

Vergleich der Qualität von Möhren aus ökologischem- und konventionellem Anbau am Beispiel der Allergenität

B Jansen^{1*}, L Dahl^{2*}, K Fötisch², S Haneklaus³, J Zagon¹, S Vieths², T Holzhauser² und H Broll¹

¹ Bundesinstitut für Risikobewertung Berlin, Thielallee 88-02, 14195 Berlin

² Paul-Ehrlich-Institut, Abt. Allergologie 5/01, Paul-Ehrlich-Str. 51-59, 63225 Langen

³ Institut für Pflanzenernährung und Bodenkunde der FAL, Bundesallee 50, 38116 Braunschweig

*zu gleichen Teilen beitragend

Abstract

The present study investigates the influence of different types of cultivation of carrots-organic versus conventional - on the pattern and quantity of carrot allergens. Chemical crop protection and the use of fertiliser may influence the expression of allergenic proteins with homology to stress-inducible pathogenesis related proteins (PR-proteins). One example is the major carrot allergen Dau c 1 with sequence homology and clinical cross-reactivity to the major birch pollen allergen Bet v 1, and which belongs to the so-called “pathogenesis-related” PR10 protein family. Based on a market survey in the year 2004/2005 that summarises the most frequently grown carrot varieties in Germany, the varieties Nerac (F1-Hybrid, conventional) and Rodelika (open pollinating, organic) were identified as most important varieties in conventional and organic farming, respectively. In a field trial in North-Western Germany (Dithmarschen), both varieties were grown under organic and conventional conditions in a cross over¹ experiment. Additionally, carrot samples from local retailers were examined to receive data that reflect a realistic market situation.

Two different analytical approaches were followed: Simultaneously to the quantification of carrot allergens with novel developed quantitative immunological tests (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) the transcriptional level of genes coding for the most important carrot allergens were examined. Applications of the quantitative reverse transcriptase real-time polymerase chain reaction (qRT real-time PCR) were thus developed to enable quantification of the transcriptional level of the allergen coding genes in relation to a housekeeping gene (HKG) which is present in all carrot tissues and constitutively expressed. The results of the qRT real time PCR were compared to the immunological systems.

Keywords: Food Quality, Carrots, Organic Farming, conventional farming, food allergy

Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluß der Anbauweise - ökologisch oder konventionell - auf Allergenprofil- und -quantität in Möhren untersucht. Der Einfluß biotischer und abiotischer Faktoren, wie beispielsweise der Einsatz von Kunstdüngern und Pflanzenschutzmitteln oder klimatische Bedingungen, könnte zu einer veränderten Bildung sogenannter Stressproteine führen, welche eine strukturelle Homologie zu bekannten Pollenallergenen aufweisen. Verschiedene mit Pollenallergenen verwandte Proteine, beispielsweise Dau c 1 und Dau 'c 4, wurden als sogenannte kreuzreagierende Allergene in der Möhre identifiziert. Ersteres gehört der Familie PR10 der sogenannten „pathogenesis-related“ Proteinen an und weist eine hohe Sequenzhomologie und klinische Kreuzreaktivität zum Hauptallergen Bet v 1 in Birkenpollen auf. Basierend auf der Auswertung einer

¹ cross-over cultivation: Growing of different seed varieties with and without staining alternately on organically and conventionally farmed fields.

Marktrecherche zu den in den Jahren 2004 und 2005 am häufigsten angebauten Möhrensorten in Deutschland wurden die Sorten Nerac (F1-Hybrid, konventionell) und Rodelika (samenfest, ökologisch) als wichtige Sorten im konventionellen und ökologischen Landbau identifiziert. In einem Feldversuch im Landkreis Dithmarschen wurden beide Sorten beispielhaft für beide landwirtschaftliche Anbauweisen in einem *cross over*² Versuch angebaut. Zudem wurden Regalproben untersucht, um Aussagen über tatsächlich im Handel befindliche Waren zu erhalten. Parallel zur Bestimmung des Allergengehaltes mittels neu entwickelter quantitativer immunologischer Tests (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), wurde die Transkription der für die Hauptallergene der Möhre kodierenden Gene untersucht. Hierzu wurde ein qRT (quantitative reverse Transkriptase) *real time* PCR (Polymerasekettenreaktion) Verfahren entwickelt, das eine relative Quantifizierung der abgelesenen Allergen-kodierenden Gene im Verhältnis zu einem in allen Geweben der Möhre konstitutiv abgelesenen Gen (*Housekeeping* Gen, HKG) erlaubt. Die Ergebnisse der qRT*real time* PCR wurden mit den Ergebnissen der immunologischen Verfahren verglichen.

Schlüsselwörter: Nahrungsmittelallergie, Lebensmittelqualität, konventioneller Anbau, ökologischer Anbau, Möhren

1 Einleitung

Bislang existierten keine Daten über die potentielle Allergenität als Qualitätsparameter in Abhängigkeit von der landwirtschaftlichen Produktionsweise. In verschiedenen Publikationen wird beschrieben, dass aufgrund von Umwelteinflüssen bzw. Wachstumsbedingungen die Ausbildung von „Stressproteinen“ beobachtet wurde. Eine Gruppe solcher „Stressproteine“, die "pathogenesis related proteins" wird unter der Familie der PR-10 Proteine zusammengefaßt. Proteine dieser Familie zeigen ein hohes Maß an Sequenzidentität und strukturelle Homologie zum Hauptallergen der Birke, Bet v 1 (Neudecker et al., 2001). Untersuchungen belegen am Beispiel der Sojapflanze, dass unter "Stress" (Krankheit, Hungerzustand, Pestizidbehandlung, Insektenbefall) in der Pflanze eine verstärkte Expression u.a. von PR-10 Proteinen stattfindet (Crowell et al., 1992). Die klinische Relevanz dieser Proteine als Allergene wurde in einer kürzlich publizierten Studie belegt: 20 Birkenpollenallergiker, die nicht wesentlich auf Soja allergisch waren, zeigten schwere allergische Reaktionen nach Genuss eines Diätproduktes, das zu 50 % aus einem Sojaisolat mit einem hohen Gehalt an PR-10 Protein Gly m 4 (SAM 22) bestand (Kleine-Tebbe et al., 2002). Unter Birkenpollenallergikern zeigen 50-80% auch eine Lebensmittelallergie gegenüber Frischobst, Gemüse und Nüssen (Vieths et al., 2002). Grund für dieses Phänomen ist ebenfalls die strukturelle Homologie allergener Pollenproteine mit Proteinen pflanzlicher Herkunft in den Lebensmitteln. Sogenannte „Kreuzreaktionen“ zwischen ursprünglich gegen Pollenallergene gerichteten IgE-Antikörpern und mit Pollenallergenen strukturell verwandten Lebensmittelproteinen führen dann zur Auslösung der pollenassoziierten Lebensmittelallergie. Die Prävalenz der Nahrungsmittelallergie in der Bevölkerung wird auf 2-4 % geschätzt (zusammengefasst in Jäger und Wüthrich, 2002).

Inwiefern die Anbauweise unter Verwendung von Pflanzenschutzmitteln und dem Einsatz von Kunstdünger zu einer vermehrten Ausschüttung solcher "Stressproteine" und so zu möglichen Unterschieden in der Allergenität beiträgt, wurde im vorliegenden Projekt untersucht.

Als Untersuchungsmaterial wurden Möhren aufgrund ihres allergenen Potentials, ihrer einjährigen Wachstumsphase und der ökonomischen Bedeutung für beide Anbauweisen (zmp,

² *cross-over* Anbau: Anbau von verschiedenen Sorten mit und ohne Beizung wechselseitig auf konventionellen und ökologisch bewirtschafteten Flächen.

2004) ausgewählt. In einer Studie zur Prävalenz von Allergien in der Berliner Bevölkerung ist Möhre, entsprechend dem Sensibilisierungsprofil der Probanden, nach Apfel und Haselnuss das dritt wichtigste allergene Lebensmittel (Zuberbier et al., 2004).

Im Rahmen des Projektes wurden neue Methoden basierend auf immunologischen und molekularbiologischen Techniken zur Detektion der Hauptallergene der Möhre Dau c 1 mit den Isoformen³ Dau c 1.01 und Dau c 1.02 und für das profilinhomologe Möhrenprotein Dau c 4 entwickelt. Bei der Entwicklung der Nachweistechiken zur Bestimmung der Transkriptionslevel der Allergen-kodierenden Gene wurden sämtliche Systeme als splicing site überspannende Systeme entwickelt. Derartige Systeme können zwischen DNA und RNA unterscheiden, so dass eventuelle Verunreinigungen der RNA Extrakte durch genomische DNA nicht detektiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchungsmaterial

Das Untersuchungsmaterial bestand einerseits aus zufällig ausgewählten Möhren des Lebensmitteleinzelhandels (LEH), und wurde von einem Projekt aus dem Bundesprogramm Ökologischer Landbau (02OE170/F) in Form von Paaren (ökologisch und konventionell) zur Verfügung gestellt. Andererseits wurden in einem Feldversuch exemplarisch für den Verbraucher relevante Möhrensornten unter definierten Bedingungen (ökologisch und konventionell) angebaut.

Sorten- und Marktanteilen von Möhren

Die Recherche über Sorten- und Marktanteilen zu den in den Jahren 2004/05 am häufigsten in Deutschland angebauten Möhrensornten erfolgte mittels telefonischer Befragungen mit den in Tabelle 1 aufgelisteten Quellen. Da Gemüse in Deutschland nicht nach Sorten gehandelt wird, existiert hierzu kein veröffentlichtes statistisches Material z.B. des Bundessortenamtes oder des LEH.

Tabelle 1. Quellen für die Recherche.

Organisation	Organisation
Bundessortenamt Hannover	Bejo Saaten, Sonsbeck
Ministerium für Umwelt und Naturschutz Düsseldorf	Bingenheimer Saatgut AG, Echzell
Landwirtschaftskammer Hannover	Nickerson Zwaan, Breda, NL
Landwirtschaftskammer Rheinland	Hild Samen, Marbach
Zentrale Markt und Preisberichtsstelle GmbH, Bonn	Syngenta Seeds, Bad Salzuflen
Agri-Saaten GmbH, Bad Essen	Firma Chrestensen, Erfurt
Universität Kassel Witzenhausen	Firma Nebelung, Everswinkel
Hipp, Pfaffenhofen	Rijk-Zwaan, Welper
Kaisers-Tengelmann, Mülheim	Seminis-Vegatable Seeds, Neustadt
Datenbank organicXseeds FiBL, Frankfurt	Juliwa-Enza, Dannstadt-Schauernheim
Dienstleistungszentrum ländlicher Raum (DLR), Rheinhesen	Gemüsebauberatungsring Dithmarschen
Arbeitskreis Betriebswirtschaft im Gartenbau, Hannover	Bioland, Mainz
	Naturland Nord-West, Lippetal

³ Isoform - bezeichnet Ähnlichkeit von Molekülen, die dieselbe Molekülgröße, identische biologische Funktionen und eine Aminosäurehomologie von > 67 % aufweisen

Charakteristika Feldversuch 2005

Im Jahr 2005 wurde ein Anbauversuch im Landkreis Dithmarschen durchgeführt. Der Anbau erfolgte an einem Standort in Hedwigenkoog (Schleswig-Holstein). Auf benachbarten Betrieben wurden im Dammanbau unter gleichen kleinklimatischen Bedingungen und räumlicher Nähe der Betriebe zwei verschiedene Möhrensorten in vierfacher Wiederholung angebaut (Abb. 1).

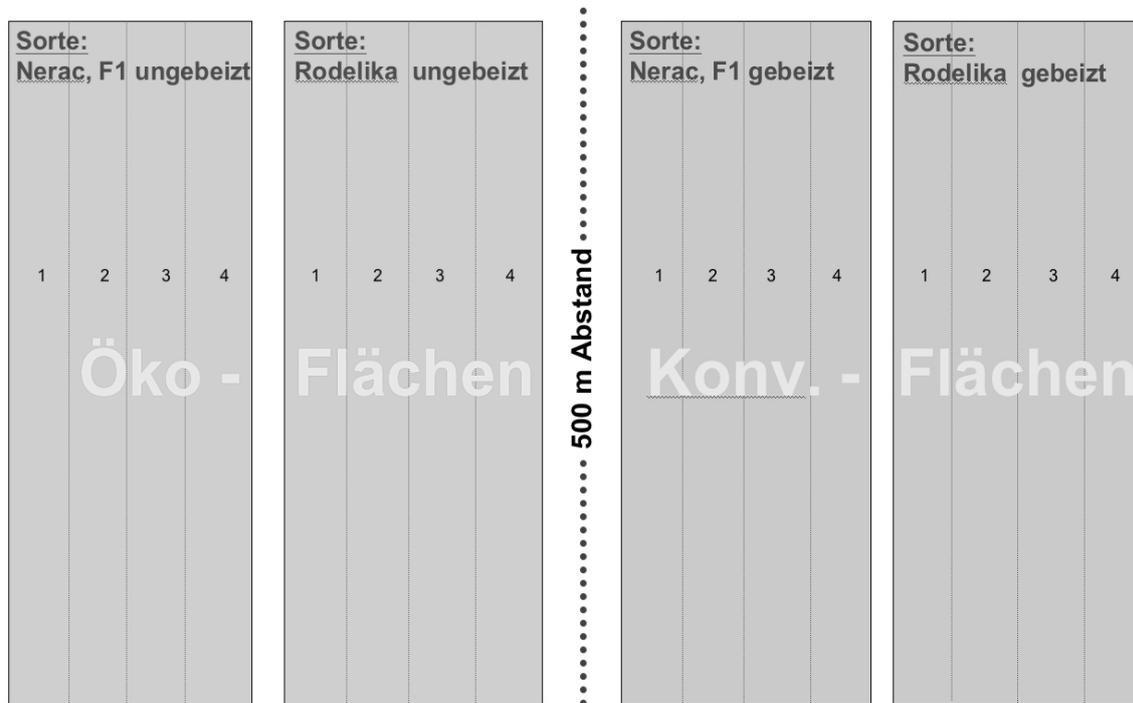


Abb. 1: Anbauversuchskonzept im Streifenversuch. Die Aussaat und Bearbeitung erfolgte im Dammanbau mit einer Parzellengröße von 60 m² und einer Aussaat in vier Wiederholungen.

Eine Fläche wurde gemäß den Vorgaben der Verordnung (EWG) Nr. 2092/91 (EG-Öko-VO) und den Richtlinien des Bioland-Anbauverbandes bewirtschaftet. Die zweite Fläche wurde konventionell bewirtschaftet. Für beide Sorten wurde Präzisionssaatgut der Sorten Nerac (F1-Hybrid; Firma Bejo, Sonsbeck) und Rodelika (samenfest; Firma Bingenheimer Saatgut AG, Echzell-Bingenheim), jeweils gebeizt auf konventionellen Flächen und ungebeizt auf ökologischen Flächen, eingesetzt. Zur Beizung des Saatguts der konventionellen Flächen wurden die Fungizide Thiram, Iprodione und Metalxyl eingesetzt. Als Maßnahmen zur Pflanzenernährung und Gesundheit wurden über die gesamte Wachstumsperiode von 143 Tagen 10 verschiedene Pestizide und 6 verschiedene Dünger ausgebracht.

Die biologische Diversität wurde anhand einzelner Möhren im Vergleich zu Mischproben untersucht. Es erfolgte keine Beprobung aus dem Randbereich. Da im Anbaujahr 2005 kein Befall mit Pathogenen zu verzeichnen war konnte auf die separate Beprobung gesunder versus kranker Möhren verzichtet werden.

Behandlung des Ernteguts

In jeder Parzelle wurden 1x Einzelproben (jeweils 10 Stück) und innerhalb jeder Wiederholung (4x) Mischproben (je 20 Stück) geerntet, woraus eine Gesamtprobenzahl von n=360 resultiert. Die Untersuchungen der Allergengehalte mittels immunochemischer Verfahren und der „Transkription der Allergene“ (Boten RNA, mRNA) erfolgten aus

identischem Probenmaterial. Um den Protein- und mRNA Status der Möhren nicht zu verändern, wurde das zerkleinerte Möhrenmaterial vor der weiteren Verarbeitung sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung dampfdicht (-80°C) gelagert. Zur Extraktion der Proteine und der RNA wurde das Untersuchungsgut vorab homogen vermahlen. Markt- und Handelsproben wurden identisch behandelt.

2.2 Methoden

RNA-Extraktion und cDNA Herstellung

Die RNA Extraktion und Aufreinigung erfolgte mit handelsüblichen Fertigreagenzien. Ein zusätzlicher DNase Verdau wurde bei allen Extraktionen durchgeführt. Die eingesetzte RNA wurde in der PCR auf die Anwesenheit von DNA überprüft - alle verwendeten Extrakte waren DNA frei. Im Anschluss wurde die extrahierte mRNA mittels Reverser Transkriptase in stabile cDNA umgeschrieben.

Auswahl Primer und Sondensysteme

Obwohl alle RNA Extrakte bis zur völligen DNA Freiheit aufgereinigt wurden, wurden Primer entwickelt, die keine genomische DNA amplifizieren. Hierzu erfolgte die Positionierung der Primer an Exon-Intron Übergängen. Zielgene waren das Hauptallergen Dau c 1 mit den Isoformen Dau c 1.01 und Dau c 1.02 und sechs verschiedene Housekeeping Gene als Referenzsystem. Für diese Sequenzen wurden neue Nachweissysteme entwickelt und optimiert.

qRT real time PCR

Die qRT real time PCR wurde nach dem TaqMan Prinzip unter Verwendung des ABI Prism 7900 Sequence Detection System (ABI 7900 SDS) nach einem Standard two-step PCR Profil unter Berücksichtigung der optimierten Primer Annealingtemperaturen durchgeführt. Die 20 µl Reaktionsansätze erfolgten mit einem kommerziellen Fertigmastermix. Die eingesetzte Menge an cDNA betrug 2 µl. Von allen Proben wurden drei unabhängige Extraktionen durchgeführt und diese jeweils als Dreifachbestimmungen in die PCR eingesetzt. Für die weitere Auswertung wurde aus den 3 Einzelwerten einer Extraktion der Mittelwert errechnet.

Protein- Extraktion

Die Proteinextraktion erfolgte nach Probenhomogenisierung unter Stickstoff mit physiologischem Kochsalzpuffer. Die extrahierten Proben wurden im Anschluss (mit Zwischenlagerung bei -80°C) im ELISA vermessen, wobei jeweils 100 µl der Extrakte in Triplets und Reihenverdünnung untersucht wurden.

Nährstoffgehalte der Pflanzen

Für die Bestimmung der Mineralstoffversorgung der Möhren erfolgte eine separate Beprobung, sowohl der Kraut- nach Reihenschluss, als auch der Möhrenproben. Bei den geernteten Möhren wurde die Trockenmasse bestimmt und die Möhren danach schockgefroren. Die Bestimmung der Mikro- und Makronährstoffgehalte wurde mittels trockenem Aufschluss nach Schnug und Haneklaus (1996) und anschließender Bestimmung von Fe, Mn, Zn, Cu und B mittels ICP-OES, P colorimetrisch, Ca und Mg mittels AAS und K und Na flammenfotometrisch durchgeführt. Die Bestimmung des Stickstoffs erfolgte nach Kjeldahl (DIN 38409 H11 (EN 25663)).

3 Ergebnisse

3.1 Sortenrecherche

Die wichtigsten in Deutschland angebauten Möhrensorten wurden über die Auswertung der Befragungen (s. Tabelle 1) identifiziert und sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Die

Ergebnisse resultieren aus der Häufigkeit der Sorten im Saatgutverkauf. Im konventionellen Landbau hat die Sorte Nerac bei den späten Lager- und Waschmöhren die größte Bedeutung. Gefolgt von den Sorten Bolero und Maestro bei den mittelfrühen Möhren.

Tab. 4: Übersicht der häufigsten in Deutschland angebauten Möhrensorten und geschätzte Marktanteile (persönliche Mitteilungen).

Aussaatzeitpunkt / Sortenname	Gesamtmarktanteil (geschätzt)	Hersteller
<u>Früh</u>		
Napoli F1	k. A.	Bejo, Sonsbeck
Laguna F1	k. A.	Hild Samen, Marbach
<u>Mittel</u>		
Maestro F1 und Bolero F1	30 %	Bejo, Sonsbeck, Nickerson-Zwaan, Edemissen
<u>Spät</u>		
Nerac F1 (als Wasch- und Lagermöhre)	75 - 80 %	Bejo, Sonsbeck

F1 bezeichnet Hybridsaatgut. k. A. keine Angabe.

3.2 Ernährungszustand der Pflanzen

Die Versorgung mit sämtlichen Haupt- und Spurenelementen war für die Realisierung standorttypischer Höchstserträge ausreichend. Ertragsunterschiede waren somit nicht ernährungsbedingt. Der erzielte Gesamtertrag betrug ca. 45 t/ha für jede Parzelle und lag damit im Durchschnitt für diese Anbauflächen.

3.3 ELISA

Auf immunologischer Ebene wurden unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern und Kaninchenserum Enzymimmunoassays (ELISA) entwickelt und „in-house“ validiert. Für die Quantifizierung des Möhrenhauptallergens Dau c 1 wurden zwei Sandwich-ELISA entwickelt, die auch die Isoformen (Dau c 1.01 und Dau c 1.02) separat erfassen. Für den Nachweis von Dau c 4 wurde ein kompetitiver ELISA entwickelt. Zum Prinzip der verschiedenen ELISA Ansätze sei auf weiterführende Literatur verwiesen (Law, 1996). Für die beiden Sandwich-ELISA wurde jeweils ein Allergenisoform (Dau c 1.01, Dau c 1.02) spezifischer monoklonaler Antikörper als Fänger und ein polyklonales Kaninchenserum mit Spezifität für beide Isoformen als Detektor eingesetzt. Für den Dau c 4 spezifischen ELISA konnte ein ausreichend spezifisches polyklonales Antiserum vom Kaninchen identifiziert werden, so daß sich hierfür das Prinzip des kompetitiven ELISA anbot. Alle ELISA wurden jeweils mit rekombinant hergestelltem Allergen standardisiert. Zudem wurde die Vergleichbarkeit mittels eines in jedem Lauf mitgeführten Referenzextraktes aus Möhre gewährleistet.

Die einzelnen ELISA waren hoch spezifisch für das jeweilige Zielprotein und zeigten keine Reaktionen mit den übrigen bekannten Möhrenallergenen sowie auf kreuz-reagierende Kohlenhydrat-determinanten. Die entwickelten zweiseitigen (Sandwich-) ELISA besaßen eine ausreichende Sensitivität zur Quantifizierung der natürlich vorkommenden Allergene in Proteinextrakten aus Möhren.

3.4 qRT real time PCR

Parallel zu den immunologischen Untersuchungen wurde auf mRNA Ebene untersucht, ob eine erhöhte Transkriptionsaktivität der allergencodierenden Gene nachweisbar ist. Hierzu wurden basierend auf dem Prinzip der qRT real time PCR Systeme für die Allergenisoformen Dau c 1.01 und Dau c 1.02 entwickelt, die in der Lage sind, spezifisch die für die Möhren-Hauptallergene kodierenden Gene zu erfassen (Publikation in Vorbereitung). Der Nachweis

erfolgt über die Zu- bzw. Abnahme von mRNA als Maß für die Transkriptionsaktivität der Zielgene in den Möhren. Zu diesem Zweck wurden insgesamt 13 verschiedene qRT real time PCR Nachweissysteme auf ihre Eignung überprüft. Bei den beiden aus diesen Untersuchungen hervorgegangenen Systemen lagen die errechneten Effizienzen sehr nahe am Idealwert, was ein Ausdruck für die hohe Qualität dieser Systeme ist.

Bei der verwendeten Methode zur Ermittlung der relativen Expressionsraten nach Livak und Schmittgen (2001) wird zur Bestimmung der Transkriptionslevel der allergenkodierenden Gene immer eine sogenannte endogene Kontrolle zur Normalisierung der Werte benötigt.

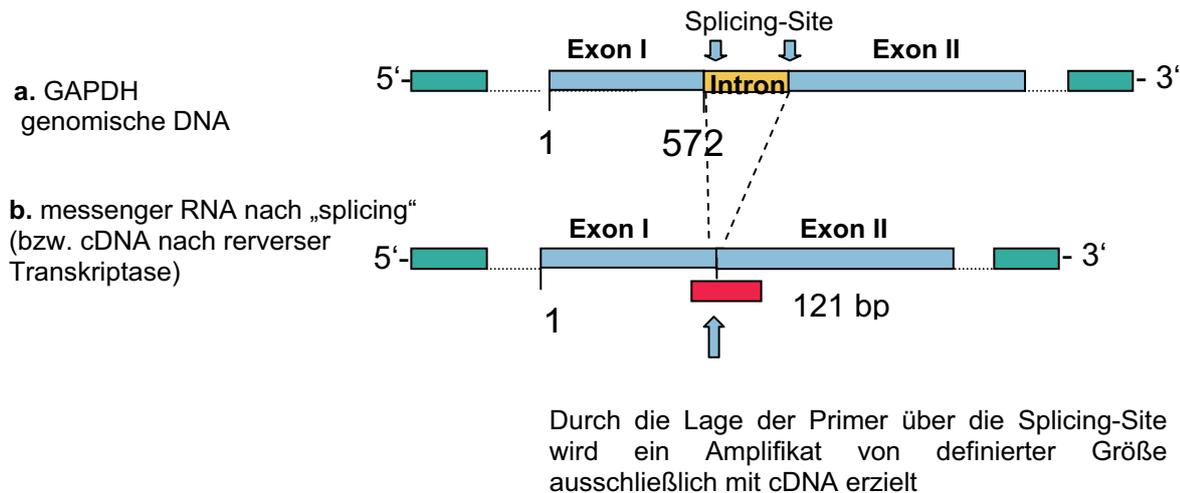


Abbildung 3: Diskriminierung genomischer DNA von cDNA durch Lage der Primer über eine Splicing-Site. Bei der genomischen DNA erfolgt keine Primerbindung im Bereich des Introns (a). Durch die Positionierung des *forward* Primers über die *splicing site* kann eine Vervielfältigung in der PCR nur bei der umgeschriebenen messenger RNA (cDNA) erfolgen (b).

Als endogene Kontrollen eignen sich z.B. Housekeeping Gene ideal, da sie in allen Geweben konstitutiv abgelesen werden. Als Kriterium für deren Auswahl wurde eine möglichst beständige Transkription in verschiedenen Möhrengeweben und die PCR Effizienz definiert. Die qRT real time PCR Systeme für die Gene für das Enzym GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-dehydrogenase) und das ribosomale Protein S15a zeigten sehr gute Effizienzen. Da beim GAPDH Gen, im Gegensatz zum ribosomalen Protein S15a, die Möglichkeit bestand, ein splicing site überspannendes Primer-System zu entwickeln, wurde GAPDH als Housekeeping Gen ausgewählt. Die Möglichkeit der Diskriminierung zwischen DNA und mRNA zeigt exemplarisch die Abbildung 3. Für alle anderen Systeme wurde nach dem gleichen Prinzip verfahren.

Tabelle 4: Vorhandene Systeme für den Allergennachweis in Möhren.

Protein	System
○ Dau c 1.01 + Dau c 1.02 (Bet v 1 homologe Allergene)	○ ELISA ○ RT-PCR
○ Dau c 4 (Profilin-homologes Allergen)	○ ELISA
○ GAPDH (Housekeeping-Gen)	○ ELISA ○ RT-PCR

Nach Abschluss der Optimierungs- und Validierungsarbeiten stehen für die Möhrenhauptallergene Dau c 1.01 und Dau c 1.02 und das Profilanaloge Dau c 4 jeweils ein validiertes Nachweissystem auf immunologischer bzw. nukleinsäure- Ebene zur Verfügung.

3.5 Analytik der Ernteproben - 2005

Mit der vorläufigen Auswertung der Analytik der Feldproben liegen erstmals Ergebnisse über den Gehalt der Möhrenallergene Dau c 1.01, Dau c 1.02 und Dau c 4 durch unterschiedliche methodische Ansätze aber an identischem Untersuchungsmaterial vor.

Nach den ersten Auswertungen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Anbauarten beobachtet werden. Allerdings wurden Unterschiede zwischen den beiden Sorten - Rodelika und Nerac - für die Allergenisiformen Dau c 1.01 und Dau c 1.02 deutlich. Jedoch handelt es sich hierbei um die ersten orientierenden Ergebnisse aus der Anbauperiode 2005. Zu deren Absicherung erfolgt für das Jahr 2006 ein Wiederholungsversuch. Nach Auswertung und Vergleich der unterschiedlichen beobachteten Allergengehalte aus beiden Jahren, erfolgt die Bewertung des allergenen Potentials mit besonderem Blick auf die praktische Relevanz für den allergischen Konsumenten.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel des Projektes war es, eine valide Aussage über mögliche Unterschiede in der Allergenität von Möhren aus ökologischem und konventionellem Anbau zu treffen. Als Probenmaterial wurden Möhren in marktfähiger Qualität und in einem Anbauversuch untersucht. Innerhalb dieses Feldversuchs wurden zwei verschiedene Möhrensorten unter konventioneller und ökologischer Wirtschaftsweise angebaut. Die Aussaat erfolgte in Hedwigenkoog (Mai 2005) unter Leitung des Gemüsebauberatungsringes Dithmarschen. Krautproben zur Untersuchung des Ernährungsstatus wurden durch die FAL (August 2005) entnommen. Die Ernte der Möhren erfolgte im Oktober 2005 in Dithmarschen.

Für die Analytik wurden insgesamt sechs verschiedene Nachweissysteme auf immunologischer und molekularbiologischer Ebene entwickelt. Für den Nachweis der Isoformen Dau c 1.01 und Dau c 1.02 des Möhrenhauptallergens Dau c 1 wurden jeweils qRT real time PCR Systeme entwickelt und validiert. Bei allen entwickelten Nachweissystemen handelt es sich um Splicing Site überspannende Systeme. In diesem Zusammenhang wurde die in der Familie der Apiaceae vermutete Splicing-Site im Codon 62 für Möhren erstmalig sequenziert und bestätigt. Für die zur relativen Quantifizierung benötigten „Housekeeping“ Gene (HKG) wurde nach einer umfassenden Studie mit verschiedenen Möhrengeweben GAPDH als geeignetes Gen ermittelt und ein entsprechendes qRT real time PCR entwickelt und validiert.

Mittels Immunoblot wurde sowohl die qualitative Eignung der Extraktionsmethode zum Nachweis von Möhrenallergenen bestätigt, als auch mittels spezifischer monoklonaler Antikörper und Tierseren die Isoformen Dau c 1.01 und Dau c 1.02 nachgewiesen. Der spezifische Nachweis und die Quantifizierung der einzelnen Allergenisiformen aus Möhre erfolgte im ELISA gegenüber rekombinanten Referenzallergenen. Die zum Nachweis von Dau c 1.01 und Dau c 1.02 entwickelten zweiseitigen (Sandwich-) ELISA sowie der kompetitive ELISA zum Nachweis des Allergens Dau c 4 wiesen eine ausreichende Sensitivität zur Quantifizierung der natürlich vorkommenden Allergene in Proteinextrakten aus Möhren auf. Alle drei ELISA waren spezifisch für das jeweilige Allergen.

Mit der Auswertung des Feldversuchs von 2005 liegen nun erste Ergebnisse für den Gehalt der Möhrenallergene Dau c 1.01, Dau c 1.02 und Dau c 4 in eindeutig beschriebenem und identisch behandeltem Probenmaterial vor. Diese gaben Hinweise darauf, dass möglicherweise nicht die Art des Anbaus sondern die Wahl der Sorte einen Einfluss auf die

Allergenzusammensetzung und Quantität besitzt. Ein zweiter Anbauversuch wird im Herbst 2006 ausgewertet und dient der Absicherung der statistischen Daten aus dem ersten Anbauversuch. Parallel finden Untersuchungen zur physiologischen Relevanz der Allergengehalte in Möhren anhand eines am PEI entwickelten in vitro Zellkultursystem statt, deren Ergebnisse zum Projektende vorliegen werden.

5 Literatur

- Crowell, D.N., John, M.E., Russel, D., Amasino, R.M. (1992). Characterization of a stress-induced, developmentally regulated gene family from soybean. *Plant Mol. Biol.* 18:459-466.
- Jäger, L., Wüthrich, B. (Hrsg.) (2002). *Nahrungsmittelallergien und -intoleranzen*. 2. überarbeitete Auflage, Urban & Fischer Verlag München, Jena.
- Kleine-Tebbe, J., Vogel, L., Crowell, DN, Haustein, UF, Vieths, S. (2002). Severe oral allergy syndrome and anaphylactic reactions caused by a Bet v 1- related PR-10 protein in soybean, *SAM22J Allergy Clin Immunol* 110: 797-804.
- Law BE (Hrsg) (1996) *Immunoassay: A practical guide*. Taylor & Francis Ltd, Bristol.
- Livak, K., J., Schmittgen, T.,D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25, 402-408.
- Neudecker, P, Schweimer, K., Nerkamp, J., Scheurer, S., Vieths, S. Sticht, H., Rösch, P. (2001). Solution structure of the major cherry allergen Pru av 1Allergic Cross-reactivity made visible. *J Biol Chem* 276: 22756 – 22763.
- Schnug, E. and Haneklaus, S. (1996). Parameters influencing the calcination of plant materials in muffle furnaces and their importance for micronutrient analysis. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 27, 993-1000, 1996.
- Vieths S., Scheurer S., Ballmer-Weber B. (2002) Current understanding of crossreactivity of food allergens and pollen. *Ann N Y Acad Sci.* 964:47-68.
- Zmp (2004). Verkaufspreise im ökologischen Landbau. *Ökomarkt Jahrbuch 2004*. ZMP Zentrale Markt- und Preisberichtsstelle für Erzeugnisse der Land-, Forst-, und Ernährungswirtschaft GmbH, Rochusstrasse 2, 53123 Bonn (info@zmp.de).
- Zuberbier T., Edenharter G., Worm M., Ehlers I., Reimann S., Hantke T., Roehr C.C., Bergmann K.E., Niggemann B. (2004). Prevalence of adverse reactions to food in Germany - a population study. *Allergy*: 59: 338-345.

Danksagung

Dieses Projekt wurde mit Mitteln des Bundesprogramms Ökologische Landwirtschaft (BÖL) unter der Projektnummer 03OE249 finanziert.

