinant <i>Malus domestica</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RO <sup>•</sup>	Alkoxyradikal
ROO <sup>•</sup>	Peroxyradikal
ROOH	Hydroperoxid
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
S	Serin
SGLT1	Natrium/Glukose-Cotransporter 1, engl. <i>sodium glucose linked transporter 1</i>
sLT	Sulfidoleukotriene
S-N-K	Student-Newman-Keuls, Post-hoc-Test
SPT	Haut-Prick-Test, engl. <i>skin prick test</i>
T	Threonin
Tab.	Tabelle
T-bet	T-Zell-Transkriptionsfaktor
TCR	T-Zell-Rezeptor, engl. <i>T-cell receptor</i>
TEAC	Trolox äquivalente antioxidative Kapazität, engl. <i>trolox equivalent antioxidant capacity</i>
T <sub>H</sub> 2-Zellen	T-Helferzellen der Subklasse 2
T <sub>H</sub> 1-Zellen	T-Helferzellen der Subklasse 1
TPC	Gesamtphenoltest, engl. <i>total phenolic content</i>
Trolox	6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure
TW	Trockengewicht
ZBG	zytosolische β-Glukosidase

# 1 Einleitung

Mit steigendem Gesundheitsbewusstsein der Bevölkerung hat Obst in den letzten Jahrzehnten einen großen Stellenwert in der Ernährung eingenommen, da sich ein regelmäßiger Verzehr positiv auf die Gesundheit auswirkt. Zu den beliebtesten Fruchtoobstsorten in Deutschland zählt der Apfel (*Malus domestica*). Allein im Wirtschaftsjahr 2015/2016 konsumierte jeder Deutsche durchschnittlich 18,9 kg Äpfel (BMEL 2018). Die Domestikation des Apfels begann vor mehr als 8.000 Jahren (Krist, Buchbauer & Klausberger 2013). Durch das gezielte Kreuzen verschiedener Sorten sind derzeit weltweit ca. 30.000 Kulturformen des Apfels bekannt (Lieberei & Reisdorff 2007). Dabei werden aus dem Handel verschwundene Apfelsorten in der Fachliteratur als alte Sorten bezeichnet.

Etwa vier Millionen Menschen in Deutschland reagieren allergisch beim Verzehr von Äpfeln. Sie verspüren Symptome wie etwa ein Brennen im Mundbereich, insbesondere auf der Zunge oder den Lippen kann es zu Schwellungen kommen. Die meisten Menschen entwickeln diese Apfelallergie im Laufe des Lebens, oft in Kombination mit einer Allergie gegen Birkenpollen (*Betula verrucosa*). In den vergangenen Jahrzehnten hat sich die Birkenpollen-assoziierte Apfelallergie zu den häufigsten Obstallergien in Deutschland entwickelt. Die wachsende Anzahl Betroffener wird mit einem höheren Konsum neuer Apfelsorten, wie z. B. Braeburn, Elstar, Golden Delicious, Granny Smith und Jonagold in Verbindung gebracht. Inzwischen ist bekannt, dass neben der Verarbeitung und Zubereitung auch die Sorte und der Reifegrad einen großen Einfluss auf die Allergenität von Äpfeln besitzen. Die Allergengehalte variieren dahingehend erheblich (Son & Lee 2001, Marzban et al. 2005, Asero et al. 2006, Zuidmeer et al. 2006). Des Weiteren beeinflussen interne Faktoren, wie der Polyphenolgehalt, die Polyphenoloxidaseaktivität sowie die antioxidative Kapazität die Allergenität von Äpfeln (Vieths et al. 1995, Schmitz-Eiberger & Matthes 2011). Insbesondere alte Apfelsorten zeigen eine bessere Verträglichkeit im Vergleich zu neuen Sorten (BUND Lemgo), bei denen der Polyphenolgehalt durch Züchtung vermindert wurde, mit der Absicht eine Reduktion des adstringierenden Geschmacks sowie der schnellen enzymatischen Bräunung zu erzielen.

Polyphenole, welche zu den sekundären Pflanzenstoffen zählen, sind durch hydroxylierte Phenyleinheiten charakterisiert. Sie stehen gegenwärtig im Fokus der Forschung, da sie neben ihrer Wirkung als Antioxidans, ein vielversprechendes antiallergisches Potenzial besitzen und sich somit günstig auf allergische Reaktionen auswirken könnten. Die am häufigsten untersuchten Polyphenole sind Phenolsäuren und Flavonoide, von denen bereits bekannt ist, dass sie ein antiallergisches Potenzial besitzen (Chirumbolo 2014). Derzeit wird vermutet, dass der reduzierte Polyphenolgehalt neuer Apfelsorten für ihre erhöhte Allergenität verantwortlich ist. Bis jetzt wurde diese Hypothese allerdings noch nicht ausreichend wissenschaftlich belegt.

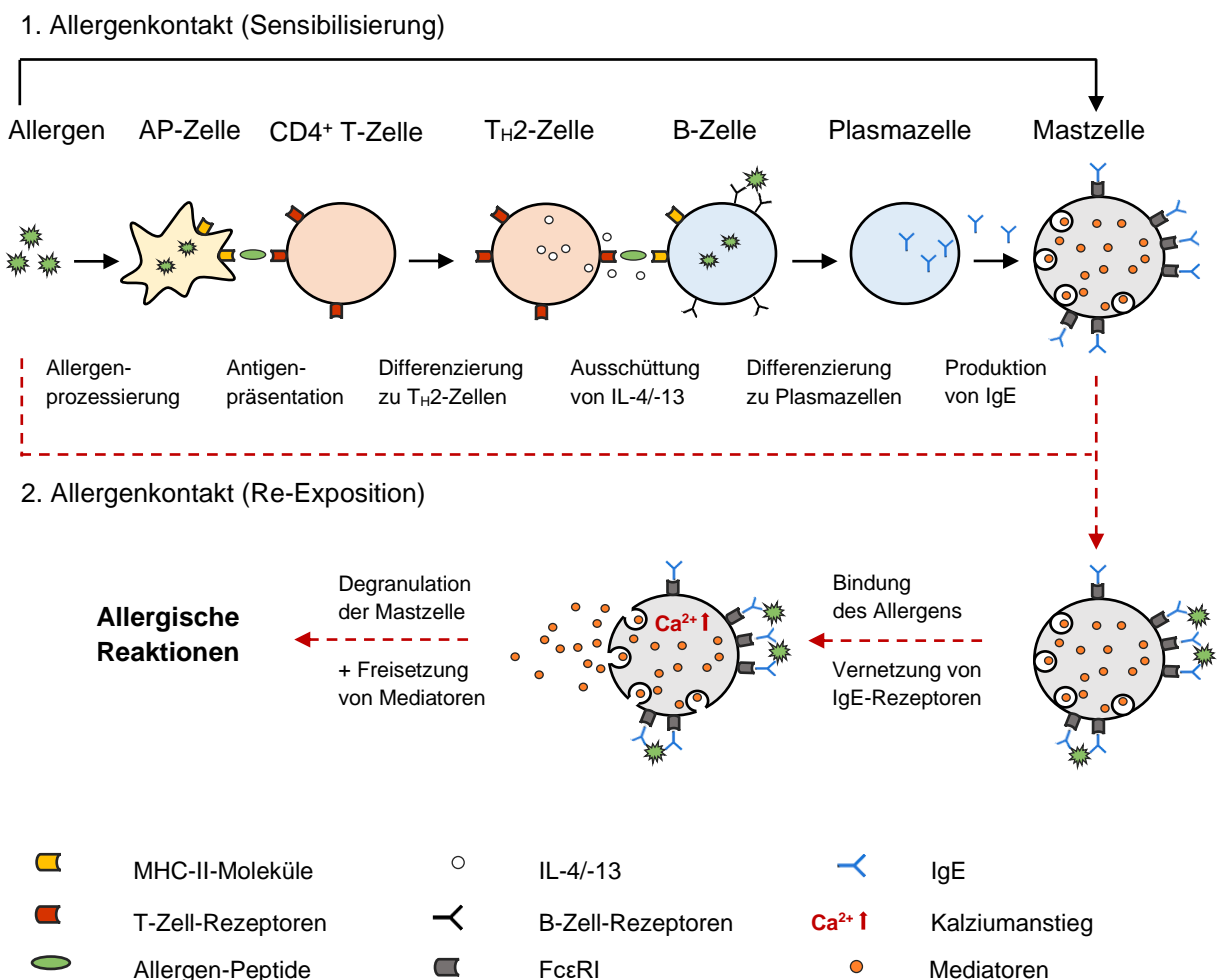
## 1.1 Birkenpollen-assoziierte Apfelallergie

### 1.1.1 Typ-I-Hypersensitivitätsreaktion

Die Birkenpollen-assoziierte Apfelallergie ist eine durch Immunglobulin (Ig) E vermittelte Hypersensitivitätsreaktion vom Typ I. Diese erfordert zunächst einen ersten Allergenkontakt (Sensibilisierung), welcher üblicherweise symptomlos verläuft. Die Exposition gegenüber dem Allergen kann über die Schleimhäute des Respirations- oder Gastrointestinaltrakts sowie per kutan über die Haut erfolgen (Valenta et al. 2015). Die Allergene werden im Körper von antigenpräsentierenden Zellen über Endozytose aufgenommen und lysosomal zu Peptiden fragmentiert (Mantegazza et al. 2013). Die Peptide werden von Haupthistokompatibilitätskomplex-(MHC)-II-Molekülen gebunden, als MHC-II-Peptidkomplex auf der Zelloberfläche exprimiert und naiven CD (cluster of differentiation)<sup>4+</sup>-T-Zellen präsentiert (Burgdorf & Kurts 2008). Durch die Bindung der T-Zell-Rezeptoren (TCR) an die MHC-II-Peptidkomplexe differenzieren naive CD<sup>4+</sup>-T-Zellen zu T-Helferzellen der Subklasse 2 (T<sub>H</sub>2-Zellen) (Zhu, Yamane & Paul 2010). Besonders dendritische Zellen sind in der Lage, naive CD<sup>4+</sup>-T-Zellen zu aktivieren, da sie große Mengen MHC-II-Moleküle zur Präsentation der allergenen Peptide exprimieren (Hart 1997). Auch B-Zellen können über ihre B-Zell-Rezeptoren (BCR), welche membranständige Immunglobuline der Klassen IgM und IgD sind, Allergene aufnehmen und so im weiteren Verlauf Peptide im Komplex mit MHC-II auf ihrer Zelloberfläche den T<sub>H</sub>2-Zellen präsentieren (Hombach et al. 1990, Barroso et al. 2015). Durch die Bindung der TCR (T<sub>H</sub>2-Zelle) an die MHC-II-Peptidkomplexe (B-Zelle) werden B-Zellen im lymphatischen Gewebe aktiviert. Die Interaktionen zwischen dem CD40-Liganden (CD40L) auf aktivierten T<sub>H</sub>2-Zellen und dem CD40-Rezeptor auf B-Zellen sind zusätzliche kostimulatorische Signale für die B-Zellaktivierung (Kawabe et al. 2011). Infolgedessen findet die Expression der Interleukine (IL) 4 und IL-13 durch T<sub>H</sub>2-Zellen statt. IL-4 ist ein Wachstumsfaktor für B-Zellen und initiiert die Differenzierung in IgE-Antikörper produzierende Plasmazellen (Ledermann et al. 1992). Die IgE-Antikörper binden über ihre Fc-Region an die hochaffinen IgE-Rezeptoren (FcεRI) auf der Oberfläche von Mastzellen und Basophilen (Amin 2012) (Abb. 1).

Ein erneuter Kontakt mit dem gleichen Allergen (Re-Exposition) führt zur Bindung des Allergens an membranständige IgE-Antikörper und bewirkt eine Aktivierung von Mastzellen und Basophilen durch eine Quervernetzung benachbarter IgE-Antikörper (Nakanishi 2010). Eine derartige Aktivierung löst ihrerseits wiederum eine Signaltransduktion aus, in der die Kinase Lyn spezielle Tyrosinstellen auf den β- und γ-Ketten der FcεRI phosphoryliert, was die Phosphorylierung der Tyrosinkinase Syk und nachfolgend der Phosphatidylinositol-3'-Kinase ermöglicht. Letztere überführt Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP<sub>3</sub>). Danach folgt die Rekrutierung von Phospholipase C, welche

PIP2 in Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3) und Diacylglycerol umsetzt. IP3 initiiert die Freisetzung von gespeichertem Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) aus dem endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat (Sanderson et al. 2010, Ma & Beaven 2011, Kawakami & Xiao 2013). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung bewirkt die Degranulation der Mastzelle und die Sezernierung vorgeformter Mediatoren, einschließlich Proteasen und vasoaktiver Amine wie Histamin, welche in zytoplasmatischen Granula gespeichert sind (Abb. 1). Darüber hinaus führt die Mastzellaktivierung zur *de-novo*-Synthese von proinflammatorischen Lipidmediatoren wie z. B. Leukotrienen und Prostaglandinen sowie Zytokinen (Baba et al. 2008, Sibilano, Frossi & Pucillo 2014). Die Aktivität dieser Mediatoren ist verantwortlich für die Symptome allergischer Erkrankungen. Die Folgen der IgE-vermittelten Hypersensitivitätsreaktion vom Typ I sind abhängig vom Eintrittsort und der Allergenmenge, sie reichen von Symptomen des oralen Allergiesyndroms (OAS) bis hin zum lebensbedrohlichen anaphylaktischen Schock.



**Abb. 1:** Typ-I-Hypersensitivitätsreaktion durch FcεRI-vermittelte Mastzellaktivierung (modifiziert nach Amin 2012). AP-Zelle: Antigenpräsentierende Zelle; TH2-Zelle: T-Helferzelle Typ 2; MHC-II: Haupthistokompatibilitätskomplex II; IL: Interleukine; IgE: Immunglobuline E; FcεRI: IgE-Rezeptoren.

### 1.1.2 Apfelallergene

Äpfel sind eine der Ursachen für Nahrungsmittelallergien sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen. Insgesamt konnten vier Hauptklassen von Allergenen identifiziert werden: *Mal d 1* (*Malus domestica*) 1, *Mal d 2*, *Mal d 3*, und *Mal d 4* (Fernández-Rivas et al., 2006). Die klinische Relevanz der genannten Allergene sowie die Symptome unterscheiden sich je nach geographischem Lebensraum und sind in nachstehender Tabelle 1 zusammengefasst.

**Tab. 1:** Klassifizierung von Apfelallergenen (nach Botton et al. 2008, Andersen, Hall & Dragsted 2011, Kiewning, Wollseifen & Schmitz-Eiberger 2013).

Allergen	Proteinklasse	Molekulargewicht	Reaktionen und Eigenschaften
<i>Mal d 1</i>	PR-10-Proteine ( <i>Bet v 1</i> -Homologe)	18 kDa	Reaktionen hauptsächlich in Nord- und Mitteleuropa; häufig durch Sensibilisierung gegen <i>Bet v 1</i> (Birke); Symptome des oralen Allergiesyndroms; hitze-/säurelabil, oxidationsanfällig
<i>Mal d 2</i>	Thaumatococcus-ähnliche Proteine	23 kDa	Geringe Datenlage zur <i>Mal d 2</i> -assoziierten Apfelallergie; besonders hitze-/säurestabil
<i>Mal d 3</i>	nicht-spezifische Lipid-Transfer-Proteine	9 kDa	Reaktionen hauptsächlich im Mittelmeerraum; häufig durch Sensibilisierung gegen <i>Pru p 3</i> (Pfirsich); systemische allergische Reaktionen; hitze-/säurestabil
<i>Mal d 4</i>	Profiline ( <i>Bet v 2</i> -Homologe)	14 kDa	Reaktionen hauptsächlich im Mittelmeerraum; orale Symptome; hitze-/säurelabil

PR-10: Pathogenese-verwandte Proteine-10; *Bet v*: *Betula verrucosa*; *Mal d*: *Malus domestica*; *Pru p*: *Prunus persica*

In Nord- und Mitteleuropa ist *Mal d 1* das Hauptallergen für allergische Reaktionen bei Apfelverzehr (Mayer et al. 2011). *Mal d 1* ist ein 17 bis 18 kDa großes Protein, welches zur Familie der Pathogenese-verwandten Proteine-10 (PR-10) zählt und als Reaktion auf biotische und abiotische Stressfaktoren exprimiert wird (Vieths et al. 1994, Hoffmann-Sommergruber 2000, Pühringer et al. 2000, Marzban et al. 2005). Der *Mal d 1*-Gehalt ist stark sortenabhängig und liegt im Fruchtfleisch bei frisch geernteten Äpfeln zwischen 0,5 bis 72,5 µg/g (Marzban et al. 2005, Asero et al. 2006, Sancho et al. 2006, Matthes & Schmitz-Eiberger 2009, Schmitz-Eiberger & Matthes 2011). Neben der Apfelsorte selbst wird der *Mal d 1*-Gehalt durch den Reifegrad sowie den Wachstumsstandort beeinflusst, so dass es innerhalb einer Sorte zu Schwankungen kommen kann (Zuidmeer et al. 2006, Sancho et al. 2006, Matthes & Schmitz-Eiberger 2009, Schmitz-Eiberger & Matthes 2011). Je nach Lagerung können die *Mal d 1*-Gehalte auf über 100 µg/g ansteigen (Matthes & Schmitz-Eiberger 2009, Sancho et al. 2006,



Ahammer et al. 2017). PR-10-Proteine, wie *Mal d 1* sind hitzelabil und instabil gegenüber Pepsinverdau im Magen (Andersen, Hall & Dragsted 2011). In mehreren Studien wurde gezeigt, dass die IgE-Reaktivität gegen PR-10-Proteine nach Hitzebehandlung von Früchten fehlt (Bohle et al. 2006, Asero et al. 2006). Daher werden allergische Reaktionen gegen *Mal d 1* hauptsächlich durch frische Früchte ausgelöst und bleiben primär auf den Mund beschränkt.

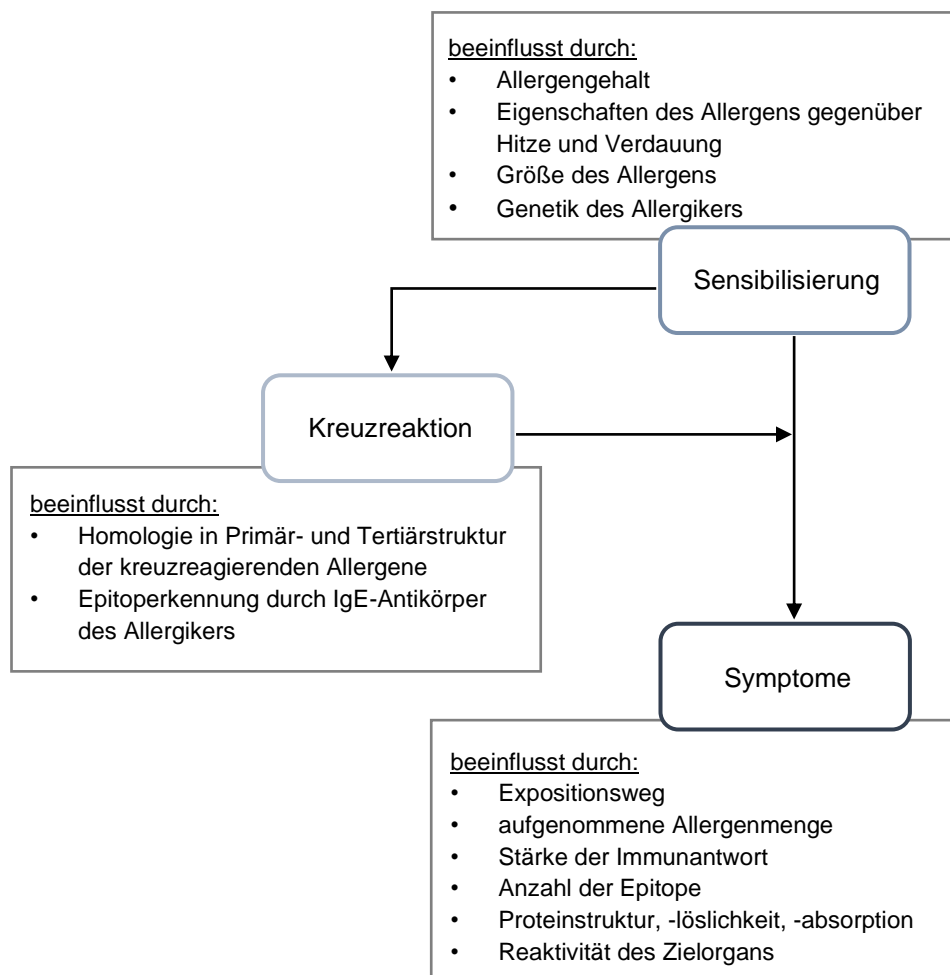
Allergien auf Früchte, wie z. B. gegenüber Äpfeln, können auch unabhängig von einer Pollensensibilisierung auftreten (Fernández-Rivas, van Ree & Cuevas 1997). *Mal d 3*, ein nicht-spezifisches Lipid-Transfer-Protein, wurde als Hauptallergen für die nicht-pollenassoziierte Apfelallergie identifiziert (Pastorello et al. 1999). In Südeuropa spielt die Sensibilisierung gegen *Mal d 3* eine wichtige Rolle, da sie zu schweren systemischen Symptomatiken führen kann (Zuidmeer et al. 2006). Im Gegensatz zu *Mal d 1* ist *Mal d 3* hauptsächlich in der Apfelschale lokalisiert.

*Mal d 2* (Thaumatococcus-ähnliches Protein) und *Mal d 4* (Profilin) sind weitere Allergene des Apfels, besitzen jedoch eine geringere allergologische Bedeutung im Vergleich zu *Mal d 1* und *Mal d 3*.

### 1.1.3 Kreuzreaktivität zwischen *Mal d 1* und *Bet v 1*

Die Kreuzreaktivität zwischen Äpfeln und anderen Lebensmitteln, Pflanzen und Pollen kann durch das Vorhandensein eines oder auch mehrerer Panallergene im Apfel auftreten (Fernández-Rivas, van Ree & Cuevas 1997). Birkenpollen sind eine bedeutende Ursache für Allergien in gemäßigten Klimazonen der Erde und betreffen bis zu 54 % der Bevölkerung Westeuropas (Osterballe et al. 2003). Ungefähr 40 bis 70 % aller Birkenpollenallergiker zeigen allergische Symptome nach dem Verzehr roher Früchte, insbesondere von Äpfeln, oder aber nach Kontakt mit diesen (Jeep et al. 2001). Tuft & Blumenstein (1942) berichteten erstmalig über die Beziehung einer pollenassoziierten allergischen Rhinitis und Allergien mit pflanzlichen Nahrungsmitteln. Die Birkenpollen-assoziierte Apfelallergie stellt häufig eine Kreuzreaktion auf eine bereits vorhandene Allergie gegen Birkenpollen dar, welches das Ergebnis einer primären Sensibilisierung gegen *Bet v* (*Betula verrucosa*) 1 mit einer nachfolgenden IgE-Kreuzreaktion auf *Mal d 1* im Apfel ist (Ballmer-Weber 2015, Dreborg & Foucard 1983, Garcia, Wichers & Wichers 2007). Ungefähr 70 % aller Birkenpollenallergiker sind von einer Kreuzallergie gegen Äpfel betroffen, welche gegen *Mal d 1* gerichtet ist (Vanek-Krebitz et al. 1995, Geroldinger-Simic et al. 2011). Der Hauptgrund für die Kreuzreaktivität von Birke und Apfel ist die Strukturähnlichkeit zwischen den Hauptallergenen *Bet v 1* und *Mal d 1*, (Vieths, Scheurer & Ballmer-Weber 2002, Bohle 2007). *Mal d 1* teilt 64 % der Aminosäuresequenz mit *Bet v 1* und Kreuzinhibitionsexperimente zeigten die Existenz von gemeinsamen IgE-Epitopen, was dazu führt, dass beide Allergene von den gleichen Antikörpern erkannt werden (Vanek-Krebitz et al.

1995). Mehr als 95 % der Birkenpollenallergiker zeigen eine IgE-Reaktivität gegenüber *Bet v 1* und mehr als 60 % sind ausschließlich gegen *Bet v 1* sensibilisiert (Valenta et al. 1991). Das Risiko, klinische Symptome wie das OAS zu entwickeln, ist von der Konzentration der IgE-Antikörper gegen *Bet v 1* abhängig. Patienten, die gegen Birkenpollen sensibilisiert sind, bei denen aber kein OAS auftritt, besitzen häufig geringe Konzentrationen von IgE-Antikörpern gegenüber Birke. In einer Studie von Ciprandi et al. (2012) wurde die Wirkung auf die *Bet v 1*-induzierte T-Zell-Proliferation untersucht. Dabei traten bei 14 *Bet v 1*-sensibilisierten Patienten mit einer pollenassoziierten allergischen Rhinitis auch Symptome des OAS nach Apfelverzehr auf. Vor allem während der Birkenpollensaison kommt es vermehrt zu klinischen Reaktionen auf Äpfel (Skamstrup-Hansen et al. 2001). In der nachfolgenden Abbildung 2 sind gegenwärtig bekannte Determinanten für die Entwicklung einer Birkenpollen-assoziierten Apfelallergie dargestellt.



**Abb. 2:** Determinanten für die Sensibilisierung, Kreuzallergieentstehung sowie Symptomentwicklung (modifiziert nach Andersen, Hall & Dragsted 2011).

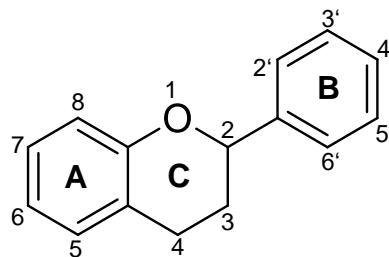
## 1.2 Polyphenole in Äpfeln

### 1.2.1 Klassifizierung

Polyphenole, eine sehr heterogene Gruppe chemischer Verbindungen, bestehen aus einem aromatischen Ringsystem, an dem mindestens zwei Hydroxylgruppen gebunden sind (Han, Shen & Lou 2007). Sie reichen von einfachen phenolischen Strukturen bis hin zu hochpolymerisierten Komponenten mit Molekulargewichten über 30.000 Da (Bravo 1998). Basierend auf ihrer chemischen Struktur, also der Anzahl phenolischer Ringe und den Substituenten, können Polyphenole in Flavonoide und Phenolsäuren klassifiziert werden.

#### Flavonoide

Flavonoide, eine Untergruppe der Polyphenole, kommen am häufigsten bei Pflanzen sowie speziell bei Äpfeln vor. Die Struktur der Flavonoide beruht auf dem 2-Phenylchromangrundgerüst, einem C6-C3-C6-Ringsystem, bei dem zwei aromatische Ringe (A und B) über einen O-heterocyclischen C-Ring verbunden sind (Habermehl 2008). (Abb.3).

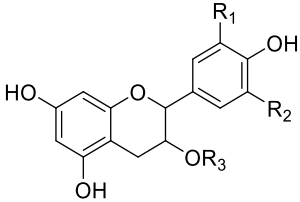
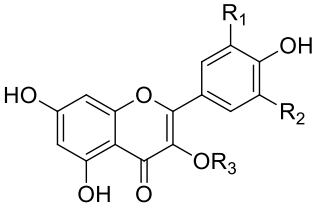
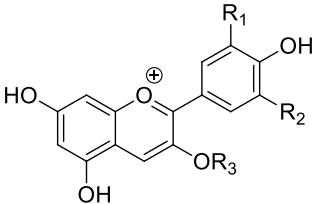
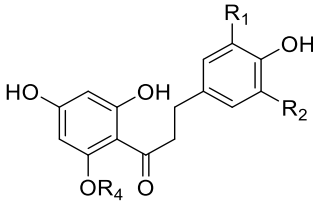


**Abb. 3:** Struktur des 2-Phenylchromangrundgerüsts (Flavan) der Flavonoide.

Je nach Oxidations- und Sättigungsgrad des O-heterozyklischen C-Rings können Flavonoide in Flavanole, Flavanone, Flavone, Flavonole, Anthocyane und Isoflavone unterteilt werden (Daumann 2009). Durch verschiedene Modifikationen am Grundgerüst, insbesondere am C-Ring, sind derzeit ca. 4.000 verschiedene Flavonoid-Verbindungen bekannt. Die zahlreichen Verbindungen unterscheiden sich in Bezug auf die jeweilige Anzahl und Verteilung der Hydroxylgruppen. Die meisten Flavonoide liegen nicht in freier Form vor, sondern sind über Hydroxylgruppen an Zucker, Sulfat- oder Acetylreste gebunden (Kahle 2008). Besonders häufig erfolgt die Glykosylierung an den Positionen C3, C5 und C7 im Grundgerüst (Böhm et al. 1998), welche mit einer besseren Speicherung in pflanzlichen Vakuolen sowie einer erhöhten Photostabilität einhergeht (Aherne & O'Brien 2002).

In Äpfeln sind Flavanole, Flavonole, Anthocyane und Dihydrochalkone enthalten. In Tabelle 2 werden die wichtigsten Flavonoid-Untergruppen aufgelistet.

**Tab. 2:** Klassifizierung von Flavonoiden anhand ihres strukturellen Grundgerüsts.

Klassifizierung	strukturelles Grundgerüst	wichtige Vertreter im Apfel
Flavanole		<p><u>Catechin, Epicatechin:</u>  <math>R_1 = \text{OH}; R_2 = R_3 = \text{H}</math></p>
Flavonole		<p><u>Quercetin:</u>  <math>R_1 = \text{OH}; R_2 = R_3 = \text{H}</math></p> <p><u>Quercetinglykosid</u>  <math>R_1 = \text{OH}; R_2 = \text{H}</math>  <math>R_3 = \text{z. B. Glukose}</math>          (Quercetin-3-O-glukosid)</p>
Anthocyane		<p><u>Cyanidin:</u>  <math>R_1 = \text{H}; R_2 = R_3 = \text{H}</math></p> <p><u>Cyanidinglykosid</u>  <math>R_1 = \text{OH}; R_2 = \text{H}</math>  <math>R_3 = \text{z. B. Galaktose}</math>          (Cyanidin-3-O-galaktosid)</p>
Dihydrochalkone		<p><u>Phloretin:</u>  <math>R_1 = \text{OH}; R_2 = R_4 = \text{H}</math></p> <p><u>Phloretinglykosid:</u>  <math>R_1 = \text{OH}; R_2 = \text{H}</math>  <math>R_4 = \text{z. B. Glukose}</math>          (Phloretin-2'-glukosid)</p>

Flavanole weisen eine gesättigte Bindung zwischen C2 und C3 auf und kommen hauptsächlich in freier Form (Aglykon) vor. Zu den im Apfel enthaltenen Flavanolen zählt das Diastereomerenpaar Catechin und Epicatechin, welche als Monomere vorliegen. Catechin ist das Isomer in *trans*-Konfiguration und Epicatechin das Isomer in *cis*-Konfiguration. Beide Flavonole haben zwei Stereoisomere, wobei (+)-Catechin und (-)-Epicatechin am häufigsten vorkommen. Catechin und Epicatechin können auch Dimere, Oligomere und Polymere bilden,

welche als Procyanidine bezeichnet werden und Kondensationsprodukte aus zwei oder mehr Catechin-/Epicatechin-Einheiten sind. Je nach Art der Interflavanverknüpfung werden Procyanidine in A- und B-Typen unterschieden. Procyanidine vom A-Typ weisen eine Verknüpfung über eine C2-O-C7- oder C2-O-C5-Bindung auf. Im Gegensatz dazu sind Procyanidine vom B-Typ über eine C4-C6- oder C4-C8-Bindung verknüpft und kommen in der Natur wesentlich häufiger vor als Procyanidine vom A-Typ (Kahle 2008). Durch die Bildung von Komplexen mit Speichelproteinen tragen Flavanole zum adstringierenden Geschmack von Äpfeln bei (Santos-Buelga & Scalbert 2000). Die Stärke der Adstringenz hängt dabei von der Höhe des Polymerisationsgrads ab. (Lea & Arnold 1978, Lea 1990b).

Die Flavonole zeichnen sich durch eine ungesättigte Bindung zwischen C2 und C3 sowie eine Ketogruppe an Position C4 am C-Ring aus. Sie liegen hauptsächlich glykosyliert vor, wobei der Zuckerrest bevorzugt an die C3-Hydroxylgruppe gebunden ist. Der wichtigste Vertreter im Apfel ist Quercetin, welches glykosyliert an die Monosaccharide Galaktose (Hyperosid), Glukose (Isoquercitrin), Xylose (Reynoutrin), Arabinose (Avicularin) oder Rhamnose (Quercitrin), aber auch an Disaccharide wie Rutinose (Rutin), vorliegen kann. Der Gehalt sowie das Verhältnis der einzelnen Quercetinglykoside sind sehr stark abhängig von der Apfelsorte. (Wald & Galensa 1989). Flavonole sind besonders in den äußeren Gewebeschichten von Pflanzen, wie z. B. der Fruchtschale des Apfels, zu finden, was damit begründet ist, dass ihre Biosynthese durch Licht angeregt wird (D'Archivio et al. 2007). Je nach Sonnenlichtexposition bestehen daher deutliche Unterschiede bezüglich des Flavonolgehaltes von Äpfeln ein und desselben Baumes und sogar zwischen den Fruchthälften eines Apfels (Price et al. 1995, Cortell & Kennedy 2006).

Anthocyane zählen zu den wichtigsten wasserlöslichen Pflanzenfarbstoffen und sind für die rote, blaue oder violette Färbung von Blüten und Früchten verantwortlich. Die jeweilige Farbausprägung ist zum einen vom pH-Wert aber auch vom Hydroxylierungsgrad sowie den einzelnen Methylierungs- und Glykosylierungsmustern abhängig (Tsao 2010). Anthocyane sind als Aglykone sehr licht- und oxidationsinstabil. Die Stabilität wird durch Glykosylierung an Position C3 und Veresterungen mit organischen Säuren erhöht (Manach et al. 2004). Anthocyane kommen im Apfel, wie bereits oben erwähnt, hauptsächlich in der Fruchtschale vor, wobei deren Gehalt sowie Zusammensetzung stark sortenabhängig ist. Sie sind lediglich in rotschaligen Apfelsorten enthalten (Rechner 2000). Das wichtigste Anthocyan in der Apfelschale ist Cyanidin, welches an Galaktose, Arabinose und Glukose gebunden vorliegt.

Zu den Flavonoiden zählen auch die Dihydrochalkone, welche im Laufe der Flavonoid-Biosynthese gebildet werden. Sie unterscheiden sich von den anderen Unterklassen der Polyphenole durch den nicht kondensierten C-Ring (Tsao 2010). Die wichtigsten Dihydrochalkone sind die Glykoside des Phloretins, Phloretin-2'-glukosid (Phloridzin) und Phloretin-2'-xyloglukosid,

welche für den Apfel charakteristisch sind. Sie kommen hauptsächlich in der Apfelschale sowie in den Kernen in höheren Konzentrationen vor (Kahle 2008).

Phenolsäuren

Unter dem Begriff Phenolsäuren werden die Hydroxybenzoesäuren und Hydroxyzimtsäuren zusammengefasst, welche überwiegend in Früchten vorkommen. Ihre Bedeutung liegt u. a. darin, dass sie zur Stabilisierung der Zellwände beitragen (Watzl & Reckemmer 2001). Phenolsäuren liegen nur selten in freier Form vor. Sie sind meistens an strukturbildende Komponenten (wie Cellulose, Proteine, Lignin) oder an organische Moleküle (Monosaccharide oder Säuren) über Ester-, Ether- oder Amidbindungen gebunden (Daumann 2009). In Tabelle 3 sind die Strukturen der o. g. Hydroxybenzoesäuren und Hydroxyzimtsäuren dargestellt.

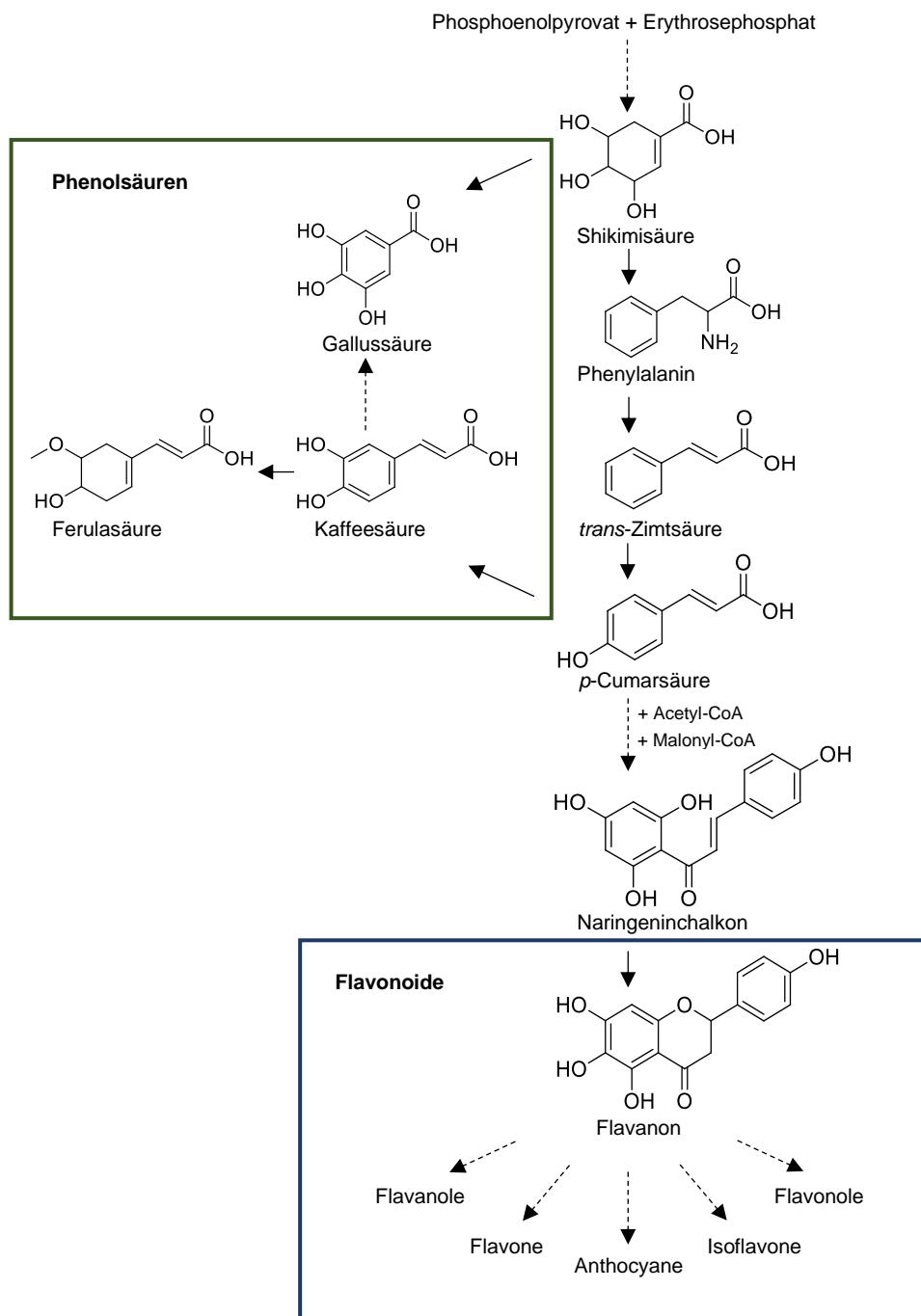
**Tab. 3:** Klassifizierung von Phenolsäuren anhand ihres strukturellen Grundgerüsts.

Klassifizierung	strukturelles Grundgerüst	wichtige Vertreter im Apfel
Hydroxybenzoesäuren		<p><u>Gallussäure:</u> R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = OH</p> <p><u>Protocatechusäure:</u> R<sub>1</sub> = H; R<sub>2</sub> = OH</p>
Hydroxyzimtsäuren		<p><u>p-Cumarsäure:</u> R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H</p> <p><u>Kaffeesäure:</u> R<sub>1</sub> = OH; R<sub>2</sub> = H</p>

Die Hydroxybenzoesäuren, wie Gallussäure und Protocatechusäure, sind durch ein C6-C1-Grundgerüst charakterisiert und sind nur in geringen Konzentrationen in Äpfeln enthalten. Die Hydroxyzimtsäuren besitzen ein C6-C3-Grundgerüst. Wichtige Vertreter sind Kaffeesäure, p-Cumarsäure und Ferulasäure. Sie liegen in Früchten häufig als Ester mit Chinasäure oder Glukose vor (Herrmann 1989). In Äpfeln ist vor allem die Chlorogensäure, ein Hydroxyzimtsäureester aus Kaffeesäure und Chinasäure, in höheren Konzentrationen enthalten (Macheix, Fleuriot & Billot 1990).

### 1.2.2 Biosynthese

Die *de-novo*-Synthese der Polyphenole findet im Zytoplasma einer Zelle unter Beteiligung des endoplasmatischen Retikulums statt. Die Ausgangssubstanzen Phosphoenolpyruvat und Erythrosephosphat entstammen dabei dem Kohlenhydratstoffwechsel (Frisch & Grisebach 1975, Hrazdina & Wagner 1985).



**Abb. 4:** Biosynthese der Flavonoide und Phenolsäuren (modifiziert nach Macheix, Fleuriet & Billot 1990).

Über den Shikimisäureweg entsteht die aromatische Aminosäure Phenylalanin, aus welcher über einen Desaminierungsschritt mit Hilfe der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase, die *trans*-Zimtsäure gebildet wird. Die *trans*-Zimtsäure ist eine wichtige Ausgangssubstanz für die Synthese der Hydroxyzimtsäuren, da aus ihr durch enzymatische Hydroxylierungs- und Methylierungsreaktionen *p*-Cumarsäure sowie nachfolgend Kaffeesäure und Ferulasäure entstehen (Rechner 2000). Die Hydroxybenzoesäuren werden aus den entsprechenden Hydroxyzimtsäuren oder direkt aus der Shikimisäure gebildet, wie dies z. B. bei Gallussäure erfolgt (Kahle 2008).

Zentraler Baustein der Flavonoid-Synthese ist die an Coenzym A gebundene *p*-Cumarsäure, welche mit drei Molekülen Malonyl-CoA zum 4,2',4',6'-Tetrahydrochalkon (Naringenin-chalkon) reagiert und das C6-C3-C6-Grundgerüst der Flavonoide aufweist, von dem sich letztlich alle Flavonoide ableiten (Böhm et al. 1998). Dieser Reaktionsschritt wird durch die Chalkon-Synthase katalysiert und ist der Schlüsselschritt in der Biosynthese der Flavonoide (Hillebrand 2004). Der Ringschluss vom Naringenin-chalkon erfolgt durch die Chalkon-Iso-merase zum Flavanon.

### 1.2.3 Bioverfügbarkeit, Absorption und Metabolismus

Insgesamt werden mit einer typisch „westlichen Ernährung“ ca. 1 g Polyphenole pro Tag aufgenommen, von denen etwa ein Drittel Phenolsäuren und zwei Drittel Flavonoide sind (Kühnau 1976, Scalbert & Williamson 2000). Ein Apfel enthält ungefähr 2 g Polyphenole/kg, was einem Polyphenolgehalt von 0,3 g bei einem durchschnittlichen Apfelgewicht von 150 g entspricht. Die Apfelsorte hat einen wesentlichen Einfluss auf das Polyphenolprofil sowie den Polyphenolgehalt. Zusätzlich wird die Konzentration der unterschiedlichen phenolischen Verbindungen durch Standortfaktoren wie z. B. Bodenqualität und Klima, aber auch vom Reifegrad beeinflusst (Stracke et al. 2009).

Die Bioverfügbarkeit von Polyphenolen bildet die Voraussetzung für deren Absorption und ist somit entscheidend für deren biologische Wirkung im menschlichen Organismus. Einen indirekten Beweis für die Absorption von Polyphenolen durch die Darmbarriere liefert die Zunahme der antioxidativen Kapazität (AOK) des Plasmas nach dem Verzehr polyphenolreicher Lebensmittel. Weitere Hinweise wurden durch Messungen der Konzentrationen in humanem Plasma und Urin ermittelt (Scalbert et al. 2002). Die Bioverfügbarkeit von Polyphenolen wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst, welche in Tabelle 4 zusammengefasst sind.



**Tab. 4:** Einflussfaktoren auf die Bioverfügbarkeit von Polyphenolen beim Menschen (nach D'Archivio et al. 2010).

Lebensmittelverarbeitung	Thermische Behandlung, Homogenisierung, Lyophilisation, Lagerung, Zubereitungsmethoden
Lebensmittelbezogene Faktoren	Lebensmittelmatrix, Anwesenheit von Fett, Proteinen Kohlenhydraten und Fasern
Wechselwirkungen mit anderen Verbindungen	Unter anderem mit Proteinen (z. B. Albumin) oder mit anderen Polyphenolen
Polyphenolbezogene Faktoren	Chemische Struktur, Konzentration in Lebensmitteln
Individuelle Faktoren	Intestinale Faktoren (Enzymaktivität, Darmtransitzeit, Darmflora), systemische Faktoren (Geschlecht und Alter, Störungen/Pathologien, Genetik, physiologischer Zustand)

Die meisten Polyphenole sind gegen die saure Hydrolyse im Magen resistent und gelangen intakt in den Darm, wo ausschließlich Aglykone und einige wenige Glykoside absorbiert werden (Gee et al. 1998). Passamonti et al. (2005) zeigten anhand von Experimenten an Ratten, dass Anthocyane hierbei eine Ausnahme sind, da sie nach oraler Aufnahme v. a. in unmetabolisierter Form in Blut und Harn nachzuweisen waren, sodass auf eine direkte Resorption bereits über den Magen geschlossen werden kann.

Nur 5 bis 10 % der über die Nahrung aufgenommenen Polyphenole, hauptsächlich solche mit monomeren und dimeren Strukturen, können im Dünndarm durch passive Diffusion absorbiert werden (Manach et al. 2005). Die meisten Polyphenole sind in Form von Estern (Hydroxyzimsäuren), Glykosiden (Flavonoide) oder Polymeren (Procyanidine) in Nahrungsmitteln enthalten und müssen vor einer Absorption durch Dünndarmenzyme oder durch die Dickdarmflora hydrolysiert werden, damit sie als Aglykonformen zur Verfügung stehen. Anhand von *in-vitro*-Studien konnte gezeigt werden, dass Aglykone in Caco-2-Zellen und perfundierten Ratten-Darmmodellen hoch permeabel sind (Gee et al. 2000, Chen et al. 1997).

Glykosidisch gebundene Flavonoide können durch die Wirkung der Laktase-Phloridzin-Hydrolase (LPH) oder durch die zytosolische  $\beta$ -Glukosidase (ZBG) hydrolysiert werden (Scalbert & Williamson 2000). Die LPH, eine  $\beta$ -Glukosidase, welche im Bürstensaum der Dünndarm-Epithelzellen lokalisiert ist, ermöglicht die Hydrolyse von Glykosiden vor der Absorption (D'Archivio et al. 2010). Anschließend können die freigesetzten Aglykone mittels passiver Diffusion in die Epithelzellen eindringen (Day et al. 1998 & 2000). Intakte Glykoside werden durch den Natrium/Glukose-Cotransporter 1 (SGLT1) in die Enterozyten der Dünndarmmukosa transportiert und dann mittels ZBG, welche in den Epithelzellen vorhanden ist,

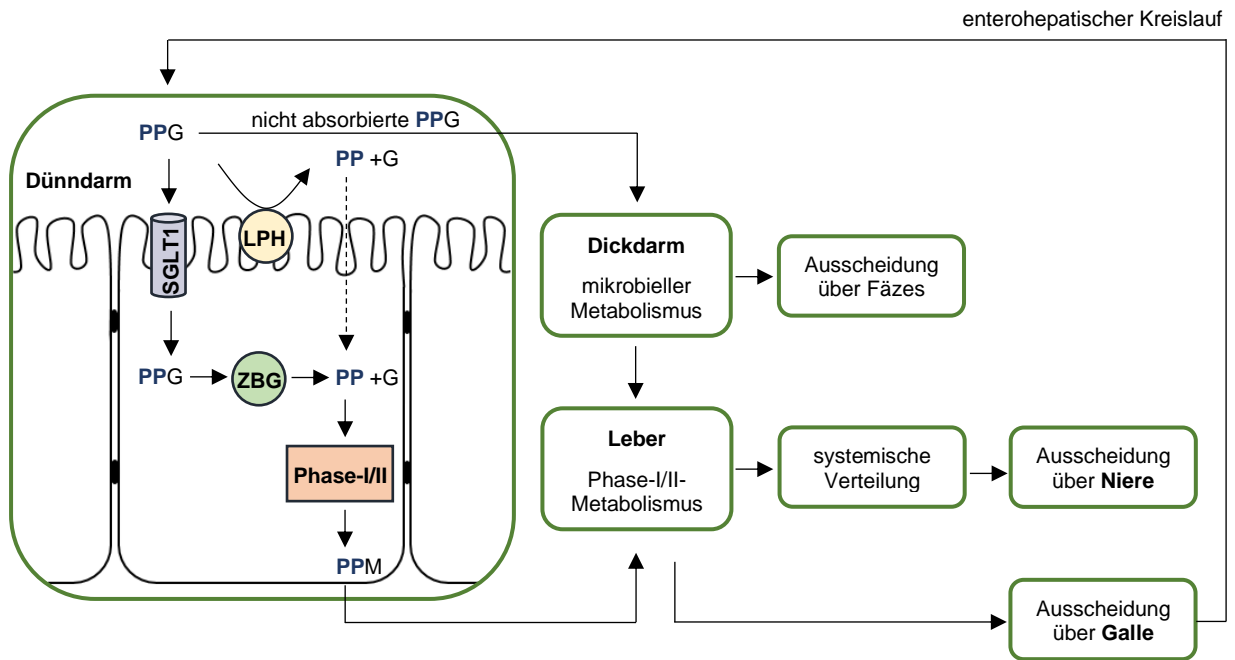
hydrolysiert (Day et al 1998, Gee et al. 2000). Unterschiede in der Effizienz der Absorption liegen bei Flavonoidglykosiden in Abhängigkeit von der Art und Anzahl der Zuckerreste begründet (Gee et al. 2000, Manach et al. 2005). Flavonoide, welche an Glukose, Arabinose oder Xylose gebunden sind, stellen geeignete Substrate für die LPH und ZBG dar, wohingegen Rhamnose kein Substrat für humane Enzyme ist (Tapiero et al. 2002).

Polyphenole, welche nicht im Dünndarm absorbiert werden, gelangen in den Dickdarm und werden infolge bakterieller  $\beta$ -Glukosidasen und Rhamnosidasen in einfache und besser bioverfügbare Phenolsäuren abgebaut (Hollman et al. 1995, Daumann 2009). Clostridium und Eubakterium sind die Hauptgattungen, welche am Metabolismus vieler Polyphenole beteiligt sind (Selma, Espín & Tomás-Barberán 2009). Auch veresterte Hydroxyzimtsäuren, wie z. B. die Chlorogensäure, werden erst nach Spaltung der Esterbindung mittels Esterasen der Dickdarmflora absorbiert. Freie Hydroxyzimtsäuren werden dagegen über passive Diffusion oder aber alternativ transzellulär über den Monocarboxylat-Transporter (MCT) in die Enterozyten aufgenommen (Konishi et al. 2005).

Die Bioverfügbarkeit der absorbierten Polyphenole ist dennoch nicht sehr hoch, da die Aglykonformen eine schlechte Löslichkeit ( $< 20 \mu\text{g/ml}$  in Wasser) aufweisen (Hu 2007). Daher werden sie durch einen umfassenden Phase-I- (Oxidation, Reduktion, Hydrolyse) und Phase-II-Metabolismus (Glukuronidierung, Methylierung und/oder Sulfatierung) konjugiert, welcher sowohl in den Enterozyten des Dünndarms als auch durch die intestinale Mikroflora sowie in den Hepatozyten der Leber stattfinden kann (Cardona et al. 2013). Dabei entstehen wasserlösliche Metabolite (Methyl-, Glukuronid- und Sulfatderivate), welche systematisch im Körper verteilt werden (Cardona et al. 2013). Infolgedessen unterscheiden sich die Polyphenolverbindungen, welche Blut und Gewebe erreichen, von jenen, welche in Lebensmitteln vorhanden sind. Die chemische Struktur der Polyphenole (Molekulargewicht, Glykosylierung und Veresterung) hat somit den größten Einfluss auf die Zeitdauer und das Ausmaß der intestinalen Absorption und bestimmt die Art der im Plasma zirkulierenden Metabolite (Tapiero et al. 2002, Scalbert et al. 2002, Pandey & Rizvi 2009). Die Konjugation wiederum erhöht die Hydrophilie der Polyphenole und ermöglicht die Ausscheidung über den Urin oder die Galle des Menschen. Über den enterohepatischen Kreislauf können Polyphenolkonjugate erneut im Darm absorbiert werden, womit sich auch die Verweildauer im Körper erhöht (Manach et al. 2004).

Aufgrund der geringen Absorption, der hohen Metabolisierung sowie der raschen Ausscheidung beträgt die Polyphenolkonzentration im Plasma zwischen 1 bis  $10 \mu\text{M}$  (Kroon et al. 2004, Ackermann 2012) bezogen auf eine polyphenolreiche Mahlzeit.

In der folgenden Abbildung 5 sind die gegenwärtigen Erkenntnisse zu Absorption und Metabolismus von Polyphenolen dargestellt.



**Abb. 5:** Absorption und Metabolismus von Polyphenolen (modifiziert nach Netzel 2011, Cardona et al. 2013). PPG: Polyphenol-Glykosid; PP: Aglykon; G: Glykosid; PPM: Polyphenol-Metabolit; SGLT1: Natrium/Glukose-Cotransporter 1; LPH: Laktase-Phloridzin-Hydrolase; ZBG: zytosolische  $\beta$ -Glukosidase; Phase I: Oxidation, Reduktion, Hydrolyse; Phase-II: Glukuronidierung, Methylierung und Sulfatierung.

#### 1.2.4 Antioxidatives Potenzial

Die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) ist eine Folge der aeroben Energiegewinnung durch Sauerstoff (Karmowski 2015). Zu den bedeutendsten radikalischen ROS zählen Superoxidradikalanion ( $O_2^{\cdot-}$ ), Hydroxyl- ( $OH^{\cdot}$ ), Alkoxy- ( $RO^{\cdot}$ ) und Peroxylradikale ( $ROO^{\cdot}$ ) sowie zu den nicht-radikalischen Derivaten Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), Singulett-sauerstoff ( $^1O_2$ ) und Ozon ( $O_3$ ) (Jenner, Rafter & Halliwell 2005). ROS entstehen endogen insbesondere durch die mitochondriale Atmungskette (oxidative Phosphorylierung), durch prooxidative Enzyme (Xanthinoxidase und NADPH-Oxidase), Entzündungsprozesse (Eicosanoidsynthese), Entgiftungsreaktionen (Cytochrom-P450-Stoffwechsel) sowie körperliche Bewegung (Halliwell & Gutteridge 2004, Carocho & Ferreira 2013, Choudhari et al. 2014). Exogene Einflussfaktoren wie z. B. Xenobiotika, Rauchen, Strahlung und Ozon begünstigen zusätzlich die Bildung von ROS (Carocho & Ferreira 2013).

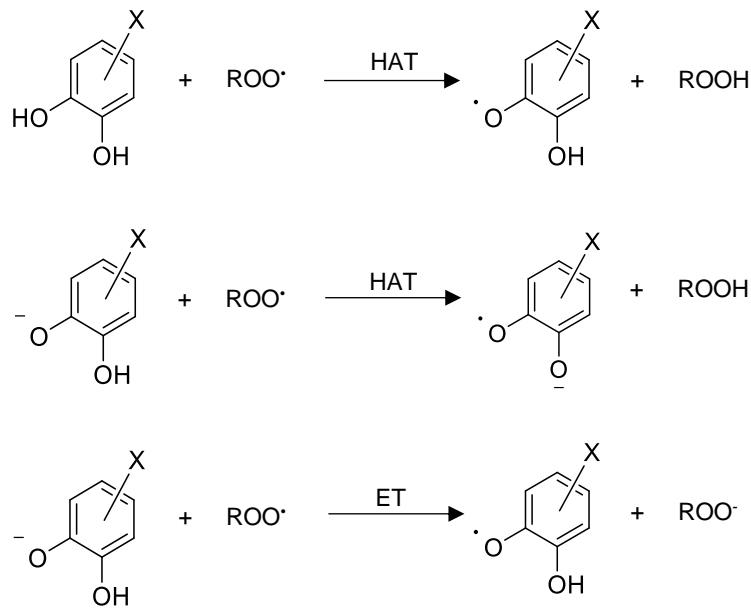
Unter normalen physiologischen Bedingungen herrscht ein Gleichgewicht zwischen prooxidativen und antioxidativen Prozessen. Eine Verschiebung des Gleichgewichts auf die Seite der Prooxidantien bedingt durch eine vermehrte Bildung von ROS oder durch eine Abnahme von Antioxidantien wird als „oxidativer Stress“ bezeichnet (Sies 1991). Oxidativer Stress kann

zu strukturellen Modifikationen von körpereigenen Molekülen führen, was mit dem funktionellen Verlust von Proteinen, Membranlipiden und DNA sowie mit Gewebeschädigungen einhergeht. Durch endogene Schutzsysteme sowie durch die alimentäre Zufuhr von antioxidativ wirksamen Substanzen über die Ernährung ist der menschliche Organismus in der Lage, dieses Gleichgewicht aufrechtzuerhalten (Daumann 2009).

Polyphenole gehören neben Vitamin C zu den natürlichen, hydrophilen Antioxidantien und tragen zur Verminderung von oxidativem Stress bei. Der regelmäßige Verzehr von Äpfeln wird daher mit einem verminderten Risiko für degenerative und kardiovaskuläre Erkrankungen, Krebs sowie Diabetes mellitus Typ II assoziiert, da die Entstehung dieser Erkrankungen im Zusammenhang mit oxidativem Stress steht (Miller & Ruiz-Larrea 2002, Hyson 2011).

Neuere Studien deuten darauf hin, dass oxidativer Stress zudem eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Allergien und immunologischen Störungen spielt (Martin et al. 2011). So konnten Suzuki et al. (2005) zeigen, dass die Stimulation von Mastzellen und Basophilen durch den hochaffinen IgE-Rezeptor die endogene Produktion von ROS wie  $O_2^-$  und  $H_2O_2$  durch die NADPH-Oxidase induziert, welche dann nachfolgend die Degranulation, Leukotriensekretion und Zytokinproduktion regulieren. Zusätzlich tragen Entzündungszellen wie Makrophagen, Eosinophile und Neutrophile zur Bildung von ROS bei und fördern das Auftreten von Allergiesymptomen (Barnes 2011, Nakai, Yoneda & Kubota 2012). Bei Erwachsenen mit einer Pollenassoziierten allergischen Rhinitis wirkte sich z. B.  $O_3$  stark auf die Rhinitis-Symptome aus (Bowler & Crapo 2002).

Phenolische Verbindungen sind in der Lage, freie Radikale über zwei verschiedene chemische Mechanismen zu deaktivieren, zum einen über Elektronentransfer (ET) und zum anderen über Wasserstoffatomtransfer (HAT). Beim HAT-Mechanismus gibt das Polyphenol ein Wasserstoffatom an das freie Radikal ab und wird dadurch selbst zum Phenoxyradikal, welches im Vergleich zu freien Radikalen weniger reaktiv ist (Abb. 6). Durch die Reaktion mit weiteren Radikalen kann das entstandene Phenoxyradikal in eine stabile Chinonstruktur übergehen. Das antioxidative Potenzial geht mit der Stabilität des Phenoxyradikals einher. Die Reaktivität des Polyphenols spiegelt sich in der Bindungsdissoziationsenergie (BDE) zwischen dem Sauerstoff- und Wasserstoffatom wider. Dabei resultiert eine schwache BDE in einer starken Reaktivität des Polyphenols gegenüber freien Radikalen (Wright, Johnson & Di Labio 2001). Im ET-Mechanismus gibt das Polyphenol ein einzelnes Elektron an das freie Radikal ab und wird selbst zum Radikal-Kation (Abb. 6). Auch beim ET ist eine hohe Stabilität des Radikal-Kations für die antioxidative Wirkung von Bedeutung. Das Ionisierungspotenzial (IP) eines Antioxidans gibt dessen Bereitschaft an, Elektronen abzugeben. Ein geringes IP geht dabei mit einer leichten Elektronenabgabe einher. HAT und ET können parallel auftreten, wobei je nach Struktur des Polyphenols ein Mechanismus dominiert (Wright, Johnson & Di Labio 2001).



**Abb. 6:** Reaktionsmechanismen von Polyphenolen mit Peroxylradikalen (modifiziert nach Amorati et al. 2006, Bendary et al. 2013). HAT: Wasserstoffatomtransfer; ET: Elektronentransfer, ROO·: Peroxylradikal; ROOH: Hydroperoxid.

Polyphenole können auch indirekt zum antioxidativen Schutz beitragen, indem sie die Expression von prooxidativen Enzymen (u. a. Xanthinoxidase) hemmen sowie antioxidativ wirksame endogene Enzyme wie z. B. die Superoxiddismutase, Katalase oder Glutathionperoxidase induzieren, welche für den Abbau von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{O}_2^{\cdot-}$  verantwortlich sind (Du, Guo & Lou 2007). Des Weiteren sind Polyphenole in der Lage, Metallionen wie Eisen(II)-Ionen ( $\text{Fe}^{2+}$ ) zu chelatisieren, sodass die Entstehung von  $\text{OH}^{\cdot}$  im Zuge der Fenton-Reaktion vermieden wird (Tsao 2010).

### 1.2.5 Enzymatische Bräunung

Die typische Braunfärbung, welche beim Schälen, Aufschneiden oder Anbeißen eines Apfels entsteht, ist das Ergebnis eines Oxidationsvorganges von Polyphenolen zu Chinonen mittels der Polyphenoloxidase (PPO) und deren nachfolgende nicht-enzymatische Polymerisation zu hochmolekularen braunen Pigmenten (Yoruk & Marshall 2003).

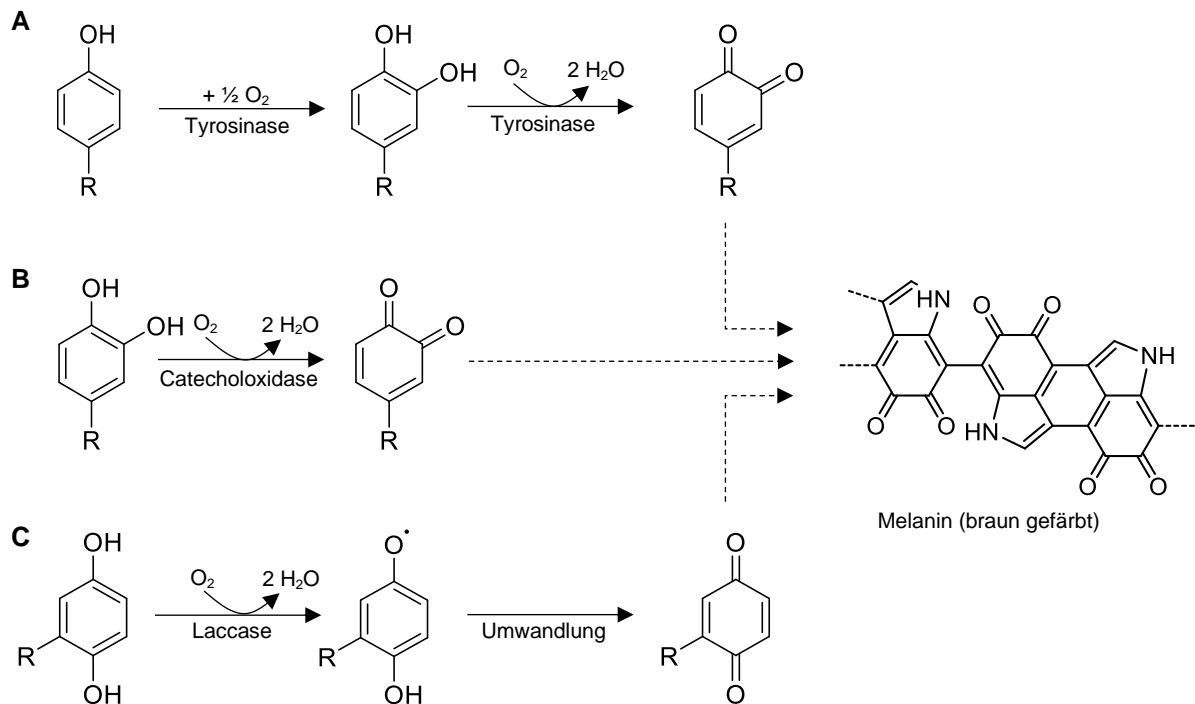
PPOs sind Oxidoreduktasen, welche die Oxidation phenolischer Substanzen katalysieren. Sie sind in den Plastiden intakter Zellen angesiedelt und dort an Membranen gebunden oder liegen in Vesikeln vor, während ihr Substrat (Polyphenole) in den Vakuolen lokalisiert ist (Tsurutani et al. 2002, Rocha et al. 1998). Der Prozess der enzymatischen Bräunung wird erst durch eine Gewebebeschädigung von Zellwänden und Membranen hervorgerufen, was zu einem Verlust

der Kompartimentierung der Pflanzenzelle führt und damit zum Kontakt zwischen den im Apfel enthaltenen PPOs und Polyphenolen (Yoruk & Marshall 2003, Billaud et al. 2003). Durch das nachfolgende Eindringen von molekularem Sauerstoff in die Pflanzenzelle sind PPOs in der Lage, zwei verschiedene Reaktionen zu katalysieren. Die dabei stattfindende Hydroxylierung von Monophenolen zu *o*-Diphenolen beruht auf der Monophenolaseaktivität, während die anschließende Oxidation der entstandenen *o*-Diphenole in *o*-Chinone auf die *o*-Diphenolaseaktivität zurückzuführen ist (Pan et al. 2018).

PPOs werden anhand der o. g. katalytischen Aktivitäten in Tyrosinasen (E.C. 1.14.18.1), Catecholoxidasen (E.C. 1.10.3.1) und Laccasen (E.C. 1.10.3.2) eingeteilt. Tyrosinasen zeigen sowohl eine Monophenolase- als auch Diphenolaseaktivität und können *p*-substituierte Monophenole und *p*-substituierte *o*-Diphenole zu *o*-Chinonen oxidieren. Catecholoxidasen hingegen sind *o*-Diphenol-spezifisch und besitzen daher ausschließlich eine Diphenolaseaktivität. Laccasen besitzen eine vielfältige Substratspezifität und können Monophenole, Diphenole, Aminophenole sowie anorganische Verbindungen oxidieren. Im Gegensatz zu Tyrosinasen und Catecholoxidasen katalysieren diese die Oxidation von *o*- als auch *p*-Diphenolen (Pourcel et al. 2007). In ihrem aktiven Zentrum enthalten PPOs zwei Kupfer(I)-Ionen ( $\text{Cu}^+$ ), die über jeweils drei Histidinreste gebunden sind. Der Sauerstoff selbst fungiert als Elektronenakzeptor und wird zwischen den beiden  $\text{Cu}^+$ -Ionen der PPO gebunden (Rolff et al. 2011). Durch diese Bindung von Sauerstoff findet ein Valenzwechsel der Kupfer(I)-Ionen zu Kupfer(II)-Ionen ( $\text{Cu}^{2+}$ ) statt. Dieser Prozess führt zur Hydroxylierung eines Monophenols zum *o*-Diphenol und dessen nachfolgende Oxidation zum *o*-Chinon (Nicolas et al. 1994).

Die chinoiden Reaktionsprodukte sind ihrerseits hochreaktive elektrophile Moleküle, welche nicht-enzymatische Sekundärreaktionen mit anderen Chinonen, Phenolen oder einer Vielzahl zellulärer Nucleophile eingehen. Sie reagieren insbesondere mit funktionellen Gruppen von Proteinen oder Aminosäuren wie Sulfhydryl-, Amin-, Amid-, Indol- und Imidazolsubstituenten (Bittner 2006). Diese führen zur Bildung komplexer Polymere, welche als Melanine bekannt sind (Yoruk & Marshall 2003) und für die charakteristische rötlich-braune Farbe bei der Bräunungsreaktion von Äpfeln verantwortlich sind. Die Braunfärbung des Apfelgewebes ist durch die Änderung der optischen Absorptionseigenschaften der entstehenden Reaktionsprodukte bedingt (Nicolas et al. 1994). Die Zeitdauer und der Umfang der Bräunung variieren dabei von Apfelsorte zu Apfelsorte und werden durch die Aktivität der PPO sowie den Polyphenolgehalt beeinflusst (Singleton et al. 1985, Coseteng & Lee 1987, Holderbaum 2010).

Die o. g. enzymatische Bräunung spielt eine physiologische Rolle beim Schutz des Apfels vor Insekten- und Mikrobenbefall, aufgrund dessen, dass die entstehenden Melanine sowohl antibakterielle als auch antimykotische Eigenschaften besitzen (Adam, Adam & Bello 2016).



**Abb. 7:** Bräunungsreaktion des Apfels (in Anlehnung an Gasparetti 2012). Oxidation eines (A): *p*-Monophenols zum *o*-Chinon; (B): *o*-Diphenols zum *o*-Chinon; (C): *p*-Diphenols zum *p*-Chinon, H<sub>2</sub>O: Wasser; O<sub>2</sub>: molekularer Sauerstoff; -----▶: nicht-enzymatische Polymerisation v. a. mit Proteinen und Aminosäuren sowie anderen Chinonen und Phenolen.

Die Bräunungsreaktion ist einer der Hauptgründe für Qualitätsverschlechterungen von Äpfeln und den daraus verarbeiteten Produkten, da sie Veränderungen von Farbe und Geschmack der Äpfel bis hin zu Veränderungen ernährungsphysiologischer Eigenschaften (z. B. Abnahme des Polyphenolgehaltes) während Ernte, Lagerung und Verarbeitung bewirken. Letztlich wird somit der kommerzielle Wert von Äpfeln und deren Verarbeitungsprodukten geschmälert (Kim et al. 2002, Carbonaro & Mattera 2001). Der Effekt dieser Bräunungsreaktion geht z. B. mit einem Verlust von bis zu 50 % in der Obstindustrie einher (Lee & Whitaker 1995). Mit der Züchtung neuer Apfelsorten mit einem geringen Bräunungspotenzial versucht man, dem entgegen zu wirken. Jüngere Bestrebungen zielen darauf ab, den Apfel nicht mittels Züchtung, sondern durch genetische Modifikation zu verändern (Shetty et al. 2018). Die neuen Apfelsorten wie z. B. Golden Delicious, Granny Smith und Fuji wurden für den kommerziellen Einsatz durch Transformation unter Verwendung von Agrobakterien modifiziert. Hierbei kamen Gensequenzen zum Einsatz, welche, mittels Ribonukleinsäure (RNA)-Interferenz, die Translation von PPOs inhibieren und dadurch die enzymatische Bräunung des Apfels vermindern (Waltz 2015, Carter 2012).

## 2 Zielstellung

Weltweit sind Allergien ein zunehmendes, gesundheitliches Problem und haben sich mittlerweile zu einer Volkskrankheit des 21. Jahrhunderts entwickelt. In den letzten 20 Jahren ist die Prävalenz für allergische Erkrankungen, wie die Birkenpollen-assoziierte allergische Rhinitis, stark angestiegen. Parallel zu einer Birkenpollenallergie beispielsweise entstehen sehr oft Kreuzallergien, wie z. B. gegenüber Äpfeln, was oftmals zusätzlich die Lebensqualität der Patienten einschränkt. Aufgrund der hohen Inzidenz für Allergien steht deshalb die Identifizierung von Lebensmittelinhaltsstoffen mit einem antiallergischem Potential im Fokus des wissenschaftlichen Interesses. Laut Aussagen betroffener Apfelallergiker, welche sich an einer Datenerhebung des BUND Lemgos beteiligt haben, hängt das Ausmaß allergischer Reaktionen nicht nur von der subjektiven Empfindlichkeit ab, sondern auch zum Großteil von der Apfelsorte. Anhand dieser Erfahrungsberichte weisen alte Apfelsorten wie Alkmene, Goldparmäne und Roter Boskoop eine gute Verträglichkeit im Vergleich zu neuen Sorten wie z. B. Braeburn, Golden Delicious und Granny Smith auf (BUND Lemgo). Somit liegt die Hypothese nahe, dass der reduzierte Polyphenolgehalt neuer Apfelsorten für ihre erhöhte Allergenität verantwortlich ist. Allerdings wurde diese Hypothese bisher noch nicht ausreichend wissenschaftlich belegt.

Das Hauptanliegen der vorliegenden Dissertation bestand darin, den Einfluss des Polyphenolgehaltes auf die *in-vitro*-Allergenität alter und neuer Apfelsorten zu untersuchen. Aufgabe war, einen Zusammenhang zwischen der besseren Verträglichkeit alter Apfelsorten und einer möglichen antiallergischen Wirkung von einzelnen phenolischen Verbindungen zu finden. Die vorliegende Dissertation soll die Auswirkungen eines durch Züchtung veränderten Polyphenolgehaltes und -profils aufzeigen und damit einen Beitrag zur Beurteilung der gesundheitsbezogenen Bedeutung alter Apfelsorten leisten. Für die genaue Charakterisierung des Polyphenolgehaltes wurde deshalb das Polyphenolprofil vom Fruchtfleisch und von der Schale alter und neuer Apfelsorten analysiert. Da Polyphenole als Antioxidantien fungieren, erfolgte zusätzlich die Bestimmung des relativen Beitrages quantifizierter phenolischer Verbindungen an der ermittelten AOK der untersuchten Apfelsorten. Im Rahmen einer Pilotstudie wurde die *in-vitro*-Allergenität im Blut von Birkenpollen-assoziierten Apfelallergikern durch Bestimmung der Freisetzung von Sulfidoleukotrienen und der CD63-Basophilenaktivierung nach Allergenstimulation mit zwei alten und zwei neuen Apfelsorten ermittelt. Außerdem wurde der *Mal d 1*-Gehalt in den Apfelsorten quantifiziert. Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit bestand darin, in einem Modellsystem den Einfluss einzelner Apfelpolyphenole auf *Mal d 1* unter dem Aspekt der enzymatischen Bräunung zu untersuchen, was mittels verschiedener *in-vitro*-Immunotests erfolgte.



### 3 Übersicht der Manuskripte

#### Manuskript I

##### **Polyphenolic compounds analysis of old and new apple cultivars and contribution of polyphenolic profile to the *in vitro* antioxidant capacity**

Kschonsek J., Wolfram T., Stöckl A., Böhm V.

*Antioxidants* **2018**, 7(1), 20; doi: 10.3390/antiox7010020

Annahme: 19.01.2018

Das Ziel der Arbeit bestand darin, den Polyphenolgehalt und das Polyphenolprofil sowie den Vitamin-C-Gehalt in Fruchtfleisch und Schale alter (Berlepsch, Cox Orange, Dülmener Rosenapfel, Goldparmäne, Gravensteiner, James Grieve, Jonathan, Oldenburger, Ontario, Roter Boskoop) und neuer (Braeburn, Elstar, Golden Delicious, Granny Smith, Jonagold) Apfelsorten zu vergleichen. Die Identifizierung und Quantifizierung der spezifischen phenolischen Verbindungen erfolgte dabei mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Diodenarray-Detektor (HPLC-DAD). Der Vitamin-C-Gehalt wurde photometrisch analysiert. Die hydrophile AOK wurde unter Verwendung bereits etablierter Methoden (*total phenolic content* (TPC)-Test, *trolox equivalent antioxidant capacity* (H-TEAC)-Test und *oxygen radical absorbance capacity* (H-ORAC)-Test) ermittelt. Zusätzlich wurde die relative antioxidative Aktivität (RAA) der quantifizierten Polyphenole sowie von Vitamin C im H-ORAC-Test bestimmt. Insgesamt wurden 20 phenolische Verbindungen bei den untersuchten Apfelsorten identifiziert. Dabei waren Quercetinglykoside die Hauptpolyphenole in der Apfelschale und Phenolsäuren im Fruchtfleisch. In den Apfelproben konnte ein linearer Zusammenhang zwischen dem Polyphenolgehalt und der AOK festgestellt werden, welcher am deutlichsten im H-ORAC-Test war. Das Fruchtfleisch alter Apfelsorten hatte im Vergleich zu neuen Sorten signifikant höhere Gehalte sowohl an phenolischen Verbindungen wie auch an Vitamin C, was in einer bis zu 30 % höheren AOK resultierte. In der Apfelschale dagegen konnte kein signifikanter Unterschied im Polyphenolgehalt sowie der AOK zwischen alten und neuen Sorten nachgewiesen werden. Der berechnete relative Beitrag der einzelnen quantifizierten Verbindungen zeigte, dass Flavonole (Schale) und Vitamin C (Fruchtfleisch) den Hauptbeitrag zur AOK im H-ORAC-Test in allen untersuchten Apfelsorten lieferten. Äpfel sind eine gute Quelle für Antioxidantien. Die Polyphenolaufnahme sowie die AOK kann durch die gezielte Auswahl von alten Apfelsorten über die tägliche Ernährung erhöht werden.

**Arbeitsanteile:**

Josephine Kschonsek:	Extraktion von Fruchtfleisch und Schale sowie Quantifizierung des Polyphenolgehaltes (HPLC-DAD) alter und neuer Apfelsorten, experimentelle und statistische Auswertung, Erstellung des Manuskripts Gesamtanteil: 70 %
Theresa Wolfram:	Extraktion von Fruchtfleisch und Schale alter und neuer Apfelsorten, Messung der AOK von Apfelproben (TPC, H-TEAC, H-ORAC)
Annette Stöckl:	Extraktion von Fruchtfleisch und Schale alter und neuer Apfelsorten, Messung des Vitamin-C-Gehaltes von Apfelproben (Photometer)
Dr. Volker Böhm:	Korrektur des Manuskripts

## Manuskript II

### **Influence of polyphenolic content on *in vitro* allergenicity of old and new apple cultivars – a pilot study.**

Kschonsek J., Wiegand C., Hipler C., Böhm V.

*Nutrition* **2019**, *58*, 30-35; doi: 10.1016/j.nut.2018.07.001

Annahme: 04.07.2018

Die steigende Anzahl von Birkenpollen-assoziierten Apfelallergikern wird mit einem höheren Konsum neuer Apfelsorten in Verbindung gebracht. So wird vermutet, dass die erhöhte Allergenität durch den reduzierten Polyphenolgehalt neuer Sorten verursacht wird. Der Polyphenolgehalt (HPLC-DAD) und der *Mal d* 1-Gehalt (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA)) wurden am Beispiel zweier alter (Ontario, Dölmener Rosenapfel) und zweier neuer (Braeburn, Granny Smith) Apfelsorten analysiert. In einer Pilotstudie wurde im Blut von 27 Birkenpollen-assoziierten Apfelallergikern sowohl die Freisetzung von Sulfidoleukotrienen (*cellular antigen stimulation test* (CAST)) als auch die CD63-Basophilenaktivierung (*basophile activation test* (BAT)) nach Allergenstimulation mit den o. g. Sorten bestimmt. Zusätzlich wurde der Grad der enzymatischen Bräunung photometrisch ermittelt. Das Fruchtfleisch alter Apfelsorten hatte einen signifikant höheren Polyphenolgehalt im Vergleich zu neuen Sorten. Die alten Apfelsorten zeichneten sich durch einen hohen Anteil an Chlorogensäure (63 %) aus, bei den neuen Sorten war dieser um das 14-fache geringer. Die Konzentration von Sulfidoleukotrienen sowie die CD63-Basophilenaktivierung der alten Apfelsorten waren gegenüber den neuen Sorten bis zu 62 % geringer und nahmen mit steigendem Grad an enzymatischer Bräunung ab. Korrelationsanalysen zeigten einen signifikanten, sich invers verhaltenen Zusammenhang zwischen dem Polyphenolgehalt und den *in-vitro*-Tests (CAST:  $r = -0,547$ ; BAT:  $r = -0,639$ ). Den stärksten Einfluss auf die *in-vitro*-Allergenität von Äpfeln hatte der Gehalt an Chlorogensäure, Kaffeesäure und (-)-Epicatechin. Im Gegensatz dazu gab es keine signifikante Korrelation zwischen dem *Mal d* 1-Gehalt und den *in-vitro*-Tests. Dies bestätigt die Hypothese, dass niedrigere CAST- und BAT-Ergebnisse von alten Apfelsorten auf einen signifikant höheren Polyphenolgehalt zurückzuführen sind. Alte Apfelsorten wie Ontario und Dölmener Rosenapfel könnten somit besser von Birkenpollen-assoziierten Apfelallergikern toleriert werden, da sie einen höheren Polyphenolgehalt besitzen sowie eine stärkere enzymatische Bräunung aufweisen.

**Arbeitsanteile:**

Josephine Kschonsek: Extraktion von Fruchtfleisch und Schale sowie Quantifizierung des Polyphenolgehaltes (HPLC-DAD), der Proteinkonzentration (Photometer) und des *Mal d 1*-Gehaltes (kompetitiver ELISA) alter und neuer Apfelsorten, Planung und Durchführung der Pilotstudie, Bestimmung der Freisetzung an Sulfidoleukotrienen (CAST) sowie der CD63-Basophilenaktivierung (BAT), Messung der enzymatischen Bräunung (Photometer) alter Apfelsorten, experimentelle und statistische Auswertung, Erstellung des Manuskripts  
Gesamtanteil: 85 %

Dr. Cornelia Wiegand: Planung der *in-vitro*-Versuche, Korrektur des Manuskripts

Dr. Uta-Christina Hipler: Planung der Pilotstudie sowie der *in-vitro*-Versuche, Korrektur des Manuskripts

Dr. Volker Böhm: Korrektur des Manuskripts

## Manuskript III

### **Allergenicity of apple allergen *Mal d 1* as effected by polyphenols and polyphenol oxidase due to enzymatic browning**

Kschonsek J., Dietz A., Wiegand C., Hipler C., Böhm V.

*LWT - Food Science and Technology* **2019**, 113, 108289;  
doi: 10.1016/j.lwt.2019.108289

Annahme: 19.06.2019

Von der Birkenpollen-assoziierten Apfelallergie sind ca. 5 % der deutschen Bevölkerung, bedingt durch das Hauptallergen *Mal d 1*, betroffen. Aufgrund der Hypothese, dass die Allergenität von Äpfeln mit zunehmendem Grad an enzymatischer Bräunung abnimmt (Manuskript II), wurde in dieser Arbeit der Einfluss der enzymatischen Bräunung auf die Allergenität von Äpfeln untersucht. Dazu wurden der Polyphenolgehalt (TPC und HPLC-DAD), der *Mal d 1*-Gehalt (ELISA) sowie der Grad der enzymatischen Bräunung (photometrisch) in drei alten (Dülmener Rosenapfel, Ontario, Roter Boskoop) und drei neuen Apfelsorten (Braeburn, Golden Delicious, Granny Smith) ohne und nach 60-minütiger enzymatischer Bräunung bestimmt. Zusätzlich wurde die Aktivität der PPO photometrisch ermittelt. Um die Relevanz der enzymatischen Bräunung weiterhin zu verdeutlichen, wurde in einem Modellversuch der Einfluss der PPO ohne oder aber in Kombination mit Chlorogensäure, Kaffeesäure oder (-)-Epicatechin auf die *in-vitro*-Freisetzung von Sulfidoleukotrienen (CAST), die CD63-Basophilaktivierung (BAT) sowie die IgE-Bindungskapazität (ELISA) von rekombinanten *Mal d 1* (*rMal d 1*) untersucht. Der Polyphenolgehalt der alten Apfelsorten wies eine signifikant größere Abnahme ( $-135 \pm 51 \mu\text{g/g}$ ) nach 60-minütiger enzymatischer Bräunung auf im Vergleich zu den neuen Sorten ( $-54 \pm 29 \mu\text{g/g}$ ), was zugleich mit einer um 46 % stärkeren Abnahme im *Mal d 1*-Gehalt einherging. Korrelationsanalysen zeigten in den untersuchten Apfelsorten einen signifikanten Zusammenhang ( $r = 0,710$ ) zwischen der Abnahme des Polyphenolgehaltes, insbesondere bezüglich des Chlorogensäure- und Kaffeesäuregehaltes, und der Abnahme des *Mal d 1*-Gehaltes. Im Modellsystem konnte eine signifikante Abnahme der *in-vitro*-Allergenität (CAST: -74,9 % und BAT: -40,8 %) sowie der IgE-Bindungskapazität (-21,3 %) von *rMal d 1* durch die PPO erzielt werden, welche durch die Zugabe von Chlorogensäure oder Kaffeesäure verstärkt wurde. Die Ergebnisse zeigen, dass natürlich vorkommende Chlorogensäure- und Kaffeesäuregehalte einen Einfluss auf die Allergenität von *Mal d 1* besitzen. Darüber hinaus kann eine hohe PPO-Aktivität die Allergenität von *Mal d 1* verringern, auch wenn der Polyphenolgehalt gering ist.

**Arbeitsanteile:**

- Josephine Kschonsek: Extraktion von Fruchtfleisch und Schale sowie Quantifizierung des Polyphenolgehaltes (HPLC-DAD) alter und neuer Apfelsorten, Planung und Durchführung des Modellsystems zwischen PPO, Polyphenolen und *rMal d 1*, Bestimmung der Freisetzung an Sulfidoleukotrienen (CAST), der CD63-Basophilenaktivierung (BAT) sowie der IgE-Bindungskapazität (kompetetiver ELISA), experimentelle und statistische Auswertung, Erstellung des Manuskripts  
Gesamtanteil: 75 %
- André Dietz: Extraktion von Fruchtfleisch und Schale sowie Quantifizierung des Polyphenolgehaltes (TPC) alter und neuer Apfelsorten, Messung der enzymatischen Bräunung (Photometer) und der PPO-Aktivität (Photometer) von Apfelproben
- Dr. Cornelia Wiegand: Planung des Modellsystems zwischen PPO, Polyphenolen und *rMal d 1*, Korrektur des Manuskripts
- Dr. Uta-Christina Hipler: Korrektur des Manuskripts
- Dr. Volker Böhm: Korrektur des Manuskripts

## 4 Diskussion

In den vergangenen Jahrzehnten ist die Züchtung bzw. genetische Modifikation neuer Apfelsorten in den Vordergrund wissenschaftlichen Interesses gerückt, um den steigenden Anforderungen von Industrie, Handel und Verbrauchern gerecht zu werden. Apfelzüchter stehen vor neuen Herausforderungen, welche hauptsächlich vier Aspekte umfassen: (a) das Aussehen der Früchte (v. a. Farbe und Glanz, Fruchtform und -größe), (b) die Fruchtqualität (v. a. Geschmack, Textur und Lagerfähigkeit), (c) die Ernte (hoher Ertrag und einfache Erntebedingungen) sowie (d) die Resistenzmerkmale der Früchte gegenüber biotischen und abiotischen Stressfaktoren (Sansavini et al. 2004, Vegro et al. 2016).

Die Beliebtheit neuer Apfelsorten beim Verbraucher wie z. B. Braeburn, Elstar, Golden Delicious, Granny Smith und Jonagold führte u. a. zu einem erheblichen Rückgang des Anbaus alter Sorten. Die wissenschaftliche Untersuchung alter und neuer Apfelsorten stellt ein interessantes Modell dar, mit welchem Auswirkungen eines durch Züchtung veränderten Polyphenolgehaltes bzw. -profils in Bezug auf die *in-vitro*-Allergenität analysiert werden.

Der besondere Vorteil dieser Analyse besteht u. a.

- (I) in der dauerhaften Verfügbarkeit von Äpfeln bzw. deren Nachfrage (stetiger Konsum)
- (II) im nachgewiesenen gesundheitlichen Nutzen für den Verbraucher (Polyphenolgehalt alter Apfelsorten)
- (III) darin, dass das Allergenprofil von Äpfeln bereits hinreichend erforscht/charakterisiert ist
- (IV) in der Möglichkeit, etablierte *in-vitro*-Methoden diagnostisch zum Nachweis der klinischen Birkenpollen-assoziierten Apfelallergie einzusetzen

### 4.1 Polyphenolprofil und antioxidative Kapazität von Äpfeln und ihre Struktur-Wirkungsbeziehungen

#### 4.1.1 Auswirkungen der Züchtung auf den Polyphenolgehalt und das -profil

Die gezielte Züchtung neuer Apfelsorten geht mit Veränderungen im Polyphenolgehalt sowie in deren Polyphenolprofil einher. Um diese Veränderungen zu charakterisieren, wurden die o. g. Parameter im Fruchtfleisch und in der Schale bei 15 verschiedenen Apfelsorten (zehn alte und fünf neue Sorten) untersucht. Insgesamt konnten 20 verschiedene phenolische Verbindungen mittels HPLC-DAD identifiziert und quantifiziert werden. Die Ergebnisse (Gehalte bezogen auf Trockengewicht (TW)) der einzelnen Apfelsorten und Literaturvergleiche sind im Manuskript I einsehbar.

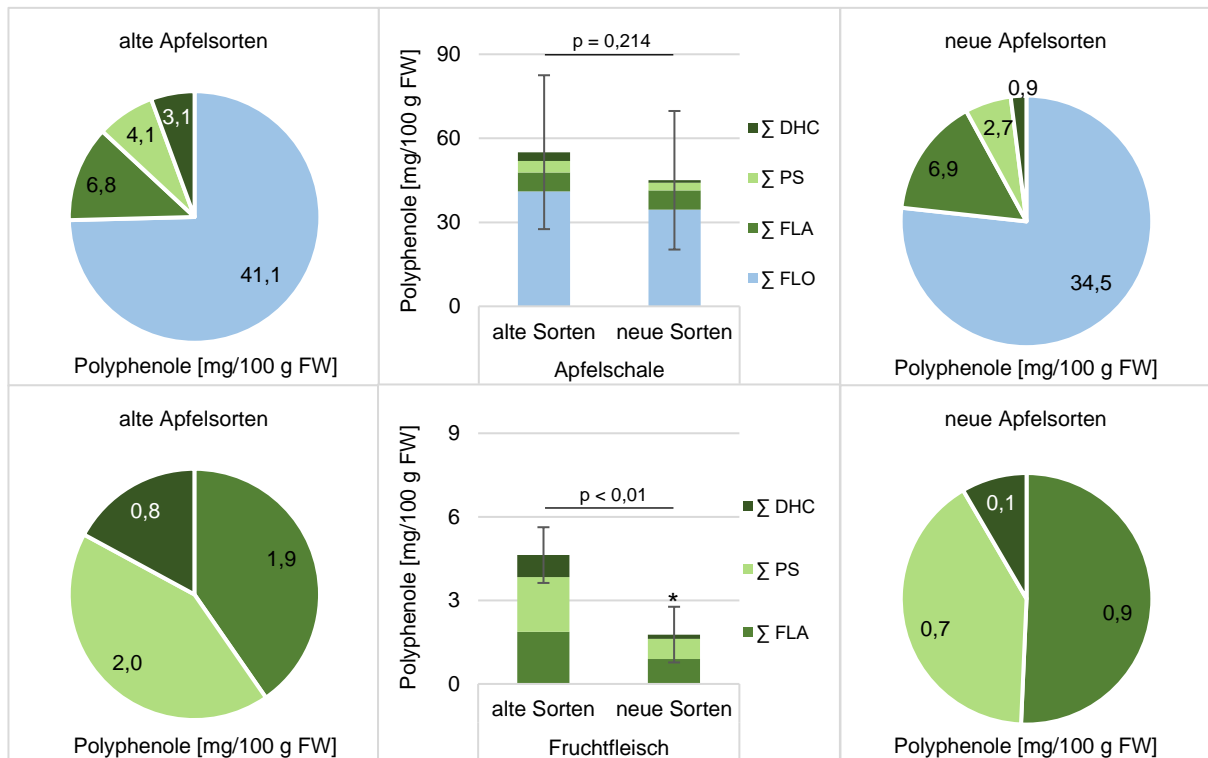
Mit der separaten Analyse des Fruchtfleisches und der Schale konnte gezeigt werden, dass die Apfelschale einen 14-fach höheren Polyphenolgehalt ( $51,7 \pm 26,2$  mg/100 g Frischgewicht (FW)) im Vergleich zum Fruchtfleisch ( $3,7 \pm 1,9$  mg/100 g FW) besitzt. Auch das Polyphenolprofil variierte stark zwischen Fruchtfleisch und Apfelschale. Während Flavonolglykoside ausschließlich in der Schale auftraten, verteilten sich insbesondere (+)-Catechin, (-)-Epicatechin und Procyanidine sowie Phloridzin und Chlorogensäure auf den Schalenbereich, in einem geringeren Gehalt auch auf das Fruchtfleisch (Manuskript I und Abb. 8). Eine wesentliche Ursache für den höheren Polyphenolgehalt in der Apfelschale liegt in der Barrierefunktion gegenüber biotischen und abiotischen Stressfaktoren begründet. Die in der Apfelschale enthaltenen Flavonoide, v. a. Quercetin und seine Glykoside, tragen maßgeblich zum Schutz vor UV-B-Strahlung bei. Des Weiteren können Flavonoide die Sporenbildung von Mikroben inhibieren und somit vor Krankheiten wie z. B. Schorf, Mehltau und Feuerbrand schützen (Harborne & Williams 2000).

Ein Ziel der Apfelzucht besteht u. a. in der Kultivierung resistenter Apfelsorten, da in den letzten Jahrzehnten die Akzeptanz gegenüber dem Einsatz von Pestiziden und anderen Pflanzenschutzmitteln beim Verbraucher gesunken ist (Fischer & Fischer 2004). Aus Gründen der Funktionalität unterschied sich der Polyphenolgehalt der Schale nicht signifikant bei den untersuchten neuen ( $45,0 \pm 24,7$  mg/100 g FW) und alten Apfelsorten ( $55,0 \pm 27,5$  mg/100 g FW) (Abb. 8). Eine weitere Aufgabe der Apfelzucht besteht darin einen möglichst süßen Geschmack sowie eine geringe enzymatische Bräunung des Fruchtfleisches zu erzielen (Fischer & Fischer 2004, Holderbaum et al. 2010). Da Polyphenole durch ihren sauren bis herben Geschmack bekannt sind, wurde bei der Züchtung neuer Apfelsorten der Polyphenolgehalt des Fruchtfleisches reduziert. Dies konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Im Gegensatz zur Schale konnte im Fruchtfleisch neuer Sorten ( $1,8 \pm 0,7$  mg/100 g FW) im Vergleich zu den alten Sorten ( $4,6 \pm 1,5$  mg/100 g FW) ein um 61,7 % geringerer Polyphenolgehalt ermittelt werden (Abb. 8).

Wie in Manuskript I beschrieben, sind die untersuchten neuen Apfelsorten durch einen geringeren Gehalt an monomeren und oligomeren Flavanolen (-51,9 %), insbesondere (-)-Epicatechin und Procyanidinen, sowie des Dihydrochalkons Phloridzin (-81,1 %) charakterisiert. Dies liegt darin begründet, dass Flavanole und Phloridzin für ihren herben Geschmack bekannt sind und insbesondere Procyanidine zur Bitterkeit und Adstringenz von Äpfeln beitragen (Lea & Arnold 1978). Zur Reduktion des säuerlichen Geschmacks wurde der Gehalt an Hydroxycimtsäuren (-63,2 %), v. a. an Chlorogensäure und Kaffeesäure, in den neuen Sorten verringert. Des Weiteren sind (-)-Epicatechin und Procyanidine sowie Chlorogensäure und Kaffeesäure sehr gute Substrate für die PPO und dadurch maßgeblich an der enzymatischen



Oxidation beteiligt (Guyot et al. 2003). Folglich geht die Zucht neuer Apfelsorten mit der Reduktion von Flavanolen und Hydroxyzimtsäuren im Fruchtfleisch einher. Ciesa (2014) konnte ebenfalls einen bis zu viermal höheren Polyphenolgehalt im Fruchtfleisch alter Apfelsorten (z. B. Edelböhmer) ermitteln, was hauptsächlich auf einen höheren Gehalt an Procyanidin B2, Chlorogensäure und (-)-Epicatechin zurückzuführen ist und auch mit den Ergebnissen dieser Arbeit belegt werden kann.

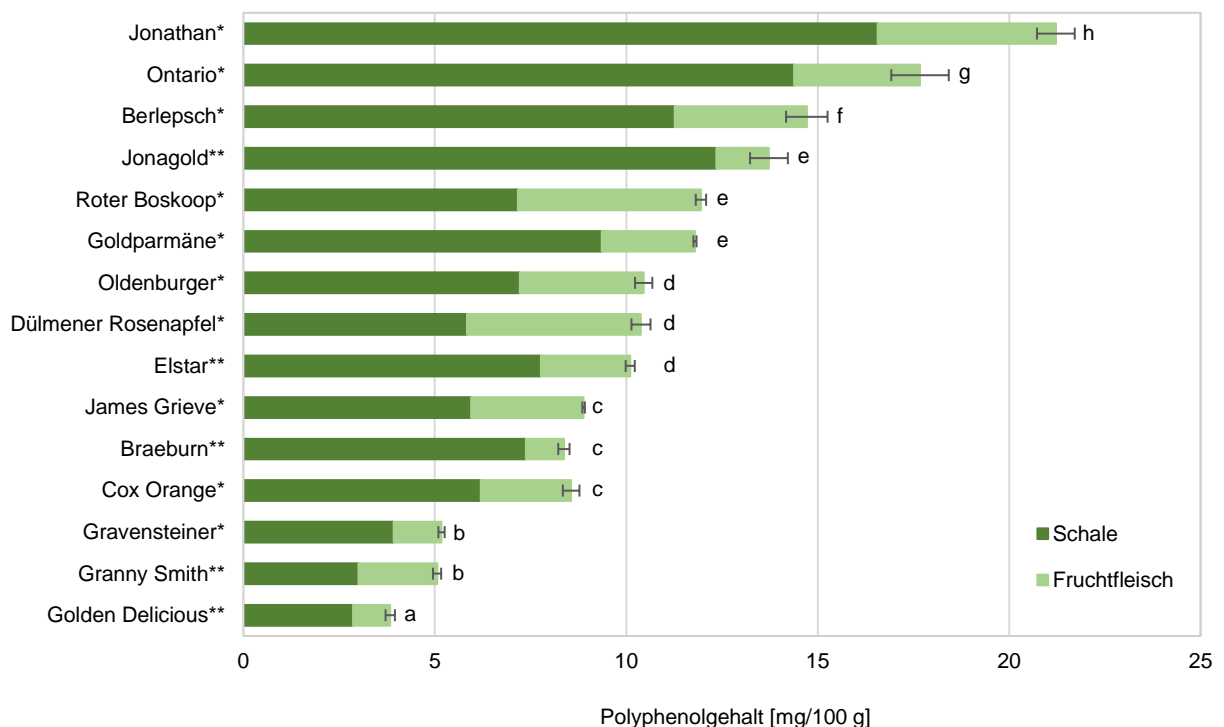


**Abb. 8:** Vergleich des Polyphenolgehaltes und -profils von Fruchtfleisch und Schale alter und neuer Apfelsorten. \* signifikanter Unterschied zwischen alten ( $n = 10$ ) und neuen Apfelsorten ( $n = 5$ ),  $p < 0,05$  ungepaarter t-Test); FLO: Flavonole; FLA: Flavanole; PS: Phenolsäuren; DHC: Dihydrochalkone; FW: Frischgewicht.

In der folgenden Abbildung 9 sind die Gesamtpolyphenolgehalte der untersuchten Apfelsorten unter Berücksichtigung der prozentualen Anteile von Schale (15,5 %) und Fruchtfleisch (76,5 %) in Bezug auf die Gesamtf Frucht dargestellt. Der Gesamtpolyphenolgehalt bewegt sich im Bereich von  $3,8 \pm 0,1$  mg/100 g FW (Golden Delicious) bis  $21,2 \pm 0,5$  mg/100 g FW (Jonathan). Die Extraktion der Polyphenole erfolgte in dieser Arbeit ohne Zugabe eines Oxidationsschutzes, um den natürlich auftretenden Abbau der Polyphenole durch die enzymatische Bräunungsreaktion während des Verzehrs nachzuempfinden. In Folge dessen konnte

allerdings ein teilweiser Abbau der Polyphenole und damit eine Abnahme des Polyphenolgehaltes nicht verhindert werden. Deshalb sind die hier ermittelten Gesamtpolyphenolgehalte auch geringer im Vergleich zu Literaturwerten (Stracke et al. 2009, Duda-Chodak et al. 2010).

Trotz des geringen prozentualen Anteils der Schale an der Gesamtf Frucht trägt sie aufgrund ihres hohen Gehaltes an phenolischen Verbindungen maßgeblich (56,3 % bis 90,0 %) zum Gesamtpolyphenolgehalt bei. Die untersuchten alten Sorten besaßen einen um 32,1 % höheren Gesamtpolyphenolgehalt ( $12,1 \pm 4,7$  mg/100 g FW) im Vergleich zu den neuen Apfelsorten ( $8,2 \pm 4,0$  mg/100 g FW). Die Reduktion des Polyphenolgehaltes sowie die Veränderung des -profils wurde durch das gezielte Einkreuzen von polyphenolarmen Apfelsorten (z. B. Golden Delicious) realisiert. Ein Beispiel hierfür ist die Apfelsorte Jonagold - eine Neuzüchtung aus den Sorten Jonathan und Golden Delicious. Im Vergleich zu Jonathan wies die Sorte Jonagold einen um 35,3 % geringeren Gesamtpolyphenolgehalt auf. Dabei war der Unterschied zwischen den zwei Sorten bezüglich des Fruchtfleisches (74,0 %) größer als der Unterschied, die Schale betreffend (25,5 %).



**Abb. 9:** Vergleich des Gesamtpolyphenolgehaltes alter und neuer Apfelsorten. Der Gesamtpolyphenolgehalt wurde unter Berücksichtigung der prozentualen Anteile von Schale (15,5 %) und Fruchtfleisch (76,5 %) an der Gesamtf Frucht berechnet. <sup>abc</sup> Mittelwerte mit unterschiedlichen hochgestellten Buchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p \leq 0,05$ ; einfaktorische Varianzanalyse mit Post-hoc-Test S-N-K). FW: Frischgewicht; \*: alte Apfelsorten; \*\*: neue Apfelsorten.

#### 4.1.2 Einfluss des Polyphenolprofils auf die antioxidative Kapazität

Polyphenole sind, neben Vitamin C, die wichtigsten hydrophilen Radikalfänger *in vivo* und gelangen über die Nahrungsaufnahme, wie z. B. über den Verzehr von Äpfeln, in den menschlichen Organismus. In zahlreichen Studien wurde beobachtet, dass Polyphenole unterschiedliche antioxidative Potenziale aufweisen (Bors & Michel 2002, Rice-Evans et al. 1995). Deshalb wurde die RAA (Berechnung siehe Manuskript I) der identifizierten phenolischen Verbindungen anhand von Polyphenolstandards im TPC nach Folin Ciocalteu, H-TEAC- und H-ORAC-Test ermittelt. Aufgrund dessen, dass Vitamin C eine weit verbreitete hydrophile antioxidative Komponente in Obst und Gemüse ist (Lee et al. 2003), wurde zusätzlich die RAA von Vitamin C bestimmt. Die Ergebnisse befinden sich in Manuskript I sowie in Tabelle 5.

**Tab. 5:** Vergleich der relativen antioxidativen Aktivität identifizierter phenolischer Verbindungen in Äpfeln sowie von Vitamin C in verschiedenen hydrophilen Testsystemen.

Klassifizierung	Phenolische Verbindung	TPC	H-TEAC	H-ORAC
Flavonole	Avicularin	0,7	3,5	6,7
	Hyperoside	0,8	4,4	7,9
	Isoquercitrin	0,7	3,7	7,2
	Quercetin	1,1	4,2	6,8
	Quercitrin	0,7	3,6	6,6
	Reynoutrin	0,7	3,3	8,6
	Rutin <sup>1</sup>	0,5	4,0	9,1
Flavanole	(+)-Catchin	0,9	2,6	4,9
	(-)-Epicatechin	1,1	3,0	5,0
	Procyanidin A2	0,7	3,9	6,0
	Procyanidin B1	0,8	5,6	10,4
	Procyanidin B2	0,6	4,9	9,6
	Procyanidin C1	0,7	6,0	10,4
Dihydrochalkone	Phloridzin <sup>2</sup>	0,4	3,2	8,7
Phenolsäuren	Chlorogensäure	0,7	1,2	4,7
	Ferulasäure	0,7	2,0	2,9
	Gallussäure	1,0	3,8	1,7
	Kaffeesäure	1,0	1,0	4,0
	<i>p</i> -Cumarsäure	0,7	2,2	4,9
	Protocatechusäure	1,2	1,0	4,3
Vergleich mit Vitamin C		0,6	0,8	0,9

RAA: Relative antioxidative Aktivität = AOA/c; AOA: antioxidative Aktivität der phenolischen Verbindung; c: Konzentration der phenolischen Verbindung; TPC: Gesamtphenoltest nach Folin-Ciocalteu; H-TEAC: hydrophiler *trolox antioxidant capacity*-Test; H-ORAC: hydrophiler *oxygen radical absorbance capacity*-Test; <sup>1</sup> Rutin als Rutintrihydrat; <sup>2</sup> Phloridzin als Phloridzindihydrat.

Anhand der erhobenen RAA-Werte kann bestätigt werden, dass die im Apfel enthaltenen phenolischen Verbindungen unterschiedlich starke antioxidative Potenziale besitzen und daher auch in einem unterschiedlichen Maß zur AOK von Äpfeln beitragen. Flavanole und Flavonole wiesen dabei die höchsten RAA-Werte auf. Dies stimmt auch mit Publikations-

ergebnissen von Chinnici et al. (2004), Stracke et al. (2009) und Wojdyło, Oszmiański & Laskowski (2008) überein. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Polyphenole stärkere Antioxidantien gegenüber Vitamin C sind (Lee et al. 2003). Unter Berücksichtigung der quantifizierten Polyphenolgehalte wurde der relative Beitrag jeder einzelnen phenolischen Verbindung an der AOK der Schale bzw. des Fruchtfleisches im H-ORAC-Test ermittelt (Abb. 1 Manuskript I). Dabei bildeten Flavonole mit  $15,9 \pm 6,5$  % den Hauptanteil zur AOK der Apfelschale. Tsao et al. (2005) zeigten ebenfalls, dass Flavonole, neben Procyanidinen, den größten relativen Beitrag zur AOK in der Schale lieferten. Im Fruchtfleisch hingegen wies Vitamin C mit  $9,1 \pm 2,6$  % den größten relativen Beitrag zur AOK auf, was auf den höheren Gehalt im Vergleich zu Polyphenolen zurückzuführen ist (Abb. 1 und Tab. 4 Manuskript I).

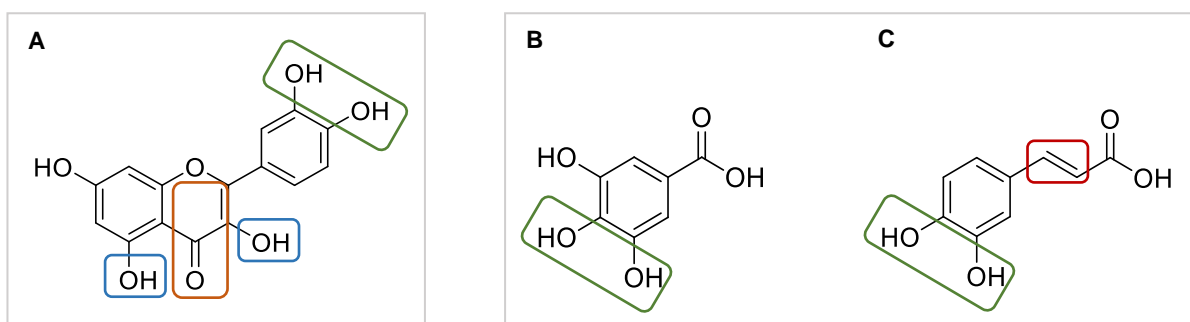
Beim Vergleich der AOK alter und neuer Apfelsorten wird deutlich, dass sowohl die Reduktion des Vitamin-C- als auch des Polyphenolgehaltes im Fruchtfleisch neuer Sorten ebenso mit einer Abnahme der AOK in allen drei Testsystemen einherging (Tab. 4 Manuskript I). Insgesamt konnte ein relativer Beitrag von  $15,9 \pm 4,1$  % (Fruchtfleisch) bis  $26,1 \pm 7,0$  % (Schale) mit Hilfe der quantifizierten Gehalte an Polyphenolen und Vitamin C berechnet werden (Berechnung siehe Manuskript I). Die Tatsache, dass alle berechneten AOK-Ergebnisse geringer ausfielen als die gemessenen AOK-Werte deutet auf unquantifizierte phenolische Verbindungen sowie mögliche Synergismen und/oder Antagonismen zwischen den Polyphenolen hin (Tsao et al. 2005, Lee et al. 2003). Verglichen mit Literaturwerten waren die berechneten AOK-Werte geringer, was auf Unterschiede in den Apfelsorten, die Probenvorbereitung (Verzicht eines Oxidationsschutzes), die AOK-Tests bzw. Methoden für die Extraktion und Quantifizierung der phenolischen Verbindungen zurückzuführen ist. (Tsao et al. 2005, van der Sluis 2002, Chinnici et al. 2004).

#### **4.1.3 Struktur-Wirkungsbeziehungen von Polyphenolen**

Neben der Untersuchung des Einflusses phenolischer Verbindungen auf die AOK von alten und neuen Apfelsorten wurden Struktur-Wirkungsbeziehungen von Polyphenolen analysiert. Im TPC nach Folin-Ciocalteu führen eine erhöhte Delokalisierung und Konjugation von  $\pi$ -Elektronen zu einer Verringerung des IP. Als Voraussetzungen hierfür werden Resonanzeffekte und Planarität diskutiert (Leopoldini et al. 2004). Dieser Zusammenhang erklärt die geringe Aktivität von Phloridzin, welches aufgrund des offenen Ringsystems zwischen Ring A und B keine Planarität aufweist. Auch führt das Fehlen der 2,3-Doppelbindung zu einem verringerten Resonanzeffekt. Diese Merkmale sind ein struktureller Vorteil von Quercetin (Rice-Evans, Miller & Paganga 1997). Im H-TEAC-Test wurde ein Zusammenhang zwischen der steigenden Anzahl an Hydroxylgruppen am aromatischen Ring und der Stärke des antioxi-

dativen Potenzials bei den Flavonoiden festgestellt, wie es bereits Salah et al. (1995) im H-TEAC-Test zeigen konnten. Die hier ermittelten Aktivitäten stimmen zudem gut mit RAA-Werten von Rice-Evans, Miller & Paganga (1996) und (1997) überein. Anhand des Vergleiches von Quercetin mit (+)-Catechin und (-)-Epicatechin konnte der positive Einfluss der 4-Oxogruppierung in Verbindung mit der 2,3-Doppelbindung am C-Ring im H-TEAC- sowie H-ORAC-Test bestätigt werden. Die 2,3-Doppelbindung in Kombination mit der 4-Oxofunktion am C-Ring führen zur Delokalisierung des entstehenden Phenoxyradikals und erhöhen damit dessen Stabilität, was sich in einer hohen RAA widerspiegelt (Salah et al. 1995).

Des Weiteren zeigten Phenolsäuren geringere RAA-Werte im Vergleich zu Flavonoiden (sowohl im H-TEAC- als auch im H-ORAC-Test), was auf die erhöhte Anzahl an *o*-ständigen Hydroxylgruppen zurückzuführen ist und mit Untersuchungen von Guo et al. (1997) und Dávalos, Gómez-Cordovés & Bartolomé (2004) übereinstimmt. Deshalb wiesen die Procyanidine B1, B2 und C1 die höchsten RAA-Werte gegenüber  $O_2^{\cdot-}$  (H-TEAC) und  $ROO^{\cdot}$  (H-ORAC) auf, da sie die höchste Anzahl an Hydroxylgruppen besitzen (Salah et al. 1995). Dávalos, Gómez-Cordovés & Bartolomé (2004) stellten weiterhin fest, dass Kaffeesäure eine höhere Effektivität als Ferulasäure aufweist, was in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte. Dieser Unterschied könnte auf die Substitution einer Hydroxylgruppe durch eine Methoxygruppe bei Ferulasäure zurückzuführen sein. Das Fehlen der Catechol-Funktion führt zu einer geringeren Stabilität des Radikals und erhöht somit die BDE, was mit einem geringeren antioxidativen Potenzial einhergeht (Leopoldini et al. 2004). Anhand des Vergleiches der RAA verschiedener phenolischer Verbindungen wird deutlich, dass das antioxidative Potenzial von Polyphenolen maßgeblich von der chemischen Struktur abhängt. In der nachfolgenden Abbildung 10 sind wichtige Strukturmerkmale dargestellt, welche essentiell für die antioxidativen Eigenschaften der Polyphenole sind (Ozgová, Heřmánek & Gut 2003).



**Abb. 10:** Strukturelle Voraussetzungen für die antioxidative Wirksamkeit von Polyphenolen (in Anlehnung an Ozgová, Heřmánek & Gut 2003). (A): Flavonoide am Beispiel von Quercetin; (B): Hydroxybenzoesäuren am Beispiel von Gallussäure; (C) Hydroxycimtsäuren am Beispiel von Kaffeesäure.

Die RAA-Ergebnisse zeigen jedoch auch, dass das Festlegen einer allgemeingültigen Rangfolge der Polyphenole gemäß ihrer antioxidativen Wirkung nicht möglich ist, da phenolische Verbindungen in Abhängigkeit von der verwendeten Methode unterschiedlich RAA-Werte aufwiesen. Gründe hierfür sind u. a., dass die Methoden auf unterschiedlichen Reaktionsmechanismen, Redoxpotentialen, pH-Abhängigkeiten sowie Lösungsmitteln basieren (Karmowski 2015). Des Weiteren reagieren einzelne phenolische Verbindungen unterschiedlich stark auf verschiedene Radikalspezies (Husain, Cillard & Cillard 1987, Huguet, Máñez & Alcaraz 1990, Rice-Evans, Miller & Paganga 1996). So wird z. B. das ROO<sup>•</sup> im H-ORAC-Test stärker von Flavonolen, Flavanolen und dem Dihydrochalkon Phloridzin abgefangen als von Phenolsäuren. Auch die Eigenschaften der oxidierbaren Substanzen können die antioxidative Wirksamkeit beeinflussen (Böhm et al. 1998). Daher ist ein Vergleich der antioxidativen Wirkung verschiedener Verbindungen oder Lebensmittelextrakte nur innerhalb eines einzigen Testsystems sinnvoll (Apak et al. 2013, Karmowski 2015).

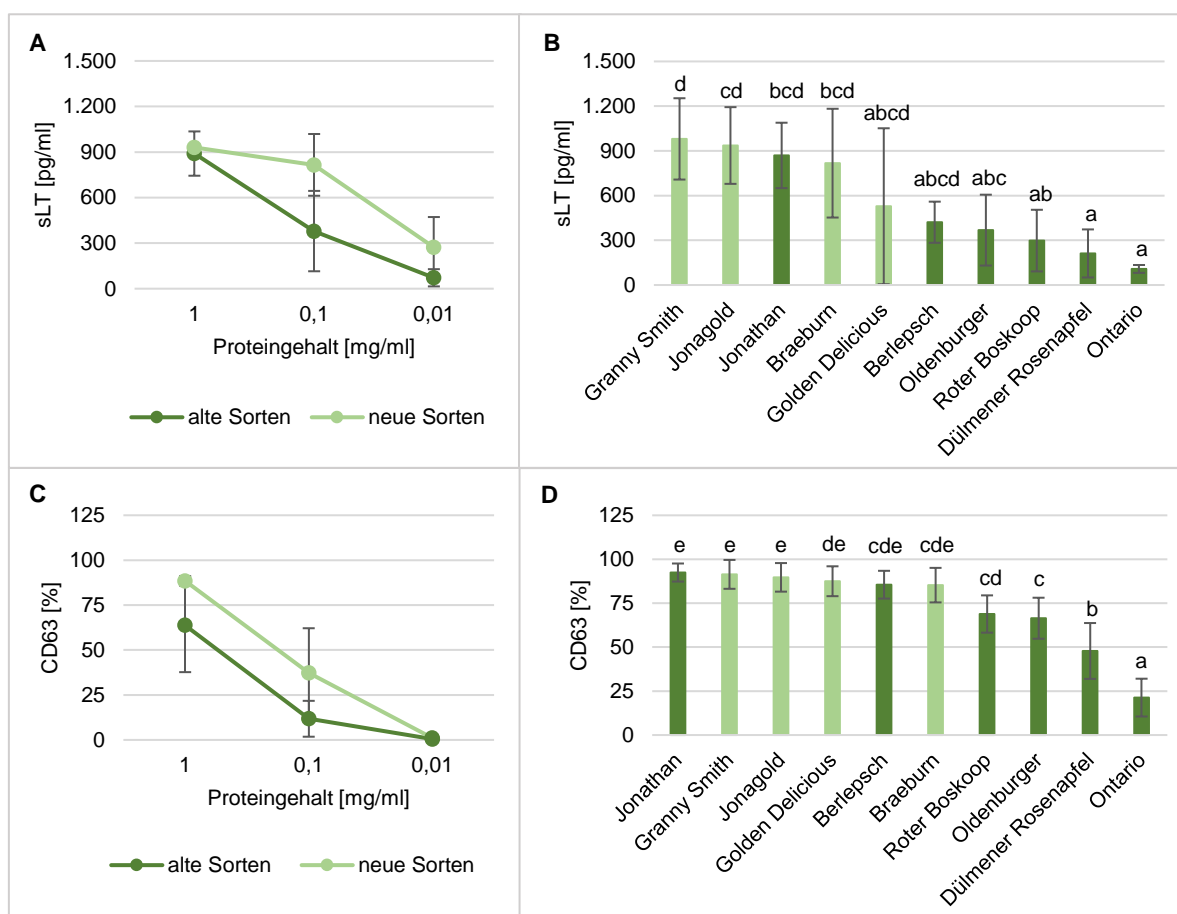
## 4.2 Allergisches Potenzial von Äpfeln und mögliche Einflussfaktoren

### 4.2.1 Vergleich des allergischen Potenzials verschiedener Apfelsorten

In Vorexperimenten wurde zunächst die *in-vitro*-Allergenität des Fruchtfleisches von zehn verschiedenen Apfelsorten in Abhängigkeit vom Gesamtproteingehalt untersucht, um u. a. geeignete Konzentrationen für die Stimulation in CAST und BAT zu ermitteln (Abb. 11). Bei einer Proteinkonzentration des Apfelextraktes von 1,0 mg/ml erfolgte eine Überstimulation im CAST, während eine Konzentration von 0,01 mg/ml zu einer sehr geringen Stimulation führte, die zum Teil sogar unterhalb der Stimulationskontrolle von  $\geq 200$  pg/ml lag. Aus diesem Grund wurde für den CAST daraufhin ein Gesamtproteingehalt von 0,1 mg/ml als geeignete Konzentration für die Stimulationsprozesse herangezogen.

Im BAT hingegen wurde eine geeignete Stimulation mit einer Gesamtproteinkonzentration des Apfelextraktes von 1,0 mg/ml erzielt, da geringere Konzentrationen wie z. B. 0,1 mg/ml und insbesondere 0,01 mg/ml bei einigen Probanden nicht für eine Stimulation ausreichten. Die Ergebnisse der Vorexperimente zeigten bereits, dass alte Apfelsorten eine geringere *in-vitro*-Allergenität (CAST: -53,5 %; BAT: -28,0 %) im Vergleich zu neuen Sorten aufweisen (Abb. 11). Eine Ausnahme war die alte Apfelsorte Jonathan, welche die höchste Allergenität im BAT und die dritthöchste im CAST verzeichnete. Auch Ricci et al. (2010) konnten mittels Pricktechnik bei 19 Birkenpollen-assoziierten Apfelallergikern nachweisen, dass die Sorte Jonathan ein höheres allergisches Potenzial im Vergleich zu Jonagold und Golden Delicious besitzt. Anhand

der Vorexperimente wurde Granny Smith als Sorte mit einem sehr hohen allergischen Potenzial identifiziert. Ontario und Dölmener Rosenapfel konnten hingegen als Apfelsorten mit einem geringen allergischen Potenzial eingestuft werden (Abb. 11). Da die Vorexperimente ausschließlich im Blut von nur vier Birkenpollen-assoziierten Apfelallergikern erfolgten, wurde eine Pilotstudie mit 34 Probanden durchgeführt, in welcher die *in-vitro*-Allergenität der neuen Apfelsorten, Granny Smith und Braeburn, sowie der alten Sorten, Ontario und Dölmener Rosenapfel, erneut untersucht wurden. Die neue Apfelsorte Braeburn wurde hinzugezogen, da diese den geringsten Polyphenolgehalt (im Fruchtfleisch) von allen untersuchten Sorten aufwies. Weitere Details zur Pilotstudie befinden sich im Methodenteil des Manuskriptes II.



**Abb. 11:** Vergleich der *in-vitro*-Allergenität alter und neuer Apfelsorten. (A) Verlauf der Konzentration an Sulfidoleukotrienen (sLT) in Abhängigkeit vom Gesamtproteingehalt; (B) Vergleich der sLT-Freisetzung verschiedener Apfelsorten bei einem Proteingehalt von 0,1 mg/ml; (C) CD63-Basophilenaktivierung (CD63) in Abhängigkeit vom Gesamtproteingehalt; (D) Vergleich der CD63 bei verschiedenen Apfelsorten mit einem Proteingehalt von 1,0 mg/ml. Die Stimulation erfolgte im Blut von Birkenpollen-assoziierten Apfelallergikern (n = 4). <sup>abc</sup> Mittelwerte mit unterschiedlichen hochgestellten Buchstaben unterscheiden sich signifikant ( $p \leq 0,05$ ; einfaktorielles Varianzanalyse mit Post-hoc-Test S-N-K).

Von den 34 Teilnehmern zeigten 27 Probanden eine Reaktion auf die Stimulationskontrollen und auf *rMal d 1* in CAST und BAT (Tab. 1 Manuskript II). In beiden *in-vitro*-Testsystemen besaß die Sorte Ontario die geringste *in-vitro*-Allergenität, gefolgt von Dülmener Rosenapfel. Bei den beiden neuen Sorten Braeburn und Granny Smith kam es hingegen zu einer höheren sLT-Freisetzung und einer höheren Aktivierung von CD63-Basophilen (Tab. 2 Manuskript II). Eine Vielzahl von Veröffentlichungen, die sich ebenfalls der Untersuchung des allergischen Potenzials verschiedener Apfelsorten widmeten, sind in Tabelle 6 aufgeführt. Dabei wurden sowohl *in-vitro*- (Radio-Allergo-Sorbent-Test (RAST)) als auch *in-vivo*- (orale Provokation, Pricktests) diagnostische Methoden angewendet, in den meisten Fällen jedoch ohne getrennte Betrachtung von Fruchtfleisch und Schale bzw. Unterscheidung zwischen alten und neuen Sorten.

**Tab. 6:** Vergleich der Allergenität verschiedener Apfelsorten.

Literatur	Methode	Allergenität verschiedener Apfelsorten
Vieths et al. (1994)	16 Apfelsorten, RAST, SPT, oP, 3 Probanden	Golden Delicious > Boskoop > Jamba
de Groot et al. (1996)	2 Apfelsorten, RAST, SPT, 79 Probanden	Granny Smith > Golden Delicious
Bolhaar et al. (2005)	19 Apfelsorten, SPT, oP, 23 Probanden	Golden Delicious > Gala > Santana
Carnés, Ferrer & Fernández-Caldas (2006)	10 Apfelsorten, SPT, 22 Probanden	Red Delicious (Starking) > Golden Delicious > Reineta Parda
Ricci et al. (2010)	11 Apfelsorten, SPT, 19 Probanden	Jonathan > Jonagold > Golden Delicious > Fiesta
Vlieg-Boerstra et al. (2011)	68 Apfelsorten, SPT, oP, 33 Probanden	Golden Delicious > Pink Lady > Santana > Elise
Vlieg-Boerstra et al. (2013)	8 Apfelsorten, SPT, 85 Probanden	Golden Delicious > Kanzi > Granny Smith > Modi > Elise > Santana
Vegro et al. (2016)	24 Apfelsorten, SPT, 76 Probanden	Ambrosia > Gloster > Modi > Golden Delicious
Wagner et al. (2016)	6 Apfelsorten, SPT, 6 Probanden	Golden Delicious > Gloster > Szampion > Cortland > Jonagold > Idared
Kschonsek et al. (2019)	4 Apfelsorten, CAST, BAT, 27 Probanden	Granny Smith > Braeburn > Dülmener Rosenapfel > Ontario

RAST: Radio-Allergo-Sorbent-Test; SPT: Haut-Prick-Test; oP: orale Provokation, CAST: zellulärer Antigenstimulationstest, BAT: Basophilenaktivierungstest.



Literaturrecherchen und auch die Ergebnisse dieser Arbeit machen deutlich, dass v. a. die neuen Sorten Golden Delicious und Granny Smith eine hohe Allergenität sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* besitzen (Abb. 11 und Tab. 6). Auffallend ist, dass insbesondere die im Supermarkt erhältlichen und beim Verbraucher beliebten, neuen Apfelsorten Gala, Golden Delicious, Granny Smith, Jonagold, Kanzi, Pink Lady und Red Delicious durch ein hohes allergisches Potenzial zu charakterisieren sind. Vlieg-Boerstra et al. (2013) und Bolhaar et al. (2005) konnten darüber hinaus zeigen, dass die für Allergiker empfohlenen Sorten Elise und Santana eine geringe Allergenität *in vivo* aufweisen. Eine Analyse von Vieths et al. (1994) bestätigte, dass die neue Sorte Golden Delicious stärkere allergische Reaktionen im Vergleich zu den alten Apfelsorten Boskoop und Jamba hervorruft.

Diskutiert wird der Allergengehalt v. a. von *Mal d 1* als mögliche Ursache für die genannten sortenspezifischen Unterschiede in Bezug auf das allergische Potenzial (Son & Lee 2001). Genetische Untersuchungen bestätigen die Existenz von mindestens 18 Genen, welche für unterschiedliche Isoformen von *Mal d 1* codieren, jedoch mit unterschiedlichen Expressionsniveaus (Botton et al. 2008, Gao et al. 2005 und 2008, Pühringer et al. 2003). Gao et al. (2008) zeigten, dass die allele Zusammensetzung von zwei spezifischen Genen (*Mal d 1.04* und *Mal d 1.06*) mit der Allergenität assoziiert ist. Bisher existieren nur wenige Studien, in denen neben dem allergischen Potenzial auch der *Mal d 1*-Gehalt der verschiedenen Apfelsorten bestimmt wurde. Ein linearer Zusammenhang zwischen Allergengehalt und Allergenität konnte allerdings in den wenigen bislang untersuchten Sorten nicht hinreichend nachgewiesen werden.

In der hier durchgeführten Pilotstudie wurde zusätzlich zum allergischen Potenzial der *Mal d 1*-Gehalt der untersuchten Apfelsorten bestimmt. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen der *in-vitro*-Allergenität und dem *Mal d 1*-Gehalt konnte jedoch nicht festgestellt werden. Die Ergebnisse und Literaturvergleiche sind im Manuskript II einsehbar. Aber auch innerhalb einer einzelnen Apfelsorte können Unterschiede bezüglich der Allergenität auftreten. Vlieg-Boerstra et al. (2013) stuften im Gegensatz zu den Ergebnissen von de Groot et al. (1996) und dieser Arbeit die Sorte Granny Smith als weniger allergisch gegenüber Golden Delicious ein.

Diese widersprüchlichen Daten können z. B. mit natürlichen Schwankungen im Allergengehalt begründet werden, welche durch unterschiedliche Wachstumsbedingungen der Bäume an den jeweiligen Standorten bedingt sind. Auch Unterschiede im Reifestadium der Äpfel und in der Lagerungsart bzw. -dauer können zu variierenden Allergengehalten führen, da mit voranschreitender Fruchtreife und während der CA (*controlled atmosphere*)-Lagerung ein Anstieg des *Mal d 1*-Gehaltes und damit eine Zunahme der allergenen Wirkung beobachtet werden konnte (Matthes & Schmitz-Eiberger 2009, Schmitz-Eiberger & Matthes 2011). Des Weiteren

sind Unterschiede im allergischen Potenzial auch auf eine ungleichmäßige Verteilung von *Mal d 1* im Bezug auf die Gesamtf Frucht zurückzuführen. Bekannt ist, dass die Apfelschale einen höheren Allergengehalt gegenüber dem Fruchtfleisch besitzt, somit wird die Allergenität auch von der jeweils getesteten Region des Apfels beeinflusst (Fernández-Rivas & Cuevas 1999, Nybom, Cervin-Hoberg & Andersson 2013). Und gerade deshalb können, je nachdem ob die Gesamtf Frucht oder der geschälte Apfel (nur Fruchtfleisch) zur Testung herangezogen wurde, unterschiedlich starke allergische Reaktionen entstehen. Vlieg-Boerstra et al. (2013) zeigten, dass um optimale Pricktest-Ergebnisse erzielen zu können, in der Stielnähe der Äpfel und nicht im Zentrum der Apfelfrucht getestet werden sollte. Skamstrup Hansen et al. (2001) stellten zudem fest, dass die klinische Reaktivität gegenüber Äpfeln (orale Provokation) in der Gruppe der Birkenpollen-assoziierten Apfelallergiker während der Birkenpollensaison ansteigt. Die Intensität allergischer Reaktionen bezüglich einer einzelnen Apfelsorte könnte auch auf die individuelle Sensibilität der Probanden zurückzuführen sein. So kam es auch in der hier durchgeführten Pilotstudie bei einzelnen Probanden zu einer höheren Freisetzung von Sulfido-leukotrienen und Basophilenaktivierung bei den getesteten alten Apfelsorten im Vergleich zu den Neuen.

#### **4.2.2 Einfluss von Polyphenolen auf das allergische Potenzial von Äpfeln**

Wie bereits erwähnt, wird die wachsende Zahl Birkenpollen-assoziiierter Apfelallergiker mit dem höheren Konsum neuer Apfelsorten in Verbindung gebracht. Da sich das Fruchtfleisch neuer Apfelsorten durch einen geringeren Polyphenolgehalt sowie durch ein verändertes Polyphenolprofil gegenüber alten Sorten unterscheidet (Manuskript I sowie Kapitel 4.1.1) liegt die Hypothese nahe, dass Polyphenole Einfluss auf das allergische Potenzial von Äpfeln haben können. In der durchgeführten Pilotstudie konnte die o. g. Hypothese mittels einer inversen Korrelation zwischen der Konzentration an Sulfido-leukotrienen sowie der CD63-Basophilenaktivierung und dem Gesamtpolyphenolgehalt der vier getesteten Sorten bestätigt werden. Darauf basierend konnte gezeigt werden, dass höhere Polyphenolgehalte (Fruchtfleisch alter Sorten) mit geringeren allergischen Reaktionen im Blut der Probanden einhergehen (siehe Manuskript II).

Eine Vielzahl von Studien berichtet von einer antiallergischen Wirkung von Polyphenolen bzw. von mit Polyphenolen angereicherten Pflanzenextrakten, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Dabei wird u. a. postuliert, dass Polyphenole die Entwicklung von allergischen Immunantworten während der allergischen Sensibilisierung und nach erneuter Re-Exposition mit dem betreffenden Allergen beeinflussen können, indem sie unlösliche, irreversible Komplexe mit potenziell allergenen Proteinen bilden (Chung & Champagne 2009, Singh, Holvoet & Mercenier

2011). Als Voraussetzung für diese antiallergische Wirkung von Polyphenolen wird die enzymatische Bräunungsreaktion diskutiert. Derzeit wird vermutet, dass die PPO-katalysierte Oxidation phenolischer Verbindungen Proteine modifiziert, wobei es zu einem Verlust der Allergenität kommt (Son & Lee 2001).

Einige Studien untersuchten die antiallergische Wirkung von Polyphenolen im Zusammenhang mit der enzymatischen Bräunungsreaktion, wie z. B. Gruber et al. (2004). Sie berichteten über eine Abnahme der IgE-Bindungsaktivität von *rPru av 1* (rekombinantes Allergen der Kirsche) als Folge der PPO-katalysierten Oxidation von Polyphenolen. In Untersuchungen von Chung, Kato & Champagne (2005) und (2009) wurden Proteinextrakte auf der Basis von Erdnussprodukten mit verschiedenen Polyphenolen (Kaffeensäure, Chlorogensäure und Ferulasäure) behandelt. Die Ergebnisse beider Studien belegen, dass die Bildung unlöslicher Allergenkomplexe mit phenolischen Verbindungen zu einer Verringerung des Gehaltes an löslichen Erdnussallergenen führt, wobei diesbezüglich eine stärkere Wirkung von Kaffeensäure im Vergleich zu Chlorogensäure beobachtet werden konnte. Die Autoren der oben genannten Veröffentlichungen postulieren, dass die Bildung von phenolischen Oxidationsprodukten (u. a. *o*-Chinone) während der enzymatischen Bräunungsreaktion ein zentraler Baustein ist. *o*-Chinone sind hochreaktive elektrophile Moleküle, welche mit sich selbst reagieren oder eine Vielzahl von zellulären Nukleophilen kovalent modifizieren und vernetzen (cross-linking) können. Sie reagieren mit funktionellen Gruppen von Proteinen oder Aminosäuren, wie Sulfhydryl-, Amin-, Amid-, Indol- und Imidazolsubstituenten. Primärprodukte sind Schiffsche Basen, N-Chinonylderivate, S-Chinonylderivate und einfache Aldehyde, die aus dem Strecker-Abbau entstehen (Bittner 2006).

Diese irreversiblen Änderungen in der Tertiärstruktur des Allergens können zum Verlust von Konformationsepitopen führen. *Mal d 1* wurde als 17-18 kDa großes Protein mit 158-159 Aminosäuren identifiziert (Hoffmann-Sommergruber et al. 1997). Untersuchungen von Ferreira et al. (2000) zeigten, dass die Aminosäurepositionen 10 (T), 30 (T), 57 (I), 112 (S), 113 (I) und 125 (N) für die IgE-Bindung von *Bet v 1* und *Mal d 1* relevant sind und somit als Konformationsepitope fungieren. Werden Aminosäuren aus diesen Positionen durch Vernetzung mit reaktiven phenolischen Oxidationsprodukten strukturell verändert, könnte dies zu einer Maskierung von Epitopregionen in *Mal d 1* führen, was wiederum die IgE-Bindung inhibiert. Dies hat zur Folge, dass allergische Reaktionen ausbleiben, da die Basophilen- und Mastzellenaktivierung verhindert wird und damit die verbundene Freisetzung von Mediatoren wie z. B. Sulfidoleukotrienen und Histamin (Yaylayan 2003, Bittner 2006, Pearce, Befus & Bienenstock 1984).

Bei der Herstellung der Apfelextrakte für die Pilotstudie wurde kein Oxidationsschutz verwendet, weshalb die PPO-katalysierte Oxidation, der im Apfel enthaltenen Polyphenole, ab-

laufen konnte. Coseteng & Lee (1987) postulierten, dass neben der PPO-Aktivität v. a. die Substratkonzentration ein wesentlicher Faktor ist, welche die enzymatische Bräunung beeinflussen. Aufgrund dessen, dass alte Apfelsorten einen höheren Gesamtpolyphenolgehalt besitzen, liegt die Hypothese nahe, dass der höhere Umsatz an Polyphenolen durch die PPO im Zusammenhang mit dem geringeren allergischen Potential von Ontario und Dülmener Rosenapfel steht.

Anhand von *in-vitro*-Experimenten, in welchen der Einfluss der enzymatischen Bräunung auf das allergische Potenzial von Äpfeln untersucht wurde, konnte der Zusammenhang zwischen der Abnahme des Gesamtpolyphenolgehalts und der Abnahme der *in-vitro*-Allergenität (Abnahme der Sulfidoleukotrien-Konzentration, der CD63-Basophilenaktivierung und des *Mal d 1*-Gehaltes) bestätigt werden (Abb. 1 Manuskript II und Tab. 1 Manuskript III). Korrelationsanalysen zeigen zudem, dass Chlorogensäure, Kaffeesäure und (-)-Epicatechin den stärksten Einfluss auf die *in-vitro*-Ergebnisse hatten (Manuskript II und Manuskript III), was insbesondere darauf zurückzuführen ist, dass diese phenolischen Verbindungen sehr gute Substrate für die PPO sind. Im *in-vitro*-Modellsystem konnte die antiallergische Wirkung der o. g. Polyphenole im Zusammenhang mit der enzymatischen Bräunungsreaktion bestätigt werden (Tab. 4 Manuskript III).

Eine Studie von Kiewning et al. (2013) kam jedoch zu einem anderen Ergebnis. Sie stellten anhand von Korrelationsanalysen fest, dass der Umsatz von Catechin und (-)-Epicatechin durch die PPO keinen Effekt auf das allergische Potential von Äpfeln besitzt. Sie gehen vielmehr davon aus, dass die PPO-Aktivität einer jeden Apfelsorte für ihre Allergenität ausschlaggebend ist. Die alleinige Behandlung von *rMal d 1* mit PPO konnte auch im durchgeführten Modellsystem die Konzentration an Sulfidoleukotrienen und die CD63-Basophilenaktivierung sowie die IgE-Bindungskapazität signifikant im Vergleich zur Kontrolle verringern (Tab. 4 Manuskript III).

Als mögliche Ursache werden Tyrosinreste an der Oberfläche von Proteinen diskutiert, welche durch ihre strukturelle Ähnlichkeit zu Polyphenolen ebenfalls von der PPO oxidiert werden können. Die oxidierten Tyrosinreste haben das Potential, kovalente Verbindungen mit Lysin, Cystein oder Tyrosin einzugehen, was zum cross-linking von Proteinen führen kann und dadurch bedingt die Tertiärstruktur des Allergens verändert, was den Verlust von Konformationsepitopen verursacht (Chung & Champagne, 2009, Wu et al. 2016, Ahmed et al. 2018). Deshalb ist denkbar, dass zu den bereits genannten Aminosäurepositionen von Ferreira et al. (2000), auch Tyrosinpositionen (Positionen 66, 81, 83, 120, 150, 158) als Konformationsepitope fungieren und daher für die IgE-Bindung von *Bet v 1* und *Mal d 1* verantwortlich sind. Dies würde auch erklären, warum die Behandlung mit PPO ohne Zusatz von Chlorogensäure, Kaffeesäure

oder (-)-Epicatechin bereits zu einer Abnahme des r*Mal d 1*-Gehaltes führte, was im kompetitiven ELISA als Abnahme der IgE-Bindung zu beobachten war (Tab. 4 Manuskript III).

Untersuchungen von Garcia, Wichers & Wichers (2007) zeigten, dass die Zugabe von PPO zu einem Apfelextrakt (Golden Delicious) die IgE-Bindung von *Mal d 1* reduzierte und eine Kombination aus PPO und Catechin zu einer noch stärkeren Hemmung führte. Auch Ahmed et al. (2018) stellten fest, dass das PPO-katalysierte cross-linking von Proteinen durch die Zugabe von phenolischen Verbindungen verstärkt werden kann. Beide Studien bestätigen die Ergebnisse des durchgeführten Modellsystems. Die Ergebnisse der Manuskripte II und III sowie ein Literaturvergleich zeigen, dass der *Mal d 1*-Gehalt effektiv durch die enzymatische Bräunung reduziert werden kann. Da das allergische Potenzial einer Apfelsorte u. a. vom *Mal d 1*-Gehalt abhängt (Kapitel 4.1.1), können Apfelsorten mit einem hohen Gesamtpolyphenolgehalt sowie hoher PPO-Aktivität eine geringere Allergenität aufweisen. Dies kann wiederum die Ursache für die verringerte Allergenität der alten Apfelsorten (Ontario und Dölmener Rosenapfel) im Vergleich zu den Neuen (Braeburn und Granny Smith) sein.

Neben der bereits beschriebenen antiallergischen Wirkung durch die enzymatische Bräunungsreaktion besitzen Polyphenole (v. a. Flavanoide) auch eine direkte Wirkung auf die Antigenpräsentation durch dendritische Zellen, indem sie u. a. die Zelloberflächenexpression von MHC-II und co-stimulatorischen Molekülen (CD80, CD86) inhibieren, was zu einer ineffizienten Antigenpräsentation sowie zur Hemmung der Zytokinproduktion führt (Gong & Chen 2003, Kim et al. 2007). Bei sensibilisierten Personen führt eine erneute Exposition mit dem Allergen zur Differenzierung und Expansion von naiven CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu T<sub>H</sub>2-Zellen, welche die adaptive Immunantwort durch die Sekretion von Zytokinmediatoren (IL-4 und IL-13) fördern, die für eine allergische Immunantwort charakteristisch sind. Diese T<sub>H</sub>2-Zellen sind wichtig für die B-Zellaktivierung und IgE-Produktion sowie die Sekretion von Chemokinen, welche allergische Immunzellen wie Mastzellen und Eosinophile an Entzündungsstellen anziehen. Polyphenole wie Catechine und ihre Derivate können die T-Zell-Proliferation und die T<sub>H</sub>2-Zytokinproduktion hemmen und dadurch bedingt die Antikörperproduktion über B-Zellen beeinflussen (Graff & Jutila 2007, Zuercher et al. 2010).

Gut untersucht ist auch die hemmende Wirkung von Polyphenolen auf die Degranulation von Effektorzellen, wie Mastzellen und Basophile (Pearce et al. 1984). Dabei werden zwei Mechanismen postuliert, zum einen, dass Polyphenole die Bildung von Allergen-IgE-Komplexen inhibieren, indem sie selbst unlösliche, irreversible Komplexe mit potenziell allergenen Proteinen bilden, und zum anderen, dass sie die Bindung des Allergen-IgE-Komplexes an den FcεRI auf der Oberfläche von Mastzellen und Basophilen herabsetzen (Tokura et al. 2005, Yano, Tachibana & Yamada 2005).

Des Weiteren wird in der Literatur beschrieben, dass Polyphenole intrazelluläre Signalwege, wie z. B. die Tyrosin-Phosphorylierung durch Lyn, inhibieren, was die Degranulation von Mastzellen und Basophilen und die damit verbundene Sezernierung vorgeformter Mediatoren (wie z. B. Histamin) herabsetzt (Yamashita et al. 2000, Nakano et al. 2008). Eine Übersicht postulierter antiallergischer Wirkmechanismen ist in der nachfolgenden Tab. 7 aufgelistet.

**Tab. 7:** Antiallergische Wirkmechanismen von Polyphenolen.

Phenolische Verbindung	Wirkmechanismus	Antiallergische Wirkung
Quercetin (Fewtrell & Gomperts 1977)	Inhibierung der Kalziumaufnahme durch Wechselwirkung mit dem Membrantransporter ATPase	Verminderte Ca <sup>2+</sup> -abhängige Degranulation und Histamin-Ausschüttung von Mastzellen <i>in vivo</i> (bei Ratten)
Catechin und Epicatechin (Yamashita et al. 2000)	Inhibierung der Tyrosin-Phosphorylierung	Verminderte Ausschüttung von Histamin, Serotonin und Arachidonsäure-Metabolite <i>in vivo</i> (bei Ratten)
Flavonoide (Gong & Chen 2003)	Inhibierung der Expression von MHC-II und co-stimulierenden Molekülen (CD80, CD86)	Hemmung der Antigenpräsentation dendritischer Zellen <i>in vitro</i>
Catechin/-derivate (Yano et al. 2007)	Inhibierung der Produktion von T <sub>H</sub> 2-Zytokinen	Verminderte IgE-Produktion und Ausschüttung von Chemokinen <i>in vivo</i> (bei Ratten)
Procyanidin C1 (Nakano et al. 2008)	Inhibierung intrazellulärer Signalwege z. B. der Tyrosin-Phosphorylierung durch Lyn	Hemmung der FcεRI-vermittelten Degranulation und Zytokinproduktion von Mastzellen <i>in vivo</i> (bei Mäusen)
Chlorogensäure, Kaffeesäure, Ferulasäure (Chung & Champagne 2009)	Bildung von unlöslichen, irreversiblen Komplexen mit Allergenen während der Sensibilisierung	Reduktion des löslichen Allergen-Gehaltes <i>in vitro</i>
Epicatechin (Singh et al. 2014)	Inhibierung der Expression von T <sub>H</sub> 1- und T <sub>H</sub> 2-produzierenden Zytokinen (IL-13, IL-12a, T-bet)	Verminderte IgE-Produktion und Ausschüttung von Chemokinen <i>in vivo</i> (bei Mäusen)

ATPase: Adenosintriphosphatase; CD: *cluster of differentiation*; T<sub>H</sub>2: T-Helferzellen der Subklasse 2; MHC-II: Haupthistokompatibilitätskomplex; Lyn: Tyrosinkinase; T<sub>H</sub>1: T-Helferzellen der Subklasse 1; IL: Interleukine; T-bet: T-Zell-Transkriptionsfaktor, Ca<sup>2+</sup>: Kalzium, IgE: Immunglobulin E; FcεRI: IgE-Rezeptor.

Neben den genannten *in-vitro*-Untersuchungen konnte eine antiallergische Wirkung von Polyphenolen auch in zwei klinischen Studien im doppelblinden, randomisierten, placebokontrollierten Design gezeigt werden. Dabei führte der Verzehr polyphenolhaltiger Apfelextrakte zur Linderung von allergischen Symptomen (Schnupfen, verstopfte Nase) bei Personen mit einer allergischen Rhinitis. In der Studie von Kishi et al. (2005) erhielten Pollenallergiker während der Pollensaison für 12 Wochen 500 mg Apfelpolyphenole. Bei Enomoto et al. (2006) war die verwendete Dosis von Apfelpolyphenolen mit jeweils 50 mg (low-dose-Gruppe) bzw. 200 mg (high-dose-Gruppe) wesentlich geringer. In den meisten *in-vitro*- und *in-vivo*-Studien zur Untersuchung der antiallergischen Wirkung von Polyphenolen wurden jedoch entweder angereicherte Pflanzen- oder Fruchtextrikte mit nicht gut charakterisierten Polyphenolen verwendet oder aber Polyphenole in nicht-physiologischen Konzentrationen eingesetzt, um eine vorteilhafte gesundheitliche Wirkung aufzuzeigen. So konnte die orale Aufnahme von Epicatechin Allergiesymptome dosisabhängig abschwächen, während Polyphenol-angereicherte Extrakte mit minimalen Konzentrationen keinen Einfluss auf bestehende Allergiesymptome hatten (Singh et al. 2014).

#### 4.2.3 Beurteilung von *in-vitro*- und *in-vivo*-diagnostischen Methoden

Unterschiedliche diagnostische Testverfahren ermöglichen heute den Nachweis der Birkenpollen-assoziierten Apfelallergie einschließlich der Bestimmung des auslösenden Allergens (*Mal d 1*, *Mal d 2*, *Mal d 3* oder *Mal d 4*). Die Diagnose eines OAS gegen Äpfel wird jedoch erheblich von der jeweils zum Einsatz kommenden diagnostischen Methode beeinflusst. In der täglichen Praxis ist der Haut-Prick-Test (SPT) immer noch die Referenzmethode für die Diagnose des OAS gegen Äpfel. SPTs werden entweder mit Proteinextrakten der zu testenden Apfelsorten oder mit frischen Äpfeln mittels Prick-to-Prick-Technik durchgeführt. In einer Vielzahl von Studien wurde jedoch gezeigt, dass die diagnostische Sensitivität des SPT mit frischem Material (z. B. frischer Apfelschale) wesentlich besser ist im Vergleich zu kommerziellen Apfelextrakten (Ortolani et al. 1989, de Groot et al. 1996, Osterballe et al. 2003).

Dennoch ist die Aussagekraft des SPTs mit frischem Material immer noch sehr problematisch, da der Gehalt an Allergenen zwischen verschiedenen Apfelsorten und Reifungsstadien variiert, was folglich mit unterschiedlich starken allergischen Reaktionen einhergehen kann (Vieths et al. 1994). Bolhaar et al. (2006), konnten anhand der Testung von 21 Apfelsorten mittels SPT an neun Patienten demonstrieren, dass allergische Reaktionen auf eine bestimmte Sorte am unteren Ende der Allergenitätsskala (Santana) wesentlich geringer ausfallen gegenüber einer Sorte am oberen Ende (Golden Delicious). Daher ist die Bestimmung des Allergengehaltes eine notwendige Voraussetzung um die Intensität der jeweiligen allergischen Reak-

tionen bewerten und die richtige Diagnose stellen zu können. Um das Resultat des SPT zu bestätigen, wird häufig ein oraler Provokationstest durchgeführt. Vlieg-Boerstra et al. (2011) zeigten jedoch mittels Testung von 68 Apfelsorten an 33 Patienten, dass die Ergebnisse des SPT schlecht mit denen des oralen Provokationstests korrelieren, was u. a. an einer ungleichen Verteilung von Allergenen in den für die SPT verwendeten Früchten begründet liegt. Der orale Provokationstest ist zudem nicht für alle Allergiker geeignet, da die Gefahr des Erstickens (starke Anschwellung des Rachenraumbereichs) bis hin zu einem anaphylaktischen Schock bei Patienten mit starker Allergiesymptomatik besteht.

Aufgrund der genannten Faktoren kommen immer häufiger zelluläre *in-vitro*-Verfahren bei der Diagnostik von Soforttypallergien zum Einsatz. Im Zentrum der *in-vitro*-Diagnostik steht die Bestimmung des allergenspezifischen IgE-Wertes (z. B. ImmunoCAP-Analyse zur Bestimmung des zirkulierenden Gesamt-IgE, RAST zum Nachweis spezifischer IgE-Antikörper) sowie der Nachweis von Mediatoren oder zellulären Antigenen, welche bei erfolgreicher Aktivierung auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Für diese *in-vitro*-Methoden werden Leukozyten oder das Vollblut von Probanden mit Allergenen inkubiert. Die nach Allergenstimulation exprimierten Oberflächenmarker (z. B. CD63) bzw. die freigesetzten Mediatoren aus basophilen Granulozyten und Mastzellen (z. B. Histamin, Sulfidoleukotriene) dienen als indirektes Maß für zellulär gebundenes spezifisches IgE (Renz et al. 2010).

Ebo et al. (2005) konnten zeigen, dass die Quantifizierung einer Basophilenaktivierung durch CD63-Expression eine zuverlässige *in-vitro*-Methode zur Diagnose der Birkenpollen-assoziierten IgE-vermittelten Apfelallergie darstellt, auch wenn Non-Responder berücksichtigt werden müssen. Die Kombination von CAST und BAT, wie in dieser Arbeit angewendet, wurde als eine Variante beschrieben, welche die diagnostische Effizienz verbessern kann (Norgaard, Skov & Bindslev-Jensen 1992). Neben den genannten Testverfahren findet häufig der Histaminfreisetzungstest Anwendung, welcher sich jedoch bei Nahrungsmittelallergien oftmals als wenig zuverlässig erwiesen hat. Dies liegt darin begründet, dass bei Patienten mit Lebensmittelallergien spontan hohe Mengen Histamin freigesetzt werden, was die Interpretation des Tests größtenteils unmöglich macht (Moneret-Vautrin et al. 1999, de Weck & Sanz 2003).

Neben dem Testverfahren können falsch negative Ergebnisse bei Probanden mit Lebensmittelallergien auch auf unangemessene Extrakte zurückgeführt werden (Vieths et al. 1998). So sind die für das OAS gegen Äpfel verantwortlichen Allergene meist instabil und können durch Extraktionsverfahren leicht denaturiert werden (Rudeschko et al. 1995). Üblicherweise wird die Proteinextraktion in Phosphatpuffer durchgeführt, welcher verschiedene Additive wie EDTA enthält (Björksrén et al. 1980). EDTA dient zur Hemmung der Reaktion zwischen Proteinen und Phenolen durch die Verringerung der PPO-Aktivität (Loomis 1974). Daneben



ist jedoch auch bekannt, dass EDTA die Pektinextraktion stimuliert, was sich wiederum negativ auf die Proteinextraktion auswirken kann (Renard & Thibault 1993). Pflanzenextrakte sind zudem für ihren relativ hohen Gehalt an Glykoproteinen einschließlich Lektinen bekannt, welche IgE über die Kohlenhydratseitenketten am Fc-Fragment von IgE binden (Shihasaki et al. 1992). Darüber hinaus stellen die Auswahl des Ausgangsmaterials sowie technologische Behandlungen des Lebensmittels vor der Extraktion wichtige Faktoren dar, welche die Eignung von Extrakten beeinflussen. Infolgedessen zeigen die meisten handelsüblichen Extrakte eine sehr geringe Empfindlichkeit und sind für den Nachweis empfindlicher Patienten weniger zuverlässig im Vergleich zu frischem Obst (Asero et al. 1999, Ortolani et al. 1989). Aufgrund dessen müssen Einflussfaktoren unter Berücksichtigung der jeweiligen untersuchten Nahrungsmittelallergie sorgfältig angepasst werden.

Auch die Sensibilisierung gegen kreuzreaktive Allergene kann zu klinisch unbedeutenden Hauttests und *in-vitro*-Tests führen. So wurde bestätigt, dass die Kreuzreaktivität einen erheblichen Einfluss auf die Spezifität von Allergietests hat, insbesondere auf die Quantifizierung von spezifischem IgE (Ortolani et al. 1998, Sicherer 2001). Um reproduzierbare Ergebnisse bei der Diagnose einer Apfelallergie zu gewährleisten, ist eine Standardisierung von Allergenextrakten erforderlich (Rudeschko et al. 1995). Lebensmittelextrakte für diagnostische Zwecke sind weit davon entfernt, standardisiert oder sogar einheitlich wirksam zu sein. Um gute zuverlässige Ergebnisse zu erzielen, insbesondere für klinische Studien, wäre deshalb ein standardisierter Apfelextrakt notwendig. Ein Ansatz hierbei könnte die Herstellung und Verwendung von gefriergetrocknetem Apfelpulver sein, wie von Skamstrup Hansen et al. (2001) beschrieben.

Neben natürlichen Allergenquellen und den daraus hergestellten Extrakten werden auch rekombinant hergestellte Allergene für die *in-vitro*-Diagnostik eingesetzt. Für die rekombinante Herstellung von Einzelallergenen wird das Gen, welches für das bestimmte Allergen kodiert, aus seiner natürlichen Allergenquelle isoliert und meist in ein Bakterium (z. B. *Escherichia coli*) übertragen, so dass dieses das Allergen gezielt produzieren kann (Raulf-Heimsoth 2009, Renz et al. 2010). Ein großer Vorteil der rekombinanten Allergene ist ihre einfachere Isolierung sowie ihre gleichbleibende Qualität und damit ihre gute Quantifizier- und Standardisierbarkeit im Vergleich zu natürlichen Allergenextrakten, welche in ihrer Zusammensetzung Schwankungen unterliegen (Renz et al. 2010). Da viele Allergene komplex aufgebaut sind, können diese nicht immer rekombinant in gleicher Struktur wie die natürlichen Allergene hergestellt werden (Raulf-Heimsoth 2009). So fehlen, bei in Bakterien exprimierten Proteinen, posttranslationale Modifikationen wie z. B. Disulfidbrücken und Glykosylierungen, welche die Allergenität beeinflussen (Renz et al. 2010). Hinzu kommt, dass die Problematik der Isoallergene unberücksichtigt

bleibt. So unterscheiden sich einzelne Isoformen eines Allergens in ihrer IgE-Reaktivität und Immunogenität, wie es z. B. bei *Bet v 1* und *Mal d 1* gezeigt werden konnte (Botton et al. 2008, Gao et al. 2005 und 2008, Pühringer et al. 2003, Renz et al. 2010). Des Weiteren muss berücksichtigt werden, dass natürliche Allergene (z. B. aus frischem Obst) mit verschiedenen Komponenten eines Lebensmittels wechselwirken und somit in ihrer allergischen Wirkung beeinflusst werden. Aus den genannten Gründen kann auf den Einsatz von natürlichen Allergenextrakten und frischem Referenzmaterial nicht verzichtet werden.

Letztendlich sollte ein direkter Vergleich verschiedener diagnostischer Verfahren vorsichtig interpretiert werden, da die diagnostische Sensitivität vor allem von den verwendeten Materialien, der jeweiligen Testmethode bzw. dem Wirkmechanismus, aber auch erheblich von der individuellen Krankheitsprävalenz des Probanden (Hautempfindlichkeit, humorale Sensibilisierung und Reaktivität des Organs) abhängt (Osterballe et al. 2003). Angesichts der klinischen Bedeutung von *in-vitro*-Verfahren ist es umso problematischer, dass bis heute eine Standardisierung dieser Diagnostik fehlt und somit die Vergleichbarkeit von Resultaten zwischen einzelnen Testsystemen ein weitgehend ungelöstes Problem ist. Daher ist dringend erforderlich, dass herstellerübergreifend Referenzmaterialien entwickelt werden, welche verbindlich zur Standardisierung der Testsysteme eingesetzt werden können.

## 5 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit wurden der Polyphenolgehalt, das Polyphenolprofil sowie der Vitamin-C-Gehalt in alten und neuen Apfelsorten analysiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass neue Apfelsorten einen signifikant geringeren Gehalt an Polyphenolen und Vitamin C im Fruchtfleisch im Vergleich zu alten Sorten besitzen. Darüber hinaus weisen diese ein verändertes Profil an phenolischen Verbindungen, insbesondere an monomeren und oligomeren Flavanolen (v. a. (-)-Epicatechin und Procyanidinen), dem Dihydrochalkon Phloridzin sowie an Phenolsäuren (v. a. Chlorogensäure und Kaffeesäure), auf. Da die genannten Inhaltsstoffe zur Bitterkeit und Adstringenz von Äpfeln beitragen und durch ihre Substratwirkung maßgeblich an der enzymatischen Bräunung beteiligt sind, wurden sie bewusst bei den neuen Apfelsorten durch das gezielte Einkreuzen von polyphenolarmen Apfelsorten wie z. B. Golden Delicious vermindert. Somit konnte gezeigt werden, dass die Reduktion des Polyphenolgehaltes sowie Veränderungen im Polyphenolprofil in neuen Apfelsorten Folgen der modernen Apfelmehr sind. In Anbetracht der Tatsache, dass der Genotyp einen entscheidenden Einfluss auf das Vorhandensein phenolischer Verbindungen im Apfel hat, führt das übermäßige Einkreuzen von ein und derselben Sorte letztendlich zu einer genetischen Verarmung von Apfelsorten, was sich auch auf die Vielfalt von phenolischen Verbindungen auswirkt (Bannier 2011). Um die Mannigfaltigkeit von Polyphenolen in Äpfeln zu erhalten, sollte daher in der Apfelmehr auf eine genetische Vielfalt geachtet werden.

Da Polyphenole und Vitamin C die wichtigsten hydrophilen Radikalfänger *in vivo* sind, gehen die in dieser Arbeit nachgewiesenen Veränderungen auch mit einer Abnahme der AOK neuer Apfelsorten einher. Anhand der erhobenen RAA-Werte konnte demonstriert werden, dass die im Apfel enthaltenen phenolischen Verbindungen unterschiedlich starke antioxidative Potenziale besitzen und daher auch in einem unterschiedlichen Maß zur AOK von Äpfeln beitragen. So wiesen beispielsweise die in den neuen Apfelsorten im Gehalt reduzierten Flavanole die höchsten RAA-Werte im Fruchtfleisch auf. Die Tatsache, dass alle berechneten AOK-Werte geringer ausfielen als die jeweils gemessenen AOK-Werte deutet auf unquantifizierte phenolische Verbindungen sowie mögliche Synergismen und/oder Antagonismen zwischen den Polyphenolen hin. Da die Analyse der AOK alter und neuer Apfelsorten sowie der AOA phenolischer Verbindungen unterschiedliche Ergebnisse innerhalb der drei genutzten Testsysteme zeigte, ist es notwendig mindestens zwei verschiedene Methoden zur Ermittlung der antioxidativen Wirkung unter Berücksichtigung der zu untersuchenden Matrix anzuwenden. Die erhobenen *in-vitro*-Ergebnisse geben Hinweise auf ein mögliches protektives Potenzial von Äpfeln und Polyphenolen, welche jedoch im Rahmen von humanen Interventionsstudien be-

stätigt werden müssen. Nur so können auch die Verfügbarkeit von phenolischen Verbindungen aus Äpfeln und deren Metabolismus *in vivo* berücksichtigt werden.

Bezugnehmend auf die festgestellten, signifikant höheren Polyphenol- und Vitamin-C-Gehalte und der daraus resultierenden stärkeren AOK im Fruchtfleisch alter Apfelsorten, wäre es wünschenswert, wenn die Nachfrage nach alten Sorten steigt. Dies erfordert jedoch die Aufklärung des Verbrauchers. Nur so haben alte Apfelsorten eine Chance zurück in den Handel.

Dass sich die Reduktion des Polyphenolgehaltes sowie Veränderungen hinsichtlich des Polyphenolprofils neuer Apfelsorten auch auf ihre *in-vitro*-Allergenität auswirken, konnte in dieser Arbeit anhand einer inversen Korrelation zwischen der Konzentration an Sulfidoleukotrienen sowie der CD63-Basophilenaktivierung und dem Gesamtpolyphenolgehalt sowie im Modellsystem demonstriert werden. Darauf basierend konnte ebenso gezeigt werden, dass höhere Polyphenolgehalte im Fruchtfleisch alter Sorten mit geringeren allergischen Reaktionen im Blut von Birkenpollen-assoziierten Apfelallergikern einhergehen. Somit konnte erstmalig die Hypothese bestätigt werden, dass der reduzierte Polyphenolgehalt neuer Apfelsorten für ihre erhöhte Allergenität verantwortlich ist.

Anhand von *in-vitro*-Experimenten, in welchen der Einfluss der enzymatischen Bräunung auf das allergische Potenzial von Äpfeln untersucht wurde, konnte die PPO-katalysierte Oxidation als ein potenzieller Wirkmechanismus für die antiallergische Wirkung von Polyphenolen identifiziert werden. Korrelationsanalysen zeigten außerdem, dass Chlorogensäure, Kaffeesäure und (-)-Epicatechin den stärksten Einfluss auf die *in-vitro*-Ergebnisse hatten, was insbesondere darauf zurückzuführen ist, dass diese phenolischen Verbindungen sehr gute Substrate für die PPO sind. Im *in-vitro*-Modellsystem konnte die antiallergische Wirkung der genannten Polyphenole im Zusammenhang mit der enzymatischen Bräunungsreaktion bestätigt werden. Auf Grundlage dieser Ergebnisse kann geschlossen werden, dass Apfelsorten mit einem hohen Gesamtpolyphenolgehalt sowie einer hohen PPO-Aktivität eine geringere Allergenität aufweisen und somit das Ausmaß allergischer Reaktionen nicht alleinig von der subjektiven Empfindlichkeit, sondern zum Großteil auch von der Apfelsorte abhängt.

Kritisch an dieser Arbeit ist anzumerken, dass die Pilotstudie mit lediglich vier verschiedenen Apfelsorten durchgeführt wurde und die erhobenen Ergebnisse auf eine geringe Probandenanzahl ( $n = 27$ ) zurückzuführen sind. Außerdem wurden zur Bestimmung des allergischen Potenzials sowie der antiallergischen Wirkung von Polyphenolen ausschließlich *in-vitro*-Test-Methoden verwendet. Diese *in-vitro*-Ergebnisse sind nur schwer auf den menschlichen Organismus *in vivo* übertragbar, da Einflussfaktoren, wie etwa die individuelle Krankheitsprävalenz eines Allergikers (Hautempfindlichkeit, humorale Sensibilisierung und Reaktivität des Organs) bzw. Vorgänge wie die Bioverfügbarkeit, die Resorption sowie der Metabolismus von Poly-

phenolen unberücksichtigt bleiben. Zudem existiert keine universelle, standardisierte Methode, welche das allergische Potenzial erfassen. Dies erschwert die Vergleichbarkeit, da die Ergebnisse stark von der jeweiligen Methode abhängen. Dennoch geben die gewonnenen *in-vitro*-Ergebnisse einen Anhaltspunkt bezüglich des allergischen Potenzials verschiedener Apfel-sorten und die antiallergische Wirkung phenolischer Verbindungen und ermöglichen eine Einordnung bzw. ein Ranking.

Um die Ergebnisse der Pilotstudie zu bekräftigen, sind weiterführende Studien mit größeren Probandenzahlen und Apfelsorten notwendig. Hierbei sollte auf die Methode der doppelblinden, placebokontrollierten Nahrungsmittelprovokation zurückgegriffen werden, da sich die Aussagekraft von SPT und spezifischem IgE im Serum bei Nahrungsmitteln oft als unzureichend erwiesen haben. Um den antiallergischen Wirkmechanismus von Polyphenolen im Zusammenhang mit der PPO-katalysierten Oxidation zu bestätigen, sind weiterführende Experimente notwendig. Einen Ansatz diesbezüglich bietet die Charakterisierung von *Mal d 1* unter Verwendung von z. B. Protein-Gelelektrophorese und Massenspektroskopie, mit denen Modifikationen von *Mal d 1* nach der PPO-katalysierten Oxidation erfasst werden können.

## 6 Zusammenfassung

Weltweit sind Allergien ein zunehmendes, gesundheitliches Problem und haben sich mittlerweile zu einer Volkskrankheit des 21. Jahrhunderts entwickelt. In den vergangenen Jahrzehnten ist die Birkenpollen-assoziierte Apfelallergie mit rund vier Millionen Betroffenen die wichtigste Obstallergie in Deutschland geworden. Die steigende Anzahl von Birkenpollen-assoziierten Apfelallergikern wird u. a. mit einem höheren Konsum von neuen Apfelsorten in Verbindung gebracht. So wird vermutet, dass infolge der Züchtung neuer Apfelsorten mit reduziertem Polyphenolgehalt eine erhöhte Allergenität verursacht wird. Die derzeitige Züchtung von neuen Apfelsorten verfolgt Ziele der Wirtschaftlichkeit und der besseren Anpassung an die Ansprüche des Verbrauchers, wie z. B. die Verminderung eines säuerlichen Geschmacks oder der enzymatisch auftretenden Bräunung. Immer mehr vereinzelte Apfelsorten, die eine große wirtschaftliche Bedeutung besitzen, werden daher verbessert und zur weiteren Zucht neuer Apfelsorten eingesetzt. Dadurch geraten jedoch alte Sorten in Vergessenheit und werden kaum für den wirtschaftlichen Anbau genutzt, auch wenn diese einen ähnlichen oder besseren Ertrag besitzen oder sogar resistenter sind als neue Sorten.

Aufgrund der o. g. Faktoren bzw. der hohen Inzidenz für Allergien steht die Identifizierung von Lebensmittelinhaltsstoffen mit einem antiallergischem Potential im Fokus des wissenschaftlichen Interesses. Anhand der Erfahrungsberichte von Apfelallergikern (BUND Lemgo) hängt das Ausmaß allergischer Reaktionen nicht nur von der subjektiven Empfindlichkeit ab, sondern auch zum Großteil von der jeweiligen Apfelsorte. So weisen alte Apfelsorten wie Alkmene, Goldparmäne und Roter Boskoop eine gute Verträglichkeit im Vergleich zu neuen Sorten wie z. B. Braeburn, Golden Delicious und Granny Smith auf. Somit liegt die Hypothese nahe, dass der reduzierte Polyphenolgehalt neuer Apfelsorten für ihre erhöhte Allergenität verantwortlich ist. Allerdings wurde diese Hypothese bisher noch nicht ausreichend wissenschaftlich belegt.

Die Dissertation hatte daher folgende Zielstellungen:

- Vergleichende Untersuchungen des Polyphenolgehaltes von ausgewählten alten und neuen Apfelsorten sowie Charakterisierung des Polyphenolprofils von Fruchtfleisch und Schale hinsichtlich zuchtbedingter Veränderungen und deren Folgen auf die antioxidative Kapazität (AOK)
- Ermittlung der relativen antioxidativen Aktivität (RAA) von quantifizierten Polyphenolen und deren relativer Beitrag an der AOK alter und neuer Apfelsorten sowie Beurteilung von Struktur-Wirkungsbeziehungen phenolischer Verbindungen in Abhängigkeit vom Testsystem

- Untersuchungen zum Einfluss phenolischer Verbindungen bezüglich der *in-vitro*-Allergenität alter und neuer Apfelsorten anhand der Durchführung einer Pilotstudie („Untersuchung des allergischen Potenzials alter und neuer Apfelsorten bei Birkenpollenallergikern“)
- Anwendung eines *in-vitro*-Modellsystems zur Untersuchung des Einflusses der Polyphenoloxidase (PPO)-katalysierten Oxidation phenolischer Verbindungen (Chlorogensäure, Kaffeesäure, (-)-Epicatechin) auf die Allergenität von *rMal d 1*.

In dieser Arbeit konnten 20 phenolische Verbindungen in den untersuchten Apfelsorten mit Hilfe einer optimierten HPLC-Methode identifiziert und quantifiziert werden. Die separate Analyse des Polyphenolgehaltes von Schale und Fruchtfleisch zeigte, dass neue Apfelsorten einen signifikant geringeren Polyphenolgehalt im Fruchtfleisch aufwiesen im Vergleich zu alten Apfelsorten. Neue Sorten zeigten ein verändertes Profil an phenolischen Verbindungen, insbesondere an monomeren und oligomeren Flavanolen (v. a. (-)-Epicatechin und Procyanidinen), dem Dihydrochalkon Phloridzin sowie an Phenolsäuren (v. a. Chlorogensäure und Kaffeesäure). Auch die AOK im Fruchtfleisch der untersuchten neuen Apfelsorten war signifikant geringer gegenüber den alten Apfelsorten. In der Apfelschale dagegen konnten keine signifikanten Unterschiede im Polyphenolgehalt sowie in der AOK zwischen alten und neuen Sorten gefunden werden.

Anhand der erhobenen RAA-Werte konnte belegt werden, dass die im Apfel enthaltenen phenolischen Verbindungen unterschiedlich starke antioxidative Potenziale besitzen und daher auch in einem unterschiedlichen Maß zur AOK von Äpfeln beitragen. Flavanole und Flavonole wiesen dabei die höchsten RAA-Werte auf. Der berechnete relative Beitrag der einzelnen phenolischen Verbindungen zeigte, dass Flavonole (Schale) sowie Flavanole und Vitamin C (Fruchtfleisch) in allen untersuchten Sorten den Hauptbeitrag zur AOK leisten. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das antioxidative Potenzial von Polyphenolen maßgeblich von der chemischen Struktur abhängt. So konnte ein Zusammenhang zwischen der steigenden Anzahl an Hydroxylgruppen am aromatischen Ring und der Stärke des antioxidativen Potenzials bei den Flavonoiden festgestellt werden. Auch der positive Einfluss der 4-Oxogruppierung in Verbindung mit der 2,3-Doppelbindung am C-Ring sowie eine erhöhte Delokalisierung und Konjugation von  $\pi$ -Elektronen konnten als strukturelle Eigenschaften, die zu einer starken antioxidativen Wirkung führen, bestätigt werden.

Im Rahmen der Pilotstudie konnte erstmalig gezeigt werden, dass alte Apfelsorten zu einer geringeren Freisetzung von Sulfidoleukotrienen und CD63-Basophilenaktivierung im Blut von Birkenpollen-assoziierten Apfelallergikern führten und die *in-vitro*-Allergenität mit steigendem Grad an enzymatischer Bräunung abnahm. Dabei konnte ein signifikanter inverser Zusam-

menhang zwischen den erhobenen *in-vitro*-Ergebnissen und dem Polyphenolgehalt der getesteten Apfelsorten festgestellt werden, wobei vor allem der Gehalt an Chlorogen- und Kaffeesäure den stärksten Einfluss auf die *in-vitro*-Allergenität von Äpfeln hatte.

Anhand von *in-vitro*-Experimenten, in welchen der Einfluss der PPO-katalysierten Oxidation von phenolischen Verbindungen auf das allergische Potenzial von Äpfeln untersucht wurde, konnte der Zusammenhang zwischen der Abnahme des Gesamtpolyphenolgehaltes und der Abnahme der *in-vitro*-Allergenität (Abnahme der Sulfidoleukotrien-Konzentration, der CD63-Basophilenaktivierung und des *Mal d 1*-Gehaltes) bestätigt werden. Dabei wiesen alte Apfelsorten eine signifikant stärkere Abnahme des Polyphenolgehaltes nach 60-minütiger enzymatischer Bräunung im Vergleich zu den neuen Apfelsorten auf, was wiederum mit einer stärkeren Abnahme der *in-vitro*-Allergenität einherging. Korrelationsanalysen zeigten zudem, dass Chlorogensäure, Kaffeesäure und (-)-Epicatechin den stärksten Einfluss auf die *in-vitro*-Ergebnisse hatten. Im *in-vitro*-Modellsystem konnte eine signifikante Abnahme der Allergenität sowie der IgE-Bindungskapazität von *rMal d 1* durch die PPO erzielt werden, welche durch die Zugabe von Chlorogensäure oder Kaffeesäure noch verstärkt wurde. Der positive Einfluss der PPO-katalysierten Oxidation von Polyphenolen konnte somit erneut bestätigt werden.

Zusammenfassend kann mit der vorliegenden Arbeit belegt werden, dass die Züchtung neuer Apfelsorten sowohl mit einer Reduktion im Polyphenolgehalt wie auch mit Veränderungen im Polyphenolprofil im Fruchtfleisch einhergehen und dadurch bedingt zu einer Abnahme der AOK dieser Sorten führen. Außerdem konnte erstmalig der Nachweis erbracht werden, dass der geringere Polyphenolgehalt im Fruchtfleisch neuer Apfelsorten für ihre höhere *in-vitro*-Allergenität verantwortlich ist. Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß allergischer Reaktionen nicht nur von der subjektiven Empfindlichkeit, sondern zum Großteil auch von der jeweiligen Apfelsorte abhängt (Polyphenolgehalt und -profil sowie PPO-Aktivität). Anhand der erhobenen Daten kann zusammenfassend festgestellt werden, dass der Verzehr von aufgeschnittenen und gebräunten Äpfeln Birkenpollen-assoziierten Apfelallergikern sehr zu empfehlen ist. Insbesondere die Sorten Ontario und Dölmener Rosenapfel zeigen sich als geeignet, da diese sich durch einen hohen Anteil an phenolischen Verbindungen und eine hohe PPO-Aktivität auszeichnen. Für die Bestätigung sämtlicher hier gewonnener Ergebnisse sind gezielte, weiterführende Studien mit höheren Probandenanzahlen und zusätzlichen Verfahren/Methoden notwendig.



## 7 Summary

Allergies are an increasing health problem worldwide and have evolved into a common disease of the 21st century. Over the past decades, birch pollen-associated apple allergy has become the most common fruit allergy in Germany with about four million individuals showing clinical reactions to apples. The increasing number of birch pollen-associated apple allergy sufferers is associated with higher consumption of new apple cultivars. It is asserted that breeding of new apple cultivars with a lower content of polyphenols is responsible for their increased allergenicity. Economically the main purpose of the breeding of new apple cultivars is the adaption to consumer requirements, such as reduction of acid taste or enzymatic browning. Therefore, more and more single apple cultivars that are of great economic importance are being improved and used for the further cultivation of new apple cultivars. As a result, older cultivars are often forgotten and rarely used for economic cultivation, even if they have a similar or better yield or are more resistant than the economically used cultivars.

Due to the high incidence of allergies, the identification of food ingredients with an antiallergic potential is in the focus of scientific interest. Based on reports of affected apple allergy sufferers (BUND Lemgo), the extent of allergic reactions not only depends on the subjective sensitivity, but also largely on the apple cultivar. Old apple cultivars such as Alkmene, Goldparmäne and Roter Boskoop are well tolerated compared to new ones such as Braeburn, Golden Delicious and Granny Smith. Therefore, it is suggested that the reduced content of polyphenols of new apple cultivars is responsible for their increased allergenicity. However, this hypothesis has not yet been scientifically proven.

Therefore, the dissertation had the following objectives:

- Comparative investigation of the polyphenolic content of selected old and new apple cultivars as well as characterisation of the polyphenolic profile of flesh and peel with regard to breeding-related changes and their consequences on the antioxidant capacity (AOC)
- Determination of the relative antioxidant activity (RAA) of quantified polyphenols and their relative contribution to the AOC of the old and new apple cultivars tested as well as assessment of structure-activity relationships of phenolic compounds depending on the test system
- Investigation on the influence of phenolic compounds with regard to the *in vitro* allergenicity of old and new apple cultivars by performance of a pilot study (Examination of the allergic potential of old and new apple cultivars in birch pollen allergy sufferers)

- Use of an *in vitro* model to investigate the influence of the polyphenol oxidase (PPO)-catalysed oxidation of phenolic compounds (chlorogenic acid, caffeic acid, (-)-epicatechin) on the allergenicity of r*Mal d 1*.

In total, 20 phenolic compounds were identified and quantified in the apple cultivars tested using an optimised HPLC method. The separate analysis of peel and flesh showed that new apple cultivars had a significantly lower polyphenol content in the flesh compared to old ones. The polyphenolic profile of the flesh of new apple cultivars was characterised by a lower content of monomeric and oligomeric flavanols (especially of (-)-epicatechin and procyanidins), of the dihydrochalcone phloridzin and of phenolic acids (especially of chlorogenic acid and caffeic acid). The AOC of the flesh of the new apple cultivars was also significantly lower than that of old ones. In contrast to the flesh, the content of polyphenols and the AOC of the apple peel did not differ between old and new cultivars.

On the basis of the RAA values, it was demonstrated that the phenolic compounds differ in their antioxidant activity and therefore also contribute to a different extent to the AOC of apples. Flavanols and flavonols had the highest RAA values. The calculated relative contribution of the individual phenolic compounds showed that flavonols (peel) as well as flavanols and vitamin C (flesh) contributed mainly to the AOC in all cultivars tested. Furthermore, it was confirmed that the antioxidant activity of polyphenols largely depends on the chemical structure. A relationship between the increasing number of hydroxyl groups on the aromatic ring and the strength of the antioxidant activity of the flavonoids was found. The positive influence of the 4-oxo group in connection with the 2,3-double bond on the C-ring as well as an increased delocalization and conjugation of  $\pi$ -electrons was confirmed as structural properties that lead to a strong antioxidant effect.

The pilot study demonstrated for the first time that old apple cultivars resulted in a lower release of sulfidoleukotrienes and CD63 basophil activation than new ones and the *in vitro* allergenicity decreased with increasing levels of enzymatic browning. A significant inverse correlation was found between the *in vitro* results and the content of total polyphenols of the apple cultivars tested. Looking at single polyphenols, the content of chlorogenic acid and caffeic acid had the strongest impact on the *in vitro* allergenicity of apples.

*In vitro* experiments showed that the allergenicity can be effectively reduced by the PPO-catalysed oxidation through polyphenols. A relationship between the decrease in total polyphenols and the decrease of the *in vitro* allergenicity (decrease in sulfidoleukotriene concentration, CD63 basophil activation and the *Mal d 1* content) was confirmed. Old apple cultivars showed a significantly stronger decrease in the content of polyphenols after 60 minutes of enzymatic browning compared to new ones, which was accompanied by a stronger

decrease in the *in vitro* allergenicity. Correlation analyses demonstrated that chlorogenic acid, caffeic acid and (-)-epicatechin had the strongest impact on the *in vitro* results. In the *in vitro* model, a significant decrease in the allergenicity and the IgE binding capacity of rMal d 1 could be achieved by the PPO, which was increased by the addition of chlorogenic acid or caffeic acid. Thus, the positive influence of PPO-catalysed oxidation of polyphenols was confirmed.

In summary, the present investigation demonstrated that the breeding of new apple cultivars is accompanied by a reduction in the content of polyphenols as well as changes in the polyphenolic profile in the flesh and thus lead to a decrease in the AOC of these cultivars. It was also possible to prove for the first time that the lower polyphenol content in the flesh of new apple cultivars is responsible for their higher *in vitro* allergenicity. This work showed that the extent of allergic reactions depends not only on the subjective sensitivity, but also largely on the apple cultivar (polyphenol content and profile as well as PPO activity). On the basis of the results of this work, it can be concluded that birch pollen-associated apple allergy sufferers are recommended to eat sliced and browned apples. In particular, old apple cultivars such as Ontario and Dölmener Rosenapfel, which are characterised by a high content of phenolic compounds and a high PPO activity, should be preferred. However, targeted, further studies are necessary to confirm these experimental results.

## Literaturverzeichnis

1. Abad-García, B., Berrueta, L.A., López-Márquez, D.M., Crespo-Ferrer, I., Gallo, B. & Vicente, F. (2007). Optimization and validation of a methodology based on solvent extraction and liquid chromatography for the simultaneous determination of several polyphenolic families in fruit juices. *Journal of Chromatography A*, 1154, 87-96.
2. Ackermann, D. (2012). Dissertation: Vergleichende Untersuchungen von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen: Zelluläre Effekte von Hydroxyzimtsäuren, Flavonoiden und Isothiocyanaten. *Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf*.
3. Adam, I.K., Adam, A.A. & Bello, B.A. (2016). Effect of polyphenol oxidase on browning of apple and garden egg. *Dutse Journal of Pure and Applied Sciences*, 2(2), 177-184.
4. Ahammer, L., Grutsch, S., Kamenik, A.S., Liedl, K.R. & Tollinger, M. (2017). Structure of the major apple allergen Mal d 1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(8), 1606-1612.
5. Aherne, S.A. & O'Brien, N.M. (2002). Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, 18(1), 75-81.
6. Ahmed, I., Lv, L., Lin, H., Li, Z., Ma, J., Guanzhi, C., Sun, L. & Xu, L. (2018). Effect of tyrosinase-aided crosslinking on the IgE binding potential and conformational structure of shrimp (*Metapenaeus ensis*) tropomyosin. *Food Chemistry*, 248, 287-295.
7. Al-Duais, M., Müller, L., Böhm, V. & Jetschke, G. (2009). Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: Use of different assays. *European Food Research and Technology*, 228, 813-821.
8. Amin, K. (2012). The role of mast cells in allergic inflammation. *Respiratory Medicine*, 106(1), 9-14.
9. Amiot, M.J., Tacchini, M., Aubert, S. & Nicolas, J. (1992). Phenolic composition and browning susceptibility of various apple cultivars at maturity. *Journal of Food Science*, 57(4), 958-962.
10. Amorati, R., Pedulli, G.F., Cabrini, L., Zambonin, L. & Landi, L. (2006). Solvent and pH effects on the antioxidant activity of caffeic and other phenolic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(8), 2932-2937.
11. Andersen, M.B., Hall, S. & Dragsted, L.O. (2011). Identification of european allergy patterns to the allergen families PR-10, LTP, and profilin from *Rosaceae* fruits. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 41(1), 4-19.
12. Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K., Özyürek, M. & Güçlü, K. (2013). Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure & Applied Chemistry*, 85(5), 957-998.

13. Asero, R., Marzban, G., Martinelli, A., Zaccarini, M. & Machado, M.L. (2006). Search for low-allergenic apple cultivars for birch-pollen-allergic patients: is there a correlation between in vitro assays and patient response?. *European Annals of Allergy and Clinical Immunology*, 38(3), 94-98.
14. Asero, R., Mistrello, G., Roncarolo, D., Antoniotti, P., Cislighi, C. & Falagiani, P. (1999). A new apple extract. *Allergy*, 54(1), 87-88.
15. Baba, Y., Nishida, K., Fujii, Y., Hirano, T., Hikida, M. & Kurosaki, T. (2008). Essential function for the calcium sensor STIM1 in mast cell activation and anaphylactic responses. *Nature Immunology*, 9(1), 81-88.
16. Ballmer-Weber, B.K. (2015). Food allergy in adolescence and adulthood. *Chemical Immunology and Allergy*, 101, 51-58.
17. Bannier, H.J. (2011). Moderne Apfelzüchtung – Genetische Verarmung und Tendenzen zur Inzucht. *Erwerbs-Obstbau*, 52(3), 85-110.
18. Barnes, P.J. (2011). Pathophysiology of allergic inflammation. *Immunological Reviews*, 242(1), 31-50.
19. Barroso, M., Tucker, H., Drake, L., Nichol, K. & Drake, J.R. (2015). Antigen-B cell receptor complexes associate with intracellular major histocompatibility complex (MHC) class II molecules. *Journal of Biological Chemistry*, 290(45), 27101-27112.
20. Bendary, E., Francis, R.R., Ali, H.M.G., Sarwat, M.I. & El Hady, S. (2013). Antioxidant and structure-activity relationships (SARs) of some phenolic and anilines compounds. *Annals of Agricultural Sciences*, 58(2), 173-181.
21. Billaud, C., Roux, E., Brun-Mérimee, S., Maraschin, C. & Nicolas, J. (2003). Inhibitory effect of unheated and heated d-glucose, d-fructose and l-cysteine solutions and Maillard reaction product model systems on polyphenoloxidase from apple. I. Enzymatic browning and enzyme activity inhibition using spectrophotometric and polarographic methods. *Food Chemistry*, 81(1), 35-50.
22. Bitsch, R., Netzel, M., Frank, T., Strass, G. & Bitsch, I. (2004). Bioavailability and biokinetics of anthocyanins from red grape juice and red wine. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 5, 293-298.
23. Bittner, S. (2006). When quinones meet amino acids: chemical, physical and biological consequences. *Amino Acids*, 30(3), 205-224.
24. Björkstén, F., Halmepuro, L., Hannuksela, M. & Lathi, M. (1980). Extraction and properties of apple allergens. *Allergy*, 35, 671-677.
25. Bohle, B. (2007). The impact of pollen-related food allergens on pollen allergy. *Allergy*, 62(1), 3-10.

26. Bohle, B., Zwölfer, B., Heratizadeh, A., Jahn-Schmid, B., Antonia, Y.D., Alter, M., Keller, W., Zuidmeer, L., van Ree, R., Werfel, T. & Ebner, C. (2006). Cooking birch pollen-related food: divergent consequences for IgE- and T cell-mediated reactivity in vitro and in vivo. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 118(1), 242-249.
27. Böhm, H., Boeing, H., Hempel, J., Raab, B. & Kroke, A. (1998). Flavonole, Flavone und Anthocyane als natürliche Antioxidantien der Nahrung und ihre mögliche Rolle bei der Prävention chronischer Erkrankungen. *European Journal of Nutrition*, 37(2), 147-163.
28. Bolhaar, S.T., van de Weg, W.E., van Ree, R., Gonzalez-Mancebo, E., Zuidmeer, L., Bruijnzeel-Koomen, C.A., Fernandez-Rivas, M., Jansen, J., Hoffmann-Sommergruber, K., Knulst, A.C. & Gilissen, L.J. (2005). In vivo assessment with prick-to-prick testing and double-blind, placebo-controlled food challenge of allergenicity of apple cultivars. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 116(5), 1080-1086.
29. Borges, J.P., Jauneau, A., Brule, C., Culerrier, R., Barre, A., Didier, A. & Rouge, P. (2006). The lipid transfer proteins (LTP) essentially concentrate in the skin of Rosaceae fruits as cell surface exposed allergens. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44(10), 535-542.
30. Bors, W. & Michel, C. (2002). Chemistry of the antioxidant effect of polyphenols. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 957, 57-69.
31. Botton, A., Lezzer, P., Dorigoni, A., Barcaccia, G., Ruperti, B. & Ramina, A. (2008). Genetic and environmental factors affecting allergen-related gene expression in apple fruit (*Malus domestica* L. Borkh). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), 6707-6716.
32. Bowler, R.P. & Crapo, J.D. (2002). Oxidative stress in allergic respiratory diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 110(3), 349-356.
33. Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317-333.
34. Bufe, A. (2001). Significance of IgE-binding epitopes in allergic disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 107, 219-221.
35. BUND Lemgo. Available online: [http://www.bund\\_lemgo.de/download/2017\\_10\\_Apfelallergie\\_Sortenliste\\_allgemein\\_int.pdf](http://www.bund_lemgo.de/download/2017_10_Apfelallergie_Sortenliste_allgemein_int.pdf). (Accessed on 28.03.2018).
36. Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft. (2013). Pressemitteilung Nr. 232, Available online: <http://www.bmel.de/SharedDocs/Pressemitteilungen/2013/232-Zahl-der-Woche-Obstverbrauch.html?nn=312878>. (Accessed on 25.04.17).
37. Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft. (2018). Statistisches Jahrbuch über Ernährung, Landwirtschaft und Forsten der Bundesrepublik Deutschland 2017. *Referat Ökonomische Analysen W, Statistik, editor*.

38. Burda, S., Oleszek, W. & Lee, C.Y. (1990). Phenolic compounds and their changes in apples during maturation and cold storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 945-948.
39. Burgdorf, S. & Kurts, C. (2008). Endocytosis mechanisms and the cell biology of antigen presentation. *Current Opinion in Immunology*, 20(1), 89-95.
40. Carbonaro, M. & Mattera, M. (2001). Polyphenoloxidase activity and polyphenol levels in organically and conventionally grown peach (*Prunus persica* L., cv. Regina bianca) and pear (*Pyrus communis* L., cv. Williams). *Food Chemistry*, 72(4), 419-424.
41. Cardona, F., Andrés-Lacueva, C., Tulipani, S., Tinahones, F.J. & Queipo-Ortuño, M.I. (2013). Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(8), 1415-1422.
42. Carnés, J., Ferrer, A. & Fernández-Caldas, E. (2006). Allergenicity of 10 different apple varieties. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 96(4), 564-570.
43. Carocho, M. & Ferreira, I. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15-25.
44. Carter, N. (2012). Petition for Determination of Nonregulated Status: Arctic Apple (*Malus x domestica*) Events GD743 and GS784.
45. Chen, L., Lee, M.J., Li, H. & Yang, C.S. (1997). Absorption, distribution, elimination of tea polyphenols in rats. *Drug Metabolism and Disposition*, 25(9), 1045-1050.
46. Chinnici, F., Bendini, A., Gaiani, A. & Riponi, C. (2004). Radical scavenging activities of pees and pulps from cv. Golden Delicious apples as related to their phenolic composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4684-4689.
47. Chirumbolo, S. (2014). Dietary assumption of plant polyphenols and prevention of allergy. *Current Pharmaceutical Design*, 20(6), 811-839.
48. Choudhari, S., Chaudhary, M., Gadbail, A., Sharma, A. & Tekade, S. (2014). Oxidative and antioxidative Mechanisms in oral cancer and precancer: A review. *Oral Oncology*, 50(1), 10-18.
49. Chung, S.Y. & Champagne, E.T. (2009). Reducing the allergenic capacity of peanut extracts and liquid peanut butter by phenolic compounds. *Food Chemistry*, 115(4), 1345-1349.
50. Chung, S.Y., Kato, Y. & Champagne, E.T. (2005). Polyphenol oxidase/caffeic acid may reduce the allergenic properties of peanut allergens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(15), 2631-2637.

51. Ciesa, F. (2014). Health and nutrition - Alte und neue Apfelsorten im Dienste der Gesundheit (APFEL-FIT). *Laimburg Report*, 2(1), 12-13.
52. Ciprandi, G., Fenoglio, G., Kalli, F., De Amici, M., Leonardi, S., Miraglia Del Giudice, M., Salpietro, C., La Rosa, M., Caimmi, S. & Marseglia, G.L. (2012). Patients with oral allergic syndrome to apple have intense proliferative response to Bet v 1. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 26(1), S113-S117.
53. Cortell, J.M. & Kennedy, J.A. (2006). Effect of shading on accumulation of flavonoid compounds in (*Vitis vinifera* L.) pinot noir fruit and extraction in a model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(22), 8510-8520.
54. Coseteng, M. & Lee, C. (1987). Changes in apple polyphenoloxidase and polyphenol concentrations in relation to degree of browning. *Journal of Food Science*, 52(4), 985-989.
55. D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C. & Masella, R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 43(4), 348-361.
56. Daumann, H. (2009). Dissertation: Einfluss von Apfelsaftkonsum auf Diabetes-assoziierte Risikofaktoren für Dickdarmkrebs und das Polyphenolprofil bei gesunden Probanden. *Technische Universität München, München*.
57. Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C. & Bartolomé, B. (2004). Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-Fluorescein) assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(1), 48-54.
58. Day, A.J., Cañada, F.J., Díaz, J.C., Kroon, P.A., Mclauchlan, R., Faulds, C.B., Plumb, G.W., Morgan, M.R. & Williamson, G. (2000). Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Letters*, 468(2-3), 166-170.
59. Day, A.J., DuPont, M.S., Ridley, S., Rhodes, M., Rhodes, M.J., Morgan, M.R. & Williamson, G. (1998). Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FEBS Letters*, 436(1), 71-75.
60. de Groot, H., de Jong, N.W., Vuijk, M.H. & Gerth von Wijk, R. (1996). Birch pollinosis and atopy caused by apple, peach, and hazelnut; comparison of three extraction procedures with two apple strains. *Allergy*, 51, 712-718.
61. de Weck, A.L. & Sanz, M.L. (2003). Cellular allergen stimulation test (CAST), a review. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 14(4), 253-273.
62. Dreborg, S. & Foucard, T. (1983). Allergy to apple, carrot and potato in children with birch pollen allergy. *Allergy*, 38(3), 167-172.



63. Drogoudi, P.D., Michailidis, Z. & Pantelidis, G. (2008). Peel and flesh antioxidant content and harvest quality characteristics of seven apple cultivars. *Scientia Horticulturae*, 115, 149-153.
64. Du, Y., Guo, H. & Lou, H. (2007). Grape seed polyphenols protect cardiac cells from apoptosis via induction of endogenous antioxidant enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(5), 1695-1701.
65. Duda-Chodak, A., Tarko, T., Satora, P., Sroka, P. & Tuszyński, T. (2010). The profile of polyphenols and antioxidant properties of selected apple cultivars grown in Poland. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 18(2), 39-50.
66. Ebo, D.G., Hagendorens, M.M., Bridts, C.H., Schuerwegh, A.J., De Clerck, L.S. & Stevens, W.J. (2005). Flow cytometric analysis of in vitro activated basophils, specific IgE and skin tests in the diagnosis of pollen-associated food allergy. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 64(1), 28-33.
67. Enomoto, T., Nagasako-Akazome, Y., Kanda, T., Ikeda, M. & Dake, Y. (2006). Clinical effects of apple polyphenols on persistent allergic rhinitis: A randomized double-blind placebo-controlled parallel arm study. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 16(5), 283-289.
68. Escarpa, A. & González, M.C. (1998). High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties. *Journal of Chromatography A*, 823, 331-337.
69. Fernández-Rivas, M. & Cuevas, M. (1999). Peels of Rosaceae fruits have a higher allergenicity than pulps. *Clinical and Experimental Allergy*, 29(9), 1239-1247.
70. Fernández-Rivas, M., Bolhaar, S., González-Mancebo, E., Asero, R., van Leeuwen, A., Bohle, B., Ma, Y., Ebner, C., Rigby, N., Sancho, A.I., Miles, S., Zuidmeer, L., Knulst, A., Breiteneder, H., Mills, C., Hoffmann-Sommergruber, K. & van Ree, R. (2006). Apple allergy across Europe: how allergen sensitization profiles determine the clinical expression of allergies to plant foods. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 118(2), 481-488.
71. Fernández-Rivas, M., González-Mancebo, E., Rodríguez-Pérez, R., Benito, C., Sánchez-Monge, R., Salcedo, G., Alonso, M.D., Rosado, A., Tejedor, M.A., Vila, C. & Casas, M.L. (2003). Clinically relevant peach allergy is related to peach lipid transfer protein, Pru p 3, in the Spanish population. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 112(4), 789-795.
72. Fernández-Rivas, M., van Ree, R. & Cuevas, M. (1997). Allergy to Rosaceae fruits without related pollinosis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 100(6), 728-733.
73. Ferreira, F., Hebenstreit, D., Kramer, B., Himly, M., Breiteneder, H., Scheiner, O., Britza, P., Ebner, C. & Breitenbach, M. (2000). Amino acid positions involved in the formation of IgE-binding epitopes of Api g 1 and Mal d 1 allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 105, S137.

74. Fewtrell, C.M. & Gomperts, B.D. (1977). Quercetin: a novel inhibitor of Ca<sup>2+</sup> influx and exocytosis in rat peritoneal mast cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 469(1), 52-60.
75. Fischer, M. & Fischer, C. (2004). Genetic resources as basis for new resistant apple cultivars. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 12, 63-76.
76. Frisch, H. & Grisebach, H. (1975). Biosynthesis of cyanidin in cell cultures of *Haplopappus gracilis*. *Phytochemistry*, 14(11), 2437-2442.
77. Gao, Z.S., van de Weg, W.E., Matos, C.I., Arens, P., Bolhaar, S.T.H.P., Knulst, A.C., Li, Y., Hoffmann-Sommergruber, K. & Gilissen, L.J.W.J. (2008). Assessment of allelic diversity in intron-containing Mal d 1 genes and their association to apple allergenicity. *BMC Plant Biology*, 8, 116.
78. Gao, Z.S., van de Weg, W.E., Schaart, J.G., Schouten, H.J., Tran, D.H., Kodde, L.P., van der Meer, I.M., van der Geest, A.H., Kodde, J., Breiteneder, H., Hoffmann-Sommergruber, K., Bosch, D. & Gilissen, L.J. (2005). Genomic cloning and linkage mapping of the Mal d 1 (PR-10) gene family in apple (*Malus domestica*). *Theoretical and Applied Genetics*, 111(1), 171-183.
79. Garcia, A., Wichers, J.H. & Wichers, H.J. (2007). Decrease of the IgE-binding by Mal d 1, the major apple allergen, by means of polyphenol oxidase and peroxidase treatments. *Food Chemistry*, 103(1), 94-100.
80. Gasparetti, C. (2012). Dissertation: Biochemical and structural characterisation of the copper containing oxidoreductases catechol oxidase, tyrosinase, and laccase from ascomycete fungi. *Aalto University School of Chemical Technology, Espoo*.
81. Gee, J.M., DuPont, M.S., Day, A.J., Plumb, G.W., Williamson, G. & Johnson, I.T. (2000). Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. *Journal of Nutrition*, 30(11), 2765-2771.
82. Gee, J.M., DuPont, M.S., Rhodes, M.J. & Johnson, I.T. (1998). Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. *Free Radical Biology and Medicine*, 25(1), 19-25.
83. Geroldinger-Simic, M., Zelniker, T., Aberer, W., Ebner, C., Egger, C., Greiderer, A., Prem, N., Lidholm, J., Ballmer-Weber, B.K., Vieths, S. & Bohle, B. (2011). Birch pollen-related food allergy: clinical aspects and the role of allergen-specific IgE and IgG4 antibodies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(3), 616-622.
84. Giomaro, G., Karioti, A., Bilia, A.R., Bucchini, A., Giamperi, L., Ricci, D. & Fraternali, D. (2014). Polyphenols profile and antioxidant activity of skin and pulp of a rare apple from Marche region (Italy). *Chemistry Central Journal*, 8, 45.
85. Gong, J. & Chen, S.S. (2003). Polyphenolic antioxidants inhibit peptide presentation by antigen-presenting cells. *International Immunopharmacology*, 3(13-14), 1841-1852.

86. Goupy, P., Amiot, M. J., Richard-Forget, F., Duprat, F., Aubert, S. & Nicolas, J. (1995). Enzymatic browning of model solutions and apple phenolic extracts by apple polyphenoloxidase. *Journal of Food Science*, 60(3), 497-501.
87. Graff, J.C. & Jutila, M.A. (2007). Differential regulation of CD11b on gammadelta T cells and monocytes in response to unripe apple polyphenols. *Journal of Leukocyte Biology*, 82, 603-607.
88. Gruber, P., Vieths, S., Wangorsch, A., Nerkamp, J. & Hofmann, T. (2004). Maillard reaction and enzymatic browning affect the allergenicity of Pru av 1, the major allergen from cherry (*Prunus avium*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12), 4002-4007.
89. Guo, C., Cao, G., Sofic, E. & Prior, R. (1997). High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Coulometric Array Detection of Electroactive Components in Fruits and Vegetables: Relationship to Oxygen Radical Absorbance Capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(5), 1787-1796.
90. Guyot, S., Marnet, N., Djamel, L., Sanoner, P. & Drilleau, J.F. (1998). Reversed-phase HPLC following thiolysis for quantitative estimation and characterization of the four main classes of phenolic compounds in different tissue zones of a French cider apple variety (*Malus domestica* Var. Kermerrien). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1698-1705.
91. Guyot, S., Marnet, N., Sanoner, P. & Drilleau, J. (2003). Variability of the Polyphenolic Composition of Cider Apple (*Malus domestica*) Fruits and Juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6240-6247.
92. Habermehl, G. (2008). *Naturstoffchemie: Eine Einführung*. Springer Verlag, Berlin.
93. Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. (2004). *Free radicals in biology and medicine*, 3rd ed., Oxford Science Publications, New York.
94. Han, X., Shen, T. & Lou, H. (2007). Dietary polyphenols and their biological significance. *International Journal of Molecular Sciences*, 8(9), 950-988.
95. Harborne, J.B. & Williams, C.A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481-504.
96. Hart, D.N. (1997). Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood*, 90(9), 3245-3287.
97. Herrmann, K. (1989). Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 28, 315-347.
98. Hillebrand, S. (2004). Dissertation: Analytik von Polyphenolen in Buntsäften im Hinblick auf Saftqualität, Farbe und antioxidative Aktivität. *Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, Braunschweig*.

99. Hoffmann-Sommergrube, K. (2000). Plant allergens and pathogenesis-related proteins. What do they have in common? *International Archives of Allergy and Immunology*, 122(3), 155-166.
100. Hoffmann-Sommergruber, K., Vanek-Krebitz, M., Radauer, C., Wen, J., Ferreira, F., Scheiner, O. & Breiteneder, H. (1997). Genomic characterization of members of the Bet v 1 family: genes coding for allergens and pathogenesis-related proteins share intron positions. *Gene*, 197(1-2), 91-100.
101. Holderbaum, D.F. (2010). Enzymatic browning, Polyphenol oxidase activity, and polyphenols in four apple cultivars: Dynamics during fruit development. *Hortscience*, 45(8), 1150-1154.
102. Hollman, P.C., de Vries, J.H., van Leeuwen, S.D., Mengelers, M.J. & Katan, M.B. (1995). Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 62(6), 1276-1282.
103. Hombach, J., Tsubata, T., Leclercq, L., Stappert, H. & Reth, M. (1990). Molecular components of the B-cell antigen receptor complex of the IgM class. *Nature*, 343(6260), 760-762.
104. Hrazdina, G. & Wagner, G.J. (1985). Compartmentation of plant phenolic compounds; sites of synthesis and accumulation. *Proceedings of the Phytochemical Society of Europe*, 25, 119-133.
105. Hu, M. (2007). Commentary: bioavailability of flavonoids and polyphenols: call to arms. *Molecular Pharmaceutics*, 4(6), 803-806.
106. Huguet, A.I., Máñez, S. & Alcaraz, M.J. (1990). Superoxide scavenging properties of flavonoids in a non-enzymic system. *Zeitschrift für Naturforschung C - Journal of Biosciences*, 45(1-2), 19-24.
107. Husain, S.R., Cillard, J. & Cillard, P. (1987). Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry*, 26(9), 2489-2491.
108. Hyson, D.A.A. (2011). A comprehensive review of apples and apple components and their relationship to human health. *Advances in Nutrition*, 2(5), 408-420.
109. Jeep, S., Pilz, B., Baisch, A., Kleine-Tebbe, J., Ohnemus, U. & Kunkel, G. (2001). Immunoblot studies in birch pollen-allergic patients with and without fruit hypersensitivity: part I: antibody pattern for birch pollen extract. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 11(4), 255-263.
110. Jenner, A.M., Rafter, J. & Halliwell, B. (2005). Human fecal water content of phenolics: The extent of colonic exposure to aromatic compounds. *Free Radical Biology and Medicine*, 38, 763-772.

111. Kahle, K. (2008). Dissertation: Polyphenole aus Apfelsaft: Studien zur Verfügbarkeit im Humanstoffwechsel. *Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Würzburg*.
112. Karmowski, J. (2015). Dissertation: Ermittlung der lipophilen antioxidativen Aktivitäten/Kapazitäten mittels Photochemolumineszenz-Methode: Untersuchungen zur Anwendung auf Carotinoide, Vitamin E und Lebensmittel sowie zum Einfluss von Wechselwirkungen und Lebensmittelmatrix. *Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena*.
113. Kawabe, T., Matsushima, M., Hashimoto, N., Imaizumi, K. & Hasegawa, Y. (2011). CD40/CD40 ligand interactions in immune responses and pulmonary immunity. *Nagoya Journal of Medical Science*, 73(3-4), 69-78.
114. Kawakami, T. & Xiao, W. (2013). Phospholipase C- $\beta$  in immune cells. *Advances in Biological Regulation*, 53(3), 249-257.
115. Khanizadeh, S., Tsao, R., Rekika, D., Yang, R., Charles, M.T. & Rupasinghe, V. (2008). Polyphenol composition and total antioxidant capacity of selected apple genotypes for processing. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 396-401.
116. Kiewning, D., Wollseifen, R. & Schmitz-Eiberger, M. (2013). The impact of catechin and epicatechin, total phenols and PPO activity on the Mal d 1 content in apple fruit. *Food Chemistry*, 140(1-2), 99-104.
117. Kim, J.Y., Kina, T., Iwanaga, Y., Noguchi, H., Matsumura, K. & Hyon, S.H. (2007). Tea polyphenol inhibits allostimulation in mixed lymphocyte culture. *Cell Transplant*, 16, 75-83.
118. Kim, Y.M., Yun, J., Lee, C.K., Lee, H., Min, K.R. & Kim, Y. (2002). Oxyresveratrol and hydroxystilbene compounds. Inhibitory effect on tyrosinase and mechanism of action. *Journal of Biological Chemistry*, 277(18), 16340-16344.
119. Kishi, K., Saito, M., Saito, T., Kumemura, M., Okamatsu, H., Okita, M. & Takazawa, K. (2005). Clinical efficacy of apple polyphenol for treating cedar pollinosis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69(4), 829-832.
120. Konishi, Y., Hitomi, Y., Yoshida, M. & Yoshioka, E. (2005). Pharmacokinetic study of caffeic and rosmarinic acids in rats after oral administration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(12), 4740-4746.
121. Krist, S., Buchbauer, G. & Klausberger, C. (2013). Lexikon der pflanzlichen Fette und Öle. *Springer Verlag, Wien*.
122. Kroon, P.A., Clifford, M.N., Crozier, A., Day, A.J., Donovan, J.L., Manach, C. & Williamson, G. (2004). How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro?. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80(1), 15-21.
123. Kschonsek, J., Wiegand, C., Hipler, U.C. & Böhm, V. (2019). Influence of polyphenolic content on the in vitro allergenicity of old and new apple cultivars - a pilot study. *Nutrition*, 58, 30-35.

124. Kschonsek, J., Wolfram, T., Stöckl, A. & Böhm, V. (2018). Polyphenolic compounds analysis of old and new apple cultivars and contribution of polyphenolic profile to the in vitro antioxidant capacity. *Antioxidants*, 7(1), 20.
125. Kühnau J. (1976). The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Review of Nutrition and Dietetics*, 24, 117-191.
126. Łata, B. & Tomala, K. (2007). Apple peel as a contributor to whole fruit quantity of potentially healthful bioactive compounds. Cultivar and year implication. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 10795-10802.
127. Łata, B., Trampczynskab, A. & Paczesnaa, J. (2009). Cultivar variation in apple peel and whole fruit phenolic composition. *Scientia Horticulturae*, 121, 176-181.
128. Lea, A.G.H. & Arnold, G.M. (1978). The phenolics of ciders: Bitterness and astringency. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 29(5), 478-483.
129. Lea, A.G.H. (1990b). Bitterness and astringency: the procyanidins of fermented apple ciders. Bitterness in food and beverages, *Elsevier, Amsterdam*, 123-143.
130. Lederman, S., Yellin, M.J., Krichevsky, A., Belko, J., Lee, J.J. & Chess, L. (1992). Identification of a novel surface protein on activated CD4+ T cells that induces contact-dependent B cell differentiation (help). *Journal of Experimental Medicine*, 175(4), 1091-1101.
131. Lee, C.H. & Whitaker, J.R. (1995). Enzymatic browning and its prevention. ACS Symposium Series. *American Chemical Society, Washington, DC*.
132. Lee, K.W., Kim, Y.J., Kim, D., Lee, H.J. & Lee, C.Y. (2003). Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6516-6520.
133. Leopoldini, M., Marino, T., Russo, N. & Toscano, M. (2004). Antioxidant properties of phenolic compounds: H-Atom versus electron transfer. *The Journal of Physical Chemistry A*, 108(22), 4916-4922.
134. Liaudanskas, M., Viškelis, P., Jakštas, V., Raudonis, R., Kviklys, D., Milašius, A. & Janulis, V. (2014). Application of an optimized HPLC method for the detection of various phenolic compounds in apples from Lithuanian cultivars. *Journal of Chemical Education*, 2014, 1-10.
135. Lieberei, R. & Reisdorff, C. (2007). *Nutzpflanzenkunde. Thieme Verlag, Stuttgart*.
136. Loomis, W.D. (1974). Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. *Methods in Enzymology*, 31, 528-544.

137. Ma, H.T. & Beaven, M.A. (2011). Regulators of Ca(2+) signaling in mast cells: potential targets for treatment of mast cell-related diseases?. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 716, 62-90.
138. Macheix, J.J., Fleuriet, A. & Billot, J. (1990). Fruit Phenolics. *CRC Press, Boca Raton, USA*.
139. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727-747.
140. Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A. & Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 230S-242S.
141. Mantegazza, A.R., Magalhaes, J.G., Amigorena, S. & Marks, M.S. (2013). Presentation of phagocytosed antigens by MHC class I and II. *Traffic*, 14(2), 135-152.
142. Martin, S.F., Esser, P.R., Weber, F.C., Jakob, T., Freudenberg, M.A., Schmidt, M. & Goebeler, M. (2011). Mechanisms of chemical-induced innate immunity in allergic contact dermatitis. *Allergy*, 66, 1152-1163.
143. Marzban, G., Puehringer, H., Dey, R., Brynda, S., Ma, Y., Martinelli, A., Zaccarini, M., van der Weg, E., Housley, Z., Kolarich, D., Altmann, F. & Laimer, M. (2005). Localisation and distribution of the major allergens in apple fruits. *Plant Science*, 169(2), 387-394.
144. Matthes, A. & Schmitz-Eiberger, M. (2009). Apple (*Malus domestica* L. Borkh.) allergen Mal d 1: effect of cultivar, cultivation system, and storage conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(22), 10548-10553.
145. Mayer, M., Oberhuber, C., Loncaric, I. & Hoffmann-Sommergruber, K. (2011). Fireblight (*Erwinia amylovora*) affects Mal d 1-related allergenicity in apple. *European Journal of Plant Pathology*, 131(1), 1-7.
146. Miller, N.J. & Ruiz-Larrea, M.B. (2002). Flavonoids and other plant phenols in the diet: Their significance as antioxidants. *Journal of Nutritional & Environmental Medicine*, 12, 39-51.
147. Mills, E.N., Sancho, A.I., Rigby, N.M., Jenkins, J.A. & Mackie, A.R. (2009). Impact of food processing on the structural and allergenic properties of food allergens. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53(8), 963-969.
148. Moneret-Vautrin, D.A., Sainte-Laudy, J., Kanny, G. & Fremont, S. (1999). Human basophil activation measured by CD63 expression and LTC4 release in IgE-mediated food allergy. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 82, 33-40.
149. Müller, L., Gnoyke, S., Popken, A.M. & Böhm, V. (2010). Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT- Food Science and Technology*, 43, 992-999.

150. Nakai, K., Yoneda, K. & Kubota, Y. (2012). Oxidative stress in allergic and irritant dermatitis: from basic research to clinical management. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, 6, 202-209
151. Nakanishi, N. (2010). Basophils are potent antigen-presenting cells that selectively induce Th2 cells. *European Journal of Immunology*, 40(7), 1836-1842.
152. Nakano, N., Nishiyama, C., Tokura, T., Nagasako-Akazome, Y., Ohtake, Y., Okumura, K. & Ogawa, H. (2008). Procyanidin C1 from apple extracts inhibits Fc epsilon RI-mediated mast cell activation. *International Archives of Allergy and Immunology*, 147(3), 213-221.
153. Napolitano, A., Cascone, A., Graziani, G., Ferracane, R., Scalfi, L., Di Vaio, C., Ritieni, A. & Fogliano, V. (2004). Influence of variety and storage on the polyphenol composition of apple flesh. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6526-6531.
154. Netzel, G. (2011). Dissertation: Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit und antioxidativen Kapazität von antioxidativ wirksamen Substanzen aus Rotwein, rotem Traubensaftkonzentrat, sortenreinem Apfelsaft und einem „Antiox“-Getränk beim Menschen. *Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen*.
155. Nicolas, J.J., Richard-Forget, F.C., Goupy, P.M., Amiot, M.J. & Aubert, S.Y. (1994). Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34(2), 109-157.
156. Norgaard, A., Skov, P.S. & Bindslev-Jensen, C. (1992). Egg and milk allergy in adults: comparison between fresh foods and commercial extracts in skin prick test and histamine release from basophils. *Clinical and Experimental Allergy*, 22, 940-947.
157. Nybom, H., Cervin-Hoberg, C. & Andersson, M. (2013). Oral challenges with four apple cultivars result in significant differences in oral allergy symptoms. *International Archives of Allergy and Immunology*, 161(3), 258-264.
158. Oleszek, W., Lee, C.Y., Jaworski, A.W. & Price, K.R. (1988). Identification of some phenolic compounds in apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36, 430-432.
159. Ortolani, C., Ispano, M., Ansaloni, R., Rotondo, F., Incorvaia, C. & Pastorello, E.A. (1998). Diagnostic problems due to cross-reactions in food allergy. *Allergy*, 53, 58-61.
160. Ortolani, C., Ispano, M., Pastorello, E.A., Ansaloni, R. & Magri, G.C. (1989). Comparison of results of skin prick tests (with fresh foods and commercial food extracts) and RAST in 100 patients with oral allergy syndrome. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 83, 683-690.
161. Osterballe, M., Scheller, R., Stahl Skov, P., Andersen, K.E. & Bindslev-Jensen, C. (2003). Diagnostic value of scratch-chamber test, skin prick test, histamine release and specific IgE in birch-allergic patients with oral allergy syndrome to apple. *Allergy*, 58(9), 950-953.



162. Ou, B., Hampsch-Woodill, M. & Prior, R.L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4619-4626.
163. Ozgová, Š., Heřmánek, J. & Gut, I. (2003). Different antioxidant effects of polyphenols on lipid peroxidation and hydroxyl radicals in the NADPH-, Fe-ascorbate- and Fe-microsomal systems. *Biochemical Pharmacology*, 66, 1127-1137.
164. Pan, T.T., Sun, D.W., Paliwal, J., Pu, H. & Wei, Q. (2018). New method for accurate determination of polyphenol oxidase activity based on reduction in SERS intensity of catechol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(42), 11180-11187.
165. Pandey, K.B. & Rizvi, S.I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), 270-278.
166. Passamonti, S., Vrhovsek, U., Vanzo, A. & Mattivi, F. (2005). Fast access of some grape pigments to the brain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(18), 7029-7034.
167. Pastorello, E.A., Pravettoni, V., Farioli, L., Ispano, M., Fortunato, D., Monza, M., Giuffrida, M.G., Rivolta, F., Scibola, E., Ansaloni, R., Incorvaia, C., Conti, A. & Ortolani, C. (1999). Clinical role of a lipid transfer protein that acts as a new apple-specific allergen. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 104(5), 1099-10106.
168. Pearce, F.L., Befus, A.D. & Bienenstock, J. (1984). Mucosal mast cells. III. Effect of quercetin and other flavonoids on antigen-induced histamine secretion from rat intestinal mast cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 73(6), 819-823.
169. Petkovsek, M.M., Stampar, F. & Veberic, R. (2007). Parameters of inner quality of the apple scab resistant and susceptible apple cultivars (*Malus domestica* Borkh). *Scientia Horticulturae*, 114, 37-44.
170. Pissard, A., Pierna, J.A.F., Baeten, V., Sinnaeve, G., Lognay, G., Mouteau, A., Dupont, P., Rondia, A. & Lateur, M. (2013). Non-destructive measurement of vitamin C, total polyphenol and sugar content in apples using near-infrared spectroscopy. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 238-244.
171. Planchon, V., Lateur, M., Dupont, P. & Lognay, G. (2004). Ascorbic acid level of Belgian apple genetic resources. *Scientia Horticulturae*, 100, 51-61.
172. Plundrich, N.J., Bansode, R.R., Foegeding, E.A., Williams, L.L. & Lila, M.A. (2017). Protein-bound Vaccinium fruit polyphenols decrease IgE binding to peanut allergens and RBL-2H3 mast cell degranulation in vitro. *Food & Function*, 8(4), 1611-1621.
173. Pourcel, L., Routaboul, J.M., Cheynier, V., Lepiniec, L. & Debeaujon, I. (2007). Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends in Plant Science*, 12(1), 29-36.

174. Price, S.F., Breen, P.J., Valladao, M. & Watson, B. (1995). Cluster sun exposure and quercetin in pinot noir grapes and wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 187-194.
175. Pühringer, H., Moll, D., Hoffmann-Sommergruber, K., Watillon, B., Katinger, H. & Laimer da Câmara Machado, H. (2000). The promoter of an apple Ypr10 gene, encoding the major allergen Mal d 1, is stress- and pathogen-inducible. *Plant Science*, 152(1), 35-50.
176. Raudone, L., Raudonis, R., Liaudanskas, M., Viskelis, J., Pukalskas, A. & Janulis, V. (2016). Phenolic profiles and contribution of individual compounds to antioxidant activity of apple powders. *Journal of Food Science*, 81, C1055-C1061.
177. Raulf-Heimsoth, M. (2009). Diagnosis of Type 1 Allergy – „State of the Art“. *Aktuelle Dermatologie*, 35(10), 385-392.
178. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.
179. Rechner, A. (2000). Dissertation: Einfluss der Verarbeitungstechnik auf die Polyphenole und antioxidative Kapazität von Apfel- und Beerenobstsäften. *Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen*.
180. Renard, C.M., Dupont, N. & Guillermin, P. (2007). Concentrations and characteristics of procyanidins and other phenolics in apples during fruit growth. *Phytochemistry*, 68, 1128-1138.
181. Renard, C.M.G.C. & Thibault, J.F. (1993). Structure and properties of apple and sugar-beet pectins extracted by chelating agents. *Carbohydrate Research*, 244, 99-114.
182. Renz, H., Biedermann, T., Bufe, A., Eberlein, B., Jappe, U., Ollert, M., Petersen, A., Kleine-Tebbe, J., Raulf-Heimsoth, M., Saloga, J., Werfel, T. & Worm, M. (2010). In-vitro-Allergiediagnostik - Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI). *Allergo Journal*, 19, 110-128.
183. Ricci, G., Dondi, A., Belotti, T., Baldi, E., Tartarini, S., Paris, R., Pagliarini, G., Serafini-Fracassini, D., Casadio, R., Giannetti, A. & Masi, M. (2010). Allergenicity of different apple cultivars assessed by means of skin prick test and sensitisation to recombinant allergens Mal d 1 and Mal d 3 in a group of Italian apple-allergic patients. *International Journal of Food Science & Technology*, 45, 1517-1523.
184. Rice-Evans, C., Miller, N. & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933-956.
185. Rice-Evans, C., Miller, N. & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4), 152-159.

186. Rice-Evans, C., Miller, N., Bolwell, P., Bramley, P. & Pridham, J. (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 22(4), 375-383.
187. Rocha, A.M.C.N., Pilar Cano, M., Galeazzi, M.A.M. & Morais, A.M.M.B. (1998). Characterisation of 'Starking' apple polyphenoloxidase. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77(4), 527-534.
188. Rolff, M., Schottenheim, J., Decker, H. & Tuczec, F. (2011). Copper-O<sub>2</sub> reactivity of tyrosinase models towards external monophenolic substrates: molecular mechanism and comparison with the enzyme. *Chemical Society Reviews*, 40(7), 4077-4098.
189. Rudeschko, O., Fahlbusch, B., Henzgen, M., Schlenvoigt, G., Herrmann, D. & Jäger, L. (1995). Optimization of apple allergen preparation for in vivo and in vitro diagnostics. *Allergy*, 50(3), 262-268.
190. Salah, N., Miller, N., Paganga, G., Tijburg, L., Bolwell, G. & Rice-Evans, C. (1995). Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 322(2), 339-346.
191. Sancho, A.I., Foxall, R., Browne, T., Dey, R., Zuidmeer, L., Marzban, G., Waldron, K.W., van Ree, R., Hoffmann-Sommergruber, K., Laimer, M. & Mills, E.N. (2006). Effect of postharvest storage on the expression of the apple allergen Mal d 1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(16), 5917-5923.
192. Sanderson, M.P., Wex, E., Kono, T., Uto, K. & Schnapp, A. (2010). Syk and Lyn mediate distinct Syk phosphorylation events in FcεRI-signal transduction: implications for regulation of IgE-mediated degranulation. *Molecular Immunology*, 48(1-3), 171-178.
193. Sansavini, S., Donati, F., Costa, F. & Tartarini, S. (2004). Advances in apple breeding for enhanced fruit quality and resistance to biotic stresses: new varieties for the european market. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 12, 13-52.
194. Santos-Buelga, C. & Scalbert, A. (2000). Proanthocyanidins and tannin-like compounds - nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1094-1117.
195. Scalbert, A. & Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*, 130(8S), 2073S-2085S.
196. Scalbert, A., Morand, C., Manach, C. & Rémésy, C. (2002). Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56, 276-282.
197. Schmitz-Eiberger, M. & Matthes, A. (2011). Effect of harvest maturity, duration of storage and shelf life of apples on the allergen Mal d 1, polyphenoloxidase activity and polyphenol content. *Food Chemistry*, 127(4), 1459-1464.

198. Selma, M.V., Espín, J.C. & Tomás-Barberán, F.A. (2009). Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(15), 6485-6501.
199. Shetty, M.J., Chandan, K., Krishna, H.C. & Aparna, G.S. (2018). Genetically modified crops: An overview. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(1), 2405-2410.
200. Shihasaki, M., Sumazuki, R., Isoyama, S. & Takita, H. (1992). Interaction of lectins with human IgE: IgE-binding property and histamine-releasing activity of twelve plant lectins. *International Archives of Allergy and Immunology*, 98, 18-25.
201. Sibilano, R., Frossi, B. & Pucillo, C.E. (2014). Mast cell activation: a complex interplay of positive and negative signaling pathways. *European Journal of Immunology*, 44(9), 2558-2566.
202. Sicherer, S.H. (2001). Clinical implications of cross-reactive food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 108, 881-890.
203. Sies, H. (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine*, 91(3), S31-S38.
204. Singh, A., Demont, A., Actis-Goretta, L., Holvoet, S., Lévêques, A., Lepage, M., Nutten, S. & Mercenier, A. (2014). Identification of epicatechin as one of the key bioactive constituents of polyphenol-enriched extracts that demonstrate an anti-allergic effect in a murine model of food allergy. *British Journal of Nutrition*, 112(3), 358-368.
205. Singh, A., Holvoet, S. & Mercenier, A. (2011). Dietary polyphenols in the prevention and treatment of allergic diseases. *Clinical and Experimental Allergy*, 41(10), 1346-1359.
206. Singleton, V.L. & Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
207. Singleton, V.L., Salgues, M., Zaya, J. & Trousdale, E. (1985). Caftaric acid disappearance and conversion to products of enzymic oxidation in grape must and wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36, 50-56.
208. Skamstrup Hansen, K., Vestergaard, H., Stahl Skov, P., Søndergaard Khinchi, M., Vieths, S., Poulsen, L.K. & Bindslev-Jensen, C. (2001). Double-blind, placebo-controlled food challenge with apple. *Allergy*, 56(2), 109-117.
209. Son, D.Y. & Lee, S.I. (2001). Comparison of the characteristics of the major allergen Mal d 1 according to apple varieties. *Food Science and Biotechnology*, 10, 132-136.
210. Stracke, A.B., Rüfer, C.E., Bub, A., Weibel, F.P., Kunz, C. & Watzl, B. (2009). Three-year comparison of the polyphenol contents and antioxidant capacities in organically and conventionally produced apples (*Malus domestica* Bork. Cultivar Golden Delicious). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 4598-4605.

211. Suzuki, Y., Yoshimaru, T., Inoue, T., Niide, O. & Ra, C. (2005). Role of oxidants in mast cell activation. *Chemical Immunology and Allergy*, 87, 32-42.
212. Tapiero, H., Tew, K.D., Ba, G.N. & Mathé, G. (2002). Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies?. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56(4), 200-207.
213. Tokura, T., Nakano, N., Ito, T., Matsuda, H., Nagasako-Akazome, Y., Kanda, T., Ikeda, M., Okumura, K., Ogawa, H. & Nishiyama, C. (2005). Inhibitory effect of polyphenol-enriched apple extracts on mast cell degranulation in vitro targeting the binding between IgE and FcεpsilonRI. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69, 1974-1977.
214. Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231-1246.
215. Tsao, R., Yang, R., Xie, S., Sockovie, E. & Khanizadeh, S. (2005). Which polyphenolic compounds contribute to the total antioxidant activities of apple?. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4989-4995.
216. Tsao, R., Yang, R., Young, J.C. & Zhu, H. (2003). Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6347-6353.
217. Tsurutani, M., Yanagida, Y., Hagiwara, S., Murata, M. & Homma, S. (2002). Comparison of soluble and plastidial polyphenol oxidase in mature apples. *Food Science and Technology Research*, 8, 42-44.
218. Tuft, L. & Blumstein, G.I. (1942). Studies in food allergy: II. Sensitization to fresh fruits: Clinical and experimental observations. *Journal of Allergy*, 13(6), 574-582.
219. Valenta, R., Duchene, M., Vrtala, S., Birkner, T., Ebner, C., Hirschwehr, R., Breitenbach, M., Rumpold, H., Scheiner, O. & Kraft, D. (1991). Recombinant allergens for immunoblot diagnosis of tree-pollen allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 88(6), 889-894.
220. Valenta, R., Hochwallner, H., Linhart, B. & Pahr, S. (2015). Food allergies: the basics. *Gastroenterology*, 148(6), 1120-1131.
221. Van der Sluis, A.A., Dekker, M., de Jager, A. & Jongen, W. (2001). Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: Effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 3606-3613.
222. Van der Sluis, A.A., Dekker, M., Skrede, G. & Jongen, W.M.F. (2002). Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple juice. 1. Effect of existing production methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7211-7219.
223. Van Regenmortel, M.H. (2001). Antigenicity and immunogenicity of synthetic peptides. *Biologicals*, 29(3-4), 209-213.

224. Vanek-Krebitz, M., Hoffmann-Sommergruber, K., Laimer da Camara Machado, M., Susani, M., Ebner, C., Kraft, D., Scheiner, O. & Breiteneder, H. (1995). Cloning and sequencing of Mal d 1, the major allergen from apple (*Malus domestica*), and its immunological relationship to Bet v 1, the major birch pollen allergen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 214(2), 538-551.
225. Vegro, M., Eccher, G., Populin, F.C., Savazzini, F., Pagliarani, G., Tartarini, S., Pasini, G., Curioni, A., Antico, A. & Botton, A. (2016). Old apple (*Malus domestica* L. Borkh) varieties with hypoallergenic properties: An integrated approach for studying apple allergenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(48), 9224-9236.
226. Vieths, S., Hoffmann, A., Holzhauser, T., Muller, U., Reindl, J. & Hausteiner, D. (1998). Factors influencing the quality of food extracts for in vitro and in vivo diagnosis. *Allergy*, 53(46), 65-71.
227. Vieths, S., Janek, K., Aulepp, H. & Petersen, A. (1995). Isolation and characterization of the 18-kDa major apple allergen and comparison with the major birch pollen allergen (Bet v I). *Allergy*, 50(5), 421-430.
228. Vieths, S., Jankiewicz, A., Schöning, B. & Aulepp, H. (1994). Apple allergy: the IgE-binding potency of apple strains is related to the occurrence of the 18-kDa allergen. *Allergy*, 49(4), 262-271.
229. Vieths, S., Scheurer, S. & Ballmer-Weber, B. (2002). Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 964, 47-68.
230. Vlieg-Boerstra, B.J., van de Weg, W.E., van der Heide, S., Kerkhof, M., Arens, P., Heijerman-Peppelman, G. & Dubois, A.E. (2011). Identification of low allergenic apple cultivars using skin prick tests and oral food challenges. *Allergy*, 66(4), 491-498.
231. Vlieg-Boerstra, B.J., van de Weg, W.E., van der Heide, S., Skypala, I., Bures, P., Ballmer-Weber, B.K., Hoffmann-Sommergruber, K., Zauli, D., Ricci, G. & Dubois, A.E. (2013). Additional indications for the low allergenic properties of the apple cultivars Santana and Elise. *Plant Foods for Human Nutrition*, 68(4), 391-395.
232. Vrhovsek, U., Rigo, A., Tonon, D. & Mattivi, F. (2004). Quantitation of polyphenols in different apple varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(21), 6532-6538.
233. Wach, A., Pyrzynska, K. & Biesaga, M. (2007). Quercetin content in some food and herbal samples. *Food Chemistry*, 100, 699-704.
234. Wagner, A., Szwed, A., Buczyłko, K. & Wagner, W. (2016). Allergy to apple cultivars among patients with birch pollinosis and oral allergy syndrome. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 117(4), 399-404.
235. Wald, B. & Galensa, R. (1989). Detection of fruit juice adulteration in apple and pear juice. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 188(2), 107-114.

236. Waltz, E. (2015). Nonbrowning GM apple cleared for market. *Nature Biotechnology*, 33, 326.
237. Watzl, B. & Rechkemmer, G. (2001). Phenolsäuren. *Ernährungs-Umschau*, 48(10), 413-416.
238. Wojdyło, A., Oszmiański, J. & Laskowski, P. (2008). Polyphenolic compounds and antioxidant activity of new and old apple varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 6520-6530.
239. Wolfe, K., Wu, X. & Liu, R.H. (2003). Antioxidant activity of apple peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 609-614.
240. Wright, J., Johnson, E. & Di Labio, G. (2001). Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical Method. *American Chemical Society*, 123, 1173-1183.
241. Wu, Z., Lian, J., Han, Y., Zhou, N., Li, X., Yang, A., Tong, P. & Chen, H. (2016). Crosslinking of peanut allergen Ara h 2 by polyphenol oxidase: digestibility and potential allergenicity assessment. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(10), 3567-3574.
242. Yamashita, K., Suzuki, Y., Matsui, T., Yoshimaru, T., Yamaki, M., Suzuki-Karasaki, M., Hayakawa, S. & Shimizu, K. (2002). Epigallocatechin gallate inhibits histamine release from rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells: role of tyrosine phosphorylation pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 274(3), 603-608.
243. Yano, S., Tachibana, H. & Yamada, K. (2005). Flavones suppress the expression of the high-affinity IgE receptor FcεRI in human basophilic KU812 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1812-1817.
244. Yaylayan, V.A. (2003). Recent advances in the chemistry of Strecker degradation and Amadori rearrangement: Implications to aroma and color formation. *Food Science and Technology Research*, 9, 1-6.
245. Yoruk, R. & Marshall, M.R. (2003). Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: A review. *Journal of Food Biochemistry*, 27(5), 361-422.
246. Zhu, J., Yamane, H. & Paul, W.E. (2010). Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annual Review of Immunology*, 28, 445-589.
247. Zuercher, A.W., Holvoet, S., Weiss, M. & Mercenier, A. (2010). Polyphenol-enriched apple extract attenuates food allergy in mice. *Clinical and Experimental Allergy*, 40, 942-950.
248. 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. (2006). Allergenicity assessment of apple cultivars: hurdles in quantifying labile fruit allergens. *International Archives of Allergy and Immunology*, 141(3), 230-240.

## Wissenschaftliche Publikationen und Konferenzbeiträge

### Publikationen

**Kschonsek, J.**, Dietz, A., Wiegand, C., Hipler, U.C. & Böhm, V. (2019). Allergenicity of apple allergen *Mal d 1* as effected by polyphenols and polyphenol oxidase due to enzymatic browning. *LWT - Food Science and Technology*, 113, 108289.

**Kschonsek J.**, Wiegand C., Hipler U.C. & Böhm V. (2019). Influence of polyphenolic content on in vitro allergenicity of old and new apple cultivars – a pilot study. *Nutrition*, 58, 30-35.

**Kschonsek, J.**, Wolfram, T., Stöckl, A. & Böhm, V. (2018). Polyphenolic compounds analysis of old and new apple cultivars and contribution of polyphenolic profile to the in vitro antioxidant capacity. *Antioxidants*, 7(1), 20.

Živković, J., Ristić, M., **Kschonsek, J.**, Westphal, A., Filipović, V. & Böhm, V. (2017). Comparison of chemical profile and antioxidant capacity of seeds and oils from *Salvia sclarea* and *Salvia officinalis*. *Chemistry & Biodiversity*, 14(12), e1700344.

**Kschonsek, J.**, Stimming, M., Libuda, L., Kersting, M. & Böhm, V. (2016). Food-based modification of LC-PUFA concentration in complementary food did not affect plasma vitamin E concentration in infants. *NFS Journal*, 3, 25-32.

Karmowski, J., Hintze, V., **Kschonsek, J.**, Killenberg, M. & Böhm, V. (2015). Antioxidant activities of tocopherols/tocotrienols and lipophilic antioxidant capacity of wheat, vegetable oils, milk and milk cream by using photochemiluminescence. *Food Chemistry*, 175, 593-600.

Bauerfeind, J., Hintze, V., **Kschonsek, J.**, Killenberg, M. & Böhm, V. (2014). Use of photochemiluminescence for the determination of antioxidant activities of carotenoids and antioxidant capacities of selected tomato products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 7452-7459.

### Konferenzbeiträge

**Kschonsek, J.**, Dietz, A., Wiegand, C., Hipler, U.C. & Böhm, V. (2019). Untersuchungen zum Einfluss der enzymatischen Bräunung auf die *in-vitro*-Allergenität des Apfelallergens *Mal d 1*. *Deutscher Lebensmittelchemikertag*, 48, 93. (Referat)

**Kschonsek, J.**, Wiegand C., Hipler U.C. & Böhm V. (2018). Untersuchungen zum Einfluss des Polyphenolgehaltes auf die *in-vitro*-Allergenität alter und neuer Apfelsorten - eine Pilotstudie. *Allergo Journal International*, 27, 63. (Referat)

Künzler, E., **Kschonsek, J.** & Böhm, V. (2018). Wechselwirkungen zwischen Apfelpolyphenolen und ihr Einfluss auf die antioxidative Kapazität. *Lebensmittelchemie*, 72, 90. (Referat)



**Kschonsek, J. & Böhm, V.** (2018). Untersuchungen des Polyphenolprofils und der antioxidativen Kapazität von alten und neuen Apfelsorten. *Proceedings of the German Nutrition Society*, 24, 37. (Referat)

**Kschonsek, J. & Böhm, V.** (2017). Einfluss des Polyphenolprofils auf die antioxidative Kapazität von alten und neuen Sorten. *Lebensmittelchemie*, 71, 23. (Referat)

**Kschonsek, J., Stimming, M., Libuda, L., Kersting, M. & Böhm, V.** (2015). Einfluss einer optimierten Fettsäurezusammensetzung in der Beikost auf den Vitamin-E-Gehalt im Blutplasma von Säuglingen. *Proceedings of the German Nutrition Society*, 20, 85. (Referat)

**Kschonsek, J., Stimming, M., Libuda, L. & Böhm, V.** (2014). Einfluss einer optimierten Fettsäurezusammensetzung in der Beikost auf den Vitamin-E-Gehalt im Blutplasma von Säuglingen. *Lebensmittelchemie*, 68, 90-91. (Referat)

Bauerfeind, J., Hintze, V., **Kschonsek, J.**, Killenberg, M. & Böhm, V. (2014). Using photochemiluminescence to measure the lipophilic antioxidant capacities of carotenoid rich food products. *International Carotenoid Society*, 18, 85. (Referat)

Bauerfeind, J., Hintze, V., **Kschonsek, J.**, Killenberg, M. & Böhm, V. (2014). Photochemolumineszenz-Methode zur bestimmung der lipophilen antioxidativen Kapazitäten von verschiedenen Tomatenprodukten. *Proceedings of the German Nutrition Society*, 19, 79. (Referat)

## Danksagung

*An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei Herrn apl. Prof. Dr. Böhm und Frau PD. Dr. Hipler für die Bereitstellung dieses interessanten Themas sowie für das Vertrauen und die wertvolle Unterstützung, welche Sie mir entgegengebracht haben, bedanken.*

*Ein besonderer Dank gebührt Dr. Jasmin Karmowski und Anna Westphal, die mir jederzeit mit Rat und Tat bei Problemen zur Seite standen. Danke für eure zahlreichen Anregungen und hilfreichen Diskussionen.*

*Ich danke den ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern der AG Bioaktive Pflanzenstoffe und des Routine- und in-vitro-Forschungslabors der Klinik für Hautkrankheiten für die intensive Betreuung bei den Laboranalysen, die ständige Hilfsbereitschaft sowie für viele motivierende Gespräche.*

*Theresa Wolfram, Annette Stöckl, Tina Hüttenrauch, Evamaria Künzler sowie André Dietz danke ich für die gute Zusammenarbeit während der Anfertigung ihrer Bachelorarbeiten sowie für die Unterstützung bei den experimentellen Analysen und der Erhebung zahlreicher Messdaten.*

*Ein ganz herzliches Dankeschön geht an meine fleißige Korrekturleserin Frau Dr. Ramona Mäurer für ihre kritischen Hinweise. Vielen Dank auch für die liebevollen aufbauenden Worte und Gesten.*

*Ich danke meinem Freund Hagen für seine Geduld und sein Verständnis sowie die unendliche Unterstützung auf unserem gemeinsamen Weg. Danke, dass du mich immer wieder aufs Neue ermutigt hast.*

*Ein ganz besonderer Dank gilt nicht zuletzt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, für die vielfältige und langjährige Unterstützung. Ohne Euer grenzenloses Vertrauen in mich, wäre dies alles nicht möglich gewesen.*

*Vielen lieben Dank!*

## Eidesstattliche Erklärungen

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass:

- mir die geltende Promotionsordnung der Fakultät für Biowissenschaften der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist.
- ich die vorliegende Dissertation selbst angefertigt und keine Textabschnitte eines Dritten oder eigener Prüfungsarbeiten ohne Kennzeichnung übernommen habe und alle benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in der Arbeit angegeben habe.
- mich lediglich die in den Manuskripten angegebenen Personen bei der Auswahl und der Auswertung des Materials sowie bei der Erstellung der Manuskripte unterstützt haben.
- ich nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen habe.
- Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen.
- ich diese Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe.
- ich weder die gleiche oder eine in wesentlichen Teilen ähnliche, noch eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule oder anderen Fakultät als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 30. Januar 2020

.....  
Josephine Kschonsek