

Allergenfri æbler

Mange mennesker, der er allergiske over for birkepollen, er også allergiske over for æbler. Det skyldes ligheder mellem et protein i æbler og det allergene protein i birkepollen. Ved hjælp af genteknologi er det muligt at nedregulere det gen, som koder for allergenet i æbler, så allergikere kan spise dem



Af Britta N. Krath, Afdeling for Toksikologi og Risikovurdering, Danmarks Fødevareforskning

Ifølge The European Federation of Allergy and Airways Diseases Patients' Association lider omkring 4% voksne og 8% børn i EU af fødevareallergi. Kløe og opsvulmning af læber, tunge og svælg er blandt de ubehagelige symptomer på fødevareallergi, og derfor undgår mange allergikere frugt og grønt i deres kost. Set fra en ernæringsmæssig vinkel er det uheldigt, fordi frugt og grønt indeholder mange vigtige næringsstoffer. Derfor er det interessant at udvikle nye sorter af frugt og grønt, som allergikere kan tåle. Danmarks Fødevareforskning (DFVF) og Danmarks JordbrugsForskning (DJF) samarbejder med hollandske forskere om udvikling af allergenfri æbler som led i et nyt stort EU-projekt, ISAFRUIT (se www.isafruit.org).

Allergener i birkepollen og æbler

For de fleste er fødevareallergien begyndt som pollenallergi. Omkring 70% af patienter med birkepollenallergi er også allergiske over for æbler. Det skyldes, at æbler indeholder et protein ved navn Mal d 1, som ligner allergenet Bet v 1 fra birkepollen. Aminosyresekvenserne i Mal d 1- og Bet v 1-proteinerne er 64.5% identiske, og DNA-sekvensen af de gener, der koder for de to proteiner, er 55.6% identiske (1). Ved udvikling af allergi mod birkepollen har kroppen dannet antistoffer (ImmunoglobulinE (IgE)) mod Bet v 1. Disse antistoffer kan også reagere med Mal d 1 med allergireaktion til følge (2,3). Andre frugter såsom pærer, kirsebær og ferskner, ja endda også hasselnødder og gulerødder kan give den samme krydsreaktion (4).

Æblesorter som Golden Delicious, Granny Smith og Cox Orange har et højt indhold af Mal d 1 og er derfor meget allergene. Sorter som Gloster og Belle de Boskoop har et lavt indhold, og indholdet i Elstar ligger omkring middel (5). Opbevaring af æbler ved 4°C øger mængden af Mal d 1-proteinet. Mal d 1 er meget ustabil og går i stykker under tilberedning med varme.

Mal d 1-proteinet

Mal d 1 og Bet v 1 tilhører en gruppe proteiner, som bl.a. spiller en rolle i planters forsvar mod svampe. De kaldes PR-proteiner (pathogenesis-related) og Mal d 1 og Bet v 1 hører til en familie af PR-proteiner, som betegnes PR10-familien (6). Der findes PR10-proteiner i alle planter. Ekspression af de gener, der koder for dem, induceres af stress, f. eks. når planten bliver angrebet af patogene svampe, og generne er også aktive under frugtmodning.

Mal d 1 er et 17-18 kDa-protein på 158-159 aminosyrer. Der er klonet Mal d 1-gener fra blade og frugter fra flere forskellige æblesorter, og indtil nu har man fundet over 30 isoformer af Mal d 1-genet (7). Der er altså flere isoformer af Mal d 1-proteinet i

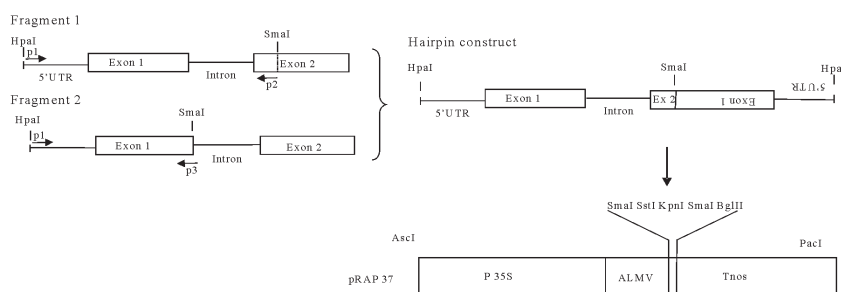
hver æblesort. Den isoform af Mal d 1 vi har udvalgt til gennedregulering kaldes Mal d 1.02.

Nedregulering af et Mal d 1-gen i æblesorten Elstar

DFVF i Mørkhøj og DJF i Årsløv har indgået et samarbejde med en gruppe forskere ved Wageningen Universitet, Plant Research International i Holland for at udvikle allergenfri æbler.

Forskergruppen i Holland har konstrueret et nedreguleringsgen og transformeret det ind i den meget populære æblesort Elstar (3). Det indsatte gen består af et stykke af Mal d 1-genet efterfulgt af en intron og et stykke Mal d 1-sekvens i modsat orientering ift. det første stykke (figur 1). Den fulde beskrivelse af hvordan Mal d 1-genet er nedreguleret i æble er beskrevet i [3].

Nedreguleringsteknikken betegnes RNA interference eller RNAi, og den virker ved, at plantens forsvarssystem mod »fremmedstoffer«, f.eks. virus, aktiveres og »oplæses« til at nedbryde RNA med en specifik sekvens – i dette tilfælde mRNA fra Mal d 1-genet.



Figur 1. Nedreguleringsgenets opbygning. Det første stykke, Fragment 1 (516 b), med HpaI site i 5'enden og SmaI i 3'enden, indeholder 5'-utranslateret ende, exon 1 og et lille stykke af exon 2. Fragment 2 (276 b) med HpaI i 5'enden og SmaI i 3'enden, indeholder 5'-utranslateret ende og exon 1. De 2 fragmenter er ligeret sammen og klonet ind i pRAP 37-ekspressionsvektor.

Transformation og opformering

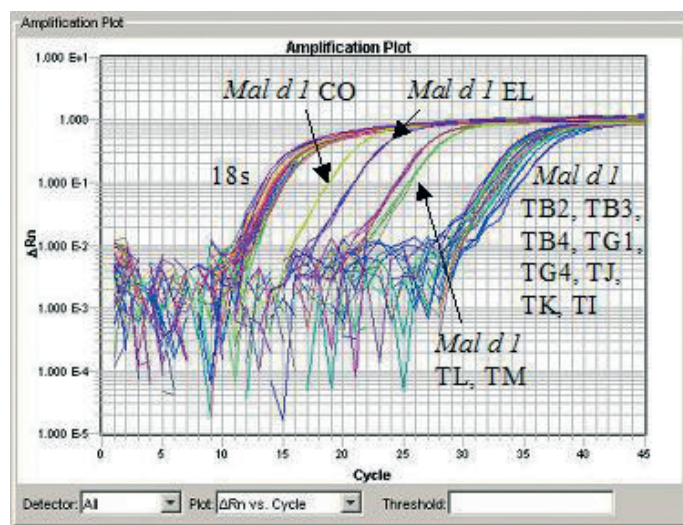
Når der indsættes et gen i en plante, afhænger genets aktivitet bl.a. af hvor i plantens genom, genet bliver placeret. Med den nuværende teknologi er det ikke muligt på forhånd at bestemme, hvor et gen skal sættes ind. Derfor undersøges flere uafhængige indsættelsesbegivenheder, altså transformerede planter, som er regenereret fra forskellige celler, der har fået sat genet ind. Transformanterne kan formeres vegetativt (stiklinger eller podning), og planter, som stammer fra den samme transformant, kaldes en linje. Da de er vegetativt formeret er de genetisk ens, og det indsatte gen sidder samme sted hos alle planter fra samme linje.

De små transgene planter blev testet i Holland vha. PCR, for at bekræfte, at det indsatte gen stadig var i planten efter opformering. Enkelte linjer, der var positive i PCR-testen, blev yderli-

gere analyseret i priktest på patienter med æble-allergi, for at få bekræftet at de ikke gav anledning til reaktion. Herefter blev 10 linjer udvalgt og sendt til DFVF i Mørkhøj til yderligere test og udvikling.

Analyse af transgene æblelinjer

Vi ønskede at undersøge, hvor effektiv nedreguleringen af *Mal d 1*-genet egentlig var. Det kan gøres vha. en teknik kaldet Kvantitativ Real-time PCR. Mængden af *Mal d 1* mRNA måles ift. mRNA af et »husholdningsgen«, som udtrykkes stabilt. Vi sammenlignede mængden af mRNA fra *Mal d 1*-genet med mængden af 18s ribosomalt RNA. Som positiv kontrol valgte vi frugtkød fra Cox Orange og Elstar. Figur 2 viser mængden af mRNA af 18s og *Mal d 1* mRNA. Jo senere kurven rejser sig – des mindre mRNA er der i cellerne. Disse foreløbige data viser, at *Mal d 1*-genet fra blade er effektivt nedreguleret i flertallet af de transgene linjer (8).



Figur 2. Otte af de 10 æblelinjer er meget nedregulerede i *Mal d 1* mRNA, de sidste to linjer (TL og TM) er mindre nedregulerede. Det ses, at 18s mRNA fra alle æblelinjer er næsten ens. Dette er også forventet.

I begyndelsen af marts 2006 blev 11 planter fra hver transgen æblelinje sendt til DJFs Forskningscenter i Årsløv, hvor de 10 fra hver linje er blevet podet sammen med en vildtype-stamme under ledelse af forsker Bjarne Pedersen. Sammenvoksningen i podestedet synes at lykkes, for både de transgene- og vildtype-toppe satte fine nye blade (figur 3).

Sidst i juni plukkede vi friske blade fra alle transgene toppe og testede nedreguleringen. Resultatet var det samme som vist i figur 2. I august blev den transgene rod og vildtype-top klippet væk, så vi fik vildtype-rod med transgen top. Grunden til at dette trin er nødvendigt er, at det fremskynder processen for frugtdannelse. Derfor forventer vi, at vi allerede i 2007 kan høste allergenfri æbler. Vi håber, at æbleplanterne fortsat vil vokse godt, og at *Mal d 1*-genet også vil være nedreguleret effektivt i frugterne. I det videre arbejde følger vi nedreguleringen af *Mal d 1*-genet i blade og senere selvfølgelig i frugterne. Desuden vil frugterne blive testet på forskellige vis blandt grupper af frugtallergikere i Holland og Belgien for at fastslå, at de ikke udløser allergi, og at sikkerheden er i orden.

Der findes flere allergener i æbler, bl.a. en der kaldes Mal d 4. Denne tilhører en anden familie af allergener kaldet profilin. Igen er det en krydsreaktion fra en birkepollen-allergen (Bet v 2) der giver allergien over for æbler. I andre dele af projektet arbejdes der med at lave transgene Mal d 4-frie æblelinjer.

Projekterne er en del af et stort EU-projekt, kaldet ISAFRUIT, som fokuserer på alle aspekter af frugt fra dens start som frø



Figur 3. De podede æbleplanter i drivhuset i Årsløv.

lige til forbrugeren tager en bid af det friske slutprodukt. Sloganet er »sund frugt for et sundt Europa«, og formålet er at øge frugtindtaget i Europa, bl.a. gennem fjernelse af barrierer som allergi. Projektet er overordnet ledet af forskningschef Ole Callesen, DJF, og forskningen i sundhedseffekter af frugt er ledet af professor Lars Ove Dragsted, DFVF. Mere information kan læses på www.isafruit.org

E-mail-adresse

Britta N. Krath: brxk@dfvf.dk

Referencer:

1. Vanek-Kreibitz M, Hoffmann-Sommergruber K, Laimer Da Camara Machado M, Susani M, Ebner C, Kraft D, Scheiner O and 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. *Biochem Biophys Res Commun* 214: 538-551.
2. Son DY, Scheurer S, Hoffmann A, Haustein D and Vieths S (1999) Pollen-related food allergy: cloning and immunological analysis of isoforms and mutants of *Mal d a*, the major apple allergen, and Bet v 1, the major birch pollen allergen. *Eur J Nutr* 38: 201-215.
3. Gilissen LJWJ, Bolhaar STHP, Matos CI, Rouwendal GJA, Boone MJ, Krens FA, Zuidmeer L, Van Leeuwen A, Akkerdaas J, Hoffmann-Sommergruber K, Knulst AC, Bosch D, van de Weg WE and van Ree R (2005) Silencing the major apple allergen *Mal d 1* by using the RNA interference approach. *J Allergy Clin Immunol* 115: 364-369.
4. Vieths S, Scheurer S and Ballmer-Weber B (2002) Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. *Ann N. Y. Acad Sci* 964: 47-68.
5. Gao SZ, Van de Weg WE, Matos C, van der Meer IM, Li YH, Bolhaar STHP, Knulst AC, Zuidmeer L, van Ree R, Hoffmann-Sommergruber K and Gilissen LJWJ (2005) Allelic constitution of *Mal d 1* genes on linkage group 16 is related to the differences in allergenicity among apple cultivars. In: Gao, S.Z. ed. *Localization of candidate allergen genes on the apple (Malus domestica) genome and their putative allergenicity*. Wageningen University and Research Centre, Wageningen.
6. Hoffmann-Sommergruber K (2000) Plants allergens and pathogenesis-related proteins. What do they have in common? *Int Arch Allergy Immunol* 122: 155-166.
7. Gao ZS, van de Weg E, Schaart JG, Schouten HJ, Tran DH, Kodde LP, van der Meer IM, van der Geest AHM, Kodde J, Breiteneder H, Hoffmann-Sommergruber K, Bosch D and Gilissen LJWJ (2005) Genomic cloning and linkage mapping of the *Mal d 1* (*PR10*) gene family in apple (*Malus domestica*). *Theor Appl Genet* 111: 171-183.
8. Gilissen LJWJ, Krath BN, Smulders MJM, Eriksen FD, Dragsted LO and Van de Weg WE. Silencing of the major apple allergen *Mal d 1*. Poster presentation, LMC International Food Congress 2006: Nutrigenomics and Health – from Vision to Food.